

脳虚血における脂質過酸化および キサンチンオキシダーゼの変化

京都大学脳神経外科（指導：菊池晴彦教授）

絹 田 祐 司

〔原稿受付：昭和63年10月28日〕

Lipid Peroxidation and Change in Xanthine Oxidase in Cerebral Ischemia

YUJI KINUTA

Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director: Prof. Dr. HARUHIKO KIKUCHI)

To verify the lipid peroxidation in the focal cerebral ischemia, the levels of α -tocopherol, ubiquinone and ascorbate were measured in the ischemic center in rats. The former two were endogeneous lipid soluble antioxidants and the last was a water soluble antioxidant. α -Tocopherol, reduced ubiquinone-9 and -10, and reduced ascorbate decreased to 79%, 73%, 66%, and 76% 0.5 hour after ischemia, respectively. α -Tocopherol decreased to 63% 6 hours after ischemia, and then reached a plateau, while reduced ubiquinones and reduced ascorbate declined further to 16% and 10% 12 hours after ischemia, respectively, and then reached plateau levels. These results suggest their functional and durational differences as antioxidants against lipid peroxidation in this ischemic model. Although the reciprocal increase in oxidized ubiquinones during ischemia was not observed, that in oxidized ascorbate was noted. The complementary antioxidant system between cytoplasmic and membranous components, the combination α -tocopherol/ascorbate, was estimated from the calculated consumption ratio of these antioxidants, assuming that the loss of these reduced antioxidants is due to neutralization of free radicals. This system was suggested to play an important role in an early ischemic period. Urate also markedly increased during ischemia. Therefore, xanthine oxidase activity was measured in rats both in normal brain and in ischemic brain induced by four-vessel occlusion method. In the control rat, the enzyme activity was 0.87 ± 0.13 nmol/g wet brain/min at 25°C (mean $\pm$ S.D.): 92.4% was associated with the NAD-dependent dehydrogenase form and only 7.6% with the oxygen-dependent superoxide-producing oxidase form. However, the

Key words: Lipid peroxidation, Antioxidant, Xanthine oxidase, Cerebral Ischemia

索引用語：脂質過酸化，抗酸化物質，キサンチンオキシダーゼ，脳虚血

Present address: Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.

ratio of the latter form increased to 43.7% after 0.5 hour of global ischemia despite the same level in total xanthine oxidase activity. This result suggests the involvement of the oxygen free radicals generated from the xanthine oxidase pathway in the pathogenesis of the ischemic injury of the rat brain.

はじめに

脳虚血における細胞障害の原因のひとつにフリーラジカルによる脂質過酸化反応が知られている^{12,14)}。フリーラジカルによる障害は自動酸化反応や酵素反応により生成されるスーパーオキシドなどにより引き起こされるが、脂質は過酸化を受けやすかつ脳には多量に存在するため⁹⁾、これらの活性酸素種の急増は脳に多大な悪影響を及ぼす。フリーラジカルによる組織障害を阻止するために生体内には酵素的消去と抗酸化物質という二つの機構が存在する。しかしながら、これらの防御機構が障害されたり、フリーラジカルがこれらの防御機構能力を上回って産生されたりするならば、フリーラジカル発生による脂質過酸化反応は極めて重要な意義を持つようになる³⁴⁾。現在まで虚血脳の脂質過酸化反応については多種多様の報告がなされたが^{3,9,14,33,45)}、いまだ一定の見解が得られていないのが現状である。

スーパーオキシドなどの活性酸素種の生成源として、以前よりキサンチンオキシダーゼが注目されていた。この酵素はハイポキサンチンからキサンチンへついでキサンチンから尿酸への転換を媒介し、生体内では NAD-dependent dehydrogenase (type-D) および Oxygen-dependent superoxide-producing oxidase (type-O) の二型で組織中に存在することが知られ¹¹⁾、通常の生理的条件下では前者が優勢である。この酵素は脳においては存在しないかあっても非常にわずかであるとされ^{3,35,37)}、フリーラジカルに起因する虚血性脳障害への関与についてはほとんど注意は払われなかった。

本研究では脂質過酸化については虚血モデルにラット一側中大脳動脈閉塞モデルを用い、その虚血中心部の大脳皮質についての細胞質および細胞膜成分の変化ならびに相互関係を明らかにする目的で脂溶性抗酸化物質 (α -トコフェロール、ユビキノン) と水溶性抗酸化物質 (アスコルビン酸) の両者を検討した。またラット脳のキサンチンオキシダーゼの変化については全脳虚血モデルを用い、NAD-dependent dehydrogenase (type-D) と Oxygen dependent superoxide-producing

oxidase (type-O) の関係および虚血脳障害におけるこの酵素の関与について検討した。

(A) 脂質過酸化に関する研究

実験材料および実験方法

(1) 実験動物

実験動物は体重 350-450 g の雄ウイスター系ラットを用いた。ラットに pentobarbital (50 mg/kg) を腹腔内に注入し麻酔を導入した後、右側臥位で実験用手術台に固定した。左眼窩外側部と左外耳孔の中央に約 2 cm の皮切を設け、側頭筋を頭蓋骨より反転し下側頭窩を露出させ、5×4 mm の小孔を歯科用ドリルを用い作製した。次に硬膜を十字に切開し左中大脳動脈を露出させ、その頸動脈からの起始部より下大脳静脈との交叉部まで電気凝固し、さらに再開通を避けるため切断することで中大脳動脈を閉塞した⁴⁾。その後、軟部組織を戻し皮膚を縫合し、麻酔から覚醒後ケージに戻した。一定時間経過後、ラットを pentobarbital 腹腔内投与にて再び麻酔導入し、pancuronium bromide を腹腔内投与し非動化させた。同時に気管切開を施行し人工呼吸器に接続した。また、一側大腿動脈にカニューレを施行し血圧測定および動脈血ガス分析に用いた。なお、動脈ガスは pO_2 が 100 mmHg 以上で pCO_2 が 35-40 mmHg の範囲内を保つようにし、体温は 37°C 前後を維持させるようにした。ラットは中大脳動脈閉塞後、0(sham operation group), 0.5, 1.5, 3, 6, 12 および 24 時間後に液体窒素を用い in situ freezing を施行した。各実験群は 5 匹のラットよりなる。脳は -30°C のクライオスタット内で取り出し液体窒素中に保存した。

(2) 組織サンプルの準備

-30°C のクライオスタット内で線条体レベルでの中大脳動脈領域の大脳皮質約 50-75 mg を病変側および非病変側の両方から採取した。虚血中心のサンプリングに際しては NADH 蛍光の変化を指標に用いた⁴³⁾。

(3) 分析方法

α -トコフェロールおよびユビキノン

両者とも HPLC (high performance liquid chro-

matography) にて定量を行った。凍結した大脳皮質サンプルに 1 ml の氷冷した生理食塩水とユビキノンを還元することなしに、脂質の自動酸化を防ぐために 50 μ l の BHT (2,6-ditert-butyl-p-cresol) のエタノール溶液 (10 mg/ml) を加え²¹⁾、ポリトロンでホモジェナイズした。α-トコフェロールおよびユビキノンの内部標準として 4 μ g のトコロールと 4 μ g の 2,3,6-trimethyl-5-decaprenyl-1,4-benzoquinone を含んだ n-ヘキサンとエタノールの混液 8 ml (5:3, v:v) を用い、褐色試験管中で α-トコフェロールおよびユビキノンを抽出した。これらを 5 分間 vortex mixer にて充分に混和した後、遠心し (3000 g, 10 min), 4 ml の n-ヘキサン層を取り出し、α-トコフェロールおよびユビキノン分析に各 2 ml を用いた。抽出した各 n-ヘキサンを窒素気流下に溶媒留去した後、その残留物に α-トコフェロール分析用には n-ヘキサン 100 μ l を加え、ユビキノン分析用にはイソプロパノール 100 μ l を加え溶解し、その 20 μ l を HPLC に注入した。使用した HPLC 機種は Shimadzu LC-3A ポンプ, SPD-2A 紫外吸光検出器, RF-500LC 蛍光検出器, Yanako VMD-101 電気化学検出器および Shimadzu C-R1A computing integrator である。α-トコフェロール分析には順相型カラム (Nucleosil-NH2, 15 cm X 4.6 mm, 5 μ m particle size, Marchery-Nagel, West-Germany) を用い、蛍光検出器 (Ex. 298 nm, Em. 325 nm) にて定量した¹⁾。移動相は n-ヘキサン-イソプロパノール (98:2, v:v) を用い、流速は 1.0 ml/min とした。ユビキノン分析は逆相型カラム (Nucleosil C-18, 25 cm X 4.6 mm, 5 μ m particle size, Marchery-Nagel, West-Germany) を用いて酸化型ユビキノンを紫外吸光検出器 (275 nm) で、還元型ユビキノンを電気化学検出器 (+0.7V) で連続的に定量した¹⁶⁾。移動相はメタノール-エタノール-70% HClO₄ (700:300:1, v:v:v) 混液 1000 ml に過塩素酸ナトリウム 7.0 g を溶解させ調製し、充分に脱気して使用した。流速は 1.0 ml/min とした。酸化型ユビキノンは外部標準法で還元型ユビキノンは内部標準法で定量した。

アスコルビン酸および尿酸

還元型アスコルビン酸と尿酸は HPLC にて定量した^{17,47)}。酸化型アスコルビン酸は蛍光法にて定量した²⁷⁾。凍結した大脳皮質サンプルに氷冷した 5% メタリン酸 (5mM EDTA を含む) を 1 ml 加え、ポリトロンでホモジェナイズした後、遠心 (5000 g, 20 min, 4°C) した。その上清を 0.2 μ m ミリポアーフィルター

で濾過した後、10 μ l を HPLC に注入し還元型アスコルビン酸および尿酸を電気化学検出器を用い定量分析した。逆相型カラム (Nucleosil C-18, 25 cm X 4.6 mm, 5 μ m particle size, Marchery-Nage, West-Germany) を用い、電気化学検出器は +0.8V のポテンシャルとした。移動相は 0.2M リン酸バッファー (KH₂PO₄-H₃PO₄, pH 2.0) を用い、流速は 1.0 ml/min とした。酸化型アスコルビン酸はオルトフェーレンジアミンを用い蛍光性キノキサリンを形成させ、これを蛍光吸光度計 (Shimadzu RF-510) で測定しその定量を行った。対照はボロン酸で酸化型アスコルビン酸蛍光物質の形成を抑制したものをを用いた。まず 250 μ l の上清に 250 μ l の 25% 酢酸ナトリウム溶液を加え、対照には 250 μ l の酢酸ナトリウム-ボロン酸溶液 (200 ml の 25% 酢酸ナトリウムに 20 g のボロン酸を溶解したもの) を加えた。これらのサンプル溶液を室温で 15 分間暗所に置き、その後 100 μ l の 0.1% のオルトフェーレンジアミン溶液を加え、37°C で 30 分間暗所でインキュベーションし、ただちにその蛍光強度を測定 (Ex. 348 nm, Em. 425 nm) した。

統計検定

サンプルを対照手術 (sham operation) 群と比較する場合は分散分析 (ANOVA) により検定し、同一脳の非手術側のものと比較する場合は対応のある T 検定を行い、 $p < 0.05$ を示したものを統計的に有意とした。

結 果

α-トコフェロール

中大脳動脈閉塞後 0.5 時間で虚血中心部の α-トコフェロールは対照手術群の 79% に低下し、その後も減少を続け虚血後 6 時間で 63% になり plateau level に達した。予備実験で虚血後 36 時間までの値を検討したが、虚血後 6 時間のものと有意な差は認められなかったことを考慮すると α-トコフェロールはこの実験モデルにおいては主に虚血後 6 時間まで抗酸化作用を発揮する一方で 60% 以上が消費されず残っていると考えられた (Fig. 1, Table. 1.)。

ユビキノン

対照手術群および非手術側群においてユビキノナー 9 の約 22%、ユビキノナー 10 の約 23% が還元型であったが、これは他の報告と一致する^{20,45)}。中大脳動脈閉塞 0.5 時間後、虚血中心部での還元型ユビキノナー 9 およびユビキノナー 10 は対照手術群の各々 73%, 66%

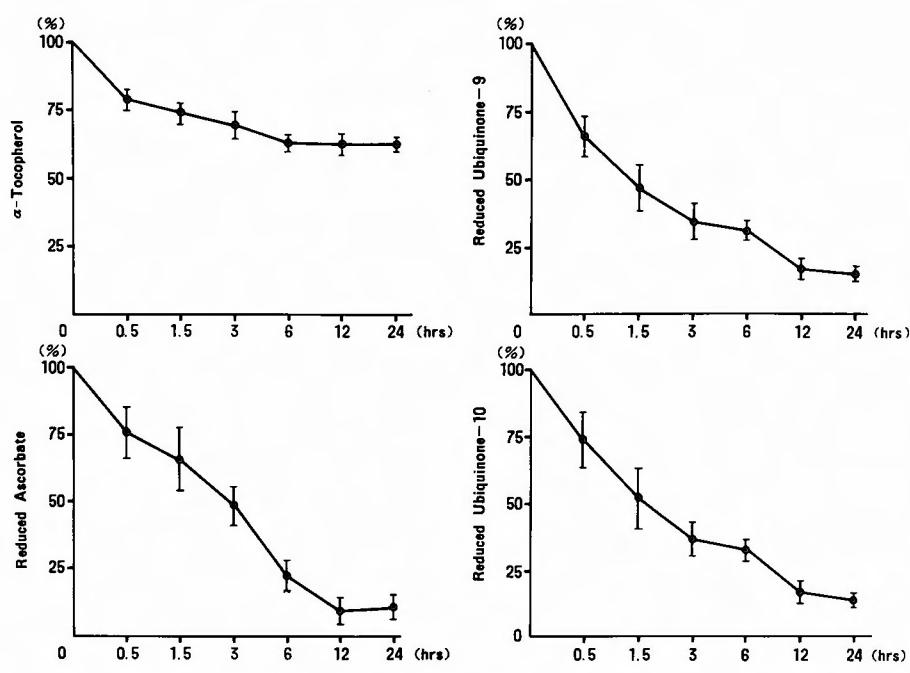


Fig. 1. The time courses of levels of various endogenous antioxidants in focal cerebral ischemia in rats. Note the difference in the manner of decrease between α -tocopherol, reduced ubiquinones, and reduced ascorbate. The manner of decrease in reduced ubiquinones resembles that in reduced ascorbate. Values (% of sham operated control) are means $\pm$ S.D. of 5 observations.

Table 1. Effect of focal cerebral ischemia on the level of a-tocopherol.

Time(h)	0	0.5	1.5	3	6	12	24
L*	40.0 $\pm$ 2.7	31.7 $\pm$ 1.6 ^a	29.8 $\pm$ 1.3 ^a	27.9 $\pm$ 2.1 ^a	25.4 $\pm$ 0.9 ^a	25.1 $\pm$ 1.4 ^a	25.1 $\pm$ 0.7 ^a
C*	40.0 $\pm$ 2.1	40.1 $\pm$ 1.6	40.5 $\pm$ 1.5	40.1 $\pm$ 1.3	39.9 $\pm$ 1.0	41.9 $\pm$ 1.0	38.7 $\pm$ 1.3

* L: lesioned area, C: contralateral area.
The group (L, Time 0) recieved sham operation. Values are means $\pm$ S.D. of 5 observations and are given in nmol/g wet weight.
a: p<0.01 versus both sham operated and contralateral groups.

に減少した。両還元型ユビキノンはさらに減少し続け、虚血後12時間で約16%まで低下しそれ以後は平衡状態に達した (Fig. 1)。一方、酸化型ユビキノナー9およびユビキノナー10についても徐々に減少してゆく傾向が認められ、虚血24時間後には対照手術群のそれぞれ81%, 80%に低下した。そのためユビキノナー9およびユビキノナー10の総量も対照手術群のそれぞれ66%, 65%に減少していた (Table. 2)。したがってこの虚血モデルでは酸化型ユビキノンの相補的な増加は認めら

れなかった。このように還元型および酸化型ユビキノンはともに減少はしていたが、還元型と酸化型の比をとるとユビキノンの相対的な酸化型の増加が観察された (Fig. 3)。
アスコルビン酸
対照手術群および非手術側群においてアスコルビン酸は99%以上が還元型で存在していた。この所見は他の報告と一致する^{9,29)}。中大脳動脈閉塞後0.5時間で還元型アスコルビン酸は対照手術群の76%に減少し、さ

Table 2. Effect of focal cerebral ischemia on levels of ubiquinones.

UQ-9							
Time(h)	0	0.5	1.5	3	6	12	24
L*, red.	7.2±1.3	4.8±0.6 ^{bd}	3.4±0.7 ^{bd}	2.4±0.5 ^{bd}	2.2±0.3 ^{bd}	1.2±0.3 ^{bd}	1.1±0.2 ^{bd}
oxi.	25.8±0.6	24.4±2.0	23.5±1.4 ^a	25.5±4.3	21.3±2.1 ^{bc}	24.0±1.2 ^{ac}	20.8±1.3 ^{bd}
total	33.0±1.4	29.1±2.0	26.8±2.0	27.9±4.7 ^{ac}	23.6±1.8 ^{bd}	25.2±1.0 ^{bd}	21.8±1.4 ^{bd}
C*, red.	8.0±0.5	7.2±0.6	8.0±0.6	7.7±1.1	8.4±0.4	9.1±1.2	8.9±1.1
oxi.	27.3±0.5	24.7±1.5	23.9±1.9	26.4±1.6	23.8±0.9	25.9±0.6	25.9±1.8
total	35.3±1.0	31.8±1.7	31.5±2.2	34.1±0.7	32.2±1.0	35.1±1.4	34.8±1.5

UQ-10							
L*, red.	3.2±0.6	2.3±0.4 ^{ac}	1.6±0.4 ^{bd}	1.1±0.2 ^{bd}	1.0±0.1 ^{bd}	0.5±0.2 ^{bd}	0.4±0.1 ^{bd}
oxi.	10.6±0.5	9.6±0.5 ^a	9.8±0.7	10.4±1.9	8.9±0.7 ^{bc}	9.8±0.6	8.5±0.6 ^{bc}
total	13.8±0.8	12.0±0.8 ^c	11.5±1.0 ^{bc}	11.5±2.2 ^c	10.0±0.6 ^{bd}	10.3±0.6 ^{bd}	8.9±0.7 ^{db}
C*, red.	3.6±0.2	3.2±0.4	3.7±0.4	3.4±0.6	4.0±0.2	4.2±0.5	4.2±0.7
oxi.	11.5±0.3	10.3±0.3	10.1±0.8	10.7±0.9	10.4±0.4	10.6±0.3	10.5±0.7
total	15.1±0.4	13.5±0.7	13.7±1.0	14.2±1.2	14.4±0.5	14.9±0.7	14.7±0.9

* L: lesioned area, C: contralateral area.

The group (L, Time O) recieved sham operation. Values are means±S.D. of 5 observations and are given in nmol/g wet weight.

^a: p<0.05 versus sham operation group.

^b: p<0.01 versus sham operation group.

^c: p<0.05 versus contralateral group.

^d: p<0.01 versus contralateral group.

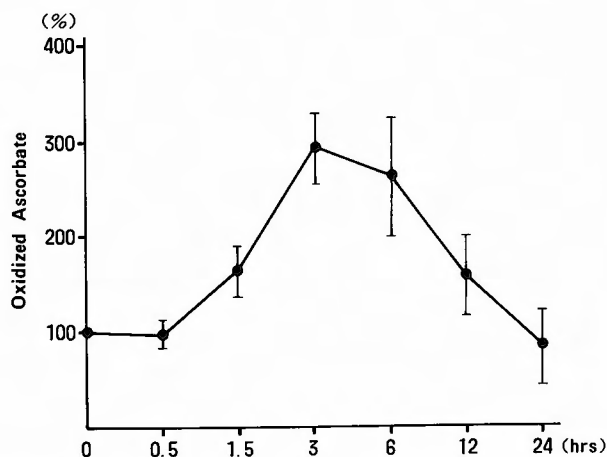


Fig. 2. The time course of the oxidized ascorbate. Note the increase from 1.5 up to 12 hours after ischemia with its maximum at 3 hours. Values (% of sham operated control) are means±S.D. of 5 observations.

らに減少を続け虚血後12時間には10%にまで低下し、それ以後平衡状態に達した (Fig. 1)。一方、酸化型アスコルビン酸は虚血後1.5時間から12時間の範囲で有

意の増加を認めた。その増加は虚血後3時間で最高となり対照手術群の3倍に達したが、その後は徐々に減少し虚血後24時間には対照手術群のレベルに戻った

Table 3. Effect of focal cerebral ischemia on the level of ascorbate.

Time(h)	0	0.5	1.5	3	6	12	24
L*, red.	2.5±0.3	1.9±0.3 ^{bc}	1.6±0.4 ^{bd}	1.2±0.6 ^{bd}	0.6±0.2 ^{bd}	0.2±0.2 ^{bd}	0.3±0.2 ^{bd}
oxi.	9.6±0.6	9.4±1.4	15.8±2.6 ^{bc}	28.2±3.4 ^{bd}	25.4±6.1 ^{bd}	15.1±4.3 ^{ac}	7.8±4.0
total	2.5±0.3	1.9±0.3 ^{bc}	1.6±0.4 ^{bd}	1.3±0.2 ^{bd}	0.6±0.2 ^{bd}	0.3±0.2 ^{bd}	0.3±0.2 ^{bd}
C*, red.	2.6±0.3	2.6±0.2	2.5±0.2	2.6±0.2	2.6±0.4	2.5±0.2	2.5±0.4
oxi.	9.2±0.3	9.1±1.1	9.1±2.2	9.2±2.9	9.2±1.2	9.0±2.7	10.0±4.8
total	2.6±0.3	2.6±0.2	2.5±0.2	2.6±0.2	2.6±0.4	2.5±0.2	2.5±0.4

* L: lesioned area, C: contralateral area.
The group (L, Time 0) recieved sham operation. Values are means±S.D. of 5 observations and are given in umol/g wet weight (reduced and total ascorbate) and nmol/g wet weight (oxidized ascorbate).
^a: p<0.05 versus sham operation group.
^b: p<0.01 versus sham operation group.
^c: p<0.05 versus contralateral group.
^d: p<0.01 versus contralateral group.

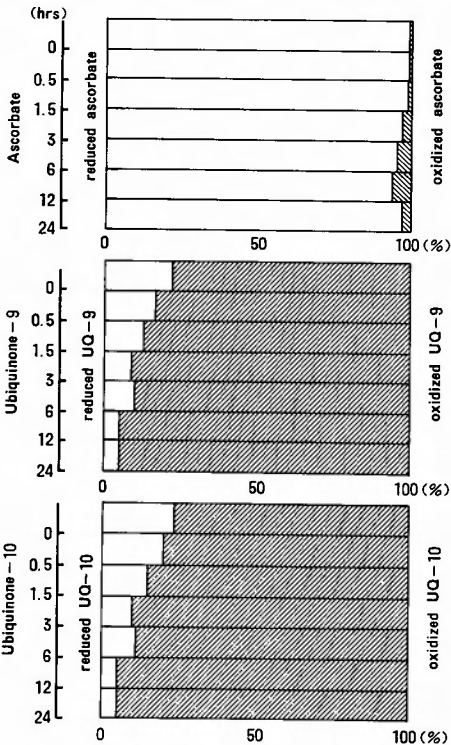


Fig. 3. The time courses of relative redox changes in various antioxidants. Although the total levels of ascorbate and ubiquinones decline in accordance with the decrease in reduced forms, their relative redox changes toward oxidation are shown.

(Fig. 2). アスコルビン酸総量も還元型アスコルビン酸の減少に対応して低下し、虚血後12時間で平衡状態に達した (Table. 3). アスコルビン酸総量の減少がユビキノン総量の減少と同様に認められたが、アスコルビン酸の場合は酸化型の増加は絶対的にも (Fig. 2) 相対的にも (Fig. 3) 統計的に有意であった。

尿酸

非手術側群の尿酸平均値が 3.06 nmol/g wet brain であるのに対し、対照手術群では 5.02 nmol/g wet brain と統計上は有意差はみられないものの若干高値を示したか、この差異は手術操作の影響と考えられる。中大脳動脈閉塞後0.5時間で尿酸は対照手術群の2倍に達し、さらに増加を続け虚血後24時間には対照手術群の約20倍に達した (Table. 4). 予備実験での虚血後36時間の尿酸値は 55.6 nmol/g wet brain と対照手術群の約11倍であったことから尿酸は虚血後24時間に最高値に達することがわかった。この結果は金光ら¹⁹⁾の報告に一致する。

(B) 脳虚血における キサンチンオキシダーゼ の変化に関する研究

実験材料および実験方法

(1) 実験動物

実験動物には体重 250-300 g の雄ウイスター系ラットを用いた。脳虚血は Pulsinelli and Brierley の方法³¹⁾ に若干の改変を加えた 全脳虚血モデルを用い作製した。ラットに pentobarbital (50 mg/kg) を腹腔内

Table 4. Effect of focal cerebral ischemia on the level of urate.

Time(h)	0	0.5	1.5	3	6	12	24
L*	5.2±2.5	10.4±2.3 ^a	15.7±2.0 ^a	25.1±5.8 ^a	53.1±15.2 ^a	71.8±5.4 ^a	100.3±19.9 ^a
C*	3.1±1.0	3.0±0.7	3.1±1.5	3.0±1.6	2.5±0.4	3.4±0.6	3.0±0.6

* L: lesioned area, C: contralateral area.

The group (L, Time 0) recieved sham operation. Values are means±S.D. of 5 observations and are given in nmol/g wet weight.

^a: p<0.01 versus both sham and contralateral groups.

注入し麻酔を導入した後、pancuronium bromide を腹腔内に注入し非動化させた。ただちに気管切開を施行し人工呼吸器に接続した。一側大腿動脈に血圧測定および動脈血ガス分析用にカニューレーションを行った。なお、動脈血ガスは pO_2 が 100 mmHg 以上で pCO_2 が 35-40 mmHg の範囲内に維持した。また体温も 37°C 近くを維持した。まずラットを腹臥位にて手術台に固定し、両側の椎骨動脈を電気凝固した。次に仰臥位に換え両側の頸動脈に10-0ナイロン糸をかけ、糸の両端にシリコンチューブを通した糸を引き頸動脈をチューブ内で屈曲させることで血行遮断を行った。全脳虚血作製30分後、液体窒素で in situ freezing を行った。対照手術群も同様の処置を行った。-30°C のクライオスタット内で脳を取り出し硬膜や表在血管を取り除いた後、液体窒素内に保存した。なお、虚血群および対照手術群はともに5匹のラットを用いた。

(2) キサンチンオキシダーゼ測定 HPLC 条件

キサンチンオキシダーゼ活性を測定するための尿酸の定量は紫外吸光検出器と電気化学検出器を用いて行った³⁰⁾。使用した HPLC 機器は Shimadzu LC-6A ポンプ, SPD-6A 紫外吸光検出器, Yanako VMD-101 電気化学検出器と Shimadzu C-R 4 A computing integrator である。二つの検出器を連続して接続し、

紫外吸光は 290 nm で電気化学は +0.6V にて尿酸を検出した。逆相型カラム (Lichrosorb RP-18, 25 cm × 4 mm, 5 μm particle size, Merk, West-Germany) を用い、移動相は 0.1M リン酸アンモニウムバッファー (pH 4.8) とした。なお、流速は 1.0 ml/min で定量は外部標準法で行った。

(3) 活性測定

キサンチンオキシダーゼ活性は Della Corte and Stirpe の方法^{11,41)} に若干の改変を加え測定した。凍結した約 75 mg の大脳皮質サンプルを 1 ml の 0.1M Tris-HCl バッファー (pH 8.1, 1mM EDTA, 10mM dithioerythritol, 1mM phenylmethylsulfonylfluoride 含む)を加えポリトロンを用いホモジェナイズした。このホモジェネートを遠心 (100000 g, 30 min, 4°C) した後、上清を活性測定に用いた。キサンチンオキシダーゼ活性はキサンチンを基質として NAD の存在下または非存在下での尿酸の増加量を計ることで測定した³⁰⁾。反応液の組成は 0.05 mM のキサンチン, 0.1 M の Tris-HCl バッファーで 0.5 mM の NAD を含むものと含まないものを用意した。なお、NAD を反応液に加えることによりキサンチンオキシダーゼの総量 (type-D + type-O) が測定され、NAD を加えないものは反応液中の溶存酸素のみが電子受容体となるため

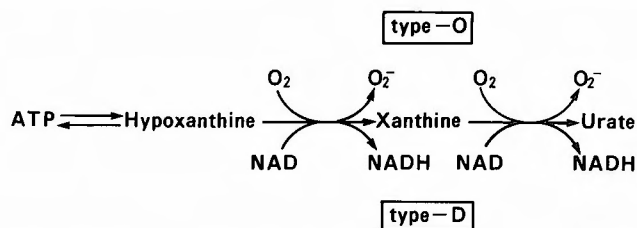


Fig. 4. Xanthine oxidase in purine metabolism of the rat brain. Xanthine oxidase consists of the NAD-dependent dehydrogenase (type-D) and the oxygen-dependent superoxide-producing oxidase (type-O).

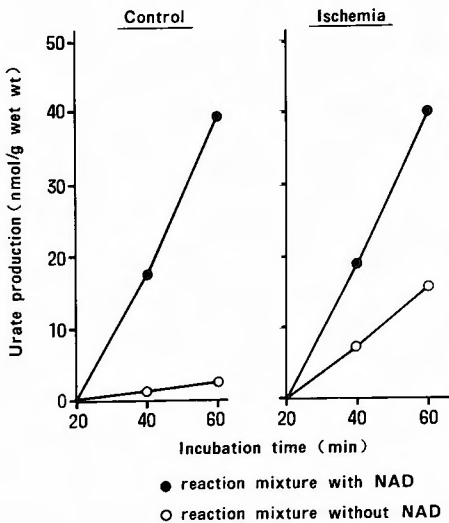


Fig. 5. Examples of urate production according to incubation times are shown. A value of urate production in the reaction mixture with NAD means the activity of type-D plus type-O. A value in the reaction mixture without NAD means the activity of type-O. Note the difference in urate production rate in the reaction mixture without NAD between the control and ischemic rat brains.

Oxygen-dependent oxidase (type-O) のみが測定されることとなる. 100 ul の上清に 100 ul の反応液を加え 25°C で20分, 40分, 60分間インキュベーションした後, 反応液に 20 ul の60%過塩素酸を加え反応を停止させた. これを遠心 (3000 r.p.m., 5 min) した後, その酸性上清の 20 ul を HPLC に注入し1分間あたりの尿酸の増加量を算出した (Fig. 5). したがって, キサンチンオキシダーゼ活性は mIU/g wet weight (1 mIU=1 nmol urate production/min at 25°C) の単位で表示した.

統計検定

得られた結果は mean±S.D. で表示し, 分散分析 (ANOVA) で検定した.

結果

Table 5 に本実験で得られたラット大脳皮質のキサンチンオキシダーゼ活性を示す. 対照手術群でのキサンチンオキシダーゼ活性は 0.87±0.13 mIU でありその大部分は NAD-dependent dehydrogenase (type-D) でわずかに7.6%が Oxygen-dependent oxidase (type-O) であった. しかしながら, 虚血群ではキサンチンオキシダーゼ総量は対照手術群と有意差は認めないもののスーパーオキシドを発生させ得る Oxygen-

Table 5. Xanthine oxidase activity in rat brain.

	XD	XO	XD+XO	% in XO form
control	0.81±0.13	0.07±0.01	0.87±0.13	7.57±1.47
ischemia	0.51±0.07 ^a	0.40±0.10 ^a	0.91±0.10 ^{NS}	43.72±7.58 ^a

* Values are means±S.D. of 5 observations.
Dimension is expressed as mIU/g wet weight/min at 25 C.
^a p<0.01 versus control.
NS: not significant.

Table 6. Reported xanthine oxidase activities in rat brain.

Author	Method	Activity
Villela	Spectrophotometry	23-68 nmol/mf protein/2hrs at 37°C, pH 7.4
Ramboer	Spectrophotometry	4 nmol/g wet weight/min at 25°C, pH 8.35
Markley et al.	Spectrofluorometry	10 nmol/g protein/h at 30°C, pH 7.4
Betz	Radioactive assay	2.26 nmol/mg protein/h at 37°C, pH 7.4
Kinuta*	HPLC-ECD	0.87 nmol/g wet weight/min at 25°C, pH 8.1

* present study.

dependent oxidase (type-O) の割合が43.7%に増加していた。なお、参照として Table. 6 に現在まで報告されたラット脳のキサンチンオキシダーゼ活性を表示する^{5,24,32,42)}。

考 察

α -トコフェロールが酸化障害に対して細胞膜を保護し、その欠乏が酸化障害に対する細胞膜の脆弱性を増強させることが知られている⁴⁶⁾。 α -トコフェロールは一般的には生体内で膜脂質過酸化の初期段階に多価不飽和脂肪酸に由来するラジカルに水素原子を供与することによりフリーラジカル反応の連鎖を遮断するとされており、それゆえ脂質過酸化の連鎖開始段階に重要な役割を演じると考えられている^{23,38)}。本実験では α -トコフェロールは中大脳動脈閉塞後0.5時間で対照手術群の79%に減少した。 α -トコフェロールは断頭虚血モデルでは断頭後3分および5分でそれぞれ84%, 80%に減少し²⁾、全脳虚血モデルでは虚血後30分で93%に低下したと報告されている⁴⁵⁾。これらの結果はフリーラジカル反応が虚血後早期から始まることを示している。本実験では α -トコフェロールの減少は他の抗酸化物質がまだその減少を続けている虚血後6時間で停止した。吉田ら⁴⁶⁾は脳ホモジネートの好氣的インキュベーション後も脂質過酸化生成物の増加にもかかわらず、 α -トコフェロールはその虚血前値の70%以上が消費されないままであったと報告している。これらの結果は α -トコフェロールは主に脂質過酸化の連鎖開始段階に作用し次の連鎖成長段階に関与しないことを示唆している。一方、膜構造や膜流動性の変化が α -トコフェロールの抗酸化作用にかなり影響することが *in vitro* で認められている¹⁵⁾。したがって、*in vivo* でも酸化障害が細胞膜に変化を引き起こすにつれ α -トコフェロールの抗酸化作用が発揮されにくくなっていくことも考えられる。

ユビキノンの抗酸化作用は *in vitro* で確認され *in vivo* では虚血後再灌流時にその抗酸化作用を発揮し始める事が示された^{25,45)}。したがって、ユビキノンは連鎖開始段階でなく連鎖成長段階にフリーラジカルを消去すると考えられている。本実験においても同じ脂溶性抗酸化物質であっても還元型ユビキノンの減少の仕方が異なっており、抗酸化作用発現機序の違いを反映したものと考えられる。また虚血中の還元型ユビキノンの減少は明かに認められたが同時にユビキノンの総量も減少したために相補的な酸

化型ユビキノンの増加は認めなかった。なお、他の虚血モデルでは酸化型ユビキノンの相補的な増加が認められており^{2,45)}、本実験ではユビキノンの総量の減少を考慮に入れると相補的に増加した酸化型ユビキノンの虚血中心部から急速にクリアランスされたかあるいは他の物質に代謝されるかしたために不明瞭になった可能性もある。同様な結果がラット虚血肝でも認められている²⁵⁾。

アスコルビン酸は副腎について脳に多量に含有されており⁴⁴⁾、キャリアーを媒介しエネルギー依存性に脳組織に取り込まれる³⁹⁾。本実験ではアスコルビン酸の99%以上が脳中では還元型で存在していたが、なぜ脳組織にこのような多量の還元型アスコルビン酸が存在するのかは明らかにされていない。アスコルビン酸は多くの活性酸素種の有効な消去物質であることが知られ⁶⁾、主に脂質過酸化反応の連鎖開始および連鎖成長段階の両方に作用するとされている³⁸⁾。しかしながら、アスコルビン酸はまた金属、とりわけ鉄の還元によりプロオキシダント作用を有することも報告されている⁴⁶⁾。また、相対的に極性でかつ非脂溶性であるにもかかわらず、アスコルビン酸は直接にリン脂質層成分^{23,36)}だけでなくスーパーオキシドと反応しフリーラジカル反応の連鎖成長反応を停止させることも明かにされている²⁶⁾。本実験では還元型アスコルビン酸は虚血後0.5時間で対照手術群の76%に減少し、12時間で10%にまで低下したが、この結果は猫一側中大脳動脈閉塞モデルで実験を行った Flamm ら⁴⁴⁾の結果にかなりよく一致する。本実験では明らかに虚血中に還元型アスコルビン酸の減少に同期した酸化型アスコルビン酸の増加を認めた。アスコルビン酸総量もユビキノンの場合と同様にその還元型の低下とともに減少した。Bremer ら⁷⁾は猿の中大脳動脈閉塞モデルにおいて大脳皮質の浮腫は虚血後12時間で最大(9.3%から37.7%の水分含量増加)となり虚血後24時間でもほぼ同レベルであったとしている。本実験ではアスコルビン酸総量は中大脳動脈閉塞後12時間でわずか10%にまで低下したが、このアスコルビン酸の減少は浮腫の影響だけでは説明できない。中枢神経系でのアスコルビン酸の turnover rate は時間あたり2%でありこれは虚血に際しても増加しないことから⁴⁰⁾、アスコルビン酸の取り込み系の障害でもまたこの減少を説明できない。Pietronigro ら²⁹⁾もまた犬脊髄の外傷モデルで同様のアスコルビン酸の減少を認めている。このアスコルビン酸総量の減少の正確な理由は明らかでないが、本実

験から少なくとも虚血後にアスコルビン酸の酸化が起きていることは確実である。また、酸化型アスコルビン酸は中大脳動脈閉塞後1.5時間から12時間まで有意に増加し、最高値には虚血3時間後に達し対照手術群の3倍であった。このことはアスコルビン酸の酸化は虚血後比較的早期から起こることを示唆している。

細胞質および細胞膜成分の抗酸化系が相互的に作用し、酸化的障害に対し有効な細胞保護機構を形成することが *in vitro* で知られている^{22,23,35}。このうち、水溶性抗酸化物質、とりわけアスコルビン酸が α -トコフェロールをその酸化物質から再生させることにより細胞膜中の α -トコフェロールのレベルを維持するとされ、実際にアスコルビン酸が α -トコフェロールセミキノン還元することが報告されている²⁰。抗酸化物質の減少がすべて脂質過酸化に対する消費によるものとすれば、本実験において細胞膜障害の程度が最も少ないと考えられる虚血後0.5時間までの消費速度は α -トコフェロールでは $16.68 \text{ nmol/g wet brain/hour}$ であるのに対して、還元型トコフェロールでは $1208 \text{ nmol/g wet brain/hour}$ となる。したがって、この時間帯での還元型アスコルビン酸/ α -トコフェロールの消費比は72.4と計算される。このことは脂質過酸化反応の場合は細胞膜であるにもかかわらず細胞質成分もまた虚血早期からかなり変化をうけることを示唆しているとともに細胞質および細胞膜成分での相補的な抗酸化系の *in vivo* での存在を示すものでもある。しかしながら、この系は細胞膜の構造が比較的保たれている虚血早期にのみ作用するのであろう。

尿酸は虚血中に著しく増加し、中大脳動脈閉塞後24時間では対照手術群の約20倍に達した。しかしながら、脳には活性酸素を発生させ得るキサンチンオキシダーゼが存在しないかあってもきわめて微量とされその意義についてあまり問題にされなかった。けれども本実験で脳中の尿酸は虚血により大量に生成されることが明らかになり、この酵素について検討する必要性が生じた。実際にラット脳で検討したところ、 $0.87 \pm 0.13 \text{ mIU}$ のキサンチンオキシダーゼ活性が認められたが、この活性量は本実験での尿酸の増加量を十分に説明し得るものであった。さらに、虚血によりスーパーオキシドを発生させ得る Oxygen-dependent oxidase (type-I) の比率が約30%増加し、NAD-dependent dehydrogenase が Oxygen-dependent oxidase に転換することが明らかになった。この酵素転換の原因については虚血で誘導された活性型プロテアーゼによる作

用が考えられている¹³。本実験では30分の全脳虚血で約30%の酵素転換が認められたが、Downey ら¹³ はラット心臓で検討し、酵素転換は虚血後5分で完遂され、その程度は25%であったとしこの不完全な転換率については転換しにくいキサンチンオキシダーゼの isozyme の存在を考えている。

キサンチンオキシダーゼは内皮細胞に多く存在していることが知られ¹⁸、Betz⁵ はラット脳ではキサンチンオキシダーゼに関して血管成分が脳実質成分より3.7倍活性が高いと報告している。それゆえ、キサンチン-キサンチンオキシダーゼ系により開始するフリーラジカル反応の場合は主に毛細血管であると推測される。また血管内皮の障害は血管透過性を増加させることが知られており¹⁰、虚血性脳障害の中でもとりわけ浮腫の発生に関与している可能性が示唆される。実際、キサンチンオキシダーゼにハイポキサンチンおよび ADP-Fe^{3+} を加えてラット脳へ注入した実験で血液脳関門が破壊されたという報告もある⁸。活性酸素の発生源にはこのキサンチンオキシダーゼ経路以外にもモノアミンオキシダーゼによるカテコールアミンの酸化、ミトコンドリア呼吸鎖、組織に浸潤した白血球、プロスタグランジンのサイクロオキシゲナーゼ経路などが知られている。したがって、虚血脳のフリーラジカル反応は多くの機序で引き起こされる可能性が考えられ、これについては今後の検討を要する。

結 語

本実験ではラット脳を用い、脂溶性および水溶性の内因性抗酸化物質の経時的な変動を検討し、局所脳虚血においては虚血後早期よりフリーラジカル反応、脂質過酸化反応が起こることを確かめ、細胞膜成分に劣らず細胞質成分も虚血後早期より変化を受けることを明らかにした。また抗酸化物質、特に α -トコフェロールと還元型アスコルビン酸の変動から抗酸化機序における細胞質と細胞膜間の相補的な抗酸化系の存在が示唆された。さらに、活性酸素発生源としてのキサンチンオキシダーゼのラット脳における存在を確認し、虚血によりスーパーオキシドを発生させ得る Oxygen-dependent oxidase の比率が増加することを明らかにし虚血性脳障害におけるこの酵素の意義について論じた。

稿を終えるにあたり、御指導、御稿閲を賜りました京都大学脳神経外科、菊池晴彦教授に深謝致します。また快く実験の場をお与え頂くとともに御指導を賜りました京都大学衛生

学教室, 糸川嘉則教授, 木村美恵子助教授, 同教室の諸先生方に深謝致します。また終始, 御指導, 御鞭達頂いた京都大学脳神経外科, 石川正恒講師に深謝致します。

References

- 1) Abe K, Ohmae M, Katsui G: Rapid and micromethod for the determination of tocopherols in liver. *Vitamins* 50: 453-457, 1976 (Jap).
- 2) Abe K, Yoshida S, Watson BD, et al: α -Tocopherol and ubiquinones in rat brain subjected to decapitation ischemia. *Brain Res* 273: 166-169, 1983.
- 3) Al-Khalid UAD, Chaglassian TH: The species distribution of xanthine oxidase. *Biochem J* 97: 318-320, 1965.
- 4) Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al: Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 17: 472-476, 1986.
- 5) Betz AL: Identification of hypoxanthine transport and xanthine oxidase activity in brain capillaries. *J Neurochem* 44: 574-579, 1985.
- 6) Bodannes RS, Chan PC: Ascorbic acid as a scavenger of singlet oxygen. *FEBS Lett* 105: 195-196, 1979.
- 7) Bremer AM, Yamada K, West CR: Experimental regional cerebral ischemia in the middle cerebral artery territory in primates. *Stroke* 9: 387-391, 1978.
- 8) Chan PH, Schmidley JW, Fishman RA, et al: Brain injury, edema, and vascular permeability changes induced by oxygen-derived free radicals. *Neurology* 315-320, 1984.
- 9) Cooper AJL, Pulsinelli WA, Duffy TE: Glutathione and ascorbate during ischemia and posts ischemic reperfusion in rat brain. *J Neurochem* 35: 1242-1245, 1980.
- 10) Del Maestro RF, Bjork J, Arfors KE: Increase in microvascular permeability induced by enzymatically generated free radicals. *Microvasc Res* 22: 239-254, 1981.
- 11) Della Corte E, Stirpe F: The regulation of rat liver xanthine oxidase. *Biochem J* 126: 739-745, 1972.
- 12) Demopoulos HB, Flamm ES, Pietronigro DD, et al: The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta Physiol Scand Suppl* 492: 91-119, 1980.
- 13) Downey JM, Miura T, Eddy LJ, et al: Xanthine oxidase is not a source of free radicals in the ischemic rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 19: 1053-1060, 1987.
- 14) Flamm ES, Demopoulos HB, Seligman ML, et al: Free radicals in cerebral ischemia. *Stroke* 9: 445-447, 1978.
- 15) Fukuzawa K: Vitamin E and lipid model membranes, in Igarasi O(ed): *Vitamin E*. Tokyo: Ishiyaku Press, 1985, pp. 84-91 (Jap).
- 16) Ikenoya S, Takada M, Yuzuriha T, et al: Studies on reduced and oxidized ubiquinones. I. Simultaneous determination of reduced and oxidized ubiquinones in tissues and mitochondria by high performance liquid chromatography. *Chem Pharm Bull* 29: 158-164, 1981.
- 17) Iriyama K, Yoshiura M, Iwamoto T, et al: Simultaneous determination of uric acid and ascorbic acids in human serum by reversed-phase highperformance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal Biochem* 141: 238-243, 1984.
- 18) Jarasch ED, Bruder G, Heid HW: Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta Physiol Scand Suppl* 548: 39-46, 1986.
- 19) Kanemitsu H, Tamura A, Sano K, et al: Changes of uric acid level in rat brain after focal ischemia. *J Neurochem* 46: 851-853, 1986.
- 20) Klicpera JA, Hoffmann PC: Ubiquinone redox status in brain in vitro. *J Neurochem* 24: 1023-1028, 1975.
- 21) Lang JK, Gohil K, Packer L: Simultaneous determination of tocopherols, ubiquinols, and ubiquinones in blood, plasma, tissue homogenates, and subcellular fractions. *Anal Biochem* 157: 106-116, 1986.
- 22) Leung HW, Vang MJ, Mavis RD: The cooperative interaction between Vitamin E and Vitamin C in suppression of peroxidation of membrane phospholipid. *Biochim Biophys Acta* 664: 266-272, 1981.
- 23) Liebler CD, Kling DS, Reed DJ: Antioxidant protection of phospholipid bilayers by α -tocopherol. *J Biol Chem* 261: 12114-12119, 1986.
- 24) Markley HG, Faillace LA, Mezey E: Xanthine oxidase activity in rat brain. *Biochim Biophys Acta* 309: 23-31, 1973.
- 25) Marubayashi S, Dohi K, Kawasaki T, et al: Changes of the levels of endogenous coenzyme Q homologues, α -tocopherol, and glutathione in rat liver after hepatic ischemia and reperfusion, and the effect of pretreatment with coenzyme Q10. *Biochim Biophys Acta* 797: 1-9, 1984.
- 26) Nishikim M: Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xanthine-xanthine oxidase system. *Biochem Biophys Res Commun* 63: 463-468, 1975.

- 27) Omaye ST, Turnbull JD, Sauberlich HE: Selected methods for the determination of ascorbic acid in animal cells, tissues, and fluids. *Methods Enzymol* 62: 3-14, 1979.
- 28) Packer JE, Slater TF, Willson RL: Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and C. *Natur* 278: 737-738, 1979.
- 29) Pietronigro DD, Hovsepian M, Demopoulos HB et al: Loss of ascorbic acid from injured feline spinal cord. *J Neurochem* 41: 1072-1076, 1983.
- 30) Podzuweit T, Braun W, Muller A, et al: Arrhythmias and infarction in the ischemic pig heart are not mediated by xanthine oxidase-derived free oxygen radicals. *Basic Res Cardiol* 82: 493-505, 1987.
- 31) Pulsinelli WA, Brierley JB: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 10: 267-272, 1979.
- 32) Ramboer CRH: A sensitive and nonradioactive assay for serum and tissue xanthine oxidase. *J Lab Clin Med* 74: 828-835, 1969.
- 33) Rehncrona S, Folbergrova J, Smith DS, et al: Influence of complete and pronounced incomplete cerebral ischemia and subsequent recirculation on cortical concentrations of oxidized and reduced glutathione in the rat. *J Neurochem* 34: 477-486, 1980a.
- 34) Rehncrona S, Smith DS, Akesson B, et al: peroxidative changes in brain cortical fatty acids and phospholipids, as characterized during Fe^{2+} - and ascorbic acid-stimulated lipid peroxidation in vitro. *J Neurochem* 34: 1630-1638, 1980b.
- 35) Santos JN, Hempstead KW, Kopp LE et al: Nucleotide metabolism in rat brain. *J Neurochem* 15: 367-376, 1968.
- 36) Scarpa M, Rigo A, Maiorino M, et al: Formation of α -tocopherol radical and re-cycling of α -tocopherol by ascorbate during peroxidation of phosphatidylcholine liposomes. *Biochim Biophys Acta* 801: 215-219, 1984.
- 37) Schultz V, Lowenstein JM, Purine nucleotide cycle: evidence for the occurrence of the cycle in the brain. *J Biol Chem* 251: 485-492, 1976.
- 38) Siesjo BK, Bendek G, Koide T, et al: Influence of acidosis on lipid peroxidation in brain tissues in vitro. *J Cereb Blood flow Metabol* 5: 253-258, 1985.
- 39) Spector R, Lorenzo AV: Specificity of ascorbic acid transport system of the central nervous system. *Am J Physiol* 226: 1468-1473, 1974.
- 40) Spector R, Spector AZ, Snodgrass S: Model for transport in the central nervous system. *Am J Physiol* 232: 73-79, 1977.
- 41) Stirpe F, Della Corte E: The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J Biol Chem* 244: 3855-3863, 1969.
- 42) Villela GG: Xanthine oxidase activity in the brain. *Experimentia* 24: 1101-1102, 1968.
- 43) Welsh FA, Sakamoto T, McKee AE, et al: Effect of lactoacidosis on pyridine nucleotide stability during ischemia in mouse brain. *J Neurochem* 49: 846-851, 1987.
- 44) Yavorsky M, Almaden P, King CG: The vitamin C content of human tissues. *J Biol Chem* 106: 525-529, 1934.
- 45) Yoshida S, Abe K, Busto R, et al: Influence of transient ischemia on lipid soluble antioxidants, free fatty acids and energy metabolites in rat brain. *Brain Res* 245: 307-316, 1982.
- 46) Yoshida S, Busto R, Watson BD, et al: Post-ischemic cerebral lipid peroxidation in vitro: Modification by dietary Vitamin E. *J Neurochem* 44: 1593-1601, 1985.
- 47) Yoshiura M, Iwamoto T, Iriyama K: Liquid chromatographic determination of catecholamines, ascorbic acid, and uric acid in mammalian tissues. *Jikeikai Med J* 32: 21-31, 1985.
- 48) Zalenska MM, Floyd RA: Regional lipid peroxidation in rat brain in vitro: possible role of endogenous iron. *Neurochem Res* 10: 397-410, 1985.