

777

モデルラットを用いた急性炎症に対する一酸化窒素の経時的变化

堀 紀代美¹⁾・岩田全広²⁾・高木健次²⁾・鈴木重行²⁾

- 1) 名古屋大学医学部附属病院リハビリテーション部
2) 名古屋大学医学部保健学科

key words

カラゲニン・炎症・一酸化窒素 (NO)

【はじめに】一酸化窒素 (NO) は炎症病巣において炎症性のサイトカインにより誘導型NO合成酵素 (iNOS) の発現を介して過剰に生成され、生体の感染防御反応における主要なメディエーターとして二面的な機能を発揮していると言われている。理学療法場においてもNOは炎症のパラメーターとして役立つものと考えられる。本研究では炎症反応におけるNOの経時的变化を明らかにするため、カラゲニン (Cg) 胸膜炎ラットを用い、胸腔滲出液量、滲出液中の細胞数およびその種類、さらにNO濃度について検討した。

【対象と方法】エーテル麻酔下でWistar系雄ラット (150 ± 20g) の右胸腔内に1% Cg 0.15mlを投与し、胸膜炎を惹起した。Cg投与から2, 6, 12, 24, 48時間経過後でエーテル麻酔下にラットを致死させ、胸腔内の滲出液を採取し、胸腔滲出液量、滲出液中の細胞数を顕微鏡下でカウントした。滲出液中のNO濃度は滲出液を4℃、8000回転/分で60分間遠心分離し、除タンパク濾液を採取し、除タンパク濾液中のNOはNO₂⁻+NO₃⁻を用いたGriess法による比色分析で求めた。

【結果】胸腔滲出液量と細胞数は炎症惹起直後から徐々に増加し24時間後にピークをむかえ、その後48時間までゆっくりと減少した。滲出液中には主に2種類の炎症性細胞の浸潤が認められた。炎症惹起後12~24時間をピークに多核白血球の浸潤が多く認められた。一方、24時間から48時間まではマクロファージ系の単核細胞の浸潤が多く認められた。滲出液中のNO濃度は炎症惹起後6時間 (11.7 ± 0.25 μM) で最も高い値を示した。その後、24時間後 (3.52 ± 0.33 μM) まで徐々に減少し、48時間後 (9.32 ± 0.81 μM) で再び増加した。

【考察】滲出液中のNO濃度は2~48時間までの経時的变化で2相性のピークを示した。まず、炎症の増悪にともなってNO濃度が増加し、炎症回復期にも再び増加していた。Paul-Clarkらは同モデルにおいてiNOS発現によるNOの経時的变化の2相性を示しており、我々の結果も同様なものとなった。また、CuzzocreaらはiNOSノックアウトマウスを用いたカラゲニン炎症において炎症が回復しないことを報告している。従って、今回我々の得た結果はiNOS阻害剤を用いた時の関わりを未確認ではあるが、彼らの結果と同様にiNOS由来のNOが炎症性メディエーターとして機能していることを示唆していた。炎症惹起6時間後の最初のピークではNOは炎症性と抗炎症性作用を有するという相反する報告があり、48時間後の2相目のピークでの作用についても解析は未だなされていない。今回の実験では炎症が軽減したと考えられる48時間後にNOの増加がみられ、NOの抗炎症作用がうかがわれた。現在、これらNOの炎症に対する作用を明らかにするために検討中である。

778

ラット海馬へのイボテン酸投与および運動負荷ストレスにより出現するDark neuronとその経過

石田和人^{1, 2)}・飛田秀樹²⁾・西野仁雄²⁾

- 1) 名古屋大学医学部保健学科
2) 名古屋市立大学医学部第二生理

key words

dark neuron・イボテン酸・神経細胞死

【はじめに】Argyrophil III (銀染色) 法により検出されるdark neuron (以下, DN) は、ニューロンの細胞骨格が障害された状態であり、神経細胞障害の最初期像であると解されている。何らかの障害を受けて脳内に出現したDNは時間経過とともに消失するが、それが細胞死に至ることを意味するのか、あるいは回復したことを意味するのかについては未だ明らかでない。今回、我々は、ラットを用い、脳内 (海馬) へ神経毒 (イボテン酸) を注入するモデル、および運動ストレス負荷を与えるモデルでそれぞれ、DNの出現することを確認し、種々の染色法を併用することで、DNがその後どのような経過を辿るのかについて組織学的に検討した。

【方法】実験動物には、ウイスター系雄ラット (240~280g) を用いた。海馬イボテン酸注入モデル：麻酔下にて頭蓋骨に小穴を明け、カニューレを刺入した。カニューレ先端部を、左海馬CA1~2の錐体細胞層や下部になるよう設置した。これにイボテン酸 (4 mg/ml) を局所微量注入 (0.2 μl/分を5分間) した。運動ストレス負荷モデル：ラットに3時間の水泳を課した (水深：40 cm, 水温：35℃)。それぞれのモデルで、直後~7日後に動物を麻酔下にて灌流固定し、前額面の凍結切片 (厚さ50 mm) を作製して、連続切片をArgyrophil III染色 (DN染色)、Caspase-3 active抗体免疫染色、TUNEL染色およびH-E染色を併用して調べた。

【結果】イボテン酸注入モデルでは、1~3時間後、DNは、海馬の注入部を中心に、CA1~2錐体細胞層の一部で局所的に出現し、12~24時間後、DNはCA1~2全域または両側海馬の正中部位やCA3にまで広がって出現した。同部位のDNは樹状突起が染色されず細胞体のみが濃染していたが、非染色部との境界部でcork-screw様の樹状突起を有する典型的なDNが認められた。H-E染色では、DNの広がりとはほぼ一致して、核小体の濃染像が多数見られ、前述の境界部では、細胞体自体の縮小が見られた。Caspase-3陽性細胞は、12時間~3日後、CA1全域に出現し、TUNEL陽性細胞が同部位に3~7日後認められた。一方、運動ストレスモデルでは、水泳の直後、海馬 (CA1~CA2)、扁桃核、内嗅野、視床下部、背外側中隔核などにDNの出現を認めた。海馬にDNが出現する割合は、5割程度であった。経過を見ると、3日後CA2領域でわずかにCaspase-3陽性細胞を認めたものもあったが、ほとんどは陰性であった。

【考察】今回の結果から、DNには種々の障害レベルがあり、細胞死に至るものもあれば、回復しうるものもあることが示唆された。今後、中枢神経障害に対する理学療法効果の作用機序を検討していく上で、脳内に出現したDNの予後が着目すべき1つのポイントになると思われる。