

一話 題一

脳虚血再灌流における free radical の役割

多摩永山病院脳神経外科 戸田 茂樹

はじめに

組織の虚血再灌流時に活性酸素を中心とした free radical が発生し生体に対して種々の反応を示すことは広く知られていることと思います。脳疾患においても一過性脳虚血発作、脳梗塞後の自然な再灌流や血栓溶解療法を行った後の再灌流、手術時の一時的な血管閉塞後の再灌流などの状況で活性酸素種の関与が考えられており、活性酸素種としては superoxide (O_2^-), hydroxyl radical ($OH^\cdot$), nitric oxide (NO) が主として関与していると考えられています。しかし、いずれの活性酸素種も反応性が高くすぐに反応し酸化物を生成してしまい実際に *in vivo* で活性酸素種、そのものを捕らえることは困難です。私たちはこれまでにラットを用いた前脳虚血再灌流モデルを作製し脳虚血再灌流における活性酸素種の役割についての実験をしてきましたので、その結果について考察し話題を提供したいと思います。

方法

1. モデルの作成

雄の Wistar rat (250 から 300 g) を用いて Pulsinelli らの 4 血管閉塞モデルを顕微鏡下で両側椎骨動脈を第 2 頸椎レベルで焼灼し、マイクロ用の鉗で切断するという独自に改良したモデルを作成し実験に供した。次に両側総頸動脈を露出し sugita の脳動脈瘤用のクリップを用い虚血再灌流を行った。

2. 活性酸素消去能の測定

両側総頸動脈閉塞を 45 分間、再灌流を 0~24 時間としそれぞれの再灌流後直ちに断頭し脳を一塊として採取、大脳半球間裂で左右に分断し、それぞれの中心前回を含む場所を約 50~100 mg 採取して sample とした。Electron Spin Resonance (ESR) を用いて河野らの方法によりあらかじめ既知濃度の Superoxide dismutase (SOD) を用いて検量線を作成しておき、sample を ESR で定量し検量線を用いて活性酸素消去能として測定した。

3. 活性酸素種の同定

同様に両側総頸動脈閉塞を 45 分間、再灌流を 0, 5, 10, 15 分とし、上記と同様の部位を採取、すぐに DMPO (5,5-Dimethyl-1-Pyrroline-N-Oxide) を用いて radical を trap させ、それを ESR で定性的に測定、検出されたスペクトルによって活性酸素種の同定を行った。

結果

1. 活性酸素消去能の測定

再灌流 45 分後に活性酸素消去能は有意に低値を示し、再灌流 12 時間後には有意に増加を示した。

2. 活性酸素種の同定

再灌流 5, 10, 15 分のいずれでも ascorbic acid radical が

e-mail: s-toda@nms.ac.jp

Journal Website (<http://www.nms.ac.jp/jnms/>)

検出されたが、sham および再灌流をしないグループでは活性酸素種のスペクトルは検出されなかった。

考察

脳の虚血再灌流時に活性酸素種の発生しているだろうことは周知の事実と思われるが、実際にどのような活性酸素種が発生しどのような役割を演じているのかは不明な点が多い。これは活性酸素種が非常に反応性に富んでいるために発生後すぐに過酸化反応をおこし姿を変えてしまうためである。したがって、これまで *in vivo* での多くの実験においては間接的に活性酸素の発生を証明したり、scavenger の使用により症状の変化をみているにすぎない。

脳虚血再灌流においては主として O_2^- が発生し、それが再灌流障害では大きな役割を演じているだろうと考えられている。そこで私たちは ESR を用いてラット脳虚血再灌流における活性酸素消去能の測定を行ったところ再灌流 45 分まで有意に減少したが、これは活性酸素種の発生により、その消去物質の消費が起こっているためと考えられ、一方再灌流 12 時間後に活性酸素消去能が有意に増加したのは、その消去物質が集積、あるいは合成が進んだためと考えられる。生体における消去能の主たる物質としては SOD, vitamin C・E などが考えられているが、脳には SOD のほか他臓器に比して vitamin C の濃度が高いとされ、vitamin C の活性酸素消去物質としての役割が大きいことが予想されている。

そこで実際に脳虚血再灌流時における活性酸素種の捕捉を ESR を用いて試みたところ再灌流の時間にかかわらず ascorbic acid radical が検出された。しかし、再灌流時に発生し過酸化反応を惹起していると考えられる O_2^- や $OH^\cdot$ などのスペクトルは捕らえることが出来なかった。これは O_2^- , $OH^\cdot$ は反応性に富んでおり発生してすぐに周囲に過酸化反応を起こし自身は変化をきたしたため捕らえられなかったものと考えられる。前述の通り ascorbic acid は活性酸素消去能の大きな役割を演じていることが予想されるが、おそらく再灌流により何らかの活性酸素種が発生し、ascorbic acid がそれを消去するために反応し ascorbic acid radical に変化し検出されたものと考えられた。

以上より脳虚血再灌流においては何らかの活性酸素種の発生がみられ、活性酸素消去物質の量の変動が認められる。また、活性酸素と反応したとみられる ascorbic acid radical も捕らえられたが、現在のところ再灌流直後に発生する活性酸素種を *in vivo* で直接捕らえられてはならず今後の課題である。

詳細は以下の学会において報告させていただいた。Role of Ascorbic Acid and SOD-like substance in Cerebral Ischemia-Reperfusion. Scientific Program of the 2000 Annual Meeting of the American Association of Neurological Surgeons, Moscone Convention Center, San Francisco, California: April 8-13, 2000.

(受付: 2000 年 6 月 30 日)

(受理: 2000 年 7 月 25 日)