

論文内容の要旨

**Evaluation of Neuronal Protective Effect of Xanthine  
Oxidoreductase Inhibitors on Severe Whole Brain Ischemia in  
Mouse Model and Analysis of Xanthine Oxidoreductase Activity  
in the Mouse Brain**

重篤な全脳虚血マウスモデルにおけるキサンチン酸化還元酵素阻  
害による神経保護効果の検討とマウスの脳におけるキサンチン酸化  
還元酵素活性の解析

日本医科大学大学院医学研究科 侵襲生体管理学分野

大学院生 鈴木 剛

Neurologia medico-chirurgica 2014年掲載予定

心肺停止後のような重篤な脳虚血再灌流障害は神経学的に転機不良となることが依然として多い。近年、脳障害を減弱させる様々な治療が発展してきたが神経学的転機を改善させるためにはさらに発展した治療が必要である。

治療法開発を目的としたラットの全脳虚血モデルは様々なものが確立されている。しかしながら我々は今後遺伝子改変マウスを用いた研究を考えているため、マウスでのモデル作成を検討した。当初、Tha1 らの脳底動脈を凝固し、数日あけて両側総頸動脈をクリップ遮断するモデルを参考にしたが死亡率が高く実験モデルとして確立できなかった。その後、米倉らの脳底動脈、両側総頸動脈を1回の実験でクリップ遮断するモデルを参考にし、生存率を安定させマウスの全脳虚血モデルを確立することができた。

脳虚血再灌流障害の際、いくつかの酵素が関与し活性酸素が生成されている。その中でキサンチン酸化還元酵素 (XOR) は最も重要な酵素の一つである。この酵素はプリン代謝の最終段階において、ヒポキサンチンからキサンチン、キサンチンから尿酸への変換を触媒する酵素である。哺乳類 XOR は障害を受けた組織では、脱水素酵素型から酸化酵素型に変換がおこり、活性酸素を産生するようになる。McCord らはこのとき生じた活性酸素が組織障害を及ぼすとするモデルを提唱し、広く知られている。そのような機序を阻害するアロプリノールのような XOR 阻害薬は活性酸素を減弱させようという報告がある。しかし、アロプリノールはラジカルスカベンジャーともなり、他の核酸代謝酵素の基質や阻害剤ともなるため、解析が困難である。そこでそのような作用のない新規 XOR 阻害剤であるフェブキソスタットを用い、検証を行った。

マウスはプラセボ群、アロプリノール群、フェブキソスタット群の3つのグループに分けた。各群ともに虚血、非虚血それぞれ10匹ずつで合計60匹作成した。グループの振り分けに関してはランダムに行い一人の術者が盲検で行った。キサンチン酸化酵素阻害薬の投与量、投与時間の検討も行った。投与量に関しては、濃度依存性に血中濃度は増加したが50mg/kgより多くなると腎機能障害が危惧されたため50mg/kgとした。投与時間に関しては、投与後1時間で血中濃度が最高となり手術時間が30分であることを考慮し実験開始30分前に経口投与とした。虚血時間に関しては、様々な時間を検討したが6、8分では安定した神経細胞の脱落が得られず。また14分を超えると死亡率が著しく高くなった。この結果は米倉らの報告を同様であり虚血時間は14分とすることとした。実験全体の生存率は88%であった。病理学的評価に関しては、術後4日間で脳神経細胞の形態変化が安定して観察できることが確認できた。また評価部位に関しては海馬CA1, CA2領域で最初に神経細胞の脱落が認められるとの報告もあり、我々も同様の結果であったため同部位を評価することとした。また、残存神経細胞数に関して統計学的評価をおこなった。病理学的評価においても一人の病理学者が盲検で行なった。

海馬CA1, CA2のどちらの領域においても14分虚血モデルでは神経細胞数の減少が認められた。両薬剤投与群ともにプラセボ群とくらべ神経細胞保護効果は認められなかった。

今回の実験系において薬剤の神経細胞保護効果が認められなかった原因に関して検討し

た。XOR の脳組織における発現にも諸説あり、虚血の際に誘導されるとの報告もあった。そこで我々は虚血と非虚血の両方のマウスの脳において市販品より特異的で質の良い抗 XOR 抗体を用いて再検証した。その結果、酵素活性に関してはマウスの肝臓においては強い活性が認められたが、脳においては虚血、非虚血ともに極めて低かった。また、キサンチン酸化還元酵素はマウスの肝臓においては多く認められたが、非虚血マウス脳と虚血マウス脳ともにほぼ認められないことをウェスタンブロット法で確認した。

このように、キサンチン酸化酵素阻害薬が脳の虚血再灌流障害を減弱させなかった原因として、マウスの脳には虚血時、非虚血時ともにキサンチン酸化還元酵素の活性がほぼ認められず、キサンチン酸化還元酵素が非虚血マウス脳と虚血マウス脳ともにほぼ認められないことが考えられた。