

新生仔ラットにおける脳内NO₂/NO₃測定 —マイクロダイアリシス法をもちいて—

(分担研究：脳室周囲白質軟化症(PVL)の成因と治療に関する研究)
研究協力者：田角 勝

要約：新生児期の脳虚血における一酸化窒素(NO)の役割を検討する目的で新生仔ラットの亜硝酸窒素(NO₂)/硝酸窒素(NO₃)を測定した。in vitroでNO発生物質であるNOC18(0.1 mmol)をPBSに溶解しマイクロダイアリシス回路に流したところ、NO₂として約100 pmol/20μl検出された。プローブからのNO₂の回収率は約33%であった。また作成したリンゲル液中には5-30 pmol/20μlのNO₂/NO₃が検出された。新生仔ラット線条体における灌流液中のNO₂、NO₃は各々10-20、15-40 pmol/20μl perfusateであった。同一個体での測定値は安定していたが、その絶対値においては個体差が見られた。NO₂/NO₃、特にNO₂はNOを反映して変化していると考えられ、マイクロダイアリシス法によりin vivoで経時的に測定することは新生児期の虚血性疾患におけるNOの検討に役立つと考えられる。

見出し語：マイクロダイアリシス法、一酸化窒素、酸化窒素、新生仔ラット

緒言：一酸化窒素(NO)は、血管拡張作用、フリーラジカルとしての作用、神経伝達物質の遊離調節作用などがあり、虚血時の神経細胞障害において重要な役割を担うと考えられる。新生児期においても脳室周囲白質軟化症や低酸素性虚血性脳症などの虚血性疾患においてNOはその重要性を指摘されるが、十分な検討はされていない。その1つの理由には代謝の早いNOをin vivoで安定して測定することの難しさにある。今回我々はin vivoでNOの役割を知るために、新生仔ラットを用いて亜硝酸窒素(NO₂)/硝酸窒素(NO₃)を測定しNOの動態を検討した。

研究方法：NO発生物質であるNOC18(0.1 mmol)をphosphate buffered saline(PBS、0.1 mol、pH 7.4)あるいはリンゲル液に溶解し、ダイアリシスの回路(37°C)を用いてin vitroでの検討した。in vivoの検討には7日齢のSprague-Dawley系雄新生仔ラットを用いた。マイクロダイアリシスのプローブ(Eicom社製)は、ガイドを用いて線条体に挿入、固定した。プローブを挿入後、リンゲル液を用い2μl/minで灌流し、透析サンプルを10分毎に回収した。回収したサンプルはin vitro、in vivoの実験とも外気に触れることなくオートインジェクター(AS-10)により直接酸化窒素測定分析システム(ENO-10)に注入しNO₂/NO₃を測定した。さらに新生仔ラット5匹に5%の低酸素負荷を30分間行いNO₂/NO₃の変化を見た。

研究成績：NO発生物質であるNOC18は1モルの分子から1-1.5モルのNOを放出する。今回の結果ではPBS(0.1 mol)に溶解したNOC18(0.1 mmol)は約100 pmol/20μlのNO₂として検出された。そしてin vitroでのプローブからのNO₂の回収率は約33%であった。なおNO₂はNOC18溶解前のPBS中には検出されず、NO₃は作成したPBS中に10 pmol/20μl程度存在した。またNO₃のNOC18投与による増加は5 pmol/20μlであった。またリンゲル液での同様の検討ではややデータが不安定であり回収率が低下し、NO₂/NO₃が5-30 pmol/20μl程度検出された。

in vivoで新生仔ラット線条体のNO₂/NO₃測定は同一個体では安定していたが、その絶対値において個体差が見られた。灌流液中のNO₂は10-20 pmol/20μl perfusate、NO₃は15-40 pmol/20μl perfusateであった。新生仔ラットに5%低酸素負荷を30分間施行したが、負荷中、負荷後ともNO₂/NO₃に僅かな増加を認めたのみであり、さらに検討が必要である。

考察：マイクロダイアリシス法は透析膜をつけたプローブを脳内に挿入、固定し、透析膜中を透析液で灌流し細胞外液中の神経伝達物質などを測定できる。そのため脳内の特定部位における神経伝達物質の経時的変化を見るために用いられる。一方、NOの測定方法には電極法や化学的発光法による測定などがあるが、生体内でのNO測定は難しく、いくつかの問題点を持つ。今回新生仔ラット線条体でマイクロダイアリシス法を行い、Griess法の応用でNO₂およびNO₃を測定した。この分析システムはNO₂、NO₃をカラムで分離した後、NO₂が酸性溶液中で芳香族第一アミンと反応して生ずるアゾ化合物に芳香族アミン類を加えてカップリングして生ずるジアゾ化合物の赤色の吸光度を分光光度計で測定するシステムである。そしてNO₃は粒状カドミウム還

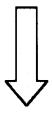
元カラムを通すことによりNO₂に還元した後同様に測定する。測定は安定しており感度はpmol/20μl程度であり、再現性も良かった。なおサンプルはオートインジェクターにより直接酸化窒素測定分析システムに注入し測定することにより、外部からの混入を避けた。

生体内で産生されたNOは酸素と結びついてNO₂/NO₃となり、生体内でのNOの半減期は約6秒とされる。このためNO₂/NO₃の変化はNOを反映すると考えられる。今回の結果でもNO発生物質投与によりNO₂/NO₃が増加し、特に増加の多いNO₂の変化がNOを反映すると考えられた。Malinskiら¹⁾は成熟ラットでの脳内NO濃度は10-8 mol以下で中大脳動脈の結紮による虚血で10-6molに上昇すると報告している。またShintaniら²⁾は成熟ラット小脳においてマイクロダイアリシス法によりN-methyl-D-aspartateを投与するとNO₂が負荷中に増加し、nitric oxide synthase(NOS)阻害剤投与により抑制されるためこれはNOS由来のものであるとしている。NO₂/NO₃はNOを反映して変化していると考えられ、マイクロダイアリシス法により経時的に測定することは新生児期の脳質周囲白質軟化症や低酸素性虚血性脳症におけるNOの役割を検討するのに役立つと考えられる。NO動態について新生仔ラットでのin vivoの検討は十分でなく、今回の5%低酸素負荷ではほとんど変化がなかったが、さらに検出方法も含めて検討が必要である。

結論：in vivoでのNOの役割を見る目的でNO₂/NO₃の測定を行うことは有用と思われる。特にNO₂がNOの変化を反映していた。しかしながら、本法で測定したNO₂/NO₃が生体内のNOを十分に反映しているかどうか、どの程度が回収されているかなど、いくつかの注意点があることがわかった。

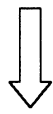
参考文献：

- 1) Malinski T et al.: Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion, J Cereb Blood Flow Metab, 13: 355-358, 1993.
- 2) Shintani F et al.: Measurement by in vivo brain microdialysis of nitric oxide release in the rat cerebellum, J Psychiatr Neurosci, 19: 217-221, 1994.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約:新生児期の脳虚血における一酸化窒素(NO)の役割を検討する目的で新生仔ラットの亜硝酸窒素(NO₂) /硝酸窒素(NO₃)を測定した。in vitro でNO発生物質であるNOC18 (0.1 mmol)をPBSに溶解しマイクロダイアリス回路に流したところ、NO₂として約100 pmol/20 μl 検出された。プローブからの NO₂⁻の回収率は約 33%であった。また作成したリンゲル液中には5-30 pmol/20 μl のNO₂/NO₃が検出された。新生仔ラット線条体における灌流液中のNO₂、NO₃は各々10-20、15-40pmol/20 μlであった。同一個体での測定値は安定していたが、その絶対値においては個体差が見られた。NO₂/NO₃、特にNO₂はNOを反映して変化していると考えられ、マイクロダイアリス法により in vivo で経時的に測定することは新生児期の虚血性疾患におけるNOの検討に役立つと考えられる。