



Oxygen radical production in rat ischemic cortex measured by intravital fluorescence imaging

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2017-01-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 王, 勇 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/792

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 530号	学位授与年月日	平成21年 3月18日
氏 名	王 勇		
論文題目	Oxygen radical production in rat ischemic cortex measured by intravital fluorescence imaging (ラット生体内蛍光イメージングによる脳表での活性酸素産生の評価)		

博士(医学) 王 勇

論文題目

Oxygen radical production in rat ischemic cortex measured by intravital fluorescence imaging

(ラット生体内蛍光イメージングによる脳表での活性酸素産生の評価)

論文内容の要旨

[目的]

今回我々は、虚血性神経細胞死の病態に重要な役割を果たしていると考えられている活性酸素 ($\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$) の産生を、生体内蛍光イメージング法により、個体レベルで評価・検討することを試みた。

[材料及び方法]

ラット脳虚血モデル：Sprague-Dawley ラット（雄、体重 300g、SLC Inc, Japan）を全身麻酔・自発呼吸下に管理し実験を行った。両側椎骨動脈を熱焼灼し、引き続いて両側頸動脈にバルーンオクルーダ (Unique Medical Inc, Japan) を装着し、そのバルーンを膨らませることにより 10 分間の一過性前脳虚血を負荷した。

蛍光色素投与：脳内の細胞を蛍光ラベルするために、pressurized bolus injection 法の変法で蛍光色素を投与した。定位脳手術式に、大脳皮質 (Bregma より 3.6 mm 尾側、2 mm 側方、深さ 1 mm) を目標点として、蛍光色素($5.0 \mu\text{l}$)を満たした微小ガラスピペットを刺入し、窒素ガスにより加圧して $2.5 \mu\text{l}$ を bolus injection した。蛍光色素投与後 30 分間ガラスピペットを静置した後に抜去し観察を行った。

大脳皮質の活性酸素蛍光イメージング：蛍光色素投与後に、closed cranial window を設置し、マルチピンホール式共焦点スキャナ(CSU-21, Yokogawa, Japan)を装着した正立顕微鏡 (BX50WI, Olympus, Japan)により、大脳皮質の蛍光観察を行った。30 秒ごとに 10 分間の前脳虚血前後のイメージをイメージインテンシファイアーと CCD カメラで記録した。スーパーオキシド ($\cdot\text{O}_2^-$) のイメージングには、MitoSOX [励起光(Ex)/蛍光(Em) = 510/560 nm, $5 \mu\text{M}$, Molecular probes, Invitrogen, USA] を用い、ヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)のイメージングには、hydroxyphenyl fluorescein (HPF, Ex/Em = 490/515 nm, $20 \mu\text{M}$, Daiichi Pure Chemicals, Japan)を用いた。

虚血による蛍光強度変化の補正：赤血球中のヘモグロビンは Ex 及び Em を吸収するので、虚血すなわち局所のヘモグロビン量の低下は蛍光強度を増加させる可能性がある。これを検討するために、使用する蛍光色素と同様の励起光・蛍光特性を持つ蛍光ビーズ(fluoromicrospheres, $0.2 \mu\text{m}$ diameter)を蛍光色素と同様の方法で脳内に投与し、蛍光色素の場合の蛍光観察と同様の条件にして、虚血前後の蛍光ビーズの蛍光強度変化を記録した。この蛍光ビーズの蛍光強度変化の結果に基づいて蛍光色素による結果を補正した。

SOD、一酸化窒素(NO)消去剤、Edaravone 投与の蛍光強度変化に及ぼす影響：SOD ($8 \times 10^5 \text{units/kg}$, Sigma)及び NO 消去剤である Carboxy-PTIO(1mg/kg , iv)は虚血前 5 分、Edaravone(3.0mg/kg , iv)は虚血前 5 分と再灌流前 5 分に投与し、 $\cdot\text{O}_2^-$ 及び $\cdot\text{OH}$ の産生をイメージング法により評価した。

[結果]

1. 虚血再灌流時の大脳皮質活性酸素の産生：大脳皮質に蛍光色素と同様に投与した蛍光ビー

ズ (MitoSOX 対象の Em/Ex=510/560nm と HPF 対象の Ex/Em=490/515nm) の蛍光強度は、 $130 \pm 13.7\%$ まで上昇し再灌流後に基礎値に戻った。これらの結果は、虚血により純粋に光学的な理由で虚血中は蛍光強度が増加することを意味しており、それぞれの計測時点において“補正值=蛍光色素の平均蛍光強度/蛍光ビーズの平均蛍光強度”の式で補正を行った。補正したデータでは、MitoSOX、HPF とともに虚血中は蛍光強度が増加せず、再灌流時にのみ MitoSOX と HPF の蛍光強度が増加、すなわち $\cdot O_2^-$ と $\cdot OH$ の産生が著明であった。部位別に $\cdot O_2^-$ と $\cdot OH$ の産生を評価したところ、いずれも動脈壁に近い部位で ROS の産生が著明であった。

2. SOD、NO 消去剤、Edaravone 投与の効果：虚血前 5 分での SOD 投与では、細胞外 $\cdot O_2^-$ の消去により MitoSOX の蛍光強度は半分ほど低下し、MitoSOX により $\cdot O_2^-$ を検出していることが確認できた。HPF は $\cdot O_2^- + NO \rightarrow \cdot ONOO_2^-$ により生成されるパーオキシナイトライトともわずかに反応するが、Carboxy-PTIO により NO を消去した場合でも、HPF の蛍光強度増加に有意な変化はなく、HPF でパーオキシナイトライトを検出していない(無視しうる)と判断され、HPF による蛍光強度増加は $\cdot OH$ の産生と見なし得ると考えられた。Edaravone は虚血前 5 分と再灌流前 5 分での投与でも HPF の蛍光強度は有意($p < 0.01$)に低下し、虚血負荷のないコントロール群と有意差がなかった。すなわち、Edaravone(3.0 mg/kg, iv)は、虚血前投与はもとより再灌流前の投与でも完全に $\cdot OH$ を消去していた。

[考察]

今回の研究で明らかになったことは：1) $\cdot O_2^-$ と $\cdot OH$ の産生は虚血中ではなく再灌流早期に著明であり；2) $\cdot O_2^-$ と $\cdot OH$ の産生はいずれも動脈壁に近い部位で著明であった。3)Edaravone (3.0 mg/kg, iv)は、虚血前投与はもとより再灌流前の投与でも $\cdot OH$ を完全に消去していた。本実験で用いた共焦点顕微鏡の観察深度は 60 μm 程度(大脳皮質第 1,2 層)であり、この範囲には 10 分間の一過性前脳虚血による虚血細胞死は見られず、ROS の発生と細胞死の関連は検討できなかったが、個体レベルでの生体内蛍光イメージング法により、リアルタイムに活性酸素産生を評価し、活性酸素消去剤の消去効果を確認したのは本研究が初めてである。さらにイメージングにより、活性酸素産生が動脈壁近傍に著明であることも初めて明らかにした。

[結論]

脳虚血再灌流では血流再開後に活性酸素が発生し、再灌流前までに投与した活性酸素消去剤の治療効果が望める。我々の生体内蛍光イメージング方法は、個体レベルの病態研究に有用である。

論文審査の結果の要旨

申請者は、虚血性神経細胞死の病態に重要な役割を果たしていると考えられている活性酸素(スーパーオキシド($\cdot O_2^-$)、ヒドロキシラジカル($\cdot OH$))の産生を、生体内蛍光イメージング法により、個体レベルで評価、検討することを試みた。

以下の方法を用いて行った。

Sprague-Dawley ラットに 10 分間の一過性前脳虚血を負荷した。脳内の細胞を蛍光ラベルするために、pressurized bolus injection 法の変法で蛍光色素を投与した。蛍光色素を満たした微小ガラスピペットを刺入し、窒素ガスにより加圧して投与した。蛍光色素投与後 30 分間ガラスピペットを

静置した後に抜去し観察を行った。蛍光色素投与後に、closed cranial window を設置し、マルチピンホール式共焦点スキャナ(CSU-21, Yokogawa, Japan)を装着した正立顕微鏡(BX50WI, Olympus, Japan)により、大脳皮質の蛍光観察を行った。30 秒ごとに 10 分間の前脳虚血前後のイメージをイメージインテンシファイアーと CCD カメラで記録した。 $\cdot\text{O}_2^-$ のイメージングには、MitoSOX を用い、 $\cdot\text{OH}$ のイメージングには、hydroxyphenyl fluorescein(HPF)を用いた。赤血球中のヘモグロビンは励起光及び蛍光を吸収するので、虚血すなわち局所のヘモグロビン量の低下は蛍光強度を増加させる可能性がある。これを検討するために、使用する蛍光色素と同様の励起光・蛍光特性を持つ蛍光ビーズを蛍光色素と同様の方法で脳内に投与し、蛍光色素の場合の蛍光観察と同様の条件にして、虚血前後の蛍光ビーズの蛍光強度変化を記録した。この蛍光ビーズの蛍光強度変化の結果に基づいて蛍光色素による結果を補正した。SOD 及び NO 消去剤である Carboxy-PTIO は虚血前 5 分、Edaravone は虚血前 5 分と再灌流前 5 分に投与し、 $\cdot\text{O}_2^-$ 及び $\cdot\text{OH}$ の産生をイメージング法により評価した。

以下の結果を得た。

大脳皮質に蛍光色素と同様に投与した蛍光ビーズの蛍光強度は、 $130 \pm 13.7\%$ まで上昇し再灌流後に基礎値に戻った。これらの結果は、虚血により純粋に光学的な理由で虚血中は蛍光強度が増加することを意味しており、蛍光ビーズを用いたデータによって補正を行った。補正したデータでは、MitoSOX、HPF ともに虚血中は蛍光強度が増加せず、再灌流時にのみ MitoSOX と HPF の蛍光強度が増加、すなわち $\cdot\text{O}_2^-$ と $\cdot\text{OH}$ の産生が著明であった。部位別に $\cdot\text{O}_2^-$ と $\cdot\text{OH}$ の産生を評価したところ、いずれも動脈壁に近い部位で産生が著明であった。

虚血前 5 分での SOD 投与では、 $\cdot\text{O}_2^-$ の消去により MitoSOX の蛍光強度は半分ほど低下し、MitoSOX により $\cdot\text{O}_2^-$ を検出していることが確認できた。HPF はパーオキシナイトライトともわずかに反応するが、Carboxy-PTIO により NO を消去した場合でも、HPF の蛍光強度増加に有意な変化はなく、HPF でパーオキシナイトライトを検出していないと判断され、HPF による蛍光強度増加は $\cdot\text{OH}$ 産生を検出していると考えられた。Edaravone は虚血前 5 分と再灌流前 5 分での投与でも HPF の蛍光強度は有意に低下し、虚血負荷のないコントロール群と有意差がなかった。

審査委員会では、虚血急性期の活性酸素の産生をリアルタイムに観察できるイメージング法を確立したこと、さらに蛍光イメージング観察に及ぼす虚血の影響を明確に示したことを高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 蛍光色素の細胞移行について
- 2) 表層からどのくらいの深さまで観察可能か
- 3) 血流に影響する薬物の評価に対しての補正法について
- 4) 蛍光色素投与法について
- 5) CA1 領域の神経細胞が障害を受けやすい理由について
- 6) CA1 と CA3 領域での活性酸素の産生と細胞死との関係について
- 7) 活性酸素の産生量と蛍光強度との関係について
- 8) 蛍光色素の細胞内分布について
- 9) 動脈壁近傍で活性酸素の産生が多い理由について

10) Carboxy-PTIO の脳内移行について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者

主査 梅村 和夫

副査 難波 宏樹

渡邊 裕司