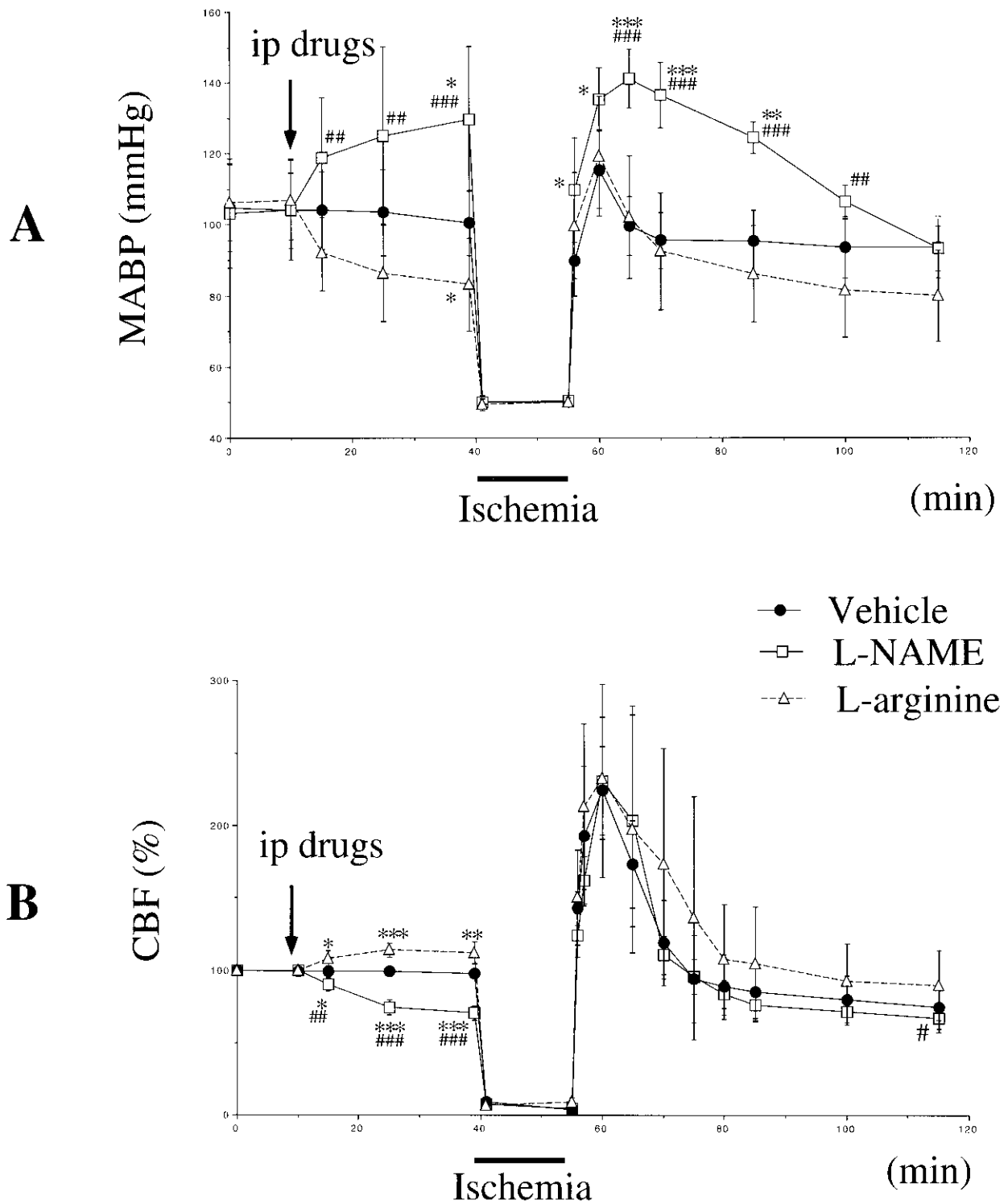
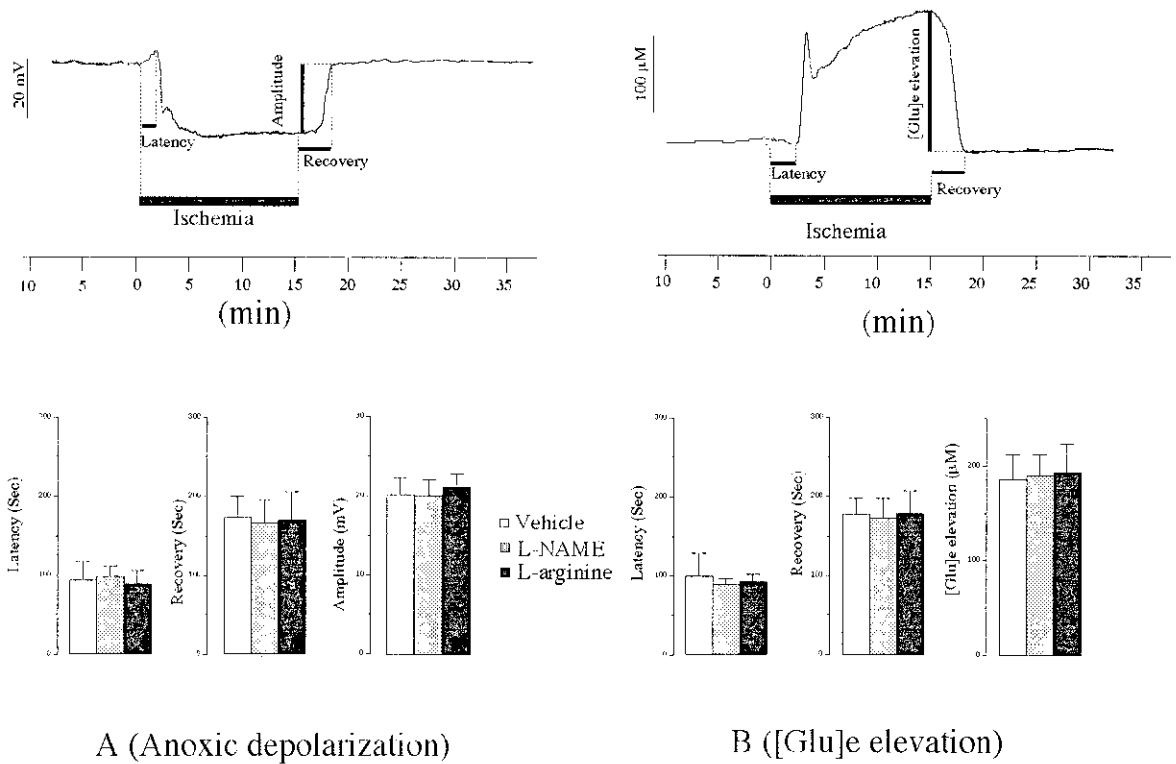


图 1



Changes of mean arterial blood pressure (MABP) (n=12) (A) and cerebral blood flow (CBF) (n=12) (B) after treatment with drugs, during 15 minutes of ischemia and 60 minutes of reperfusion. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 vs. vehicle; # P<0.05, ## P<0.01, ### P<0.001 vs. L-arginine.

图 2



Anoxic depolarization (AD) (A) and biphasic [Glu]e elevation (B) during 15 minutes of global ischemia and reperfusion in rats treated with L-NAME, L-arginine or vehicle. AD was evaluated by analyzing its onset latency, recovery time and amplitude. [Glu]e elevation was analyzed similarly to AD with respect to its onset latency, reuptake time of released glutamate during reperfusion and [Glu]e elevation at 15 minutes of ischemia. In both A and B, each column represents the mean SD of 6 animals. Note that there is no significant difference among the three groups.

Ⅲ. 論 文 発 表

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

微小透析電極 (微量透析電極法) とフェロセン (Ferrocen, 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報告した。このシステムにより、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) からの二相性の細胞外グルタミン酸濃度の上昇のより詳細な解析が可能になった。この系を用い、虚血中の脳内微小循環の影響を出来る限り少なくし、脳完全虚血時の細胞外液中のグルタミン酸動態を半定量化した。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の放出の増加は、認められず、脳温上昇とグルタミン酸の放出の増加は、相関しなかった。以前の報告 (参考論文4) とあわせて、一定以上の強さの虚血条件下では、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報告した。

19980033

これ以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

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 Oct 5;9(14):3183-8.

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

脳虚血再灌流時の細胞外グルタミン酸濃度は、虚血時の脳血流量によって変化することは知られていたが、脳血流量とグルタミン酸放出の関係が明確に記載され、さらに加え脳温の要因を含んで、グルタミン酸放出動態の検討がなされていた研究はない。したがって、以前なされた研究には、仮に脳温上昇とともに、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グルタミン酸放出動態と脳温の関係が比較された可能性がある。したがって、我々は、虚血時脳温変化の細胞外グルタミン酸濃度への影響を観察する際、脳内の脳血流を直接同時測定し、脳温変化の影響を検討した。透析酵素電極とCBF測定プローブを両側にそれぞれ線条体に挿入し、10分間全脳虚血を施行したところ、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こりやすいことがわかった。さらに、脳血流が20%以上保たれている時は、脳温によっては虚血中にもかかわらず、グルタミン酸の濃度が減少することもあり、グルタミン酸の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。脳虚血時に微少循環がある程度保たれていると、脳温の変化は、グルタミン酸放出閾値にも大きな影響を与える。

19980033

これ以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

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 Dec 1;9(17):3863-8.

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

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) を用いて低血圧併用による (50mmHg) 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。

19980033

これ以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

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 Feb 5;10(2):313-8.

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

透析酵素電極を用いることで、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。脳虚血時のanoxic depolarization (AD) は虚血病態に密接に関わっているとされているが、その機構については、解明し得ていない。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、今後の虚血の病態生理解明に有用と考えられる。我々は、透析酵素電極とDC電極を用い、虚血誘導後ごく早期におこる、グルタミン酸の細胞外への大量放出機序について、詳細に検討をおこなった。

その結果、カルシウムイオンチャンネルをブロックすることによってグルタミン酸放出の第一相が消失し、同時に anoxic depolarization も遷延化し緩徐になったことから、第一相は神経伝達物質の exocytosis が主要な役割を果たし急峻な anoxic depolarization の発生と密接に関わっていることがわかった。またカルシウムをブロックすることが代謝プールからのグルタミン酸の放出（第二相）に影響することからグルタミン酸トランスポーターによる逆向き輸送（reversed uptake）には第一相におけるエネルギー枯渇、ADによる急激なイオン環境の変化、カルシウムイオンの細胞内流入が関与している可能性も示唆された。グルタミン酸放出機構として神経伝達物質の exocytosis のみならず reversed uptake にも カルシウムイオンの細胞内流入が関与している可能性が示唆された。虚血早期には神経伝達物質を介したいくつかの悪循環が形成され、それによってエネルギー枯渇や脱分極が急激に進行すると考えられた。

19980033

これ以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

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 Mar 20;822(1-2):142-8.

Asai S, Zhao H, Yamashita A, Jike T, Kunimatsu T, Nagata T, Kohno T, Ishikawa K. Nicergoline enhances glutamate re-uptake and protects against brain damage in rat global brain ischemia. *Eur J Pharmacol.* 1999 Nov 3;383(3):267-74.

Asai S, Ishikawa K. Glutamatergic drugs and in vivo re-uptake mechanism of extracellular glutamate in brain ischemia-reperfusion model, using dialysis electrode. Improving the therapeutic profile of glutamatergic drugs subtype selectivity, use- and context-dependent modulators. March 4-5, 1999, Orlando, Florida, U.S.A.

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 Apr 10;7(5):1092-6.

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 Jun 1;81(1-2):199-205.

Asai S, Kohno T, Katayama Y, Iribe Y, Hosoi I, Kanematsu K, Kunimatsu T, Ishikawa K. Oxygen-independent real-time monitoring of distinct biphasic glutamate release using dialysis electrode in rat striatum during anoxia: in vivo evaluation of glutamate release and reversed uptake. *J Neurotrauma.* 2000 Nov;17(11):1105-14.

19980033

これ以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

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 Jul 7;8(9-10):2389-93.

VI. 謝 辭

謝 辞

本研究に平成10年度厚生科学研究費を助成して頂きました、厚生省厚生科学特別研究事業関係者各位に深謝致します。

本研究は、日本大学医学部薬理学教室において、石川 絃一 教授のご指導とご支援のもとで行われました。日本大学医学部脳神経外科学教室 片山 容一 教授には、貴重なご助言を頂きました。酸素非依存的酵素電極システムの開発には、東京ガス(株)フロンティアテクノロジー研究所 河野 匡 博士、ラット脳内グルタミン酸測定系の立ち上げ進展は、日本大学医学部 入部 雄司 博士、酵素電極改良開発は、ニューロサイエンス(株)松本裕一氏のご尽力を頂きました。日本大学医学部 石井 敬基 博士、同 高橋 泰夫 博士、同 加藤 公敏 博士、同 永田 俊人 医師、同 山下 晶子 博士、東海大学医学部 木の上 高章 博士、日本大学歯学部 國松 輝仁 博士 各位には、数々のご協力とご助言を賜りました。諸先生方に深く感謝致します。又、報告書製作にあたりご尽力下さいました(株)博 美様に深謝致します。