

NMDA 負荷時の新生仔ラット線条体の 興奮性アミノ酸および一酸化窒素動態

(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: 7および14日齢の新生仔ラット線条体にマイクロダイアリシス法を用いてNMDAを投与し、灌流液中の興奮性アミノ酸および一酸化窒素 (NO) 代謝産物であるNO₂/NO₃について検討した。NMDA負荷は灌流液中に1mmolのNMDAを入れ40分間行った。NMDA負荷時の興奮性アミノ酸は投与中に増加し、負荷終了後も高値を示した。その増加は7日齢と14日齢による差を認めなかった。NO₂/NO₃はいずれの日齢でも負荷中に軽度増加し、14日齢では負荷終了後に著明なNO₂の増加を認めた。これらの変化はL-NAME (3mg/kg) を投与することにより抑制された。7日齢と14日齢ラットでは日齢による変化の違いが大きく、日齢によるNOの役割の相違が示唆された。

見出し語: 一酸化窒素, 興奮性アミノ酸, マイクロダイアリシス法, 新生仔ラット

緒言: 興奮性アミノ酸と一酸化窒素 (NO) は、虚血時の神経細胞障害において重要な役割を担う。その機序として虚血により興奮性アミノ酸であるグルタミン酸が放出され、シナプスのグルタミン酸濃度が上昇するとN-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体チャンネルが開き、それによりカルシウムイオンが細胞内へ流入し神経細胞障害がおこると考えられる¹⁾。そして流入したカルシウムイオンは一酸化窒素合成酵素 (NOS) を活性化しNOが産生される。産生されたNOは血管拡張作用、フリーラジカルとしての作用、神経伝達物質調節作用など様々な作用を持ち、神経保護と神経毒性の両面からの報告がみられる²⁾。今回我々は新生仔ラット線条体にNMDAを投与し興奮性アミノ酸およびNOの変化をみることにより、これら物質からみた新生仔期の神経細胞障害の特徴を検討することを目的とした。

研究方法: 7および14日齢のSprague-Dawley系新生仔ラットを用いた。マイクロダイアリシスはハロタン麻酔下でプローブ挿入のためのガイドを固定し、プローブ (直管型, 直径0.22mm, 膜長2mm, Eicom社製) を線条体外側に挿入・固定した。なお実験終了後に挿入部位が線条体であることを確認した。灌流はリンゲル液で2μl/minの灌流速度で行った。

サンプル回収は約2時間の回復期をおいた後、自由行動状態で行った。また実験をヒーター上で行うことにより直腸温、脳温を37°C前後に保った。

コントロール群は負荷を行わず約5時間の変化を検討した。NMDA負荷群としてNMDAの負荷は灌流液に1mmol入れ、pHを7.2-7.4にあわせ40分間行った。またNOS阻害剤であるNG-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME) 3mg/kgをNMDA負荷1時間前に投与し、同様のNMDA負荷を行った。透析サンプルは10分毎に酸化窒素測定分析システム (ENO-10, Eicom社製) に注入しNO代謝産物であるNO₂/NO₃を測定した。また興奮性アミノ酸はサンプルを回収した後、HPLC蛍光測定システムにより測定した。

研究成績: 7日齢 (n=11) および14日齢ラット (n=5) のコントロール群のアスパラギン酸の基礎値は7日齢と14日齢で各々3.10±0.17 (平均±標準誤差) pmol/30μl perfusate, 4.79±0.40 pmol/30μl perfusate, グルタミン酸は8.62±0.45 pmol/30μl perfusate, 17.24±1.12 pmol/30μl perfusateと14日齢において高値を示した。これら細胞外液中興奮性アミノ酸は5時間の経過中に大きな変化を認めなかった。コントロール群におけるNO₂/NO₃ (n=5) はNO₂が0-5pmol/20μl perfusate, NO₃は20-30pmol/20μl perfusateであった。経過中NO₂はやや低下傾向、NO₃は3-4時間後より増加傾向がみられ、その傾向は14日齢において強かった。

NMDA負荷群の7日齢 (n=7) および14日齢 (n=7) の興奮性アミノ酸はNMDA投与により負荷前に比較し2倍程度の増加を示し、負荷終了後も増加傾向が残った。NMDA負荷群のNO₂/NO₃は7日齢 (n=3) で負荷中に一過性に軽度増加し、NO₂は負荷終了後に軽度ではあるが徐々に増加した。14日齢 (n=3) では負荷中に軽度増加し、負荷終了後また増加するという2相性の変化を示し5時間後には平均で120 pmol/20μl perfusateとなった。L-NAME (3mg/kg) を負荷1時間前に投与するといずれの群 (7日齢: n=3, 14日齢: n=4) においてもNMDA負荷によるNO₂の増加は抑制され、負荷前値も下まわった。

考察: 新生仔ラットにおけるマイクロダイアリシス法による実験は、in vivoで連続してサンプルの回収することができることや灌流液中に薬剤を入れることにより脳内に直接薬剤投与ができるという利点がある。今回の実験では1mmolのNMDA投与により興奮性アミノ酸は増加したが、日齢による変化は少なかった。NMDAを直接脳内に投与した実験では7日齢がもっとも脳障害を起こしやすい時期³⁾と考えられているが、この障害と細胞外液中の細胞外液中興奮性アミノ酸の量とは必ずしも一致していなかった。

またNMDA投与によりNO₂/NO₃の細胞外液中濃度の増加が起こる。この増加はNOS阻害剤であるL-NAMEにより抑制されることによりNOS由来であると考えられた。そしてNO₂/NO₃の変化は14日齢が大きく、14日齢において神経障害が少ない報告³⁾を考えれば、NMDAによる神経障害はNOの毒性によるものとは考えにくく、NOが神経障害に対して防衛的に働いていることを示す可能性もある。また数時間後からNO₂の著明な増加が見られることは、急性期の変化より後の変化にNOの果たす役割が大きく、誘導型NOSがより重要であるかもしれない。NOS阻害剤の虚血障害の防禦に関しては様々な報告²⁾があるが、今回の実験のようにNOS阻害剤の使用により負荷前値以下になることはNOS阻害剤がNOの生理機能を阻害してしまうことも考慮されねばならない。

このような日齢によるNO産生の相違の理由として1つにはNMDA受容体チャンネルのサブタイプの分布が日齢により異なり⁴⁾、サブタイプによりカルシウムイオンの透過性の違いがある。このサブタイプの違いにより新生仔期ではグルタミン酸が細胞外液中に増加してもカルシウムの流入が少ないため、NOSの活性化が少ないと考えられる。またNOS含有細胞の分布が日齢により異なり新生仔ラットでは少ないことも理由の1つとしてあげられる。

結論: 新生仔ラットに対するNMDA負荷は細胞外液中興奮性アミノ酸の増加において日齢による差を認めなかった。それに比較しNOの反応は14日齢で大きく、7日齢による反応と異なった。これらのことは新生仔期においてNMDA受容体チャンネルのサブタイプの分布や発達、NOS含有細胞の分布や活性化が異なることを反映していると考えられた。

参考文献

- 1) 桐野高明: 虚血性神経細胞死. Annual Review 神経, 119-131, 1993.
- 2) 長壽寿昭, 松居徹. NO産生増大による虚血性脳損傷. 実験医学, 13: 1011-1019, 1995.
- 3) McDonald JW, Johnston MV.: Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. Brain Res Reviews, 15:41-70, 1990.
- 4) 森寿, 三品昌美: NMDA受容体チャンネルの分子多様性と生理機能. 日薬理誌 108:1-12, 1996.



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: 7 および 14 日齢の新生仔ラット線条体にマイクロダイアリス法を用いて NMDA を投与し, 灌流液中の興奮性アミノ酸および一酸化窒素(NO)代謝産物である NO₂/NO₃ について検討した. NMDA 負荷は灌流液中に 1mmol の NMDA を入れ 40 分間行った. NMDA 負荷時の興奮性アミノ酸は投与中に増加し, 負荷終了後も高値を示した. その増加は 7 日齢と 14 日齢による差を認めなかった. NO₂/NO₃ はいずれの日齢でも負荷中に軽度増加し, 14 日齢では負荷終了後に著明な NO₃ の増加を認めた. これらの変化は 1-NAME (3mg/kg) を投与することにより抑制された. 7 日齢と 14 日齢ラットでは日齢による変化の違いが大きく, 日齢による NO の役割の相違が示唆された.