

磁気共鳴と医学

VOL. **11** **2000**

MAGNETIC RESONANCE IN MEDICINE

編集 **桑原幹典**

吉川敏一

執筆者名

表題

日本医学館

鉄塩誘導てんかんモデルラットの無麻酔自由行動条件下における 海馬抗酸化能力の減弱

-無麻酔自由行動条件下でのX-band ESRを用いた検討-

土井拓¹⁾, 植田勇人¹⁾, 中島暉²⁾, 横山秀克³⁾, 徳丸潤¹⁾, 三山吉夫¹⁾, 保田昌秀⁴⁾
大矢博昭³⁾, 鎌田仁³⁾

¹⁾宮崎医科大学精神医学講座, ²⁾宮崎医科大学化学, ³⁾山形県テクノポリス財団生物ラジカル研究所, ⁴⁾宮崎大学地域共同研究センター

Anti-Oxydant Ability in the Hippocampus of Fe⁺⁺⁺-induced Epilepsy Model: the Methodology of in vivo Microdialysis applied to ESR and the Protective System against the Pyramidal Cell Death in the Hippocampus

Taku Doi, Yuto Ueda¹⁾, Akira Nakajima²⁾, Hidekatsu Yokoyama³⁾, Jun Tokumaru¹⁾, Yoshio Mitsuyama¹⁾, Masahide Yasuda⁴⁾, Hiroaki Ohya-Nishiguchi³⁾ and Hitoshi Kamada³⁾

¹⁾Dept. of Psychiatry, ²⁾ Dept. of Chemistry, Miyazaki Med. College, 5200 Kihara, Kiyotake, Miyazaki 889-1692, Japan; ³⁾ Div. of ESR tech., Inst. for Life Support Tech., Yamagata Tech. Foundation, 2-2-1 Matsuei, Yamagata 990-2473, Japan; ⁴⁾Miyazaki University, Cooperative Research Center, 1-1 GakuenKibana-dai nishi, Miyazaki 889-2192

To analyze the hippocampal anti-oxydant ability in the Fe-induced epilepsy model, microdialysis was used to monitor the sequential changes of an exogenous nitroxide radical by X-band ESR in the freely moving rats. Nitroxide radicals used in this study are 200mM 3-methoxy carbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl (PCAM) i.p. administration and 300mM 3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl(carbamoyl-PROXYL) perfused into the hippocampus for 70 min at 3ul/min. Each half-life of carbamoyl-PROXYL and PCAM in the epilepsy model was statistically longer than that of control, respectively. Prolonged half-life of carbamoyl-PROXYL reveals the decreased anti-oxydant ability in the extracellular space (ascorbic acid), while prolonged half-life of PCAM indicates the decreased anti-oxydant ability in the neuronal membrane (ascorbic acid and α -tocopherol). The result of the decreased hippocampal anti-oxydant ability is possibly due to lipid peroxidation induced by the repetitive seizures, and the decreased anti-oxydant ability will result in the more severe damage in the pyramidal cell of the hippocampus.

KEY WORDS

Epilepsy, ESR, nitroxide radical, in vivo microdialysis, anti-oxydant ability

1. 緒言

脳内にて様々なメカニズムを通じ発生するフリーラジカルは中枢神経疾患の病態を左右する因子として注目されるが、その一方でラジカル攻撃に対する防御システム機構としての脳実質内抗酸化物質も重要な働きをしているとの観点から、両者間のバランスの検討が行なわれてきた。その指標としてin vivo ESR(共振周波数1GHz以下)を用い麻酔下の動物におけるニトロキシドラジカルの減衰速度が比較検討された^{1,2,3)}。しかし、てんかんモデルなどけいれん発作を主体とする疾病モデルで抗酸化能力を検討する場合、無麻酔自由行動という条件で観察することが望ましく、無麻酔自由行動条件下での脳内におけるニトロキシドラジカルの減衰速度を検討するにはin vivo ESRを用いた手法では困難である。我々は既に、in vitro X-band ESRと脳内微小透析法を組み合わせ、無麻酔自由行動条件下でけいれん重積中の脳内抗酸化能力の検討を可能にした実験方法を報告した⁴⁾。本研究では脳内マイクロダイアリース法を応用し、てんかんモデルにおけるニトロキシドラジカルの脳内減衰速度をin vitro ESR装置を用いて計測、ラジカル攻撃に対する防御システム機構としての抗酸化能力を評価した実験結果を紹介する。なお、本実験は宮崎医科大学動物実験委員会の承認(1998-155-2)を得て行なわれたものである。

2. 実験方法

Wistar系雄性ラットを実験動物として使用し、ラットは4群(A, B, C, D群; 各群n=7)に分けた。

2-1. てんかんモデル作成

本実験ではてんかんモデルとして鉄塩誘導てんかんモデルを用いた。B群とD群に対しネブタール麻酔下に、右扁桃体へFeCl₃水溶液(1.5 μl, pH 2.2)の注入を行い、各群の対照群としてのA群, C群にはpH 2.2に調整した生理食塩水1.5 μl注入、手術一カ月を経過した後、脳内微小透析を施行した。

2-2. ニトロキシドラジカル

使用したニトロキシドラジカルは以下の二種類である。

①blood-brain barrier (BBB)非通過ラジカル:3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl (carbamoyl-PROXYL)をRinger溶液にて300mMに調整した。

②blood-brain barrier (BBB)通過ラジカル:3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl (PCAM)生理食塩水にて200mMに調整した^{3,5)}。

2-3. 脳内微小透析プローブの留置

右扁桃体注入手術から1カ月が経過した全群のラットに対し再度ネブタール麻酔下にて、右海馬腹側部灌流目的であるマイクロダイアリース用のガイドカニューレを植え込み、その後5日間の回復期を設けた後、微小透析プローブを急性留置した⁶⁾。

2-4. ニトロキシドラジカル投与

A群とB群に対してはcarbamoyl-PROXYLを、C群とD群に対してはPCAMを投与した。

①carbamoyl-PROXYLは非BBB通過ラジカルであるためprobeを通じて3 μl/minの速度で灌流投与、70分後Ringer液での灌流に切り替え、3時間後から20分間隔で灌流液を回収した。

②BBB通過ラジカルである200mM PCAM生食溶液は2ml腹腔内投与し、その後3 μl/minの速度で回収される灌流液を20分間隔で採取した。各々のサンプルのESR計測(RE-1X、日本電子)を行い、信号強度(低磁場側のスペクトルのピーク長)の時間変化を記録した。ESR測定条件を次に記す。magnetic field, 335.3±5 mT; microwave frequency, 9.43 GHz; microwave power, 8 mW; modulation width, 0.1 mT; scan speed, 5 mT/min; time constant, 0.1 sec。

3. 結果

3-1. 行動上の変化

B群及びD群のすべてのラットにおいて鉄塩投与後2日以内に部分発作、15日以内に全般化発作が出現した⁷⁾。それに対し、A群及びC群では何ら行動上の変化は観察されなかった。また、すべてのラットにおいて脳内微小透析灌流中には何ら行動上の変化は観察されず、灌流が発作間歇期に行われていることを確認した。

3-2. 脳内微小透析:

計測を行ったすべてのサンプルで信号強度は指数関数的な減衰を示したので、減衰のパラメータとして半減期を用いることにした(Figure 1)。海馬腹側部(CA1領域)から回収されるBBB非通過ラジカルcarbamoyl-PROXYLの半減期はA群で45.057±2.9489 min(mean±S.E.M.)、B群で86.74±15.696 minであり、鉄塩誘導てんかんモデルで半減期の延長

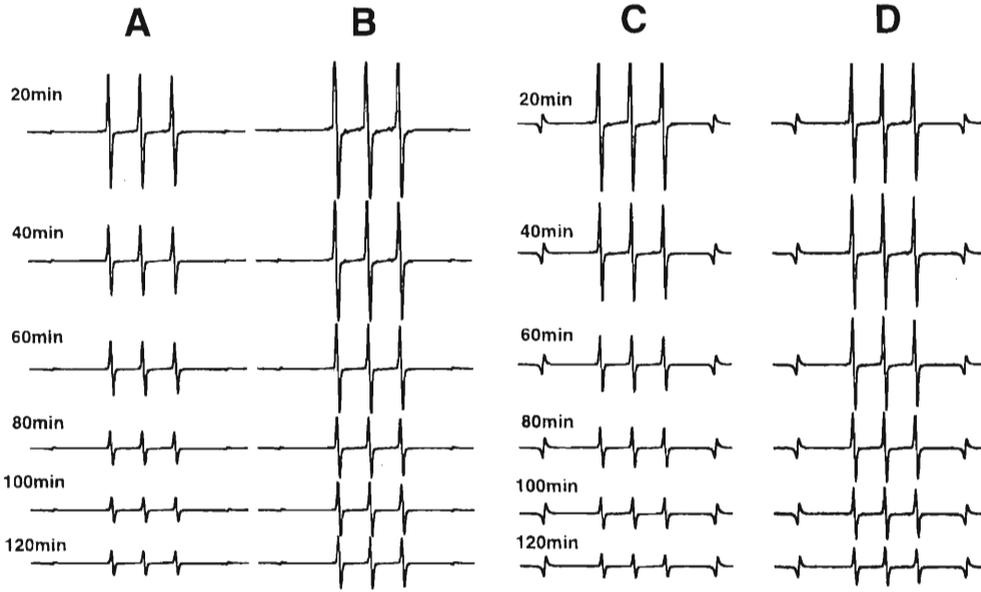


Figure 1: Spectra of carbamoyl-PROXYL (Fig. 1A and B) and PCAM (Fig. 1C and D) of the dialysates from the hippocampus. We measured the ESR signal intensity as the peak-to-peak height of the low field component ($M_s = +1$) of PCAM. Rate of elimination of the spectra of B and D is slower than that of A and C, respectively.

(Student t-test, $p < 0.05$)が見られた。また、BBB通過ラジカルPCAMの信号強度半減期はC群で 34.115 ± 2.0196 min、D群で 43.729 ± 3.8349 minであり、てんかんモデルで延長を示した($p < 0.01$)(Figure 2)。

4. 考察

今回用いたニトロキシドラジカルは、アスコルビン酸により還元され、常磁性を失うことが知られている^{3,8)}。この還元速度は α -トコフェロールの共存下で亢進する⁸⁾。Carbamoyl-PROXYLを使用した実験でその半減期が延長した結果は、主に細胞外液に存在する抗酸化剤(アスコルビン酸主体)の減弱を反映したものである。

次にPCAMは腹腔内から脳実質へ血管輸送され、細胞内から細胞外にleakしてきたものを脳内微小透析法のプローブを介し回収される関係上、てんかんモデルの海馬神経細胞膜でのアスコルビン酸と α -トコフェロール系が実質上対照群と比較し減弱してきていることを示唆するものである。

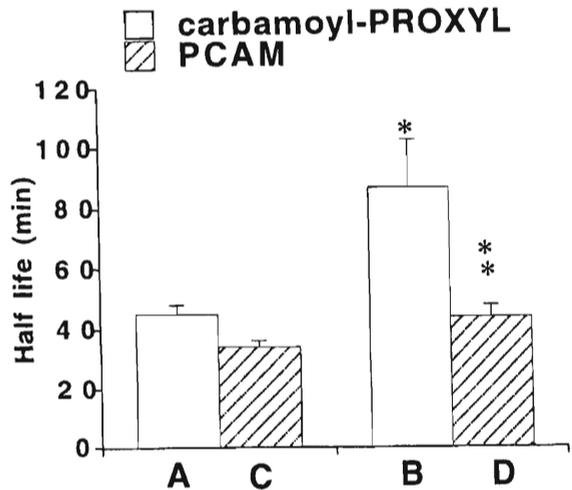


Figure 2. Comparison of half-life between control and Fe^{2+} -induced epilepsy model.

* $P < 0.01$, ** $P < 0.05$, vs control (Student t-test)

てんかんモデルにおいては、神経細胞の壊死性変化やgliosisの進行を主体とした海馬硬化なる

特徴的神経病理所見が得られるが、その生化学的自体は神経細胞膜の過酸化にあると考えられる^{9,10}。今回提示した結果は、神経細胞膜を構築する不飽和脂肪酸の過酸化進行に対する防御システム機構としての抗酸化能力が、てんかん発作急性のみならず⁴⁾、発作間歇期においても、海馬においてその能力が減弱していることを、無麻酔自由行動条件下で証明したものととして重要視される。

5. 参考文献

1. Yokoyama, H., Tsuchihashi, N., Ogata, T., Hiramatsu, M. and Mori, N. An analysis of the intracerebral ability to eliminate a nitroxide radical in the rat after administration of idebenone by an in vivo electron spin resonance spectrometer. *MAGMA*. 4: 247-250; 1997.
2. Yokoyama, H., Itoh, O., Ogata, T., Obara, H., Ohya-Nishiguchi, H. and Kamada, H. (1997) Temporal brain imaging by a rapid scan ESR-CT system in rats receiving intraperitoneal injection of a methyl ester nitroxide radical, *Magn. Reson. Imag.* 15: 1079- 1085.
3. Yokoyama, H., Lin, Y., Itho, O., Ueda, Y., Nakajima, A., Ogata, T., Sato, T., Ohya-Nishiguchi, H. and Kamada, H. (1999) EPR imaging for in vivo analysis of the half-life of a nitroxide radical in the hippocampus and cerebral cortex of rats after epileptic seizures. *Free Rad. Bio. Med.* in press.
4. Ueda, Y., Yokoyama, H., Ohya-Nishiguchi, H. and Kamada, H. (1998) ESR spectroscopy for analysis of hippocampal elimination of a nitroxide radical during kainic acid-induced seizure in rats. *Magn. Reson. Med.* 40: 491-493.
5. Sano, H., Matsumoto, K. and Utsumi, H. (1997) Synthesis and imaging of blood-brain barrier permeable nitroxyl-probes for free radical reaction in brain of living mice. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 42: 641-647.
6. Nakahara, D., Ozaki, N., Miura, Y., Miura, H. and Nagatsu, T. (1989) Increased dopamine and serotonin metabolism in rat nucleus accumbens produced by intracranial self-stimulation of medial forebrain bundle as measured by in vivo microdialysis. *Brain Res.* 495: 178-181 .
7. Ueda, Y., Willmore, L.J. and Triggs, W.J. (1998) Amygdalar injection of FeCl₃ causes spontaneous recurrent seizures. *Exp. Neurology* 153: 123-127.
8. 林一晶 (1997) In vivo ESR時空間計測法の開発と応用に関する研究. 山形大学博士論文.
9. Willmore, L.J., Hiramatsu, M., Kochi, H. and Mori, A. (1983) Formation of superoxide radicals, lipid peroxides and edema after FeCl₃ injection into rat isocortex. *Brain Res.* 277: 393-396.
10. Ueda, Y., Yokoyama, H., Niwa, R., Konaka, R., Ohya-Nishiguchi, H. and Kamada, H. (1997) Generation of lipid radicals in the hippocampal extracellular space during kainic acid-induced seizures in rats. *Epilepsy Res.* 26:329-333.