

脳虚血時の脳内グルタミン酸 再吸収機構に関する研究

平成10年度厚生科学研究費補助金
(厚生科学特別研究事業)

平成11年3月

主任研究者 浅井 聡

目次

I. 総括研究報告書	浅井 聡	1
II. 分担研究報告書	趙 恒	15
III. 論文発表		19
IV. 学会発表		71
V. 参考論文		73
VI. 謝 辞		101

I. 総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）

総括研究報告書

脳虚血時の脳内グルタミン酸再吸収機構に関する研究（10010102）

主任研究者 浅井 聡 日本大学・医学部・講師

【研究要旨】

脳血管性疾患のなかで大部分をしめる脳卒中は、発症直後数時間の脳温の違いによりその予後が著しく変化することが知られている。したがって、発症直後からの脳温と脳障害との関連を研究することは、脳卒中発症後の後遺症軽減をすすめるうえでも有意義な研究であると考えられている。

虚血性神経細胞死が虚血中の温度に依存し、数度の脳温低下が、虚血性障害を劇的に減少させることが知られている。以前の研究結果から、明らかな温度依存性があるのは、虚血中の細胞外へのグルタミン酸濃度の放出量の減少であったことから、その減少は脳温低下による細胞保護効果の有力なメカニズムの一つであると考えられている。近年我々は、微小透析電極とフェロセンを用いた、酸素非依存性グルタミン酸のリアルタイム測定系を開発し、ラットを使った虚血再灌流実験系で、虚血中に起こる二相性のグルタミン酸放出機構と再灌流後に起こるグルタミン酸再吸収機能を区別して評価することを可能にし、より詳細な細胞外グルタミン酸動態の解析が可能になった。その結果、以前から言われていた脳温上昇による虚血中のグルタミン酸放出の増加は、脳温の上昇によって、グルタミン酸の放出が増えるのではなく、虚血再灌流後のグルタミン酸の取り込み機構が障害され、その結果としてグルタミン酸の上昇が遷延する可能性を示唆した。また、虚血中の脳温が39℃に上昇すると、約10分ほどのごく短時間の脳虚血が起こっても、再灌流時のグルタミン酸再吸収機構が傷害され、約2時間後には重度な神経障害が認められることが確認された。同時に、グルタミン酸再吸収機構を活性化させる薬物は、組織傷害も軽減したことから、グルタミン酸再吸収機構は、脳虚血再灌流障害に密接に関わっており、グルタミン酸再吸収を促進する薬物の脳虚血性疾患治療薬として可能性が示唆された。

本研究により、超急性期の初期治療の重要性が再確認され、厚生行政でなしえてきた虚血性心疾患の発症数時間の超急性期集中治療法の確立過程を踏まえ、脳卒中治療においても、ブレインアタック (brain attack) やストロークケアユニット (stroke care unit) といった概念を念頭に置き、超急性期の治療確立に向け、基礎的、社会医学的を含めた包括的な研究の必要性が認識された。

【分担研究者】

趙 恒・日本大学・医学部・招聘研究員

【研究目的】

わが国の疾病構造の現状によると、脳血管性疾患の占める割合並びに、かかった医療費は上位を占め、今後高齢化によりますますその割合は上昇していくとされている。(平成7年度人口動態統計) 特に、脳血管性疾患

のなかで大部分をしめる脳卒中は、死亡総数の2割弱を占め、入院原因の第2位である。近年その死亡率は減少しているが、死亡を免れても後遺症として障害が生じたり、長期臥床などがきっかけとなり寝たきりの状態となる場合が多く、寝たきり老人の約4割を脳卒中が占めるといわれている。また、不幸にして寝たきりを余儀なくされた方々は、脳卒中発作後も傷害を持ちながら医療費もかかり、

現状では、医療費の約一割弱がそのために費やされている。さらに、2020年には、4人に1人が高齢者という時代を迎える。このため、脳卒中後遺症による寝たきりの克服およびその対策は老人保健事業の重要課題となっており、年々すすむ高齢化社会の重要課題の一つとなっている。(平成9年度厚生白書)

現行で行われている、脳卒中の発症予防、発症後の早い時点(発症後数週間後)からのリハビリテーションなどの対策はもちろんではあるが、発症直後数時間(超急性期)の処置が、極めてその後遺症の軽減に重要な役割をもたらすことは、近年の研究から明確になってきている。具体的に、脳卒中の専門誌を含めた国際誌の発表によれば、発症直後数時間内に適切な処置を行えば、「3か月での早期死亡が30%程度低下する」、「最終追跡時の死亡も明らかに低下する」、「ストロークケアユニットで治療すると寝たきり等の転帰が40%ほどよくなる」など試算されている。しかしながら、脳卒中の発症後直後数時間の処置については、明確化されていないのが現状である。以上の厚生行政の現状を踏まえ、我々は、心虚血性疾患において現行で目覚ましい成果を上げてきた数時間の超急性期集中治療法の確立と同様に、今後臨床面で注目確立されていくであろうブレインアタック(brain attack)やストロークケアユニット(stroke care unit)といった概念を念頭に置き、超急性期の治療について基礎的研究を発展させてきた。

脳実質にダメージが加わり、脳内に一定以上の虚血状態になり、その後再灌流が起こると、頭蓋内圧亢進症状を呈する以前に、脳内熱貯留現象がおこり、脳温が38℃から44℃にまで上昇すると言われている。そのため、脳虚血性疾患の急性期の治療法で、脳内温度を下げる低体温療法が劇的予後の改善をみる事が判明した。また、近年の様々な研究結果から、虚血状態において脳温による細胞外液中のグルタミン酸濃度の変化が、脳組織障害と密接に関連していることがつきとめられている。われわれは、微小透析電極法とフェロセン(鉄イオン)を利用することにより、酸素非依存性のグルタミン酸リアルタイム測定系を開発し(参考論文R2、3)、虚血時の脳温の減少が、グルタミン酸の虚血

中の放出量の減少にではなく、虚血再灌流後のグルタミン酸の再吸収を促進しすることを発表した。(参考論文R4)

今回我々の行った基礎的研究は、近年、救急医療で効果を上げている、低体温療法の臨床データを踏まえ、我々の開発した細胞外グルタミン酸リアルタイム測定系を用い、超急性期の脳温と脳障害の病態生理を細胞外グルタミン酸濃度の変化、とくにグルタミン酸再吸収機構を中心に検討し、脳温上昇による虚血再灌流後のグルタミン酸再吸収能の障害と虚血後の脳組織障害の程度が密接な相関を示すかどうか、虚血中並びに直後からの再吸収機構の賦活化が脳組織障害の進行を軽減するか、この脳温変化による虚血病態モデルは、グルタミン酸再吸収能を賦活化させる薬物のin vivoのスクリーニング系に利用できるか、などの仮説を確かめるために本研究を行った。

このように、脳損傷後の高脳温による脳障害の機序や低体温療法の脳神経細胞保護効果の機序を研究することは、超急性期の脳卒中の応急処置を確立するために、大変有意義であると考えられる。また、我々の研究によって、後遺症軽減発症後の脳障害軽減する薬物をグルタミン酸再吸収機構の活性化を指標にして探索検討することで、以前とは異なった観点で脳卒中発症後の後遺症の軽減に役立つ薬剤などの情報を提供出来ると考える。以上のような事を研究を礎とし、長期臥床や寝たきりの方々の数を減らすことは、微力ながら、国民医療福祉への貢献が出来ると考え研究を行った。

【実験方法】

実験器具と方法(詳細は、参考論文R2、R3)

1. 電気化学検出器、体温維持管理、脳温管理、血圧管理システムをMabLabSystemに接続し、コンピューター上での同時モニタリングシステムを構築する。
2. Ferrocene BSAとグルタミン酸酸化酵素(GOX)をPBSにとかし、この溶液を透析電極中に注入し灌流する。

3. 雄Fisherラットは、ウレタン (1.0g/kg) で麻酔し気管切開、両側頸動脈、気管支を剥離露出し、気管カニューレーションを施行し、脳固定器に固定する。直腸温を36.5~37.0°Cに保持する。
4. 大腿動脈と頸静脈にカニューレーションを行い動脈圧モニターを接続した。人工呼吸器で機械的に呼吸を促し、動脈内酸素分圧(PCO₂)は30~35mmHgに保持し、血液ガス分圧を測定した。
5. EEG電極を脳の表面におき、温度センサーを側頭筋筋内に挿入し赤外線ランプにより、脳温を所定の温度付近に保持した。透析電極または、DC電極を両側の線条体に定位 (0.5 mm anterior and 3 mm lateral to the bregma, 6 mm ventral to the dura) に挿入する。
6. レーザー脳局所血流計にて脳血流 (CBF) をモニターするために、透析電極と反対側線条体に定位挿入する。
7. 完全全脳虚血の誘導は、頸動脈切断により行った。脳虚血再灌流は smith の方法に準じて行った。すなわち、両側頸動脈をクランプし大腿静脈より瀉血し動脈血圧をコントロールしながらCBFの値を一定レベルまで下降させた。再灌流は、クランプ解除後、瀉血した血液を体内に戻す。
8. 各種薬物は、腹腔内あるいは、カニューラから投与する。
9. これらの in vivo の実験の直後に、上述した方法で透析電極のキャリブレーションを行う。
10. 再灌流後の脳組織の変化を経時的に検討する。切片に関しては、H-E、ニッスル及び免疫染色染色等を行う。

実験計画

- < 1 > 虚血時のグルタミン酸放出機構の仕組みについて、脳にDC電極を挿入し膜電位の変化と細胞外グルタミン酸放出の仕組みについて検討した。(詳細は、論文発表4)
- < 2 > 単純な脳虚血 (脱血) モデルでの狭義のグルタミン酸放出機構と脳温との関係を解析した。(詳細は、論文発表1)
- < 3 > 虚血時の脳血流量をモニターし、その

虚血程度を変化させた時のグルタミン酸放出パターンと放出閾値と脳温との関係を検討する。(詳細は、論文発表2)

- < 4 > 脳温上昇による脳虚血障害の成因に再灌流後の細胞外液中グルタミン酸再吸収機能が重要な影響を与えているとの仮説から、脳虚血時の脳温の影響が、虚血再灌流後のグルタミン酸再吸収機構に及ぼす影響について検討する。
- < 5 > 虚血中の脳温変化による虚血再灌流後のグルタミン酸再吸収機構と脳組織傷害の程度を検討する。
- < 6 > 脳虚血時のグルタミン酸再吸収機構への一酸化窒素 (NO) の役割について、上記脳温上昇時のグルタミン酸再吸収障害のモデルを用い検討する。(詳細は、論文発表3)
- < 7 > グルタミン酸再吸収機構の活性化を促進する薬物が脳温上昇による脳虚血障害の治療薬として有用と考え、上記脳温上昇時のグルタミン酸再吸収障害をモデルとして、脳血管代謝改善薬 (ニセルゴリン) を用い虚血再灌流時のグルタミン酸再吸収能への薬効をスクリーニングする。(詳細は、論文発表5)

【研究結果および考察】

グルタミン酸は生体内において中枢神経系の興奮性神経伝達物質の一つとして生理的に欠くことのできない必須アミノ酸の一つである。グルタミン酸は神経伝達刺激によって神経終末から遊離する。放出されたグルタミン酸はその後シナプス後細胞やグリア細胞に取り込まれて、シナプス間隙から取り除かれる。グリア細胞に取り込まれたグルタミン酸はグルタミンシンセターゼによってグルタミンに変換され神経終末へ前駆物質として供給される。神経終末のシナプス小胞の中には、100 mM程度の濃度に濃縮されて存在するといわれている。また、グルタミン酸は中間代謝物質の一員として細胞質内にも豊富 (10 mM程度) に存在する。細胞外のグルタミン酸濃度は数 μ M程度の低濃度に厳密にコントロールされており、そのためにグリア細胞や神経終末への取り込み・不活性化機構が存在し、この中心的な役割を担っているのが、グ

ルタミン酸トランスポーターである。グルタミン酸トランスポーターは、その強力な濃縮能力によりグルタミン酸を細胞内に隔離することによって細胞外のグルタミン酸濃度を低値に保ち、神経細胞をグルタミン酸の興奮毒性から保護する役割を果たしていると考えられている。現在のところ、神経細胞をグルタミン酸の興奮毒性から保護するのは、グリア細胞のグルタミン酸トランスポーターが最も重要だと考えられている。このように、グルタミン酸は、神経伝達に使われる貯蔵系とシナプス後細胞やグリア細胞に取り込まれて存在する代謝系の二つの貯蔵様式があり脳内に広く分布している。

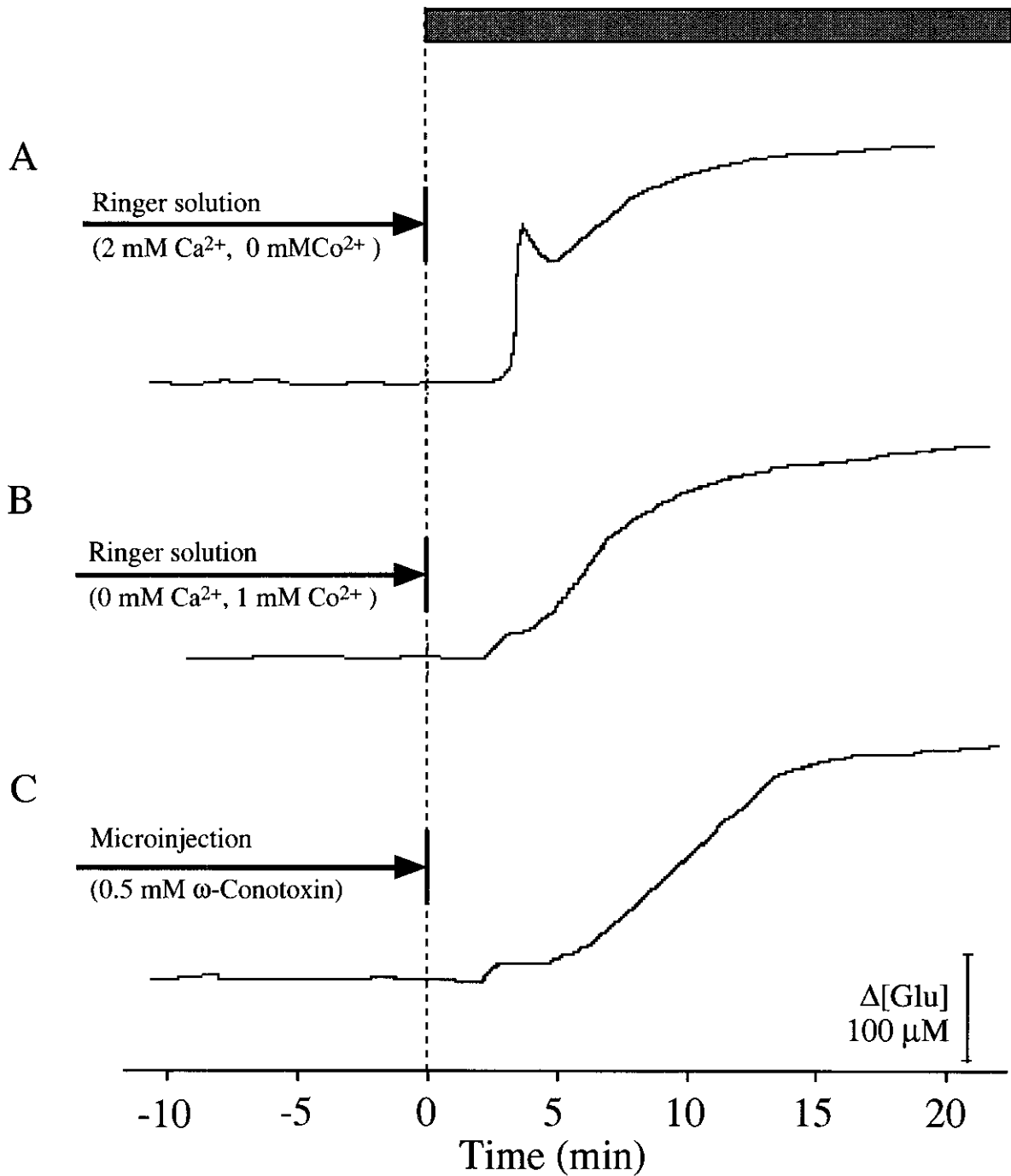
我々は世界に先がけ、微小透析電極とフェロセン（鉄イオン）を用いた、ラット脳内での酸素非依存性グルタミン酸のリアルタイム測定系を開発し（参考論文R2、R3）、二相性の連続した細胞外液中のグルタミン酸濃度の変化を再現性良く測定できる系を開発した。この微小透析電極を脳内線条体近傍に挿入し、脳に強い虚血状態を加えると、虚血負荷開始から2分前後に始まる急峻な増加の後ピーク（1st phase）をつくり、減少後基線に戻ることなくなだらかな上昇（2nd phase）を認めた。さらに虚血再灌流実験系において、虚血中に起こる二相性のグルタミン酸放出機構と再灌流後に起こるグルタミン酸再吸収機能を区別して評価することを可能にした。（参考論文R1）我々は、この二相性の放出と再吸収機序に、虚血時に脳内のグルタミン酸の二つの異なった貯蔵放出様式（神経伝達物質プールおよび代謝プール）がどのように関与しているかを解明することは、今後の虚血再灌流の病態生理解明に有用と考え、研究を試みた。

脳が急激に高度の虚血状態に陥ると、初期変化には Krebs cycle 以下の酸化障害と嫌氣的解糖過程促進が起こる。嫌氣的解糖過程促進によって乳酸が蓄積され、細胞内の水素イオンが増加しアシドーシスとなり細胞内のH⁺が、細胞外のNa⁺と入れかわりNa⁺電位を低下させると考えられている。またもう一方で、酸化障害が起こるとATP産生が低下し、Na⁺/K⁺-ATPase の不活性化によってNa⁺/Ca²⁺-exchange 機構が二次的に抑制されて細胞内のカルシウム濃度が上昇しカルモジュ

リンキナーゼIIが活性化される。そして、細胞内カルシウム濃度がさらに上昇し細胞内貯蔵部位からのカルシウム依存性カルシウムが放出され、カリウムチャンネルが開孔し細胞外K⁺が上昇すると言われている。現在、Anoxic Depolarization に至る過程には通説はないが、上記のような要因が絡み合って、細胞膜の静止電位が保てなくなり、急な脱分極を誘発し、細胞内ナトリウムイオン（Na⁺）、カルシウムイオン（Ca²⁺）、細胞外カリウムイオン（K⁺）が増加し、持続性脱分極電位を形成すると思われる。このような背景から我々は、透析電極及びDC電極を用い、虚血時膜電位の変化と細胞外グルタミン酸濃度の変化の関係を調べた。その結果、DC電極で深い脱分極が起こった時と同じ潜時で、1st phase のグルタミン酸の放出が認められ、Anoxic Depolarization に一致して起こっていると考えられた。（論文発表4）カルシウムチャンネルの拮抗薬である ω -コノトキシン（ ω -conotoxin）とコバルト（Co²⁺）を透析電極及びDC電極近傍に前投与しておき、虚血操作を行うと1st phase のピークが抑制されたことから（図1）、1st phase で見られる急峻な細胞外グルタミン酸濃度の上昇ピークの主体は、Anoxic Depolarization（脱分極）による神経伝達物質プールからのATP-Ca²⁺依存性のグルタミン酸の放出と考えた。大量のグルタミン酸放出は、細胞の過興奮や細胞の恒常性を保つために、急激なエネルギーの消費を引き起こし、膜のイオン勾配の破綻をおこす。細胞外K⁺濃度が上昇し、Na⁺が低下し膜が脱分極すると、グルタミン酸トランスポーターが逆向きに作動しグルタミン酸を細胞外へ輸送し、細胞外のグルタミン酸濃度上昇させ、いわゆる‘reversed-uptake’（逆向き輸送）の状態に陥り、エネルギーの枯渇状態が起こっているのにも関わらず、細胞外グルタミン酸の濃度は基線に戻ることなくなだらかに増加し、ある一定濃度で定常状態に達する（2nd phase）と考えられる。

グルタミン酸トランスポーターの逆向き輸送については、in vitro の系で、特定の培養細胞を用いた研究結果では証明されているが、実際の個体脳内で同様に起こっているかは、現在決着がついていない。我々の研究結果では、この一定濃度で推移する細胞外グ

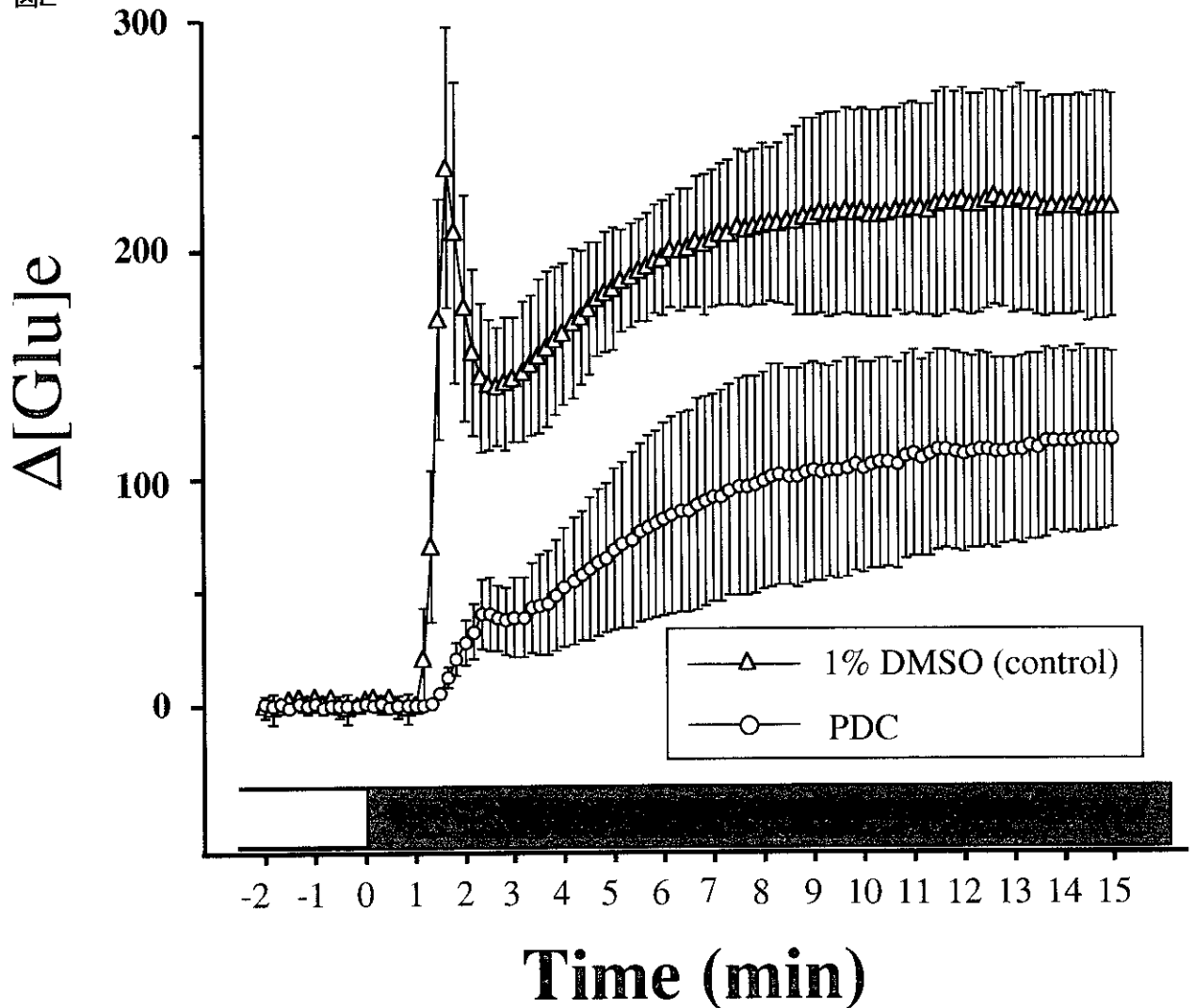
图 1



A, The inspired gas was switched from air to 100% N₂ for induction of anoxia 1 min after the second microinjection of PBS(+) or 300 mM NaCl, in which of 1 μl each was microinjected over 4 sec at an interval of 1 min. The biphasic glutamate elevation took place approximately 2 min later and a slow rise persisted for at least 15 min. When 1 μl of 300 mM KCl was microinjected, the [Glu]e elevation peaked within a few seconds. One minute later, the second KCl microinjection induced another [Glu]e peak, smaller than the first. One minute after the second KCl microinjection, the inspired gas was switched from air to 100% N₂ for the induction of anoxia. The 1st phase of the [Glu]e elevation disappeared, while the 2nd phase elevation occurred more quickly (within 1 min) and a gradual increase continued for 15 min.

B, When 300 mM KCl was microinjected, the [Glu]e elevation peaked very rapidly with essentially the same curve as in Fig. 2A. Fifteen minutes after the second KCl injection, anoxia was induced. The curve of the [Glu]e elevation was the same as that produced by anoxia alone.

図2



Effect of direct pharmacological manipulation on 2nd phase of [Glu]e elevation in anoxia. tPDC (1 mM) was preloaded for 30 min prior to anoxic induction. The time course of [Glu]e changes detected by a microdialysis electrode in the rat striatum is shown. The real-time response was sampled from the dialysis electrode and averaged at 10-sec intervals. Values are mean \pm SD from 6 samples in each group.

ルタミン酸濃度は、ほぼ200 μM から250 μM の間であり、この上昇は一定を保ったまま、少なくとも40分以上は続いた。さらに、トランスポーターの阻害薬である、PDCを前投与し虚血をかけると、2nd phaseのグルタミン酸放出量が低下したことから(図2)、このグルタミン酸放出は代謝プールからの放出で、エネルギー枯渇状態でのイオン勾配の破綻によって代謝プールからの多量のグルタミン酸が放出され、グルタミン酸トランスポーターの逆向きの状態が起きていると考えられる。

2nd phaseのグルタミン酸放出機序については、他に膜に微細な穴があり、細胞膜が細胞浮腫などにより伸展しその結果、代謝プー

ルからグルタミン酸放出がおこなわれるなどの説があるが、我々の予備実験の結果少なくとも電顕所見では、大きな15分間で膜構造の損傷は見あたらず、細胞外グルタミン酸濃度が40分以上に渡って変化しないため、細胞内部の数mMにも及ぶ高濃度グルタミン酸が細胞外液中に放出されているとは考えづらい。さらに、この二相性の上昇は、虚血再灌流系の虚血中に再現性よくおこり、再灌流後は速やかに減少することから、細胞膜に器質的な損傷が起ったとも考えづらい。また、虚血後のエネルギー枯渇により膜のイオン勾配が働かなくなったとき細胞内外でおこる理論的グルタミン酸濃度の平衡値が、200~300 μM と換算されており、ほぼ我々の測定結

果と一致する。以上の結果から、我々の測定系で起こっている 2nd phase の大量のグルタミン酸上昇機序は、代謝プールの逆回転によりが生じて起こっていると考えられる。

さらに興味あることに、PDCを前投与をすると 1st phase の放出も押さえた。in vitro のグリア細胞の培養系において、一時的に細胞外 K^+ 濃度を上昇されるとトランスポーターの逆向き輸送がおりグルタミン酸の放出がおこることから、in vivo 虚血時におこった Anoxic Depolarization によって、一時的に膜電位の平衡状態がおこり、上記トランスポーターの逆向き輸送による、神経細胞やグリア細胞からの放出がピークの中にオーバーラップしていることも考えられる。(投稿中)

虚血性神経細胞死が脳温度に依存することはよく知られている。そして、虚血中の脳温を低下させるとグルタミン酸の増加が抑制されることから、グルタミン酸の細胞外液中の放出量の減少が脳温低下による細胞保護効果の有力なメカニズムの一つであると言われている。虚血時の細胞外液中のグルタミン酸の濃度は、神経細胞からの放出とその再吸収のバランスとして測定される。グルタミン酸の変動を観察するには、従来微量透析法が用いられて来た。しかしながら、微量透析電極法を用いることで、微量透析法では不可能であった、ほぼリアルタイムでの細胞外グルタミン酸の詳細な変動を測定することで、細胞外液中のグルタミン酸の放出の増加と再吸収の促進という経時変化をより詳細捉えることが可能になった。我々は微量透析電極法を用いて、虚血時に二相性のグルタミン酸放出を再現性よく示す系を確立し(参考論文R1)、さらに、虚血再灌流実験系において、虚血中に起こる二相性のグルタミン酸放出機構と再灌流後に起こるグルタミン酸再吸収機能を区別して評価することを可能にした。これにより、虚血時の脳温が 37°C の時、グルタミン酸の放出が、虚血再灌流後のグルタミン酸の再吸収を有意に抑制することを示した。(参考文献R4)

グルタミン酸と細胞障害を論じる時、虚血時間は重要な factor であるにもかかわらず、10分程度の虚血時間で、in vivo の虚血前後で脳温と細胞外液中のグルタミン酸動態の関

係を述べた論文は少ない。これは、従来微量透析法のグルタミン酸濃度の検出限界と時間分解能の問題から、数度の脳温の違いによるごく微細な変化を捉えることが困難であったことに起因することと思われる。今日に至る虚血時のグルタミン酸濃度と脳温による細胞傷害の関係は、脳温の上昇によってグルタミン酸放出の上昇がおこり、グルタミン酸の放出量の多さと細胞傷害性が相関するという理論であった。今回我々の測定系では、グルタミン酸の放出量上昇を、グルタミン酸の神経伝達物質主体のプール(1st phase)、なだらかな上昇を示す代謝プール(2st phase)からの放出、再灌流後のグルタミン酸の再吸収抑制によるグルタミン酸の細胞外液中への停留の3つの要因に分けて論じることができる。一方、細胞外液中グルタミン酸の再吸収機構は、グルタミン酸トランスポーターが、 Na^+/K^+ -ATPase 依存性であることから、虚血中の脳血流(微小循環系)への影響などで、再灌流後の取り込み活性が異なることは明白である。したがって、脳温の変化によるグルタミン酸の細胞外液中の上昇を論じるために、虚血時の脳血流の要因を加え、脳温とグルタミン酸濃度の関係を研究した。最も脳血流が急激に0付近に低下する内頸動脈切断モデルを用い、脳温の二相性のグルタミン酸放出への影響について検討を行った。この結果、驚いたことに、1st phase の上昇に関しては、むしろ脳温の上昇時に対しグルタミン酸濃度に反比例し減少傾向を示した。また、なだらかな上昇を示す代謝プール(2st phase)のからの放出は、ほぼ10分後には 32 、 37 、 39°C の脳温間で変化がなかった。(図3)すなわち、完全虚血モデルにおいては、脳温の上昇にともなってグルタミン酸の放出量は上昇しなかった。(論文発表1)

そこで、今日まで蓄積されてきた、脳温の上昇時に対し細胞外液中へのグルタミン酸の放出量が増加するという定説を再考察した結果、2つの可能性が示唆された。第一に、実験モデルにおいて、脳血流量とグルタミン酸放出の関係が明確ではなく、さらに加え脳温の要因を含んだ検討はなされていないので、脳温上昇とともに、脳血流が変化した場合にグルタミン酸放出閾値も変化する可能性があり、虚血の程度の違う実験系で比較された可

図3

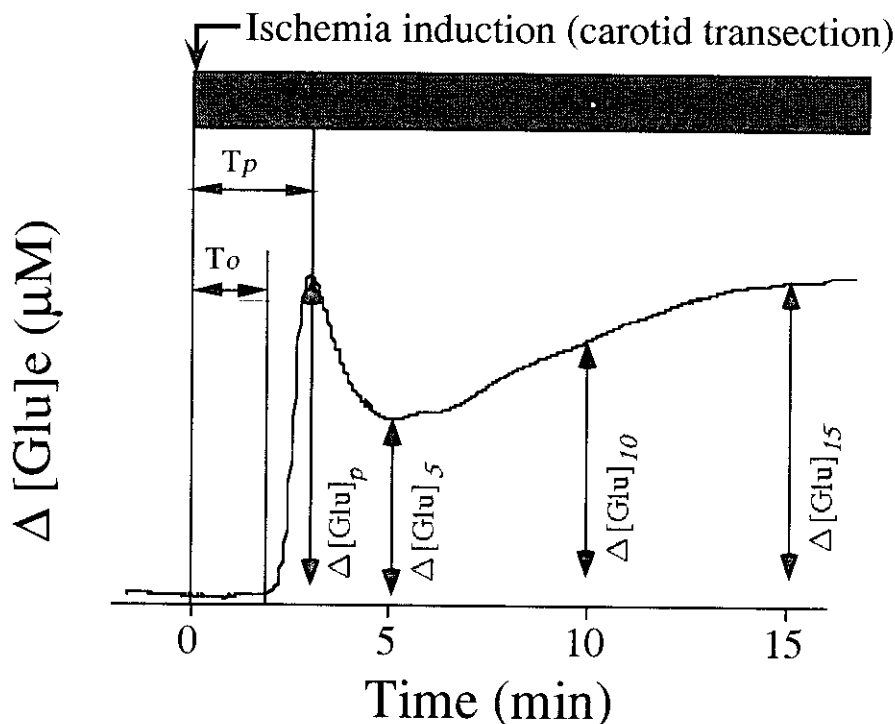


TABLE. Changes in [Glu]e dynamics at different brain temperatures using real-time monitoring with a dialysis electrode; ischemia induced by transecting both carotid arteries.

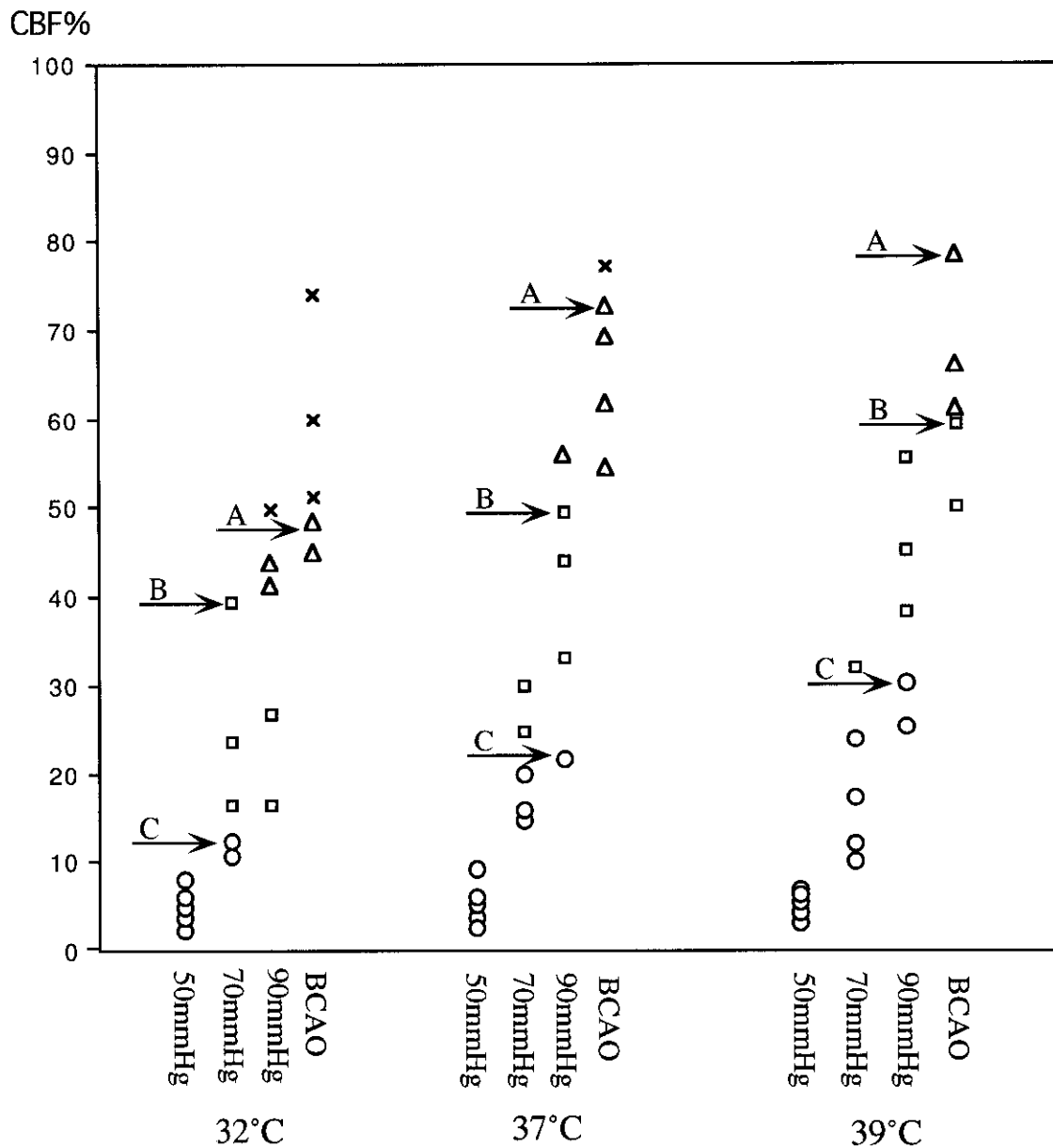
Temperature (°C)	Time after induction of ischemia (s)		Δ[Glu]e after inducing ischemia (μM)			
	To	Tp	Δ[Glu]p	Δ[Glu] ₅	Δ[Glu] ₁₀	Δ[Glu] ₁₅
28	181 ± 13**	247 ± 22**	403 ± 59**	-	170 ± 16*	204 ± 23
32	139 ± 10**	187 ± 12**	332 ± 50*	-	196 ± 25	217 ± 34
37	77 ± 10	111 ± 8	233 ± 31	180 ± 31	214 ± 29	214 ± 30
39	52 ± 7**	93 ± 11	211 ± 28	186 ± 29	212 ± 26	209 ± 28

Changes in real-time monitoring of [Glu]e with a dialysis electrode, when brain temperature was maintained near 28, 32, 37 or 39°C, during ischemia produced by transecting the bilateral carotid arteries (n = 6). The average plots of the [Glu]e time course were evaluated at 5 min intervals from the induction of ischemia by transecting the bilateral carotid arteries to 15 min (Δ[Glu]₅, Δ[Glu]₁₀, Δ[Glu]₁₅). Δ[Glu]_p is the peak value in the 1st phase. To is onset time of [Glu]e elevation from the induction of ischemia. Tp is the time of the [Glu]e peak from the induction of ischemia. Data represent the mean ± SD obtained from 6 samples. **p < 001; *p < 005 (comparison with normothermic intar ischemia kept at 37°C; ANOVA with Fischer LSD).

能性がある。第二に、今まで行われてきた微量透析法の時間分解能では、虚血中のグルタミン酸放出と再灌流後のグルタミン酸再吸収という現象を明確に区別が付けにくいため、一様に放出量として論じられてきたが、上記でのべた完全脳虚血モデルでの放出量には変化がなく(論文発表3)、再灌流後の再吸収機構に変化があり、細胞外液中のグルタミン酸濃度が上昇している可能性が高い。

このことを検証した結果、第一点については(図4)、脳温とグルタミン酸濃度の上昇の関係は、虚血時の脳血流が基準値のい20%を越えると、脳血流の低下が軽度であっても脳温の上昇とともに細胞外液中のグルタミン酸濃度の上昇がおりやすいこと、脳血流が20%以上ある時は、虚血中のグルタミン酸再吸収機構の働きが重要な役割を果たしていることがわかった。また、20%以下ま

図4



Relationships among blood pressure, CBF and [Glu]e elevation during ischemia with brain temperatures maintained at 32°C, 37°C and 39°C. CBF values are those measured five minutes after occlusion of bilateral common carotid arteries. The temperatures 32°C, 37°C and 39°C represent groups in which intras ischemic brain temperatures were maintained at these levels; 50 mmHg, 70 mmHg and 90 mmHg represent subgroups in which ischemia was produced by bilateral carotid artery occlusion combined with hypotension to 50, 70 and 90 mmHg, respectively, BCAO represents the subgroup in which ischemia was produced by bilateral carotid artery occlusion alone; The symbols ×, Δ, □ and ○ represent no glutamate release, and types A (mild), B (moderate) and C (massive) [Glu]e elevation, respectively. The arrows (→) with A, B and C indicate the CBF thresholds for types A, B and C [Glu]e elevation, respectively. Note that, as the arrow indicates, the CBF thresholds for all three types of [Glu]e elevation shifted to lower ranges as brain temperature fell.

で脳血流が下がると、グルタミン酸濃度の上昇のパターンは脳温に影響しない事もわかった(論文発表2)。したがって、脳の虚血再灌流実験を行う際には、特に虚血操作時の脳血流量を直に測定しながら行うことが不可欠

であると考えられた。第二点については、20%以下まで脳血流を下げ、虚血中のグルタミン酸再吸収機構が働かない条件の強い虚血をかけた時、脳温変化時の脳虚血中のグルタミン酸濃度の上昇の変化は、上記の完全虚血

図5

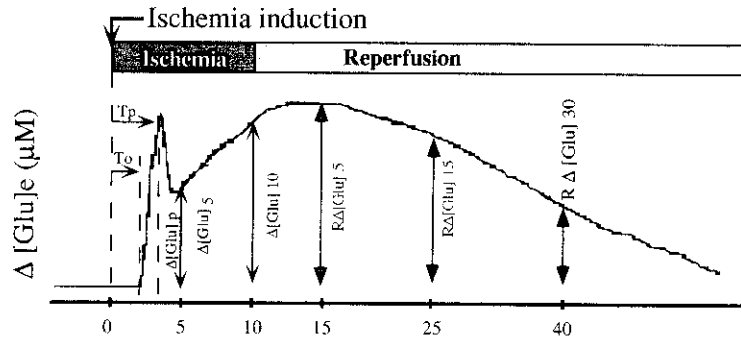


Table. Changes in [Glu]e dynamics at different BTs in the intrainischemic and postischemic periods using real-time monitoring with a dialysis electrode with 10 minutes of ischemia followed by reperfusion.

Temperature (°C)	Time (sec) after inducing ischemia		Δ [Glu]e (μM) after inducing ischemia				Δ [Glu]e (μM) after start of reperfusion		
	To	Tp	Δ [Glu]p	Δ [Glu]5	Δ [Glu]10	Δ [Glu]5 onset	R Δ [Glu]5	R Δ [Glu]15	R Δ [Glu]30
32	134 ± 25**	240 ± 19**	272 ± 61	—	187 ± 28	167 ± 26	Baseline**	Baseline**	Baseline
37	71 ± 13	164 ± 42	217 ± 43	173 ± 15	214 ± 14	179 ± 11	183 ± 21	60 ± 25	2 ± 6
39	48 ± 8*	136 ± 20	201 ± 19	177 ± 16	209 ± 35	182 ± 17	192 ± 13	154 ± 32**	90 ± 45**

Changes in [Glu]e as demonstrated by real-time monitoring with a dialysis electrode, with BT maintained near 32, 37 or 39°C, during ischemia (n=10) and reperfusion (n=10). Average plots of the [Glu]e time course at 5-minute intervals in an ischemia-reperfusion model are shown. Average plots of the [Glu]e time course were evaluated for 40 minutes, at 5-minute intervals, after inducing ischemia (Δ[Glu]5, Δ[Glu]10), and from the onset of the [Glu]e increase in the 1st phase (Δ[Glu]5 min.onset, Δ[Glu]10 min.onset). Δ[Glu]p is the peak value in the 1st phase. To is the time from ischemia induction until the onset of [Glu]e elevation. Tp is the time from the induction of ischemia until the [Glu]e peak. The [Glu]e dynamics after reperfusion were RΔ[Glu]5, RΔ[Glu]15 and RΔ[Glu]30. Glutamate calibration for the ischemic and reperfusion phases in [Glu]e dynamics was carried out in different groups. Data represent mean ± SD of 10 samples. **p< 0.01; *p< 0.05 (in comparison with normothermic intrainischemia maintained at 37°C; ANOVA with Fisher LSD).

のモデルとほぼ同じ様な値を示し、ある一定以上の強い脳虚血状態では、虚血時のグルタミン酸の放出量は、脳温の影響を受けないことがわかった。しかしながら、このようなある一定以上の強さの虚血状態を付加し、脳温の変化を加味すると、再灌流後のグルタミン酸の変化は、明らかに虚血中の脳温高いほうが、グルタミン酸濃度上昇の遷延化がおり、グルタミン酸再吸収機能が抑制されていることがわかった。とくに、脳温39°Cの再灌流後のグルタミン酸濃度上昇は、虚血中の放出量よりも遙かに多量であり、脳温上昇時の再灌流傷害の重要性が示唆された。(図5、投稿中) さらに、この実験条件と同じ虚血再灌流

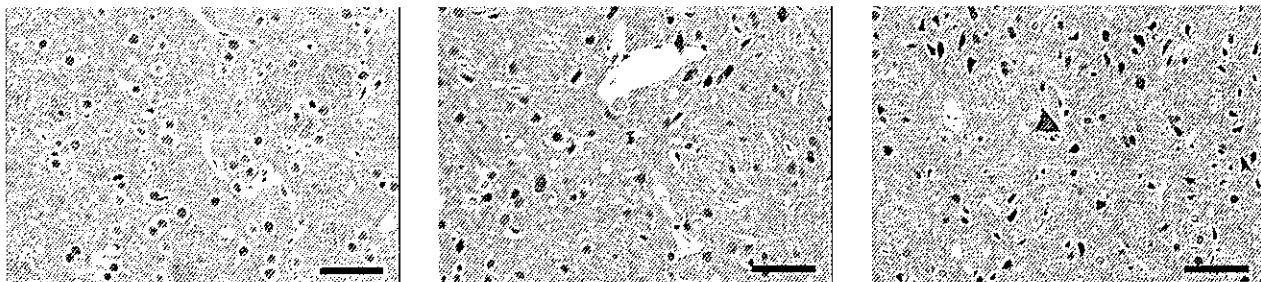
条件で脳の組織傷害の程度を検討したところ、2時間後の線条体での組織傷害の程度は、虚血中の脳温に比例して強くなり、わずか10分間の虚血であっても脳温が2度ほど上昇すると、2時間後には重度の細胞傷害を誘発することが明らかになった。(図6-A,B,C)

低体温療法は、現在最も確実な脳卒中治療法として注目されている。今回の我々の研究を通して、低体温療法の作用機序にグルタミン酸再吸収機構が関与している可能性を示唆した。そこで、グルタミン酸再吸収機構の活性化が、脳温上昇時の脳の組織傷害を軽減するか、いくつかの薬物を用い病態薬理学的見地でいくつかの薬物を用いて検討をおこな

図6 A.32°C

B.37°C

C.39°C



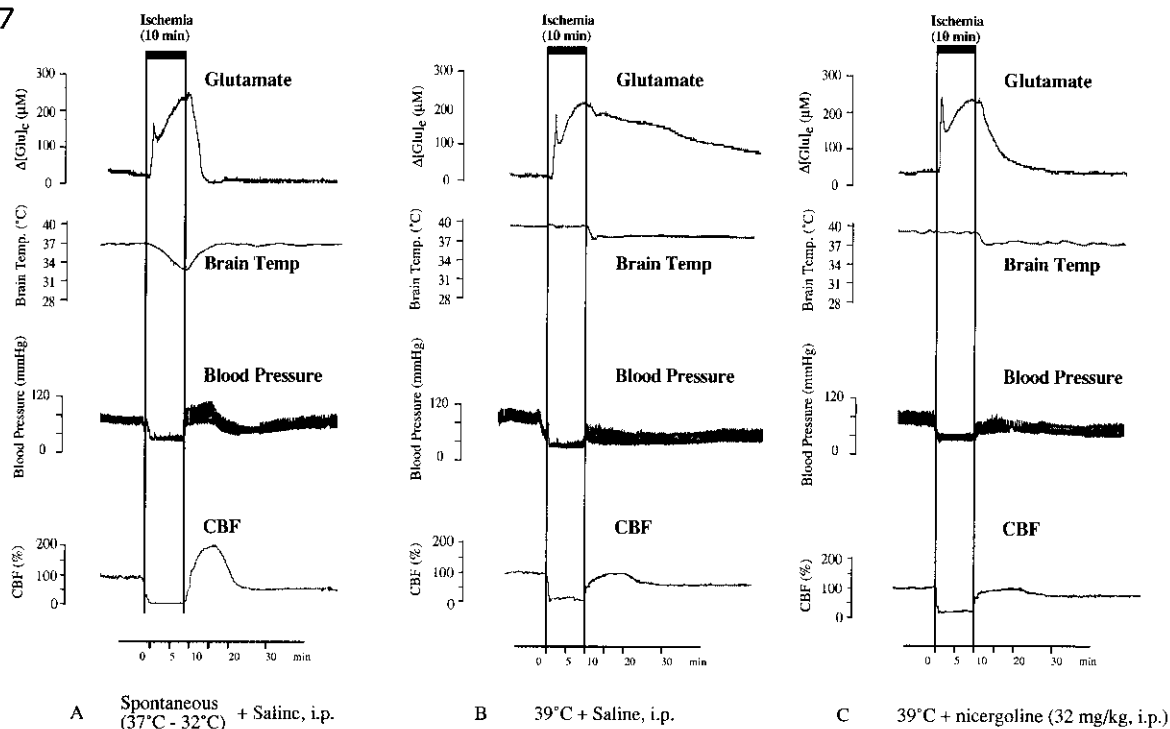
ラット 10 分間全脳虚血再灌流後、2 時間の光顕像 (HE 染色)。Bar のスケールは、50 μ m。虚血中の脳温を A ; 32°C、B ; 37°C、C ; 39°C にそれぞれ保った。39°C のクロマチンの凝集細胞の数は、37°C に比べ多く認められる。32°C では認められない。

った。

NO (一酸化窒素) は神経細胞においても、rapid messenger と cytotoxic mediator の両方の働きを持ち、グルタミン酸受容体、とくに NMDA 受容体の活性化によってカルシウム/カルモジュリン依存性 NO 合成酵素により L-アルギニンから NO の合成が行われることが明らかにされてきた。In vitro において NO はシナプス前伝達物質の放出を増やすと言われており、多量の NO の産生により興奮毒性神

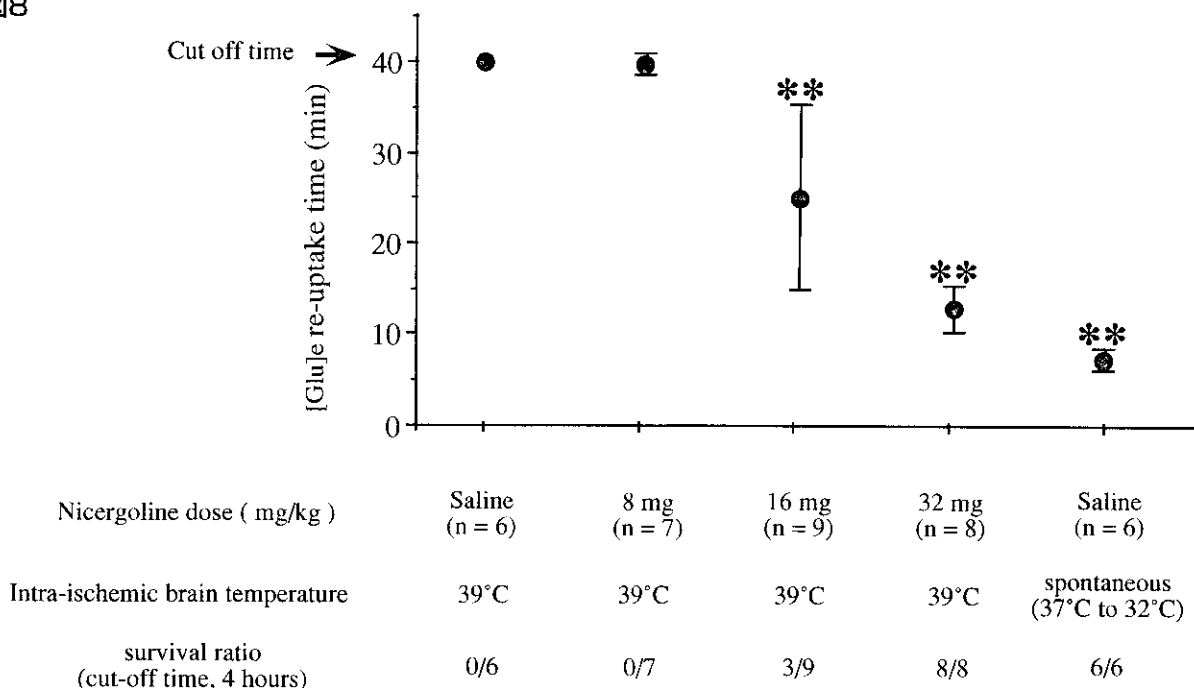
経細胞障害を引き起こすことが示唆されてきた。一方、興奮性アミノ酸である細胞外液中のグルタミン酸濃度の上昇が脳虚血によって誘発されることは数々の研究で確認されてきたが、in vivo での虚血によるグルタミン酸動態と NO の関係については、明確な回答は出されていない。そこで、NO 産生を増やす NO 合成前駆体の L-アルギニンと、非選択性 NO 合成酵素阻害薬の N-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) の投与

図7



Effects of nicergoline on extracellular glutamate ([Glu]e) response, blood pressure, cerebral blood flow (CBF) and brain temperature (Brain Temp). Real-time [Glu]e monitoring revealed the events occurring when the brain temperature dropped spontaneously from 37 to 32 (Fig. 2A) and was then kept constant at 39 followed by injection of saline alone (Fig. 2B) or nicergoline (Fig. 2C) during the ischemic period. Body temperature was kept at a nearly constant 37. Saline or nicergoline was administered intraperitoneally 60 minutes before inducing ischemia. Results are from a representative experiment performed three times with similar results.

図8

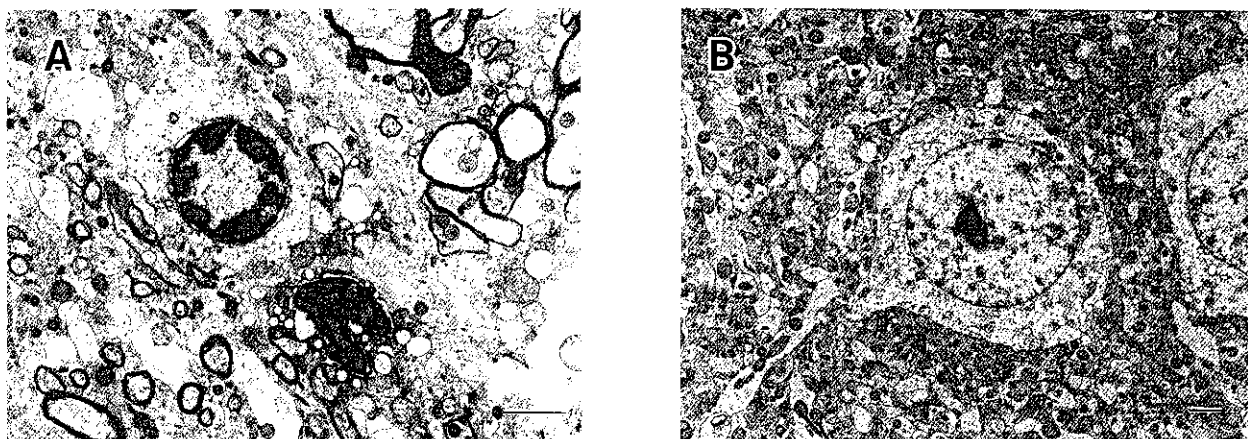


The glutamate re-uptake activity in the postischemic period was measured as the time required for 90% clearance of the [Glu]_e elevation. Saline or nicergoline was administered intraperitoneally 60 minutes before inducing ischemia. The cut-off time for [Glu]_e re-uptake was set at 40 minutes and that for calculating the survival ratio in the postischemic period at 4 hours. The data are presented as means ± SEM. **p < 0.01 vs. saline; intrainischemic brain temperature at 39°C (ANOVA with Fischer LSD).

し、NOが、ラット線条体で一過性全脳虚血時および再灌流時でグルタミン酸の経時変化に影響を与えるかどうかを検討した。その結果、NO関連薬物は、我々の虚血再灌流実験系では、虚血時、再灌流時どちらのグルタミ

ン酸動態にも影響を与えず（論文発表3）、組織傷害についても有意の改善は認めなかった。しかしながら、虚血再灌流時のNOの作用は、虚血の強さによっても変化する可能性があり、今後虚血実験系の考察も含め、詳細

図9



Electron-micrographs of neuronal cells in the striata of ischemic animals that had been treated without (A) and with (B) nicergoline. Tissue preparations were processed as described in Materials and Methods. A, Saline (i.p.); the nuclei of some neuronal cells show chromatin condensation, indicating neuronal degeneration (ratio of abnormal cell, 42%/150 neurons, n = 3). B, Nicergoline (32 mg /kg, i.p.); nearly all neuronal cells show normal morphology (ratio of abnormal cells, 4%/150 neurons, n = 3). Bars indicate 2 mm.

な検討がなされるべきと考えている。(投稿準備中)なほ、本研究テーマは、分担研究者の趙恒を中心に現在も継続研究中である。

次に、現在脳代謝改善薬として汎用されている、ニセルゴリン(Nicergoline)について同様の検討を行った。ニセルゴリン(Nicergoline)前投与群は、明らかに脳温39℃グルタミン酸濃度上昇の遷延化を抑制し、ラットの致死率も有意に改善した。(図7, 図8, 図9-A, B)(論文発表5)また、以前よりnon-NMDA受容体遮断薬(NBQX)は、虚血後の投与により、虚血再灌流後傷害を軽減する数少ないグルタミン酸受容体拮抗薬物の一つとして知られているが、最近の我々の研究結果では、NBQX投与群は明らかに、再灌流後の投与でグルタミン酸再吸収能を活性化する。(学会発表M1)これらの結果から、虚血再灌流病態の発現に細胞外グルタミン酸が密接に関わっていることを再確認した。超急性期の細胞外グルタミン酸濃度の上昇機構、再吸収機構、及び神経障害は密接に影響しあっている可能性があることが示唆された。

今回の研究報告を踏まえ、今後研究戦略について考案する。現在、脳虚血再灌流時の神経細胞傷害を論じるとき、グルタミン酸が病因危険因子として重要であることには疑う余地がない。しかしながら、その病態研究の中心は、グルタミン酸受容体、とりわけ、外部からの過剰刺激に対するグルタミン酸受容体情報伝達系を保護する目的で行われている。一方、近年の研究成果から、神経細胞傷害時におけるグルタミン酸トランスポーターの重要性が明らかになってきた。今回の研究で、脳神経細胞傷害を論じるときグルタミン酸再吸収機構(グルタミン酸トランスポーターが関与している)の解明も、大切であることを示唆されたと考え。したがって、現在精力的に行われている、グルタミン酸受容体を介したグルタミン酸受容体サブタイプ間のクロストークも重要な研究テーマではあるが、今後、グルタミン酸トランスポーターの細胞内外からの調節システムの総合的な研究が重要と考える。

しかしながら、脳虚血再灌流時の病態解明には、非常に多くの要因が関係していると考えられ、数個のパラメーターを取り上げるだ

けではでは、その解明の糸口すら見いだせない可能性が高い。したがって、今後の研究戦略は、以下の通りである。今回の脳温変化による脳虚血動物モデルを用いた、グルタミン酸再吸収活性と、再灌流後の組織傷害の改善程度を考察し、作用機序のなるべく異なったグルタミン酸再吸収活性の高い薬物のリストを作ることから始めることが必要であろう。さらに、現在、本大学で稼働している、遺伝子発現(GeneChip)システム(Affymetrix, CA, U.S.A.)を活用し、グルタミン酸再吸収活性の高い薬物投与群とコントロール群と組織を経時的に採取し、約1万弱の遺伝子発現パラメーターを観察解析し、より機能的に重要な遺伝子群を発見することで、脳虚血病態の解明に迫っていきたいと考えている。

【結論】

今回の研究によって、従来から言われているように、虚血再灌流病態の発現に細胞外グルタミン酸が密接に関わっていることを再確認した。とりわけ本研究において、超急性期の細胞外グルタミン酸濃度の上昇機構には、再吸収機構が重要な働きをしていること、特に、脳虚血後の脳温の上昇による神経障害に、細胞外グルタミン酸再吸収機構が関与している可能性が示唆された。このことは新たな知見であり、今後の研究に重要な道筋をつけたものとする。

現在、最も治療効果が期待される低体温効果の病態生理の研究は、多くの治療法の確立につながると考えられる。こういった見地に立って考えれば、今回の研究により、脳虚血時の細胞外グルタミン酸の上昇の病態には、再吸収機構が重要な役割を果たしていることが示唆され、再吸収機構の主な役割を担っているグルタミン酸トランスポーターの阻害薬が虚血再灌流時の細胞外グルタミン酸濃度の上昇を抑えることから、今後再吸収機構の活性化を促すような薬剤が、神経障害の軽減に役立つ可能性が示唆された。本研究を含め、近年の研究成果から、脳虚血後の超急性期の低体温の治療効果については、確認されている。したがって、虚血性心疾患の発症数時間の超急性期集中治療法の確立をめざした厚生行政を踏まえ、脳卒中治療においても、ブレインアタック(brain attack)やストロークケ

アーユニット (stroke care unit) といった概念を念頭に置き、超急性期の治療確立に向け、基礎的、社会医学的を含めた包括的な研究が必要となろう。

【研究発表】

1. 論文発表 (本研究補助金を活用して行われたもの)

- 1) Asai S, Zhao H, Takahashi Y, Nagata T, Kohno T, Ishikawa K, Minimal effect of brain temperature changes on glutamate release in rat following severe global brain ischemia: a dialysis electrode study. Neuroreport 1998 9:3863-3868
- 2) Zhao H, Asai S, Kohno T, Ishikawa K, Effects of brain temperature on CBF thresholds for extracellular glutamate release and reuptake in the striatum in a rat model of graded global ischemia. Neuroreport 1998 9:3183-3138
- 3) Zhao H, Asai S, Ishikawa K, Neither L-NAME nor L-arginine changes extracellular glutamate elevation and anoxic depolarization during global ischemia and reperfusion in rat. Neuroreport 1999 10:313-318
- 4) Satoh M, Asai S, Katayama Y, Kohno T, Ishikawa K, Real-time monitoring of glutamate transmitter release with anoxic depolarization during anoxic insult in rat striatum. Brain Res 1999, in press
- 5) Asai S, Zhao H, Yamashita A, Jike T, Kunimatsu T, Kohno T and Ishikawa K, Nicergoline enhances extracellular glutamate re-uptake during postischemic period and protects against brain damage following severe global brain ischemia in a rat model -Nicergoline enhances glutamate re-uptake-, submit

2. 学会発表 (本研究補助金を活用して行われたもの)

- M 1) Asai S and Ishikawa K, at Improving the therapeutuc profile of glutamatergic drugs subtype selectivity, use- and context-dependent modulators. March 4-5, 1999, Orlando, Florida, U.S.A.

【参考論文】

- R 1) Asai S, Iribe Y, Kohno T, Ishikawa K, Real time monitoring of biphasic glutamate release using dialysis electrode in rat acute brain ischemia. Neuroreport 1996 7:1092-1096.
- R 2) Kohno T, Asai S, Iribe Y, Hosoi I, Shibata K, Ishikawa K, An improved method for the detection of changes in brain extracellular glutamate levels. J Neurosci Methods 1998 81:199-205.
- R 3) Kohno T, Asai S, Iribe Y, Hosoi I, Shibata K, Ishikawa K. Oxygen independent real-time monitoring for the detection of changes in brain extracellular glutamate levels using ferrocene conjugated BSA. J Brain Sci 1998 in press
- R 4) Zhao H, Asai S, Kanematsu K, Kunimatsu T, Kohno T, Ishikawa K, Real-time monitoring of the effects of normothermia and hypothermia on extracellular glutamate re-uptake in the rat following global brain ischemia. Neuroreport 1997 8:2389-2393

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）

分担研究報告書

脳虚血時の脳内グルタミン酸再吸収機構に関する研究

分担研究者 趙 恒 日本大学・医学部・招聘研究員

【研究要旨】

NO（一酸化窒素）は rapid messenger と cytotoxic mediator の両方の働きを持ち、グルタミン酸受容体、とくにNMDA受容体の活性化によってカルシウム/カルモジュリン依存性 NO合成酵素によりL-アルギニンからNOの合成が行われることが明らかにされてきた。In vitro においてNOは retrograde messenger としてシナプス前伝達物質の放出を増やすと言われており、多量のNOの産生により興奮毒性神経細胞障害を引き起こすことが示唆されてきた。一方、興奮性アミノ酸である細胞外液中のグルタミン酸濃度（[Glu]e）の上昇が脳虚血によって誘発されることは数々の研究で確認されてきた。本研究は、in vivo で虚血による[Glu]e上昇にNO産生の役割を明らかにする目的で、グルタミン酸透析電極（glutamate dialysis electrode）とDC電極（direct current potential electrode）を用いて低血圧（50mmHg）併用による両側総頸動脈閉塞モデルにを用い、生理食塩水投与群をコントロールとして、NO産生を増やすNO合成前駆体のL-アルギニンと、非選択性NO合成酵素阻害薬のN-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride（L-NAME）の投与し、NOが、ラット線条体で一過性全脳虚血時および再灌流時で[Glu]eの経時変化に影響を与えるかどうかを検討した。

正常な状態では、L-NAME投与は、脳血流を減少させ、L-アルギニン投与は、増加させた。したがって、この結果は、以前から言われている、NOの脳血管拡張作用と合致する結果であった。また、再灌流後3群の脳血流量の経時変化に有意差は認められなかった。一方投与前の[Glu]eの基線変化は、3投与群間での有意の認められず、さらに、虚血時および再灌流時の[Glu]eの経時変化にも影響を及ぼさなかった。DC potentialの変化においても、ADの潜時および基線への回復時間においては、3群間で有意差は認められなかった。よって、以上の結果より我々は、一過性虚血や再灌流時においてNOが[Glu]e変化の重要な mediator ではないと結論した。

【研究目的】

NO（一酸化窒素）は rapid messenger と cytotoxic mediator の両方の働きを持ち、グルタミン酸受容体、とくにNMDA受容体の活性化によってカルシウム/カルモジュリン依存性 NO合成酵素によりL-アルギニンからNOの合成が行われることが明らかにされてきた。In vitro においてNOは retrograde messenger としてシナプス前伝達物質の放出を増やすと言われており、多量のNOの産生により興奮毒性神経細胞障害を引き起こすことが示唆されてきた。

一方、興奮性アミノ酸である細胞外液中のグ

ルタミン酸濃度（[Glu]e）の上昇が脳虚血によって誘発されることは数々の研究で確認されてきた。本研究は、in vivo で虚血による[Glu]e上昇にNO産生の役割が明らかにする目的で、グルタミン酸透析電極（glutamate dialysis electrode）とDC電極（direct current potential electrode）を用いて低血圧（50mmHg）併用による両側総頸動脈閉塞モデルにを用い、NO産生を増やすNO合成前駆体のL-アルギニンと、非選択性NO合成酵素阻害薬のL-NAMEの投与し、NOが、ラット線条体で一過性全脳虚血時および再灌流時で[Glu]eの経時変化に影響を与えるかどうかを検討した。

【研究方法】

ラット線条体で15分間の全脳虚血時と再灌流時に細胞外グルタミン酸濃度 ([Glu]e) と虚血時脱分極 anoxic depolarization (AD) をそれぞれ glutamate electrode と direct current (DC) potential electrodeを用いて測定した。NO産生を増やすためにNO合成前駆体の L-アルギニンと非選択性 NO 合成酵素阻害薬 (L-NAME) を投与し、ラット線条体で一過性全脳虚血および再灌流時に経時変化および [Glu]e の変化に影響を与えるかどうかを検討した。前脳虚血は低血圧 (50mmHg) 併用による両側総頸動脈閉塞により行った。グルタミン酸バイオセンサーか DC potential electrode のいずれかを用いて脳血流を同時にモニターし、脳温は実験中 36 度に保った。脳血流量は、動物死後の値を 0、投与前の値を 100 % として換算した。

【研究結果及び考察】

虚血開始前、薬物腹腔投与後 29 分の脳血流量は L-NAME 投与群では投与前に比べて約 70 % に減少し、L-アルギニン投与群では約 110 % に増加していた。虚血負荷中は生食投与群、L-NAME 投与群、L-アルギニン投与群の各群で薬物投与前の約 5 % にまで脳血流量は減少した。血流再灌流後約 10 分で、いずれの群も 230 % の最高値を示した。この脳血流量の上昇は約 15 分間持続した後、測定終了まで次第に減少していった。再灌流開始後はどの時間点を取っても、生食投与群と比較して、薬物投与した他の 2 群のいずれも脳血流量に有意差は認められなかった。(図1)

正常な状態では、L-NAME 投与は、脳血流を減少させ、L-アルギニン投与は、増加させた。したがって、この結果は、以前から言われている、NOの脳血管拡張作用と合致する結果であった。また、再灌流後 3 群の脳血流量の経時変化に有意差は認められなかった。一方投与前の [Glu]e の基線変化は、3 投与群間での有意の認められず、さらに、虚血時および再灌流時の [Glu]e の経時変化にも影響を及ぼさなかった。DC potential の変化においても、AD の潜時および基線への回復時間においては、3 群間で有意差は認められなかった。(図2)

【結論】

以上の結果より我々は一過性虚血や再灌流時において NO が [Glu]e 変化の重要な mediator ではないと結論した。

【研究発表】

- 1) Asai S, Zhao H, Takahashi Y, Nagata T, Kohno T, Ishikawa K, Minimal effect of brain temperature changes on glutamate release in rat following severe global brain ischemia: a dialysis electrode study. Neuroreport 1998 9:3863-3868
- 2) Zhao H, Asai S, Kohno T, Ishikawa K, Effects of brain temperature on CBF thresholds for extracellular glutamate release and reuptake in the striatum in a rat model of graded global ischemia. Neuroreport 1998 9:3183-3138
- 3) Zhao H, Asai S, Ishikawa K, Neither L-NAME nor L-arginine changes extracellular glutamate elevation and anoxic depolarization during global ischemia and reperfusion in rat. Neuroreport 1999 10:313-318
- 4) Satoh M, Asai S, Katayama Y, Kohno T, Ishikawa K, Real-time monitoring of glutamate transmitter release with anoxic depolarization during anoxic insult in rat striatum.