

脳血管攣縮と superoxide

—Oxyhemoglobin 誘発脳血管攣縮モデルネコを用いて—

神山 和世・岡田 仁・鈴木 二郎

The Relation between Cerebral Vasospasms and Superoxide

—Application of an Experimental Model of Vasospasms Induced
by Oxyhemoglobin in Cats—

KAZUYO KAMIYAMA, HITOSHI OKADA and JIRO SUZUKI

Division of Neurosurgery, Institute of Brain Diseases, Tohoku University, Sendai 982

Summary

It was previously proposed that spasmogenic activity of oxyhemoglobin was stronger than that of methemoglobin and that oxyhemoglobin induced marked and continuous vasospasms on the exposed basilar artery in the cat. Therefore, oxyhemoglobin may be one of the most important spasmogenic substances following subarachnoid hemorrhages. It was also reported that, due to autoxidation, oxyhemoglobin produced superoxide, and that lipid peroxidation induced by superoxide with an Fe-complex was inhibited by superoxide dismutase, catalase, 1,4-diazabicyclo [2,2,2] octane (DABCO), etc.

In this experiment, the spasmogenic activity of oxyhemoglobin on the exposed basilar artery was reduced to that of methemoglobin by superoxide dismutase, catalase and DABCO. On the other hand, methemoglobin induced marked contraction of the arteries after the xanthine oxidase system, which is believed to be a superoxide producing system, was injected into the subarachnoid space together with EDTA-Fe and FeCl₃. The authors have therefore concluded that the strong spasmogenic activity of oxyhemoglobin is due to a change in reactivity of the artery which is affected by lipid peroxidation, induced by superoxide generated by autoxidation of oxyhemoglobin, on the cellular membrane of nerve-endings or smooth muscle of the artery.

Key words: cerebral vasospasm, oxyhemoglobin, superoxide, singlet oxygen, lipid peroxidation

I はじめに

脳動脈瘤破裂によるクモ膜下出血後に発生する脳血管攣縮は、患者の予後に重大な影響を与えるが、その原因に関しては、なお議論が多い。先に教室の遠藤¹⁴⁾が、成猫を用いた脳血管攣縮誘発実験において、自家動脈血と脳脊髄液の等量混合液を37℃に孵置した後、それぞれを直視下に脳底動脈に接触させ、5~10日孵置したものにもっとも強い活性を認めたと報告し、続いて園部²⁰⁾が、

この孵置液の経時的な化学的分析によって、oxyhemoglobin (以下 oxyHb と略す)が重要な脳血管攣縮物質であり、oxyHb が酸化した形である methemoglobin (以下 metHb と略す) では、攣縮能が減弱するとの報告を行った。この事実から、この実験モデルネコを用いて攣縮のメカニズム、特に superoxide との関わりあいについて種々の検討を加えた。

OxyHb に関しては、それが自酸化により metHb に変化する際 superoxide が生成されうると言われている⁷⁾²¹⁾

東北大学脳研脳神経外科

〔連絡先: 〒982 仙台市長町5-13-1, 東北大学脳研脳神経外科, 神山和世〕

1980年3月31日 受稿

ことから、今回我々は、superoxide の scavenger として知られている superoxide dismutase (以下 SOD と略す) を用い、oxyHb により誘発される脳血管攣縮における superoxide の関与について検討を加えた。また、最近、種々の疾患の病態に関して不飽和脂肪酸の過酸化物の影響が示唆されている¹¹⁾³⁹⁾が、lipid peroxidation と活性酸素の関連が注目されてきている³⁾⁵⁾⁸⁾²⁵⁾²⁷⁾³⁶⁾。

Lipid peroxidation に関係する活性酸素に関しては、superoxide そのものではなく、hydroxy radical あるいは、singlet oxygen が Fe-complex 等の存在のもとに関与していると言われている⁸⁾²⁵⁾³⁸⁾が、これらは superoxide から生成されるものであり、生化学的には superoxide 生成系を用いた不飽和脂肪酸の過酸化を SOD, catalase 1,4-diazabicyclo [2, 2, 2] octane (以下 DABCO と略す) 等が抑制することが知られている³⁾¹⁷⁾³⁷⁾。そこで我々は、oxyHb の血管攣縮能について SOD のみならず、catalase, DABCO をも用いて検討を加えた。さらに oxyHb 以外の superoxide 生成系として信頼されている xanthine, xanthine oxidase を用い、EDTA-Fe, FeCl₃ の存在の下に血管攣縮の誘発を試みた。

II 実験方法

1. 実験モデルの作成および観察方法

実験動物には、体重 2.5 ~ 5 kg の雑種雌雄成猫を用いた。Pentobarbital sodium (Nembutal) 30 ~ 50 mg/kg の腹腔腔内投与麻醉下に仰臥位に固定し、気管切開後、気管内挿管を行い、調節呼吸下に実験を行った。全身血圧、動脈血ガス分析の monitoring を行い、実験中著しい変化をきたしたものは除外した。

Transcervico-transclival approach にて後頭蓋窩脳底部硬膜に達し、クモ膜損傷を最小限にとどめるように注意しながら硬膜に縦切開を加え左右に開き脳底動脈を露出した。そして後述する種々の溶液の約 0.3cc を、脳底動脈に機械的刺激が加わらないよう注意し、骨密全体のクモ膜下腔に速やかに拡散するように注入した。注入後は次の溶液を注入するまで髄液により希釈されるにまかせた。

動脈径の変化は、手術顕微鏡下に 25 倍で写真撮影を行い動脈内径に相当する流血の幅を測定し、初回注入直前との差を初回注入直前の血管径に対する百分率で、拡張を (+)、収縮を (-) として表わし、無作意の 3 点の平均をとり、その時点での変化率とした。

2. 注入物質の生成および攣縮誘発実験

<実験 I> OxyHb および metHb による攣縮誘発実験：OxyHb はネコの股動脈から、ヘパリン採血した血

液を 3,000 rpm で 5 分間遠心し、白血球、血小板、血漿を除き赤血球浮遊液を得た。これを生理的食塩水で洗滌した後、-70℃にて 3 時間以上凍結破壊し、室温にて溶解し再び 3,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を得た。さらに滲透圧を生理的範囲内とし、かつ可及的に Na⁺, Cl⁻ 以外の電解質を除去するため、生理的食塩水にて 12 時間透析した。この溶液を生理的食塩水にて希釈し、5.5 mMol 濃度の hemoglobin 溶液とした。

MetHb は前述のごとく赤血球浮遊液を得、同容積の 100 mMol 亜硝酸ソーダを加え、10 分間室温にて反応させ met 化した後、3,000 rpm で 5 分遠心し赤血球を残し、さらに生理的食塩水にて洗滌し亜硝酸ソーダを除去した。その後、oxyHb と同様の方法にて 5.5 mMol 濃度の metHb 溶液を作成した。

誘発実験はまず、生理的食塩水をクモ膜下腔に注入し、30 分間血管径の変化を観察した後、oxyHb 溶液あるいは metHb 溶液を生食にて 5.5/2 mMol 濃度に希釈し、クモ膜下腔に注入した。さらに 30 分後、再び同一の hemoglobin 溶液をクモ膜下腔に注入し、同質同濃の hemoglobin 溶液を 2 回注入した時の血管径の変化を観察した。

次に 5.5/2 mMol metHb 溶液の注入 30 分後に同濃度の oxyHb 溶液を注入し、血管径の変化を見た。

<実験 II> SOD, catalase, DABCO により処理した oxyHb、および過酸化水素による攣縮誘発実験：SOD は McCord¹⁹⁾, Weser³⁴⁾ らの方法に準じて牛赤血球から作成し、生理的食塩水にて 12 時間透析し等張溶液とし、Na⁺, Cl⁻ 以外の電解質を可及的に除去した。これを Patriarca²⁴⁾の方法に準じて活性を確認し (Fig. 1)、そして、これを既知濃度の SOD と比較すると数 μ Mol 濃度と考えられた。この標品の 10 倍濃縮溶液 (これを SOD $\times 10$ とした) と 100 倍希釈溶液 (SOD $\times 1/100$) を作成した。Catalase (P-L Biochem, Inc.) は、生理的食塩水に溶解させ透析して 4.4 μ Mol 溶液として用いた。DABCO (東京化成工業) は、生理的食塩水に溶解させ、0.1 mMol 溶液として使用した。

実験はまず標準濃度の SOD 溶液を生理的食塩水で 2 倍に希釈し、クモ膜下腔に注入し脳底動脈と接触させ、標準 SOD 自体による血管径の変化を観察した。次に、標準 SOD 溶液と 5.5 mMol oxyHb 溶液と同量混合し、hemoglobin 濃度としては 5.5/2 mMol とし、37℃に 15 分静置した後、直ちにクモ膜下腔に注入した。さらに 30 分後、未処理の 5.5/2 mMol oxyHb 溶液を注入し、oxyHb 単独による血管径の変化を観察した。

SOD $\times 10$, SOD $\times 1/100$ についても同様の実験を行っ

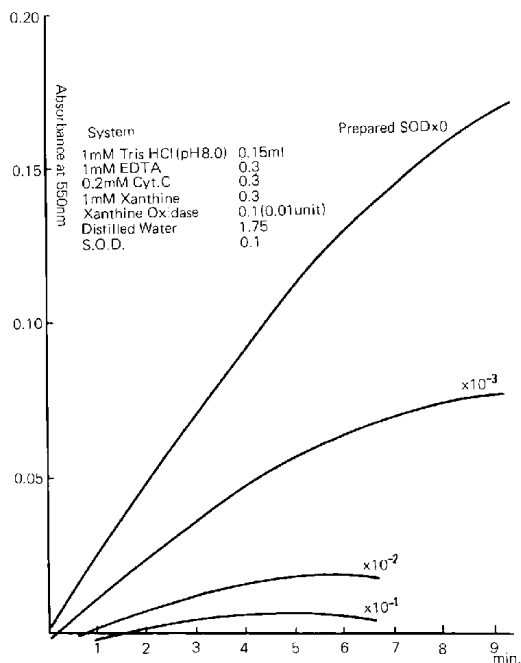


Fig. 1 Activity of superoxide dismutase which was prepared from bovine blood cells by McCord's method: It was adjusted to 10^{-2} to 10^{-3} mMol/L.

た。

また、標準 SOD, SOD $\times 10$ においては、一旦誘発された攣縮に対する SOD の効果を見るため、oxyHb 単独を注入した30分後に、最初に注入した溶液と同濃度の SOD 溶液を注入し血管径の変化を見た。

OxyHb は、 $\text{Fe}^{+++}\text{O}_2^- \rightarrow \text{Fe}^{+++} + \text{O}_2^-$ の反応により superoxide を生成し、superoxide は自発的不均化反応、 $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ により過酸化水素を生成する。したがって 5.5/2mMol oxyHb からは、5.5/4 mMol の過酸化水素が生成されうる可能性がある と仮定し、1.5 mMol 濃度の過酸化水素を用い過酸化水素自体の攣縮誘発を試みた。まず生食注入にて30分観察し、次に過酸化水素溶液、最後にその血管の反応性を確認するため 5.5/2 mMol oxyHb 溶液を注入した。

過酸化水素の分解酵素である catalase, および singlet oxygen の scavenger として知られている DABCO は、SOD と同様地使用し、これらの物質により処理した oxyHb の攣縮誘発能を見、最後に 5.5/2 mMol oxyHb 溶液を注入し、oxyHb 単独による血管の収縮を観察した。

<実験Ⅲ> Xanthine oxidase 系から生成される superoxide による攣縮誘発実験: Xanthine (和光純薬工業) の 152 mg を 20cc の 0.1N NaOH 溶液に溶解させ、pH を 7.4 になるまで 0.1N HCl 溶液を加えた後、蒸留水

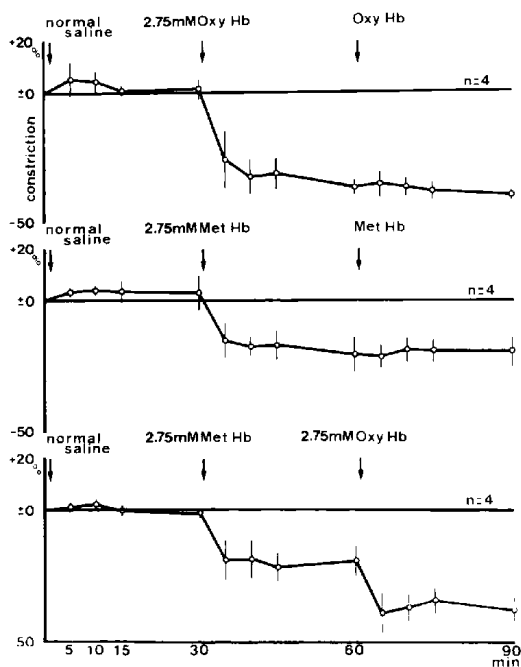


Fig. 2 Changes in diameters of basilar arteries following application of 5.5/2 mMol/L OxyHb or MetHb. Ten minutes after the first application of OxyHb, the extent of vasoconstriction reached $32.5 \pm 6.6\%$ ($n=4$) and the second application of OxyHb did not cause further constriction (upper). Ten minutes after the first application of MetHb, the constriction reached $15.3 \pm 6.3\%$ ($n=4$) and the second application did not produce further constriction (middle). The vasospasmogenic activity of OxyHb surpasses that of MetHb. When MetHb was first applied, the extent of constriction was $18.1 \pm 6.3\%$ ($n=4$). After 30 minutes, application of OxyHb induced $32.4 \pm 9.3\%$ constriction (lower).

を加え 100cc とし、xanthine の 10 mMol 溶液を作成し、浸透圧を 290 mOsm/L となるように NaCl を溶解させ、さらにこれを生理的食塩水にて稀釈し、 $1 \mu\text{Mol}$ xanthine 溶液とした。

Xanthine oxidase (Sigma Chem. Co.) は、0.01unit/0.1cc となるよう生理的食塩水を加え、生食にて透析し使用した。EDTA-Fe, FeCl_3 は、それぞれが 5 mMol 濃度となるよう生理的食塩水に溶解し、鉄溶液として使用した。

まず、鉄が存在しない時の superoxide の血管に対する影響をみるため、xanthine 溶液 0.2cc と xanthine oxidase 溶液 0.1cc および生食 0.2cc を混合し、直ちにクモ膜下腔に注入し、攣縮誘発能を観察した。30分後再び

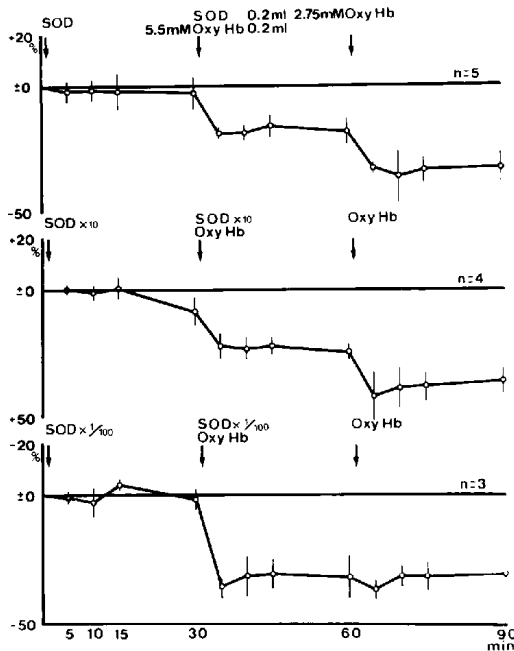


Fig. 3 Changes in diameters following 5.5/2 mM/L OxyHb treated by superoxide dismutase (SOD). OxyHb treated by standard SOD or SOD at a 10-fold concentration (SOD $\times$ 10) caused constriction of $18.9 \pm 2.4\%$ ($n=5$) or $23.1 \pm 4.7\%$ ($n=4$) respectively. Application of non-treated OxyHb, induced $36.5 \pm 9.8\%$ and $38.5 \pm 7.8\%$ constriction (upper and middle). On the other hand, OxyHb treated by SOD diluted 100-fold (SOD $\times$ 1/100) caused constriction of $31.3 \pm 7.7\%$ ($n=3$) immediately (lower). SOD inhibits the spasmogenic activity of OxyHb.

同様に xanthine, xanthine oxidase を注入し、その10分後に 5.5/2 mMol metHb 溶液を注入した。

次に superoxide が生成されない時の Fe 溶液の血管に対する影響を見るため、xanthine oxidase 溶液 0.1cc と鉄溶液 0.2cc および、生理的食塩水 0.2cc を混合し、あるいは xanthine 溶液 0.2cc と、鉄溶液 0.2cc, 生理食塩水 0.1cc を混合し、クモ膜下腔に注入した。30分後に同じ溶液を再注入し、その10分後に 5.5/2 mMol metHb 溶液を注入した。

最後に、xanthine oxidase 系により生成された superoxide が Fe-complex の存在のもとに生体膜の lipid peroxidation を惹起することを期待し、xanthine 溶液 0.2cc, 鉄溶液 0.2cc, xanthine oxidase 0.1cc を混合後、ただちにクモ膜下腔に注入した。30分後に、同様に再注入し、その10分後に 5.5/2 mMol metHb 溶液を注入し、血

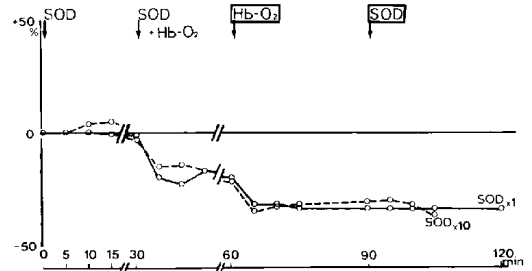


Fig. 4 Changes in diameters following application of SOD to arteries constricted by OxyHb. Standard SOD and SOD $\times$ 10, which inhibited vasospasmogenic activity of OxyHb, could not dilate the arteries once they had become constricted.

管径の変化を観察した。

Ⅱ 結 果

実験Ⅰ (Fig. 2) : 園部²⁹⁾ の報告と同様に、oxyHb は metHb より著明な収縮を認めた。5.5/2 mMol oxyHb 溶液注入では、注入後10分で $32.5 \pm 6.6\%$ ($n=4$) の収縮を認めたが、metHb 溶液の注入では、注入後10分で $15.3 \pm 6.3\%$ ($n=4$) と軽度の収縮を認めたにすぎなかった。使用した oxyHb 溶液も metHb 溶液も、赤血球内の他の物質を同程度に含んでいると考えられるので、2者の収縮能の差は、oxyHb と metHb の化学的違いによるものと考えた。同濃度の oxyHb あるいは、metHb を再注入しても同じ hemoglobin の注入では、最初の注入で誘発された収縮を維持し、それ以上に収縮することはなかった。

しかし、metHb 注入後 oxyHb を注入すると、metHb 注入後10分では $18.1 \pm 6.3\%$ ($n=4$) の収縮に対し、その30分後に注入した同濃度の oxyHb では、 $32.4 \pm 9.3\%$ ($n=4$) と著明な収縮を認めた。

実験Ⅱ (Fig. 3, 4, 5) : 標準 SOD, SOD $\times$ 10, SOD $\times$ 1/100各濃度の SOD 溶液は、いずれもそれ自体に血管を収縮あるいは拡張させる作用は認められなかった。標準および、SOD $\times$ 10溶液で処理した oxyHb 溶液では、それぞれ注入後10分で $18.9 \pm 2.4\%$ ($n=5$)、 $23.1 \pm 4.7\%$ ($n=4$) の収縮を認めたが、30分後の 5.5/2 mMol oxyHb 溶液単独注入によって、それぞれ注入後10分に $36.5 \pm 9.8\%$ 、 $38.5 \pm 7.8\%$ と著しい収縮を認めた。これは、metHb 注入後に oxyHb を注入した時の pattern と類似していた。OxyHb 単独注入直前のクモ膜下腔を手術顕微鏡下で観察した限り、SOD 処理 oxyHb 溶液の色調は、髄液により洗い流され消失しており、oxyHb 単独注

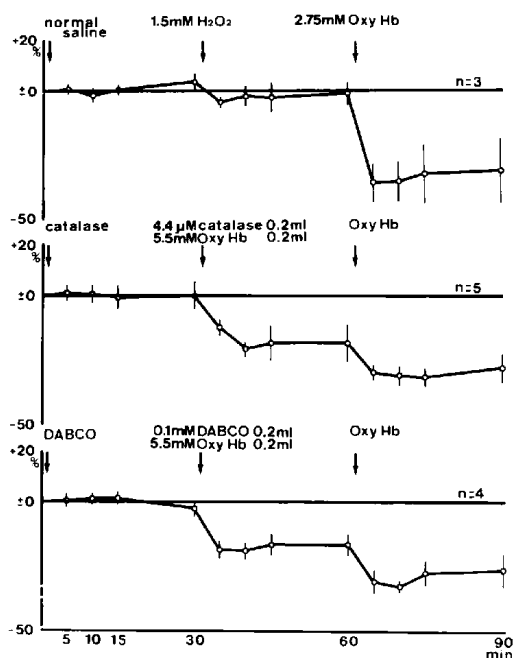


Fig. 5 Changes in diameters following application of 1.5 mM/L H_2O_2 , 5.5 mM/L OxyHb treated by 4.4 mM/L catalase and 0.1 mM/L 1,4-diazabicyclo [2,2,2] octane (DABCO). H_2O_2 did not induce vasoconstriction at this concentration which was assumed to be the maximal amount produced by 5.5 mM/L OxyHb (upper). OxyHb treated by catalase and DABCO, however, caused constriction of merely $20.3 \pm 2.6\%$ ($n=4$) or $19.0 \pm 2.7\%$ ($n=4$), respectively. After 30 minutes, non-treated OxyHb caused constriction of $31.1 \pm 3.3\%$ and $32.7 \pm 2.2\%$, respectively (middle and lower).

入前に oxyHb とともに注入した SOD は洗い流され、oxyHb 単独の収縮に影響を与えていないものと判断した。一方、SOD $\times$ 1/100溶液処理の oxyHb 溶液では、注入後10分ですでに $31.3 \pm 7.7\%$ ($n=3$)と著明な収縮を認め、その後注入した oxyHb 単独によっても10分後に $31.3 \pm 4.1\%$ と差はなかった。標準 SOD、SOD $\times$ 10処理 oxyHb の20%前後の収縮は、metHb の収縮能とほぼ一致し、SOD はある濃度以上において oxyHb の収縮能を減弱させるものと考えた。

しかし、一旦 oxyHb で誘発された血管収縮は、収縮阻害作用のあった標準 SOD、SOD $\times$ 10 によっても観察時間内には拡張を認めなかった。

以上から SOD が有する oxyHb の収縮能阻害は、血管の拡張作用によるものではなく、oxyHb による血管収縮

序機そのものに作用すると考えられるが、一旦 oxyHb により惹起された血管収縮は、SOD によっても緩解されるものではないと考えた。

5.5/2 mMol oxyHb 溶液から生成しうる最大濃度と仮定した過酸化水素素によっては、血管収縮は誘発できなかった。しかし、過酸化水素素の分解酵素である catalase で処理した oxyHb 溶液注入では、10分後に $20.3 \pm 2.6\%$ ($n=4$)の収縮に対し、その後注入した5.5/2 mMol oxyHb 溶液単独注入10分では、 $31.1 \pm 3.3\%$ と著明な収縮を認め、oxyHb の血管収縮機序のある過程においては H_2O_2 は間接的に関与しているものと思われた。

DABCO 処理 oxyHb でも注入後10分で $19.0 \pm 2.7\%$ ($n=4$)、その後 oxyHb 単独注入10分後に $32.7 \pm 2.2\%$ と SOD catalase と同様の結果を得た。これは、singlet oxygen が oxyHb の血管収縮機序に関与している可能性を示唆するものと思われた。

実験Ⅲ(Fig. 6) : Superoxide を生成するといわれる xanthine, xanthine oxidase 混合液の注入では、5~10分間に一過性の拡張を認め、30分後の再注入によっても同様の結果を得た。また、再注入後10分に5.5/2 mMol metHb 溶液を注入しても、10分で $15.4 \pm 4.1\%$ ($n=4$)の収縮を認めただけであった。

Xanthine あるいは、xanthine oxidase を除いた系では一過性の拡張は見られず、再注入後10分の5.5/2 mMol metHb 注入によってもその後10分で、それぞれ $21.6 \pm 2.0\%$ ($n=4$)、 $12.8 \pm 3.9\%$ ($n=4$)と著明な収縮は認められなかった。

Xanthine, xanthine oxidase, 鉄溶液をすべて混合した系では、最初の注入で $6.0 \pm 10.8\%$ と一過性の拡張を認めたが、2回目の注入ではほとんど血管径に変化を認めず、その10分後に注入した5.5/2 mMol metHb で注入15分後に $30.4 \pm 5.4\%$ ($n=5$)と著しい収縮を認めた。

以上より xanthine, xanthine oxidase から生成される superoxide そのものには血管収縮作用はなく、むしろ一過性の拡張作用を有する可能性があるが、Fe-complexの存在のもとではその拡張作用は減弱し、その後注入した metHb による収縮を増強せしめ、oxyHb と同程度の収縮を惹起させるものと思われた。

IV 考 察

脳動脈瘤破裂によるクモ膜下出血後に発生する脳血管収縮は、患者の予後に重大な影響を与え、脳動脈瘤の surgical treatment にも大きな制約を与えている。これまでも数多くの実験的脳血管収縮の報告がなされ、収縮誘発物質として、serotonin¹⁾、prostaglandin¹³⁾²⁸⁾、 $F_2\alpha$ 、

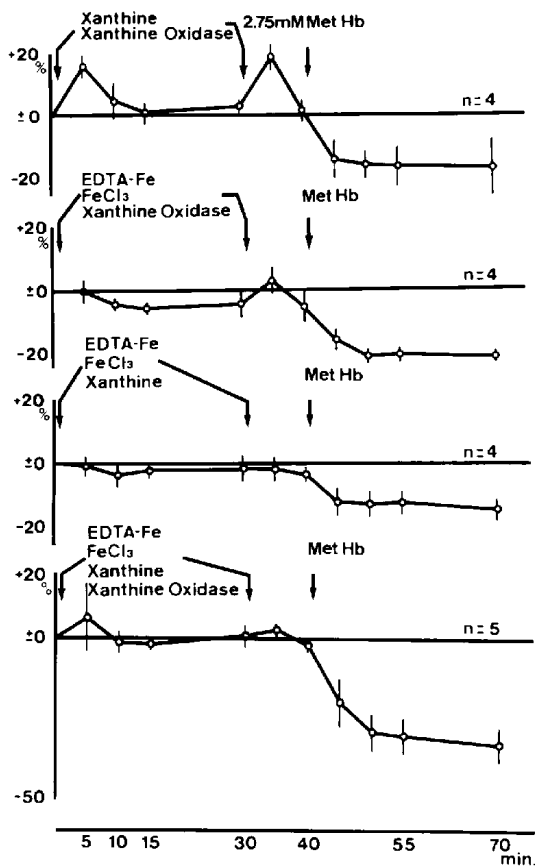


Fig. 6 Changes in diameters following application of the xanthine oxidase system, which is believed to be a superoxide producing system, and EDTA-Fe, FeCl₃. The mixture of xanthine and xanthine oxidase induced vasodilatation rather than vasoconstriction and ten minutes after the second application, 5.5 mMol/L MetHb caused 15.4 ± 4.1% (n=4) constriction (upper). The incomplete system, which lacks either xanthine or xanthine oxidase induced neither vasoconstriction nor vasodilatation, and ten minutes after a second application, MetHb induced merely 21.6 ± 2.0% (n=4) or 12.8 ± 3.9% (n=4) constriction (middle). Application of 5.5 mMol/L MetHb following the complete system induced after 15 minutes marked vasoconstriction to the extent of 30.4 ± 5.4% (n=4) (lower). Complete system: 0.2 ml of 1 μM/L xanthine, 0.1 ml of 0.01 unit/0.1 ml xanthine oxidase, 0.2 ml of 5 mMol/L EDTA-Fe and 5 mMol/L FeCl₃.

thromboxane A₂¹²⁾, uridine 5-triphosphate⁴⁾ 等種々の物質の呈示がなされている。赤血球破壊産物中に攣縮誘発物質を求めようとする報告も多く、学坂²²⁾は、血小板浮

遊液は24時間の孵置で血管収縮作用は減弱してしまうが、赤血球破壊により作成した溶液は1～7日の孵置によっても収縮能が失われず、また12時間以上の長時間の血管収縮が可能であったとし、赤血球破壊産物を脳血管攣縮の重要な物質として報告している。さらに、宮岡ら²⁰⁾³⁰⁾³⁵⁾はこの赤血球破壊産物を oxyHb 類似の物質であろうと言及し、また、長久¹⁰⁾は oxyHb の蛋白の高次構造の違いによる血管収縮能の差を指摘している。教室の園部²⁹⁾は、ネコ動脈血と髄液を混合し37℃に孵置し、経時的に収縮能および生化学的分析を行い、攣縮誘発物質を oxyHb そのものであると解明し、血液髄液混合孵置液では、溶血により遊出した oxyHb が血管攣縮を惹起し、7日目を peak として oxyHb は、metHb に変化していくことで oxyHb 濃度は減じ、それとともに孵置液の収縮能も減弱していくことを示した。

今回我々の実験でも oxyHb と metHb では、収縮力に差を認め、oxyHb は metHb よりも強力な収縮能を示した。以上からネコ脳底動脈に oxyHb を接触させることにより、強力、かつ持続的な脳血管攣縮を発現されることができると知り、このモデルを用いて、持続する脳血管攣縮のメカニズムとしての superoxide の役割について種々の実験を行った。OxyHb と metHb の生化学的な違いとしては、oxyHb の Hem 中の鉄は2価であり、O₂を結合しており、metHb の鉄は3価で O₂を結合する能力を欠いていること、およびその違いに基づく蛋白の高次構造の違いなどが知られている。また、oxyHb は metHb に自動的に酸化されていき、その過程に superoxide が生成されることが Misra²¹⁾、Brunori⁷⁾らによって報告されている。そして、superoxide が生成される系においては、superoxide の自発的不均化反応によって過酸化水素が生成され、過酸化水素と superoxide の共存は Fe-complex 等の存在の下に、きわめて反応性の高い singlet oxygen や hydroxy radical を生成する可能性のあることが知られている。そして、superoxide 自体は lipid peroxidation を起こしえないが、singlet oxygen は不飽和脂肪酸の過酸化を起こすといわれており、生体膜の hydrophobic zone には、多量の不飽和脂肪酸を含んでいることから、ここは lipid peroxidation が起こりやすく、活性酸素の標的部として着目されている³⁾³²⁾。従来、hemocuprein, erythrocuprein等として知られていた銅を含む蛋白質が、1969年に Fridovich¹⁸⁾により $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ の反応を触媒する酵素であることが証明され、これが生体内で生成される superoxide に対する防御機構として作用していると考えられるに至り、活性酸素の酸素毒性への関与が解明されつ

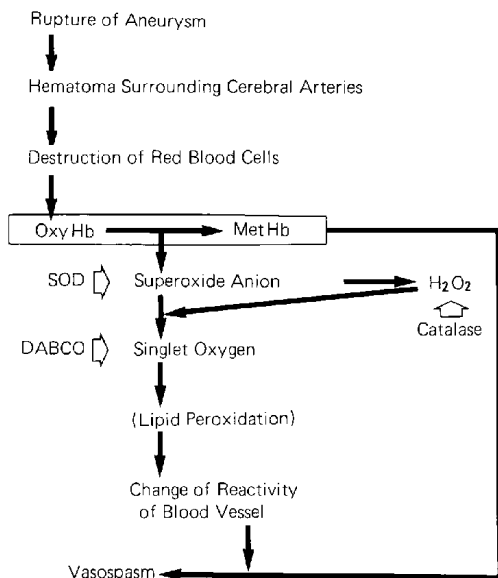


Fig. 7 Mechanism of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. Superoxide produced by autoxidation of OxyHb produces singlet oxygen with the help of hydrogen peroxide which is produced by the reaction of superoxide with itself. Singlet oxygen induces lipid peroxidation on the membranes of the nerve-endings or smooth muscle. As a result, the reactivity of the arteries changes and marked vasoconstriction is induced by a slight spasmogenic activity of hemoglobin.

つある。

我々の実験では、ある濃度以上の SOD 溶液処理により、oxyHb の収縮能が減弱されることを示しており、これは、oxyHb の autoxidation により生成される superoxide が oxyHb の誘発する血管収縮に何らかの機序で関与しているものと思われた。SOD は前述したように、superoxide の不均化反応を促進し過酸化水素生成するが、SOD により oxyHb の収縮が減弱され、また 1.5 mMol 過酸化水素水によっても血管の収縮が誘発されなかったことは、過酸化水素が直接に血管の収縮に関与しているのではないと思われる。しかし、過酸化水素の分解酵素である catalase が SOD と同様に、oxyHb の収縮を減弱させることは、oxyHb の強力な収縮能には superoxide から生成される過酸化水素が不可欠であることを示す。前述したように過酸化水素水は Fe-complex 等の存在のもとに、singlet oxygen が生成される際に不可欠であり、また、SOD が superoxide の不均化反応を触媒する時には singlet oxygen の生成が起こらないと言われていることは¹⁸⁾²⁸⁾、oxyHb の著明な収縮に singlet oxy-

gen が関与している可能性を示唆するものと思われた。事実、singlet oxygen の scavenger として知られている DABCO²³⁾によっても、SOD、catalase と同様の結果を得た。

生化学の実験において、不飽和脂肪酸として linolenic acid を基質とし、superoxide の生成系として xanthine oxidase 系を用い、過酸化物の生成を検討した報告によれば、過酸化物の生成は、SOD、catalase、DABCO等により抑制されると報告されている¹⁷⁾。我々の実験において、oxyHb の収縮が SOD、catalase、DABCO いずれによっても同様に減弱されたことは、oxyHb の autoxidation によって生成された superoxide が脂質の過酸化を介し、血管収縮に関与している可能性を示すものと思われた。

また、一旦 oxyHb によって誘発された血管収縮が、SOD によっても緩解しえないことは、superoxide からの一連の反応が常に進行していることが収縮に関与しているのではなく、収縮機序のどこかに不可逆的、あるいは修復に時間を要するような変化を起こしていると考えた。

Superoxide の生成系として、xanthine oxidase 系を用いた攣縮誘発実験において、EDTA-Fe、FeCl₃が必要であったことも、収縮の機序に singlet oxygen が関与している可能性を示唆すると思われる。しかし、この系だけでは収縮が見られず、その後加えた metHb ではじめて著明な収縮を認めたことは、superoxide からの singlet oxygen が、神経終末あるいは節等の生体膜脂質等の過酸化を惹起し、血管の反応性を変化させたものと考えた。

以上から我々は、oxyHb の著明な収縮を図のごとく考察した。すなわち、oxyHb の autoxidation によって生じた微量の superoxide が、superoxide 自身の反応によって生成された過酸化水素とともに、Fe-complex (Hem) の存在の下に singlet oxygen を生成し、これが神経終末あるいは、筋の生体膜脂質等の過酸化反応を惹き起こし、血管の収縮に対する反応性を亢進させ、hemoglobin 自体が有すると思われる軽度の収縮能によって著しい血管の収縮を惹起するのではないかと考えた。

しかし、臨床でみるような高度な長時間持続する脳血管攣縮には、その他の収縮の機序が重なりあっていることも考えられ、また、superoxide の生成系は、oxyHb 以外にも知られており、特に白血球においてはその貧食作用の過程で、superoxide の生成が証明されており²³⁾¹⁶⁾、クモ膜下出血の初期には、多数の白血球の浸潤が見られることから¹⁵⁾、今後の検討を要するところと思われる。

すなわち、臨床的には、血管攣縮が見られないとされている3日までの経過中にも³¹⁾、白血球から生成された superoxide によって、血管収縮を起こさない程度の hemoglobin (Fe-complex) の存在下に血管攣縮準備状態というべき変化が起こりえる可能性も考えられる。

以上の実験をもとに、脳血管攣縮における superoxide-lipid peroxidation の関与に関し考察してきたが、赤血球中には過量の SOD が含まれていることが知られており、溶血後の SOD の活性と生成された superoxide の関係等についての報告はなく、ただ Fe の存在は、SOD の活性を抑制する¹⁷⁾との報告はあるものの、今後の検討を要するところと思われる。

V ま と め

我々は、クモ膜下出血後に発生する脳血管攣縮誘発物質としては、oxyHb が重要であり、これを用いれば確実性のある持続的脳血管攣縮モデルネコの作成が可能であること、また、oxyHb が酸化した metHb では、攣縮能が減弱することを報告してきた。この事実を応用して、脳血管攣縮のメカニズム、特に superoxide とのかかわりあいについて種々の検討を加えた。OxyHb の autoxidation においては superoxide が生成されることが知られており、superoxide は、Fe-complex 等の存在により singlet oxygen を介し、生体膜脂質の過酸化を惹き起こすと考えられている。Superoxide 生成系による lipid peroxidation を阻害すると言われている。SOD, catalase, DABCO は、oxyHb により誘発される血管攣縮を、metHb の収縮程度まで減弱させた。さらに、superoxide の生成系として信頼されている xanthine oxidase 系を EDTA-Fe, FeCl₂ の存在下に用いると、metHb の収縮が著しく増強された。以上から、我々は、クモ膜下出血後の脳血管攣縮の一機序を、oxyHb の autoxidation に基づく一連の反応により、神経終末、あるいは筋の生体膜脂質等に過酸化反応が起こり、血管の反応性が変化し、hemoglobin の有する軽度収縮能により著しい収縮を惹起するものと考えた。

文 献

- 1) ALLEN, G. S., HENDERSON, L. M., GHOU, S. N. & FRENCH, L. A.: Cerebral arterial spasm. Part 3: In vivo intracisternal production of spasm by serotonin and blood and its reversal by phenoxybenzamine. *J Neurosurg* 40: 451-458, 1974
- 2) ALLEN, R. C., YEVICH, S. J., ORTH, R. W. & STEELE, R. H.: The superoxide anion and

singlet molecular oxygen: Their role in the microbicidal activity of the polymorphonuclear leukocyte. *Biol Biophys Res Comm* 60: 909-917, 1974

- 3) ANDERSON, S. M. & KRINSKY, N. I.: Protective action of darotenoid pigments against photodynamic damage to liposomes. *Photochem Photobiol* 18: 403-408, 1973
- 4) ARQUIRA, P. R.: Prolonged contraction of isolated human and canine cerebral arteries induced by uridine 5-triphosphate. *Stroke* 9: 133-138, 1978
- 5) 浅田浩二: 酸素毒性. *生化学* 48: 226-257, 1976
- 6) BABIOR, B. M., KIPNES, R. S. & CURNUTTI, J. T.: Biological defence mechanism. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 52: 741-744, 1973
- 7) BRUNORI, M., FALCIONI, G., FIORETTI, E., GIARDINA, B. & ROTILIO, G.: Formation of superoxide in the autoxidation of isolated α and β chains of human hemoglobin and its involvement in hemichrome precipitation. *Eur J Biochem* 53: 99-104, 1975
- 8) BUS, J. S., AUST, S. D. & GIBSON, J. E.: Superoxide and singlet oxygen catalysed lipid peroxidation as a possible mechanism for paraquat toxicity. *Biochem Biophys Res Comm* 58: 749-755, 1974
- 9) BUTTERFIELD, J. D. & MCGRAW, C. P.: Free radical pathology. *Stroke* 9: 443-445, 1978
- 10) 長久雅博: 脳血管攣縮の実験的研究—特に血色素成分の攣縮作用について. *大阪市医学会雑誌* 24: 211-221, 1970
- 11) DEMPOULAS, H. B.: Control of free radicals in biologic system. *Fed Proc* 32: 1903-1908, 1973
- 12) ELLIS, E. F., NIES, A. S. & OATES, J. A.: Cerebral arterial smooth muscle contraction by thromboxane A₂. *Stroke* 8: 480-483, 1977
- 13) EMANUELE, L. T., PATRONO, C., FORTUNA, A. & GROSSI-BELLONI, D.: Role of prostaglandin F_{2 α} in human cerebral vasospasm. *J Neurosurg* 41: 293-299, 1974
- 14) ENDO, S. & SUZUKI, J.: Experimental cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage—Course and degree of vasospasm. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 17, Part II: 47-53, 1977
- 15) HAMMES, E. M.: Reaction of the meninges to blood. *Arch Neurol Psychiatry* 52: 505-514, 1944
- 16) 柿沼カツ子: 白血球の食作用に伴う代謝変化. *蛋白質核酸酵素* 21: 43-53, 1976
- 17) KELLOGG, E. W. & FRIDOVICH, I.: Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by xanthine oxidase system. *J*

- Biol Chim* 250: 8812-8817, 1975
- 18) MAYEDA, E. A. & BARD, A. J.: Singlet oxygen. The suppression of its production in dismutation of superoxide ion by superoxide dismutase. *J Am Chem Soc* 96: 4023-4024, 1974
 - 19) McCORD, J. M. & FRIDOVICH, I.: Superoxide dismutase. *J Biol Chem* 244: 6049-6055, 1969
 - 20) MIYAOKA, M., NONAKA, T., WATANABE, H., CHIGASAKI, H. & ISHII, S.: Etiology and treatment of prolonged vasospasm—Experimental and clinical studies. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 16, Part II: 103-114, 1976
 - 21) MISRA, H. P. & FRIDOVICH, I.: The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J Biol Chem* 247: 6960-6962, 1972
 - 22) OSAKA, K.: Experimental studies on cerebrovascular spasm in cats. *Arch Jap Chir* 38: 349-371, 1969
 - 23) OUSANNÈS, C. & WILSON, T.: Quenching of singlet oxygen by tertiary aliphatic amines. Effect of DABCO. *J Am Chem Soc* 90: 6527-6528, 1968
 - 24) PATRIARCA, P., DRI, P. & ROSSI, F.: Superoxide dismutase in leukocytes. *FEBS Lett* 43: 247-251, 1974
 - 25) PENDERSON, T. C. & AUST, S. D.: The role of superoxide and singlet oxygen in lipid peroxidation promoted by xanthine oxidase. *Biochem Biophys Res Comm* 52: 1071-1078, 1973
 - 26) PENNINK, M., WHITE, R. P., CROCHARELL, J. R. & ROBERTSON, J. T.: Role of prostaglandin F_2 in the genesis of experimental cerebral vasospasm. Angiographic study in dogs. *J Neurosurg* 37: 398-406, 1972
 - 27) 沢田幸治, 山崎勇夫: 生物と酸素—酸素活性化と超酸化物分解酵素. 蛋白質核酸酵素 19: 527-536, 1974
 - 28) SCHAAP, A. P., THAYAY, A. L., FALEX, C. R., GODA, K. & KIMURA, T.: Singlet molecular oxygen and superoxide dismutase. *J Am Chem Soc* 96: 4025-4026, 1974
 - 29) SONOBE, M. & SUZUKI, J.: Vasospasmogenic substance produced following subarachnoid hemorrhage and its fate. *Acta Neurochir* 44: 97-106, 1978
 - 30) SUZUKI, S.: Experimental study of cerebral vasospasm—Vasospasm of the circle of Willis. *Brain and Nerve* 22: 49-59, 1970
 - 31) SUZUKI, J. & HORI, S.: Prediction of reattacks following rupture of intracranial aneurysms. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 15: 35-39, 1975
 - 32) TAPPEL, A. L.: Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed Proc* 32: 1870-1874, 1973
 - 33) TYLER, D. D.: Role of superoxide radicals in the lipid peroxidation of intracellular membranes. *FEBS Lett* 51: 180-183, 1975
 - 34) WESER, U., BUNNENBERG, E., CAMMACH, R., DEJERASSI, C., FLONE, L., THOMAS, G. & VOELTER, W.: A study of purified bovine erythrocyte. *Biochim Biophys Acta* 243: 203-213, 1971
 - 35) WILLKINS, R. H. & LEVITT, P.: Intracranial arterial spasm in the dog. A chronic experimental model. *J Neurosurg* 33: 260-269, 1970
 - 36) 八木國夫, 錦見盛光: 酸素とビタミン. 代謝 15: 13-21, 1978
 - 37) ZIMMERMANN, R., FLOHÉ, L., WESER, U. & HARTMANN, H. J.: Inhibition of lipid peroxidation in isolated inner membrane of rat liver mitochondria by superoxide dismutase. *FEBS Lett* 29: 117-120, 1972