総説 脳虚血への細胞応答の病態分子薬理

ラット中大脳動脈閉塞・再灌流後の iNOS の誘導と梗塞巣進展

長藤 寿昭, 鈴木 昌幸, 細井 陽介

1. はじめに

本邦における脳血管障害による死亡は急性期治療の向上に伴い 1970 年を境に減少に転じたが, 成人病の死亡原因としては未だ癌に次ぎ 2 位である. 一方, 発症率に関しては多くの統計結果から変化はないと考えられ, 世界に類を見ない今後の高齢化を考えれば患者数はむしろ増加していくと推測される. 死亡率の低下と高齢化は慢性期脳血管障害の増加を生み, このことは患者個人および社会的な面からは勿論, 長期療養に伴う医療経済性の面からも国家的な問題となっている. 脳血管障害のうち大部分を占める脳梗塞では, 脳動脈の閉塞により閉塞部位から末梢側で乏血を起こし虚血状態となる. 脳梗塞の慢性期症状は神経細胞の脱落に起因するものが殆どであり, これらの症状を完全に回復させる治療薬あるいは治療方法の確立は困難を極めるものと考えられる. 従って, 脳梗塞に対する治療成績の向上は如何に神経細胞の保護を目的とした急性期の治療を実施するか, 急性期にどこまで症状の改善が行えるのかにかかっていると言っても過言ではない. しかしながら, 現在臨床で用いられている治療薬は, 抗血小板薬, 抗凝固薬等であり, これらは直接神経保護作用を有するものではない(1).

我々は 1991 年から脳梗塞やその他神経変性疾患の新規な治療剤開発の観点から, 一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase, NOS) 阻害剤の研究を開始した. これまでの我々の検討結果は, 主に血管内皮細胞に構成的に発現している endothelial NOS (eNOS) に対して, 主に神経細胞に構成的に発現している neuronal NOS (nNOS) に

選択的な阻害剤は, ラット中大脳動脈 (MCA) 閉塞後の脳浮腫, 脳梗塞を広い用量範囲で軽減することを示している(2~5). 即ち, eNOS 阻害作用に起因する体血圧上昇, 脳血流量低下, 血小板凝集等は, 既に虚血状態にある組織の微小循環をさらに悪化させてしまうため, 非選択的 NOS 阻害剤と比較すると神経保護作用用量と副作用用量との乖離が広がるためと解釈される. この考えは, nNOS ノックアウトマウスの MCA 閉塞後の梗塞巣は対照群より小さいこと(6), 一方 eNOS ノックアウトマウスでのそれは対照群より大きく, これに NOS の非選択的阻害剤である N^G -nitro-L-arginine (L-NA) を投与すると梗塞巣は縮小される(7) という, より直接的な実験によって証明されている. これらの研究を行った Dr. Moskowitz との私信では, nNOS/eNOS ノックアウトマウスでは理由は不明であるが inducible NOS (iNOS) は発現しないので, eNOS ノックアウトマウスに投与した L-NA は nNOS を抑制することになるという. これらの実験成績は, 虚血性脳損傷の発生・進展機序に nNOS が重要な役割を演じることを示している. また, グリア細胞, 白血球, 骨細胞その他様々な細胞には新規に誘導合成される iNOS が存在し得るため, 当然のことながら我々の研究の課程で, 虚血性脳損傷の進展における iNOS の寄与に関しても明らかにする必要があった. 本稿では特に iNOS に焦点を当て, 我々のこれまでの研究の一端を紹介し考察を加えてみたい.

2. MCA 閉塞・再灌流モデルにおける脳内 NO, nNOS, eNOS の変動

表 1 に MCA 閉塞・再灌流後の脳内 NO やその代謝関連物質と NOS の変動を報告した論文を, 急性期 (MCA 閉塞後 2 時間以内), 亜急性期 (MCA 閉塞 2 時間移行から 24 時間以内), 慢性期 (MCA 閉塞 24 時間移行 7 日以内) に分類してまとめた. 最初にこの種の実験を報告したのはポルフィリン電極装置を用いた Malinski ら(8) であったが, そこでは再灌流後の NO 濃度変化のデータは 1 例しか報告されていないばかりか, 再灌流直後の NO 濃度

キーワード: 神経型一酸化窒素合成酵素, 誘導型一酸化窒素合成酵素, 血管内皮型一酸化窒素合成酵素, 中大脳動脈閉塞, 脳梗塞

中外製薬(株)富士御殿場研究所
(〒412 静岡県御殿場市駒門 1-135)

原稿受領日: 1997 年 8 月 28 日

編集委員会依頼総説

Table 1 Reported changes of NOS, NO and its related metabolites in MCA occlusion models

Author	Species	Model	Method	Results
Acute phase (<2 hr)				
Malinski et al (1993)	rat (Wistar)	2 hr MCAO + 1 hr RE	porphyrinic microsensor	MCAO: begins at 2-3 min and peaks at 3-24 min (1.3-4 mM), RE: slowly increase
Tominaga et al (1993)	rat (SD)	5-30 min MCAO + BCCAO	EPR (NO-metal complex)	increases at 5 min and peaks at 15 min
Matsui et al (1993)	rat (SD)	2 hr MCAO + 2 hr RE	Pt/Ir microsensor	MCAO: increases at 10-45 min (1.7 mM) and at 1.5-4 hr (0.5 mM), RE: 1-2 hr (1 mM)
Kader et al (1993)	rat (Wistar)	1 hr MCAO + BCCAO	nitrite, cGMP, NOS activity	transient ten fold increase in NOS activity at 10-min post-ischemia
Kumura et al (1994)	rat (SD)	2 hr MCAO + 30 min RE	EPR (nitrosyl hemoglobin)	selective increase during RE
Sato et al (1994)	rat (SD)	60 min MCAO + 30 min RE	EPR (NO-metal complex)	increases at 5-60 min post MCAO and RE
Kumura et al (1994)	rat (SD)	2 hr MCAO + 30 min/2 hr RE	nitrite + nitrate	increase at 2 hr post MCAO, at 30 min and 2 hr post RE in plasma
Nagafuji et al (1995)	rat (SD)	2 hr MCAO + 2 hr RE	eNOS, iNOS in brain MVs	eNOS: 5.3-fold increase, iNOS: no change
Zhang et al (1995)	rat (Wistar)	2 hr MCAO + 1 hr RE	porphyrinic microsensor	basal: <10 nM, maximum during MCAO: 1.47 mM, maximum during RE: 0.54 mM
Lin et al (1996)	rat (SD)	40 min MCAO + BCCAO	TMPP-Ni/Nafion microsensor	peaked at 7 min (18.76 ± 3.36 nM), half-life for NO decay: 16.3 ± 1.5 min
Subchronic phase (2-24 hr)				
Zhang et al (1993)	rat (Wistar)	1 hr-7 days MCAO	eNOS IR	increases at 1-24 hr post MCAO in ischemic penumbra
Nagafuji et al (1993)	rat (SD)	15 min-7 days MCAO	eNOS, iNOS in brain MVs	eNOS: increase at 15 min, 4, 24 hr
Zhang et al (1994)	rat (Wistar)	1 hr-6 days MCAO	nNOS mRNA and IR	mRNA: increase at 15 min and peak at 1 hr, IR: increase at 2-48 hr, peak at 4 hr
Chronic phase (24 hr-7 days)				
Nagafuji et al (1993)	rat (SD)	15 min -7 days MCAO	eNOS, iNOS in brain MVs	iNOS: increase at 48 hr, 7 days
Wallace et al (1994)	mouse	5 days MCAO	NADPH-D	expression in reactive astrocytes surrounding the infarction
Iadecola et al (1995)	rat (SHR)	7 days MCAO	iNOS activity, NADPH-D	increase at 1, 2 days
Iadecola et al (1995)	rat (SHR)	7 days MCAO	iNOS mRNA, activity, IR	mRNA: begin at 12 hr, peak at 48 hr, activity: peak at 2 days; IR: 48-96 hr in neutrophils
Yoshida et al (1995)	rat (SD)	7 days MCAO	iNOS activity	increases at 3, 4 days
Iadecola et al (1996)	rat (SD)	2 hr MCAO + 7 days RE	iNOS mRNA, activity, IR	mRNA: maximal at 12 hr; activity: peak at 1 day; IR: 12-24 hr in vascular cells

MCAO, middle cerebral artery occlusion; RE, reperfusion; BCCAO, bilateral common carotid artery occlusion; EPR, electron paramagnetic resonance; MVs, microvessels; IR, immunoreactivity; NADPH-D, NADPH-diaphorase

変化を示す実際のトレースは削除してある。さらに、最も重要であるはずの NO 濃度の変動と脳損傷の程度の相関、あるいは NOS 阻害剤による NO 濃度の減少と脳損傷の程度の相関に関しては検討がなされていない。

そこで我々は、白金・イリジウム製の作用電極をもつ NO 測定装置を用いてこれらの点を検討した。その結果、ラット MCA を閉塞すると 15~30 分後に患側大脳皮質表層部の NO 濃度は $2.4 \sim 4 \mu\text{M}$ 増大し、その後一旦虚血前のレベルに戻ったが、3~4 時間後に再び $1.6 \mu\text{M}$ の増大を示した。また 2 時間閉塞 2 時間再灌流モデルでは、再灌流 1~2 時間後に約 $6 \mu\text{M}$ の NO 濃度上昇を認めた。さらに両モデルにおいて L-NA を投与すると、上述した NO 濃度上昇は抑制され、その後の脳浮腫の発生や大脳皮質領域の梗塞巣を減少させることを見出した(9, 10)。ここで注目すべきは、NO 濃度上昇が「見かけ上」2 相性であったという点である。「見かけ上」と記載した理由は、「この 2 つの NO のピークは実は 1 つの大きなピークとして存在するが、その大きなピークの中心付近では発生した大量の NO は次々と peroxynitrite anion (ONOO^-) に変化し、NO 電極装置では検知されなかったために両端の 2 つの小さなピークとして検出されたのではないか」という仮説を考えたからである。残念ながら、その後この仮説を検証する実験には至っていないが、上記実験成績は L-NA の作用機序、即ち脳虚血後に脳内 NO 濃度は上昇し、これを抑制するとその後に発生する脳損傷を軽減することを初めて示したものであった。

次に、上述した脳内 NO 濃度上昇の由来を調べる目的で、まず脳微小血管に注目して Ca^{2+} 依存性あるいは非依存性に $[\text{H}^3]\text{-L-arginine}$ から $[\text{H}^3]\text{-L-citrulline}$ へ変換する量を測定することで、eNOS と iNOS 活性の経時変化を調べた。その結果、MCA 閉塞 15 分後には eNOS 活性が 806 % 増大し、4 時間後と 24 時間後には iNOS 活性がそれぞれ 822% と 820% 増大し、さらに 1 週間後には eNOS 活性が 643% 増大することを発見した。また、2 時間の MCA 閉塞後に 2 時間の再灌流を施行すると、iNOS 活性には変化が認められないが eNOS 活性は 429% 増大することも判明した(5, 11, 12)。従って、前述した NO 濃度上昇の由来は、MCA 閉塞 15~30 分後は eNOS、3~4 時間後は iNOS が、また再灌流 1~2 時間後は eNOS 活性の増大が少なくとも部分的に寄与しているものと考えられた。

我々の NO 電極装置を用いた脳内 NO 濃度の定量は急性期の実験しか行えなかったが、Zhang ら(13)は、eNOS に対するモノクローナル抗体を用いて MCA 閉塞 1 週間後までのラット脳切片における免疫染色像の経時変化を報告している。それによると、閉塞 1 時間後から脳微小血管中の eNOS 免疫染色活性が増大し始め、24 時間

後には最大に達し、少なくとも 1 週間後まで持続していたという。我々の実験の 48 時間と 1 週間後に eNOS 活性が増大する結果と一致する彼らの実験成績は、この時期における eNOS 活性の増大は酵素量の増大によることを示唆している。また彼らは、同様のモデルで eNOS のみならず nNOS の Northern blotting による mRNA 量と免疫染色像の経時変化も報告している(14)。その内容は、nNOS mRNA は MCA 閉塞 15 分後から増大し始め 1 時間後にピークに達し、nNOS 免疫染色活性は 2 時間後から上昇し 4 時間でピークに達するという非常に興味深いものであった。何故ならば、現在臨床試験や前臨床試験の途上にある神経保護作用を目的とした各種興奮性アミノ酸受容体拮抗剤 (NMDA 受容体拮抗剤、グリシン受容体拮抗剤、AMPA 受容体拮抗剤) の動物実験での therapeutic time window (MCA 閉塞時から治療効果が得られる薬物投与開始までの時間) は殆どが 1 時間が限界であるので、nNOS 特異的阻害剤はそれを少なくとも 2~4 時間へと拡大する可能性を有することを意味しているからである。事実 Zhang ら(15)は、eNOS/iNOS に対して少なくとも 100 倍 nNOS に選択的な阻害剤である ARL17477 を、2 時間 MCA 閉塞 1 週間再灌流モデルで再灌流直後から投与しても梗塞巣を縮小させることを報告している。さらに優れた nNOS 特異的阻害剤の MCA 永久閉塞モデルでの therapeutic time window も、近い将来に明らかにされるであろう。

3. これまでに報告されているラット MCA 閉塞・再灌流モデルにおける梗塞巣進展と iNOS の誘導

この命題に関して、Iadecola らのグループがこれまで精力的な研究を行っている。彼らは外頸動脈から MCA 起始部の内頸動脈までナイロン栓子を挿入することで作製する、いわゆる suture model で一連の実験を行っている。それらを要約すると、まず MCA 永久閉塞モデルでは、iNOS mRNA は 12 時間後から上昇し 48 時間後にピークに達し、酵素活性は 24~48 時間後に増大し、48~96 時間後に多核白血球で免疫組織活性の増大が観察されている(16, 17)。次ぎに 2 時間閉塞からの再灌流モデルでは、iNOS mRNA と酵素活性はそれぞれ 12 時間後と 24 時間後にピークに達し、12~24 時間後に血管内皮細胞で免疫組織活性の増大が観察されている(18)。さらに、彼らは iNOS 特異的阻害剤と称して aminoguanidine (AG) を驚くべきことに MCA 閉塞 24 時間後から投与を開始しても、両モデルで有意に梗塞巣を縮小させたとしている(18, 19)。また、iNOS ノックアウトマウスで MCA 閉塞後の梗塞巣は対照群より小さいことから(20)、彼らは iNOS が梗塞巣の進展に大きく関与していると考えている。前項

で述べた nNOS/eNOS の MCA 永久閉塞モデルでの免疫組織活性の変化と Iadecola ら(17) のそれを、よく知られている脳浮腫・脳梗塞形成の経時変化と共に模式的に図 1 に示したが、急性期脳血管障害の約 80% を占める脳梗塞の治療剤にとって、上述した様に “therapeutic time window” は極めて重要であるので、Iadecola ら(18, 19) の AG の実験成績は大変魅力的である。

しかしながら残念なことに、AG も含めて試薬として購入できる NOS 阻害剤の阻害強度や各アイソフォームに対する選択性を、同じ方法で NOS 活性を測定し、同じ精製度の酵素サンプルを用いて比較した報告は存在しなかった。そこで我々はこの点を調べたところ、AG はとても iNOS 特異的阻害剤と言える様なものではなく、その阻害強度も極めて弱いことが判明した。これに関連して、7-nitro indazole (7-NI) もしばしば nNOS 特異的阻害剤として用いられることがあるが、これも少なくとも *in vitro* では非常に弱い非選択的 NOS 阻害剤である(4, 5)。少なくとも *in vitro* 実験で、AG や 7-NI を iNOS や nNOS 特異

的阻害剤として用いることの危険性についてここで再度警鐘を鳴らしたい。この様に論を進めると、Iadecola らの実験における AG の梗塞巣縮小作用は、iNOS 阻害以外の作用によってもたらされた可能性が浮上する。事実、AG は生体内ポリアミンの酸化によって毒性が高く反応性に富むアルデヒド代謝物を産生する酵素である PAO を阻害するし、また advanced glycation end product (AGE) の非酵素的阻害剤としても知られ、米国で糖尿病治療薬として臨床試験が行われたぐらいである。さらに、Iadecola ら(17) の MCA 永久閉塞モデルでの検討によれば、iNOS 酵素活性の上昇がまだ見られない 24 時間後の梗塞巣を、AG は閉塞 2 時間後からの投与で縮小させている(21)。しかしながら Iadecola ら(19) は、MCA 永久閉塞 4 日後の梗塞巣に対する AG の効果を評価した際、患側で上昇する iNOS 活性を AG が抑制することも報告しており、AG の作用機序は今後の研究結果の集積を待たなければ断定できない。

Fig. 1 Diagram summarizing the reported immunocytochemical analysis of NOS in the rat brain during MCA occlusion. It is well-known that brain edema and infarction occur at 3-4 hr and reach their maximum levels at 48-72 hr after the onset of MCA occlusion. nNOS immunoreactivity (IR)-containing neurons in the ischemic cortex and striatum were significantly greater than those in the contralateral hemisphere at 2-48 hr after the onset of MCA occlusion. The number of nNOS IR-containing neurons peaked at 4 hr after ischemia (14). iNOS IR was increased in neutrophils at 48-96 hr after ischemia (16). eNOS IR in the cerebral vessels was upregulated at 1 hr after the induction of ischemia throughout the ischemic region. The induction of eNOS IR progressively increased up to 24 hr of ischemia (13).

4. 我々の実験でのラット MCA 閉塞・再灌流モデルにおける梗塞巣進展と iNOS の誘導

前項に記載した Iadecola らの実験成績を追試する目的で、我々は craniotomy (直線的開頭法) によって MCA にアプローチする、いわゆる田村法によるラット MCA 閉塞・再灌流モデルを用いて iNOS の誘導を調べた。我々の実験では、3 時間閉塞からの再灌流で再現性良く比較的安定した梗塞巣の経時変化が得られていたので (図 2)、梗塞巣体積がピークに達する 48 時間後まで同じ再灌流時間において iNOS mRNA を reverse transcription-polymerase chain reaction products (RT-PCR) 法で検索した。図 2 で 96 時間の再灌流によって梗塞巣体積が 48 時間後より減少している点に関して、実験では 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) の非染色部位を梗塞巣として定量しており、この時期にはグリオシスが起きているため、実際には梗塞巣である部位にグリア細胞が集積し TTC で染色されるために、見かけ上梗塞巣体積が減少した結果となっているのではないかと推察される。

図 3 に iNOS mRNA をもとに増幅した cDNA の典型的な電気泳動像写真を示したが、患側大脳皮質から調製した total RNA 画分中において恒常的に発現している

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) mRNA 量には明らかな変化は認められないのに対し、24 時間まで再灌流時間の延長に従って iNOS mRNA の増大が検出された。図 4 は iNOS mRNA 量を G3PDH mRNA 量に対する比率で表現し各群 4 例で解析した定量結果を、正常無処置群での結果と比較して示した。正常無処置ラットの患側にも僅かに iNOS mRNA 量が検出されたが、再灌流 3 時間後にはその 10 倍以上に増大し、以降再灌流時間と共に増大し 24 時間後にピークに達した後、48 時間後から減少し始めていた。興味深いことに、対照側においても MCA 閉塞・再灌流で iNOS mRNA 量の増加が観察されたが、これはおそらく患側の外科的処置が対照側へ神経連絡網 (transcallosal pathway) を介して何らかの影響を及ぼす、いわゆる diaschisis の結果ではないかと考えられる。次に、患側の iNOS mRNA 量の増大が真に虚血・再灌流のみによって誘導されたものなのかどうかを検証するために、MCA を閉塞する以外の全ての外科的処置を施行し、9 時間後と 27 時間後に脳を取り出した偽手術群と、3 時間 MCA 閉塞 6 時間再灌流群、3 時間 MCA 閉塞 24 時間再灌流群とをそれぞれ比較した (図 5)。その結果、両群とも偽手術群と比較して患側の iNOS mRNA 量に統計学的な有意差はなかった。従って、図 4 に示した MCA

Fig. 2 Chronological alterations in infarct volume after reperfusion following 3 hr of MCA occlusion in rats. Surgical procedures for induction of transient MCA occlusion were described elsewhere (4, 5). Following a reperfusion, indicated in the figure, the animals were decapitated, and then coronal brain sections were stained with TTC solution. The injured area in each section was determined by subtracting the non-injured area in the ischemic hemisphere from that in the contralateral hemisphere to reduce the influence of edematous expansion of the infarct tissue. The total infarct volume was calculated by integrating the injured areas obtained from each section.

Fig. 3 A representative agarose gel with RT-PCR corresponding to iNOS and G3PDH after transient MCA occlusion in rats. Although a faint band corresponding to iNOS cDNA is detected in the sham-operated group at 6 hr of reperfusion, the density of iNOS cDNA apparently increases up to 24 hr of reperfusion in the ischemic hemisphere.

閉塞・再灌流後の iNOS mRNA 量の増加は、虚血・再灌流以外の外科的侵襲によって誘導されたものであることが判明した。尚, Iadecola ら(16) の報告では iNOS mRNA 量の増加がピークに達している 48 時間 MCA 永久閉塞後においても、我々の結果は同様であった (結果省略)。さらに Iadecola ら(18) と同じ抗体を用いて、MCA 永久閉塞後、あるいは再灌流後の脳組織を用いて Western blotting を行ったところ、陽性対照である精製した iNOS タンパクのバンドは検出されたが、何れの虚血脳サンプルにおいても iNOS は検出されなかった (図 6)。この結果と一致して、脳切片を用いた免疫組織染色においても明らかな iNOS 陽性細胞群は検出されなかった (結果省略)。以上の我々の実験成績から、ラット MCA 閉塞・再灌流後の脳梗塞の進展において iNOS は重要な役割を持たないと結論された。

iNOS mRNA の発現は検出されているのに iNOS タンパクは検出されなかったことに関して、RT-PCR 法は原理的に in situ での現象を増幅して検出するので、生体内で誘導された iNOS mRNA 量は、その後 iNOS タンパクに翻訳され存在するとしても所詮 Western blotting の検

Fig. 4 Temporal profiles of the expression of iNOS mRNA in the ischemic and contralateral hemispheres after transient MCA occlusion in rats. The amount of the iNOS cDNA band is normalized using the corresponding G3PDH band. iNOS mRNA expression starts at 3 hr and is maximal at 24 hr of reperfusion after ischemia.

Fig. 5 Quantitative analysis of iNOS mRNA expression at 6 hr (left) and 24 hr of reperfusion (right) compared to their respective time-matched sham operation. No significant difference is obtained between the 6-hr and 24-hr reperfusion groups and their respective sham operation groups in the amount of iNOS mRNA. * : $P < 0.05$, sham vs. MCAO, contralateral (unpaired t-test).

Fig. 6 Western blotting of iNOS in a rat model of permanent and transient MCA occlusion. Although a band corresponding to purified iNOS as the positive control is seen, no evident iNOS band is detected in the brain subjected to either permanent or transient ischemia.

出限界以下の産物でしかないと解釈するのが妥当であろうと考えている。また Iadecola らの報告との相違に関しては、局所脳虚血モデルの種類の相違が起因している可能性が高い。田村法では、頭蓋骨に小孔を開け、硬膜と蜘蛛膜を部分的に切開するのに対して、ナイロン栓子法ではその様な外科的侵襲は加わらないからである。事実、Iadecola ら(16)の実験では、偽手術による iNOS mRNA の増加は見られていない。しかしながら両モデルにはそれぞれ長所・短所があり、今後の脳虚血の基礎研究もこの2つの局所脳虚血モデルを用いて精力的に行われることが想像されるため、新しい現象の発見はモデルに関わらず普遍的に再現されることなのかどうかを検証されなければならない。

5. おわりに

我々が1991年にNOSの研究を開始して以来、世界的にnNOSあるいはiNOS特異的阻害剤を記載した特許が、我々のものも含めて既に何件か公開されている。さらに、これらの化合物が脳梗塞、頭部外傷、片頭痛、パーキンソン病、敗血症、腎不全、関節炎、慢性関節リウマチ、癌等の治療剤として有用性を発揮する可能性を開示する論文も集積しつつある。

ある統計によれば、新薬1品目が着想段階から薬価収載され上市されるまでには平均15年の年月と150億円近くの研究開発費を要するという。誠に気の遠くなる様な話である。医療の一端を担う製薬企業の研究員として、できれば自ら着想し研究活動を推進してきた結果を医療現場で貢献できる製品として結実させたいと願っている。少なくとも、その前臨床試験を終了させて、自身の研究生活に終止符を打ちたいと思っている。

文 献

- 1) 山口武典, 高木 誠, 橋本洋一郎, 神野哲夫: 脳卒中急性期治療—Update—. 脳と循環 **2**, 13-27 (1997)
- 2) Nagafuji T, Matsui T, Koide T and Asano T: Blockade of nitric oxide formation by N^G -nitro-L-arginine mitigates ischemic brain edema and subsequent cerebral infarction in rats. *Neurosci Lett* **147**, 159-162 (1992)
- 3) Nagafuji T, Sugiyama M, Matsui T and Koide T: A narrow therapeutic window of a nitric oxide synthase inhibitor against transient ischemic brain injury. *Eur J Pharmacol* **248**, 325-328 (1993)
- 4) Nagafuji T, Sugiyama M, Muto A, Makino T, Miyauchi T and Nabata H: The neuroprotective effect of a potent and selective inhibitor of type 1 NOS (L-MIN) in a rat model of focal cerebral ischaemia. *Neuroreport* **6**, 1541-1545 (1995)
- 5) Nagafuji T, Sugiyama M, Matsui T, Muto A and Naito S: Nitric oxide synthase in cerebral ischemia: possible contribution of nitric oxide synthase activation in brain microvessels to cerebral ischemic injury. *Mol Chem Neuropathol* **26**, 107-157 (1995)
- 6) Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC and Moskowitz MA: Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* **265**, 1883-1885 (1994)
- 7) Huang Z, Huang PL, Ma J, Meng W, Ayata C, Fishman MC and Moskowitz A: Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J Cereb Blood Flow Metab* **16**, 981-987 (1996)
- 8) Malinski T, Bailey F, Zhang ZG and Chopp M: Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* **13**, 355-357 (1993)
- 9) 長藤寿昭, 杉山昌一, 松居徹: ラット局所脳虚血中及び血流再開後の脳内NO産生増大とその由来: NO電極装置を用いたin vivo定量. 神経科学 **33**, 260-261 (1994)
- 10) 松居徹, 長藤寿昭, 浅野孝雄, 久村英嗣, 吉峰敏樹, 早川徹: 脳虚血とNO. 神経進歩 **38**, 957-964 (1994)
- 11) Nagafuji T, Sugiyama M and Matsui T: Temporal profiles of Ca^{2+} /calmodulin-dependent and -independent nitric oxide synthase activity in the rat brain microvessels following cerebral ischemia. *Acta Neurochir (Wien)* **60**, 285-288 (1994)
- 12) 長藤寿昭, 松居徹: NO産生増大による虚血性脳損傷. 実験医学 **13**, 127-135 (1995)
- 13) Zhang ZG, Chopp M, Zaloga C, Garcia JH, Pollock JS and Forstermann U: Cerebral endothelial nitric oxide synthase expression after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* **24**, 2016-2022 (1993)
- 14) Zhang ZG, Chopp M, Gautam S, Zaloga C, Zhang RL, Schmidt HHHW, Pollock JS and Forstermann U: Upregulation of neuronal nitric oxide synthase and mRNA, and selective sparing of nitric oxide synthase-containing neurons after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res* **654**, 85-95 (1994)
- 15) Zhang ZG, Reif D, Macdonald J, Tang WX, Kamp DK, Gentile RJ, Shakespeare WC, Murray R and Chopp M: ARL 17477, a potent and selective neuronal NOS inhibitor decreases infarct volume after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* **16**, 599-604 (1997)
- 16) Iadecola C, Zhang F, Xu S, Casey R and Ross ME: Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **15**, 378-384 (1995)
- 17) Iadecola C, Xu X, Zhang F, EL-Fakahany EE and Ross ME: Marked induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **15**, 52-59 (1995)
- 18) Iadecola C, Zhang F, Casey R, Clark HB and Ross ME: Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia. *Stroke* **27**, 1373-1380 (1996)
- 19) Iadecola C, Zhang F and Xiaohong X: Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. *Am J Physiol* **268**, R286-R292 (1995)
- 20) Iadecola C, Zhang F, Casey R and Ross ME:

Knockout mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene are resistant to cerebral ischemia. Abstracts of 26th Society for Neuroscience **22**, 1693 (1996)

21) Cockcroft KM, Meistrell IIM, Zimmerman GA,

Risucci D, Bloom O, Cerami A and Tracey K: Cerebroprotective effects of aminoguanidine in a rodent models of stroke. Stroke **27**, 1393-1398 (1997)

Abstract—Lack of evidence that inducible nitric oxide synthase participates in the development of ischemic brain damage. Toshiaki NAGAFUJI, Masayuki SUZUKI and Yohsuke HOSOI (Fuji-Gotemba Research Laboratories, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., 1-135 Komakado, Gotemba, Shizuoka 412, Japan).

Folia Pharmacol. Jpn. **111**, 45~53 (1998)

We have already reported that the concentration of nitric oxide (NO) increases during and after cerebral ischemia and a selective inhibitor of neuronal NO synthase (nNOS) suppresses this increase and subsequently mitigates brain damage in rats. Although the selective inhibition of nNOS is a promising pharmacological strategy for the treatment of stroke, the role of inducible NOS (iNOS) remains to be clarified. Toward this end, we investigated temporal alterations in iNOS mRNA by the RT-PCR method in a rat model of middle cerebral artery (MCA) occlusion. We found that iNOS mRNA in the ischemic hemisphere began to increase at 3 hr and reached the maximum level at 24 hr of reperfusion following 3 hr of MCA occlusion. However, quantitative analysis revealed that no significant difference existed between 6 hr or 24 hr reperfusion group and their respective time-matched sham operation group. In addition, neither Western blotting nor immunocytochemical study disclosed an apparent induction of iNOS at any time points examined. Similar results were obtained at 24 hr of permanent MCA occlusion. Taken together, these data indicate that iNOS induction during and after MCA occlusion may be not a critical event for the development of infarction caused by ischemia itself.

Keywords: neuronal nitric oxide synthase (nNOS); inducible nitric oxide synthase (iNOS); endothelial nitric oxide synthase (eNOS); middle cerebral artery (MCA) occlusion; cerebral infarction

著者プロフィール

長藤 寿昭 (ながふじ としあき)

◇中外製薬(株)富士御殿場研究所, 研究主査. ◇1985年広島大学医学部総合薬学科薬効解析科学講座卒, '87年同大学院医学系研究科生命薬学系修士課程修了, 同年中外製薬(株)入社, 富士御殿場研究所に配属, '93年広島大学より博士号(薬学)授与, '96年より新潟大学客員助教授を兼任, 現在に至る.

◇研究テーマ: 脳血管障害・神経変性疾患に対する新規治療剤のシーズ探索, 薬効解析, 創薬研究. 現在は特に nNOS 特異的阻害剤と脳梗塞, 片頭痛に興味を持っている. ◇趣味: 休日になると, 5歳と2歳になる娘と一緒に家庭菜園で野菜を作ったり, ガーデニングを楽しんでいる.

鈴木 昌幸 (すずき まさゆき)

◇中外製薬(株)富士御殿場研究所, 研究員. ◇1996年東京理科大学基礎工学研究科にて生物工学専攻修士課程を修了, 同年中外製薬(株)入社, 富士御殿場研究所に配属, 現在に至る. ◇研究テーマ: 学生時代は抗生物質生産菌である放線菌のプロテアーゼとインヒビターを題材とした基礎研究を行ったが, 中外(株)入社後は一転, 中枢神経の変性疾患に対する新薬の探索・創薬を主眼に研究し, 創薬研究のおもしろさを徐々に知りつつある. 現在は脳梗塞, 頭部外傷, アルツハイマー病, パーキンソン病等に興味がある. ◇趣味: 熱帯魚の王様ディスクに魅了され, 休日は飼育・繁殖に時間を費やしている.

細井 陽介 (ほそい ようすけ)

◇中外製薬(株)富士御殿場研究所, 研究員. ◇1995年京都大学薬学部大学院修士課程修了, 同年中外製薬(株)入社, 富士御殿場研究所に配属, 現在に至る. ◇研究テーマ: 脳血管障害治療薬, 神経変性疾患治療薬の創薬研究. ◇趣味: ドライブ, ランニング (ホノルルマラソンは完走できたので, 次はいつかボストンマラソンに出てみたいと思っている.)