

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19591817
 研究課題名（和文） 亜硝酸ヘモグロビン反応からの一酸化窒素による脳虚血再灌流後の
 脳神経障害軽減効果
 研究課題名（英文） Neuroprotective effects of nitric oxide derived from hemoglobin
 -nitrite reaction against cerebral ischemia-reperfusion injury.
 研究代表者
 岡本 浩嗣（OKAMOTO HIROTSUGU）
 北里大学・医学部・教授
 研究者番号：50224077

研究成果の概要：還元型ヘモグロビン-亜硝酸反応によって生成された一酸化窒素が脳虚血再灌流後の梗塞領域軽減効果をもたらし、ひいては脳神経障害軽減に確かにかかわっていることが機序とともに示され、脳保護の可能性につながる非常に重要で意義ある結果が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：脳虚血、脳保護、一酸化窒素、ヘモグロビン、亜硝酸、虚血再灌流障害

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究の学術的背景

脳虚血再灌流後の脳梗塞などによる脳神経障害は現在でもその機序や有効な治療法については全てが解明・確立されるには至っていない。脳虚血が引き起こされている条件下において、虚血部位の脳神経細胞や脳組織の適正な酸素化を保つことは、高次脳機能を含む虚血後脳機能障害を軽減させるために最も有効な手段の一つであると考えられる。

虚血脳組織への酸素運搬を高め、その酸素化を維持するためには高酸素濃度や高酸素運搬体を使用する方法のほかに、虚血・低酸素組織への側副血管を拡張させ微小循環を増加させることが挙げられる。この観点に立つと、2003年 Cosby らによって赤血球内の還元型ヘモグロビンが亜硝酸と反応し一酸化窒素 (NO) が生成され、毛細血管が拡張することで微小循環血流を増加させる系が発見さ

れたことが本研究の学術的背景として大きな意味を持つ。しかもこの NO 生成系は、従来のように NO 合成酵素を必要としないため低酸素環境でも働き、低酸素性血管拡張反応における重要な役割を担っていることが摘出したラットの太動脈で報告された (Nature Medicine 2003;9:1498)。その後、虚血再灌流モデルでも追試がなされ、Duranski らにより心臓と肝臓の再灌流モデルで (J. Clin. Invest. 2005;115:1232)、Basireddy らによって腎臓の再灌流モデルで (Am. J. physiol. 2006;291:R779)、相次いで亜硝酸ヘモグロビン反応による NO 生成系の再灌流障害軽減効果が報告された。しかしながら申請研究課題である脳虚血再灌流後の脳梗塞領域の縮小効果および脳神経障害軽減効果を検討した研究は国内外でも申請時 2006 年 10 月当初未だ報告されていなかった。

(2) これまでの研究成果を踏まえ研究申請を行った動機

研究代表者である岡本は 1996 年から NO と脳循環に関する研究に従事し、研究成果を継続的に報告してきており (Anesthesiology 1997;86:875, Anesth. Analg. 2000;91:896-903, Circ Res 2000;87:60)、2006 年には人工酸素運搬体であるヘモグロビン小胞体を使用した研究において脳虚血時に NO 供給体を投与して NO を供給すると脳虚血後の脳梗塞を減少する可能性を初めて、しかも他に先駆けて一部を報告している (Anesthesiology 2006;105:A680)。

また平成 14 から 17 年度まで 2 回の科学研究費補助金の助成を受けて (別途記載)、アラキドン酸代謝物 EETs、脳血管内交換神経 α 2B 受容体のそれぞれが脳虚血再灌流後の脳梗塞に与える影響を研究し報告してきた (Am. J. Physiol. 2002;282:H1556, Circ. Cont.

2004;25:50-55, Circ. Cont. 2005;26:24-28)。そこでこれらの研究の成果と手法をさらに発展・結合させ、還元型ヘモグロビン-亜硝酸反応によって生成される NO による低酸素性血管拡張作用を利用して脳虚血領域への酸素運搬を改善し、脳虚血再灌流後の脳梗塞領域を縮小させ、脳神経障害の軽減をはかることができるのではないだろうかと考えたのが本研究を申請するに至った動機である。

2. 研究の目的

(1) 還元型ヘモグロビン-亜硝酸反応によって生成された一酸化窒素 (以下 NO と称する) が脳虚血再灌流後の脳梗塞領域を縮小させ、脳神経障害を軽減するのではないかという仮説を検証する

(2) 脳虚血時の亜硝酸投与という新しい虚血後脳神経障害の予防・治療法を確立すること。

3. 研究の方法

(1) 動物モデルでの検討

既に研究代表者の岡本が確立し報告している実験方法である局所脳虚血後再灌流モデル (Circ. Cont. 2004;25:50-55) を使用し、還元型ヘモグロビン-亜硝酸反応によって生成される NO による低酸素性血管拡張作用が脳虚血再灌流後の脳梗塞領域を縮小させ、脳神経障害を軽減するのではないかという仮説を検証する

①局所脳虚血後再灌流モデルでの検討：慢性ラットモデルを使用 (コントロール)

麻酔導入後、人工呼吸器装着下に、定点固定装置にラットの頭部を固定し、閉鎖型脳窓を作成、レーザー血流計で局所脳血流を測定する。局所脳虚血再灌流は以下の方法で行う (Koizumi's model Jpn J Stroke 1986)。固定装置にて頭部の回旋を行った後、左内頸動脈の分枝及び左外頸動脈を結紮、切離し左

外頸動脈より先端を加工した4-0エチロン糸を左内頸動脈方向に挿入し左中大脳動脈まで到達閉塞させ脳虚血を作成する。閉塞後2時間後に再灌流を行う。慢性ラットモデルではいったん覚醒させ6日後にそれぞれラットを断頭し、脳組織を凍結後、一定の断面で切断する。2,3,5-triphenyl tetrazolium hydrochloride (TTC)の生理食塩水添加溶液の中でインキュベートしTTC染色を行い、デジタルカメラを用いて梗塞部位を撮影する。画像をPCに保存し、解析ソフトウェアを用いて梗塞領域の体積を計算する。その後Hematoxylin-Eosin (HE)染色を重ねて行い、脳神経細胞の変化を確認する。慢性ラットモデルでは覚醒後の神経学的評価をBakerらの方法(Stroke 1991)で行う。実験中の亜硝酸-還元型ヘモグロビン反応による脳組織での一酸化窒素(NO)の発生状況は申請設備であるNOセンサーを用いて測定する。

②薬理的アプローチ

亜硝酸-還元型ヘモグロビン反応によるNO生成系を促進するために以下の薬理的アプローチを行う。

a) 亜硝酸前投与による脳梗塞領域の変化；Duranskiらの心臓と肝臓の再灌流モデル(J. Clin. Invest. 2005;115:1232)を参考に亜硝酸ナトリウムを $10\mu\text{M}$ - $100\mu\text{M}$ の濃度で静脈内前投与し局所脳虚血再還流後の脳梗塞領域を検討する。

b) 一酸化窒素合成酵素(NOS)の阻害による脳梗塞領域の変化；NOS阻害薬であるL-NNAの前投与では梗塞領域に変化が生じないことを確認する。

c) NO-cGMP系の関与を確かめるため阻害薬のODQを投与し局所脳虚血再還流後の脳梗塞領域を検討する。

d) NO欠如時の脳梗塞領域の変化；NOスカベンジャーであるC-PTIO存在下で局所脳虚血

再還流後の脳梗塞領域を検討する。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

①局所脳虚血再灌流ラットモデルでの亜硝酸の効果

局所脳虚血再灌流させたラットをいったん覚醒させ、数日後に脳組織を凍結後一定の断面で切断、TTC染色を行い虚血領域の同定と範囲の測定を解析ソフトウェアを用いて体積として計算しコントロール値とした。比較検討群として亜硝酸を前投与し還元型ヘモグロビン-亜硝酸反応を利用してNOを生成させた後に局所脳虚血再灌流を行った群を用い同様に梗塞領域の体積を測定した。その結果、亜硝酸前投与群では約50%の脳梗塞軽減効果が認められた。

②薬理的インターベンション

局所脳虚血再灌流ラットの同じモデルを使用し、上記の研究で認められた脳梗塞領域軽減効果が還元型ヘモグロビン-亜硝酸反応によるNO生成系を介していることを確かめるために、NOS阻害薬であるL-NNAを投与したが亜硝酸の効果発現したためNOSによるNO生成系の関与が否定された。またcGMP-GC系を介しているかを確かめるために新たな阻害薬であるODQを使用した結果、亜硝酸の効果が影響を受けたためcGMP-GC系の関与が認められた。またさらに、活性酸素系の関与を調べるためにNOスカベンジャーCPTIOを投与したが亜硝酸の効果が影響を受けた。

③局所脳虚血再灌流ラットモデルでのNOの定量研究

局所脳虚血再灌流の準備をしたラットに亜硝酸を前投与し還元型ヘモグロビン-亜硝酸反応を利用してNOを生成させ(経静脈投

与および経腹膜的投与) NO の濃度を NO センサーを用いて測定した。その結果、静脈内投与群腹膜投与群ともでは約 50%の NO の産生増加が認められた。

(2) 得られた成果の意義と今後の展望

以上の実験結果より還元型ヘモグロビン-亜硝酸反応によって生成された NO が脳虚血再灌流後の梗塞領域軽減効果に確かにかかわっていることが機序とともに示され脳保護につながる非常に重要で意義ある結果が得られた。今後の展望として英文雑誌にここまでの結果を投稿すると同時にヘモグロビンのファクターを人為的に変化させたモデルにてさらに検証を進める計画である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

(1)

査読あり

Nakano T, Okamoto H

Dexmedetomidine-induced cerebral hypoperfusion aggravates ischemic brain injury in rats. Journal of Anesthesia 2009, in press

[学会発表] (計 2 件)

(1) 岡本浩嗣、中野貴明

亜硝酸からの NO による局所脳虚血再灌流後の脳保護効果

第 13 回神経麻酔集中治療研究会 2009. 3. 27
大阪市

(2) Okamoto H, Nakano T, Hoka S

Neuroprotective effects of nitrite against cerebral-reperfusion injury in rat

アメリカ麻酔学会、2007. 10. 15

サンフランシスコ市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 浩嗣 (OKAMOTO HIROTSUGU)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：50224077

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし