

Mn-SOD および Cu/Zn-SOD 様免疫組織 化学反応陽性細胞のラット脳内分布

岡山大学医学部解剖学第三講座 (指導: 徳永 毅教授)

王 燕

(平成10年3月2日受理)

Key words: Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, 免疫組織化学, ラット脳内分布,
FeCl₃ 大脳皮質内注入

緒 言

Superoxide dismutases (SODs) は、酸素が代謝される過程で生じる活性酸素種の一種であるスーパーオキシド (O_2^-) を消去する酵素のひとつである¹⁾。中枢神経系で問題となる活性酸素種には O_2^- の他、 H_2O_2 やヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) があげられるが、毒性の強い $\cdot OH$ に比べ、 O_2 や H_2O_2 はそれ自体では細胞傷害性は低い。しかし、 O_2^- は Fe^{3+} や Cu^{2+} の金属イオンを Fe^{2+} や Cu^+ の遷移金属イオンに変換し、この遷移金属イオンは H_2O_2 を還元して細胞毒性の強い $\cdot OH$ を生じさせる²⁾。そのため、生体内には O_2^- 消去酵素である SODs が広く存在する^{3,4)}。SODs のうち、Mn-SOD は主としてミトコンドリアのマトリックス⁵⁾ に、Cu/Zn-SOD は細胞質⁶⁾ や細胞核⁵⁾ に存在している。これら SODs の組織内局在に関しては、すでにいくつかの報告が出されているが^{3,4,7)}、SODs 含有細胞の脳内分布についての詳細な研究は少ない⁸⁾。

鉄イオンを脳組織内に注入すると、その局所では注入直後より活性酸素種の濃度が急激に上昇することが知られている⁹⁾ ので、増加した活性酸素種を消去するため、局所で SODs が新たに誘導される可能性が考えられる¹⁰⁾。

今回は Mn-SOD および Cu/Zn-SOD に対する特異抗体⁷⁾ を用いて、正常成体ラットの脳における SODs 様免疫組織化学反応陽性を呈する細胞の分布様式、さらに大脳皮質感覚運動領野内

へ FeCl₃ を微量注入した後の SODs 様免疫組織化学反応陽性細胞数の変動を検索した。

材 料 と 方 法

本観察には体重250-300 g の Wistar 系雄性成体ラット22匹を使用した。Mn-および Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞の脳内分布を調べるにあたり、概日周期による変動を除くため動物の灌流固定は全て11時より13時の間に行った。4匹の正常無処置ラットをネプタール (sodium pentobarbital, 30mg/kg, i. p.) 麻酔下で開胸し、左心室より灌流固定した。ヘパリン投与後、等張リンゲル液150mlで駆血し、直ちに Zamboni 固定液 (4°C) 1000ml を約1時間かけて灌流した。取り出した脳は Zamboni 固定液中 (4°C) でさらに5時間後固定してから、10%ショ糖添加リン酸緩衝液 (pH 7.4, 4°C) に浸漬し、2-4日間保存した。脳は凍結ミクロームで40 μ m厚の1枚おき前額断切片とし、0.15M NaCl 添加リン酸緩衝液 (PBS, pH 7.4) 中に2群に分けて集めた。各群の切片を0.3% Triton-X 添加 PBS (PBS-Tx) で洗滌し、10%正常ヤギ血清で30分間処理した後、一群に抗 Mn-SOD ポリクローナル抗体⁷⁾ (PBS-Tx で24000倍に希釈、山梨医科大学小児科学講座、朝山光太郎博士の好意により供与された)、他群に抗 Cu/Zn-SOD ポリクローナル抗体⁷⁾ (1:24000, 同上) をそれぞれ12時間 (4°C) 作用させた。切片は PBS-Tx で洗った後、ABC 法

(avidin - biotin - peroxidase complex kit, Vector 社) による免疫組織化学反応を施し, 0.05 % DAB (3,3'-diaminobenzidine) と 0.1% H_2O_2 で発色させた。免疫染色された切片は必要に応じて, 0.5% cresyl violet 水溶液で後染色を施した。陽性細胞分布図譜 (図 2) 作成に当たって, 神経核の分類・名称は Paxinos & Watson のラット脳図譜¹¹⁾に準拠した。

また, 18匹のラットを 6 匹ずつ 3 群に分けて, それぞれの群に以下のような処置を施した。

- 1) 100mM $FeCl_3$ -生食水 (W/V, pH 1.8),
- 2) HCl で pH 1.8 に調整した酸性化生食水,
- 3) 生食水をそれぞれ大脳皮質感覚運動領野に注入した。ラットをネブタール麻酔下で脳定位固定装置に固定し, 冠状縫合尾方の左側頭頂骨に 1.5-2.0mm 径の骨窓をあけて大脳皮質感覚運動領野の一部を露出させ, ガラス管カニューレを針先に装着したマイクロシリンジを用いて, bregma の尾方 2.0mm で左方 2.0mm の位置の皮質領野に 1.0mm の深さで刺入し, 各液 $5.0\mu l$ を 5 分間かけて注入した。各群とも注入 2 時間 (3 匹) および 6 時間 (3 匹) 後に正常成体ラット群と同様に Zamboni 固定液で灌流固定し, 両 SOD ポリクローナル抗体による免疫染色を行った。

さらに, 両 SOD ポリクローナル抗体で染めた一部の切片には, 抗 GFAP モノクローナル抗体 [Progen Biotech, U. S. A.] を用いて二重標識を行った。抗 Mn-SOD および抗 Cu/Zn-SOD 抗体による免疫染色は 5% $NiCl_2$ を加えた DAB- H_2O_2 液で黒く発色させた。その後, 10% 正常ウマ血清で 30 分間処理した後, 抗 GFAP モノクローナル抗体 ($2.5\mu g/ml$) を 12 時間 ($4^\circ C$) 作用させ, ABC 法で処理し DAB- H_2O_2 液で褐色に発色させた。Mn-SOD 様および Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞数は, $100\mu m$ 間隔の格子を刻んだマイクロメーターを接眼レンズに装着して検鏡し, 各群各例より任意に選んだ 10 か所の単位面積 ($100 \times 100 \mu m^2$) 当たりの陽性細胞数を数えることにより求めた。各群間の陽性細胞数の平均値を一元配置分散分析法により 1% の危険率で有意差検定を行った。

結 果

1. 正常成体ラット脳における Mn-および Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞の分布:

1) Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞:

Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞の多くは胞体の大きい, 錐体形および多角形細胞であり, DAB 反応産物は顆粒状で核周囲部や太い樹状突起とその基部に密に見られた。しかし, 細胞核は抗 Mn-SOD 抗体で免疫染色されなかった (図 1 A)。Mn-SOD 様陽性細胞は脳の広い領域に認められたが, その主な存在部位を単位面積 ($100\mu m^2$) 当たりの陽性細胞数の多い順に表 1 にまとめ, さらに脳内分布を図 2 に模式図で示した。

Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞数が特に高密度に分布する部位は: 視上核 (19.3 ± 1.2 個), 視床下部前側野 (17.5 ± 1.0 個), 青斑核 (16.5 ± 0.4 個), 視床下部室傍核 (16.2 ± 0.7 個), 橋核 (15.9 ± 0.5 個), 視床網様核 (15.1 ± 2.1 個) で, その大半が視床下部の細胞であった。嗅球では, 僧帽細胞の多くが Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性を示した (表 1) が吻側部 (9.7 ± 0.5 個) にある僧帽細胞の方が, 背側部 (4.4 ± 0.3 個) や腹側部 (3.1 ± 0.4 個) にある

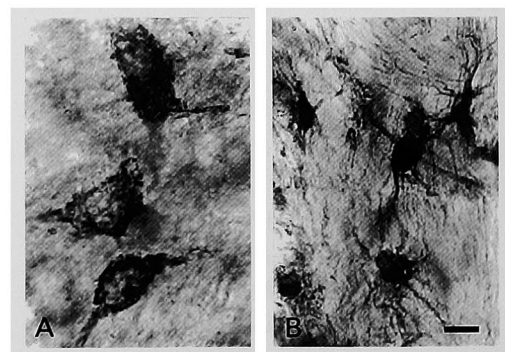


図 1 正常成体ラット脳における Mn-SOD 様および Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞。スケール: $10\mu m$

A. 大脳皮質第 III 層に見られた Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞。

B. 大脳皮質の皮質下白質における Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞。

表1 正常ラット脳各部における Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞数

部 位	Mn-SOD 陽性細胞	部 位	Mn-SOD 陽性細胞
SO: 視索上核	++	DLL: 外側毛帯背側核	+
AH: 視床下部前側野	++	FRC: 大脳皮質 前頭葉	+
LC 青斑核	++	SUVE: 前庭神経上核	+
PAV: 視床下部室傍核	++	MED: 小脳内側核	+
PN: 橋核	++	LAT: 小脳外側核	+
RT: 視床網様核	++	ING: 上丘中間灰白層	+
PV: 視床脳室周囲部	++	3: 動眼神経核	+
PO: 梨状葉	++	VP: 視床後腹側核	+
10: 迷走神経背側核	++	VLL: 外側毛帯腹側核	+
CA3: 海馬 CA-3	++	MVE: 前庭神経内側核	+
CA2: 海馬 CA-2	++	CNF: 楔状束核	+
AD: 視床前背側核	++	DPG: 上丘深灰白層	+
CG: 中脳中心灰白質	++	MT5: 三叉神経運動核	+
LH: 視床下部外側野	++	VL: 視床外腹側核	+
PH: 視床下部後側野	++	4: 滑車神経核	+
MS: 内側中隔核	++	IP: 脚間核	+
DC: 蝸牛神経背側核	++	INT: 小脳中位核	+
PE: 視床下部脳室周囲層	++	PORF: 橋網様体	+
ARC: 視床下部弓状核	++	SLT: 孤束核	+
CA4 海馬 CA-4	++	MERF: 中脳網様体	+
VC: 蝸牛神経腹側核	++	P: 小脳皮質プルキンエ細胞層	+
DB: 対角帯	++	MG: 内側膝状体核	+
op: 上丘視索層	++	LVE: 前庭神経外側核	+
R: 赤核	++	RMG: 大縫線核	+
LM: 乳頭体外側核	+	ST5: 三叉神経脊髄路核	+
VTG: 腹側被蓋核	+	LRT: 外側索核	+
LHB: 外側手綱核	+	PS5: 三叉神経主知覚核	+
COP: 後交連核	+	PPT: 視蓋前域後側垂核	+
RD: 背側縫線核	+	IC: 下丘中心核	+
OS: 上オリーブ核群	+	GP: 淡蒼球	±
SNR: 黒質網様部	+	DG: 齒状回	±
12: 舌下神経核	+	CM: 視床中心内側核	±
TU: 嗅結節	+	IGL: 外側膝状体核間小葉	±
SNC: 黒質緻密部	+	GI: 網様体巨大細胞部	±
AM: 扁桃核群	+	VLG: 外側膝状体腹側核	±
APT: 視蓋前域前側垂核	+	OT: 視索核	±
ZI: 不確帯	+	CPU: 被殻・尾状核	±
MI: 嗅球僧帽細胞層	+	CA1 海馬CA-1	±
OC: 大脳皮質 後頭葉	+	DLG: 外側膝状体背側核	±
7: 顔面神経核	+		

Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞数/100 μ m²: ++:10個以上, +: 9~3個, ±: 2個以下 (N=40)

ものより陽性細胞数は多かった。顆粒層では極く少数の顆粒細胞のみが Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性を示した。梨状葉の錐体細胞層の中等大錐体細胞の多くが (14.2±0.8個) Mn

-SOD 様免疫組織化学反応陽性であった。

海馬における Mn-SOD 様免疫反応陽性細胞は、CA-3 (13.5±0.6個), CA-2 (13.1±0.6個) および CA-4 (10.9±1.0個) の錐体細胞

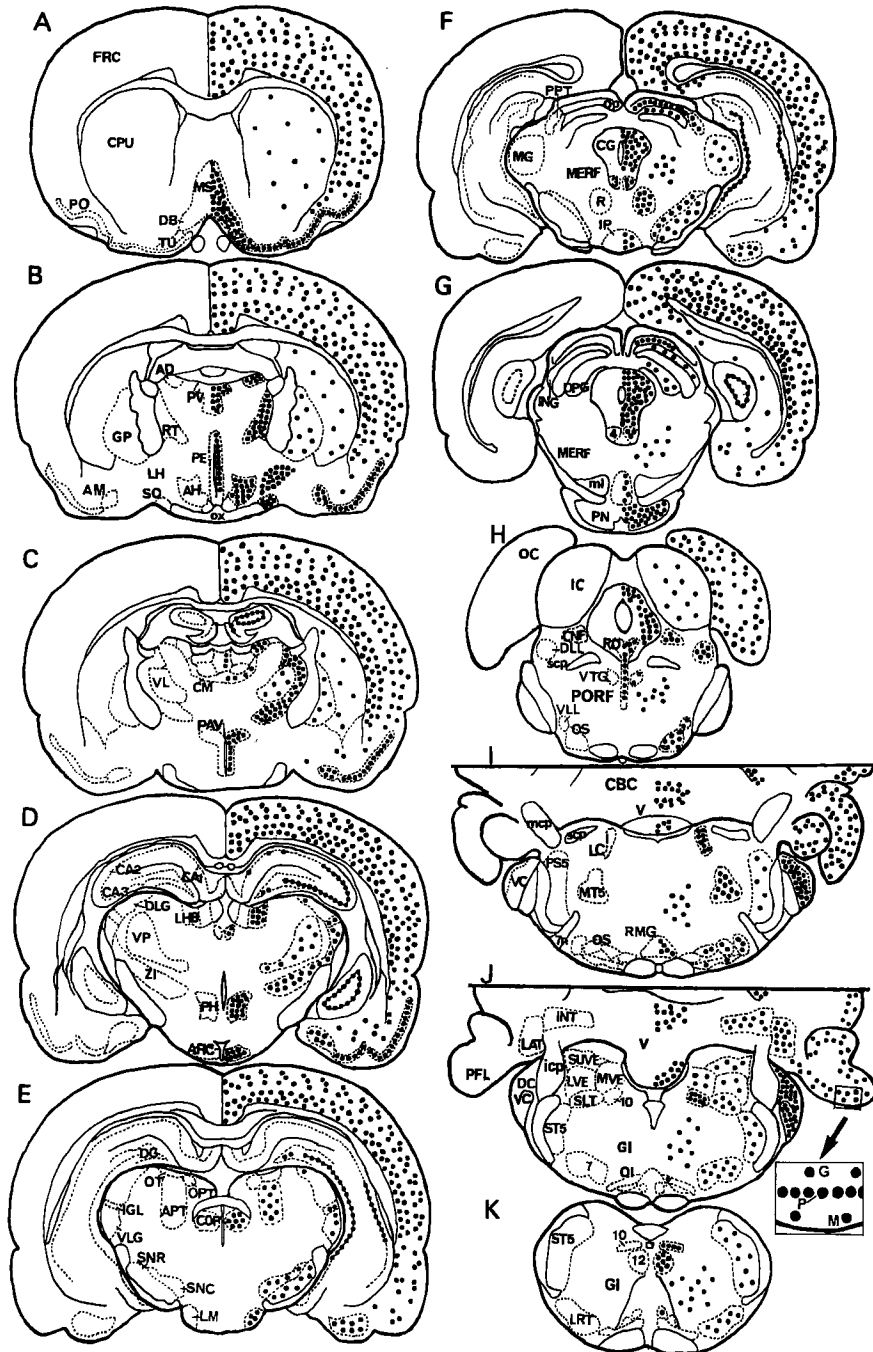


図2 正常成体ラット脳における Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞の分布を示す模式図。

Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞の存在部位とその分布密度を、各横断面の右半分に「●」で模式的に示した。7n: 顔面神経根, CBC: 小脳皮質, G: 小脳皮質顆粒層, icp: 下小脳脚, M: 小脳皮質分子層, ml: 内側毛帯, mcp: 中小脳脚, ox: 視交叉, OI: 下オリーブ核, OPT: 上丘オリーブ核, PFL: 傍片葉, scp: 上小脳脚, V: 小脳虫部。(その他の略語は表1を参照のこと)

層で多く認められたが、CA-1 (1.1 ± 1.0 個)の錐体細胞層には非常に少なかった。

間脳では、視床下部の多くの領域には上記のように Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞が多く見られたが、視交叉上核には Mn-SOD 様陽性細胞が殆どみられなかった。大部分の視床核には Mn-SOD 様陽性細胞を認めなかったが、視床の外側表面を被う視床網様核と視床前背側核には Mn-SOD 様免疫反応陽性を示す中等大紡錘形の細胞が多く分布していた (表 1, 図 1)。

中脳以下の脳幹では、脳神経諸核の細胞は Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性を呈していた。上丘では視索層内にある中等大多角形細胞の多く (10.1 ± 1.3 個) が Mn-SOD 様免疫反応陽性を示し、中間灰白層 (4.9 ± 1.4 個) および深灰白層 (4.3 ± 1.3 個) では Mn-SOD 陽性を示す大型多角形細胞は少なかった。中脳中心灰白質には Mn-SOD 様陽性細胞が多く (12.8 ± 1.5 個) 存在し、特にその背側部で目立っていた。赤核 (10.1 ± 1.9 個) や黒質網様部 (7.2 ± 0.8 個) と緻密部 (6.7 ± 0.5 個) にも中等大の Mn-SOD 様陽性細胞が比較的多く見られた。背側縫線核 (7.3 ± 0.5 個) では大型の Mn-SOD 様陽性細胞が強く免疫染色された。網様体では大型多角形で樹状突起を長く伸ばす細胞に Mn-SOD 様免疫組織化学陽性反応がみられた。

大脳皮質 (新皮質) の Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞の分布パターンはどの部位でもほぼ同様で、第 II から第 VI 層にかけて広く分布していたが、第 II 層 (3.2 ± 0.4 個) と第 IV 層 (3.9 ± 0.4 個) の顆粒細胞には少なく、第 III 層 (6.9 ± 0.4 個) および第 V 層 (6.3 ± 0.5 個) の大型錐体細胞、第 VI 層の中等大多角形細胞 (4.6 ± 0.6 個) で陽性を示すものが多かった。なお、第 VI 層の基底部に多角形の Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞 (7.7 ± 0.4 個) が皮質下白質の背側に 2~3 列の層状配列をとっているのが特徴的であった (図 4 A, 矢印)。単位面積当たりの Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞数を第 III 層から第 V 層にかけて比べたが、前頭葉 (5.3 ± 0.8 個)、頭頂葉 (5.7 ± 0.9 個) および後頭葉 (5.6 ± 0.6 個) 間で有意差は認められなかった。小脳皮質では、プルキンエ細胞は

全て Mn-SOD 様免疫反応陽性を示したが、分子層の小型ないし中等大細胞および顆粒層の顆粒細胞の少数のものが抗 Mn-SOD 抗体に弱陽性を示した。小脳核には、中等大ないし大型円形および多角形の Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞 (4.6 ± 0.5 個) が少数見られた。

2) Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞

正常成体ラット脳における Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞は小型円形で、細胞質、細胞核および樹状突起ともに抗 Cu/Zn-SOD 抗体で一様に染まっていた (図 1 B)。Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞のうち、細胞質に富み突起の短く太いものは主として灰白質に、細長く分岐の少ない突起を持つものは主に白質に分布していた。正常ラット脳における Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞の分布密度は、嗅球 (3.6 ± 0.4 個)、大脳皮質 (3.6 ± 0.6 個)、小脳皮質 (3.8 ± 0.2 個)、脳幹 (中脳被蓋 3.9 ± 0.8 個、橋底部 3.7 ± 0.5 個、延髄 3.6 ± 0.4 個) を通して、ほぼ同じであった。海馬において、小型円形の Cu/Zn-SOD 様陽性細胞は歯状回顆粒細胞層の基底部と多形細胞層の間にほぼ一列に並んでいた。小脳皮質神経細胞層には、Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陰性のプルキンエ細胞に隣接して Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞が認められたが、突起を分子層に長く垂直に伸ばしており、パーグマングリアと考えられた。

3) 二重標識による解析

大脳や小脳皮質および脳神経諸核で見られた大型錐体形および多角形の Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞は、抗 GFAP 抗体では免疫染色されなかった (図 3 A)。しかし、脳内にほぼ均等に分布している小型円形の Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞の殆どすべてが、抗 GFAP に対し陽性反応を示した (図 3 B)。

2. 大脳皮質内 FeCl₃ 注入後の SODs 様免疫組織化学反応陽性細胞の変化:

大脳皮質感覚運動領野に FeCl₃ (pH 1.8)、酸性化生食水 (pH 1.8) および生食水をそれぞれ微量注入後、2 および 6 時間の注入隣接部皮質 (後述) における単位面積 ($100^2 \mu\text{m}^2$) 当たり

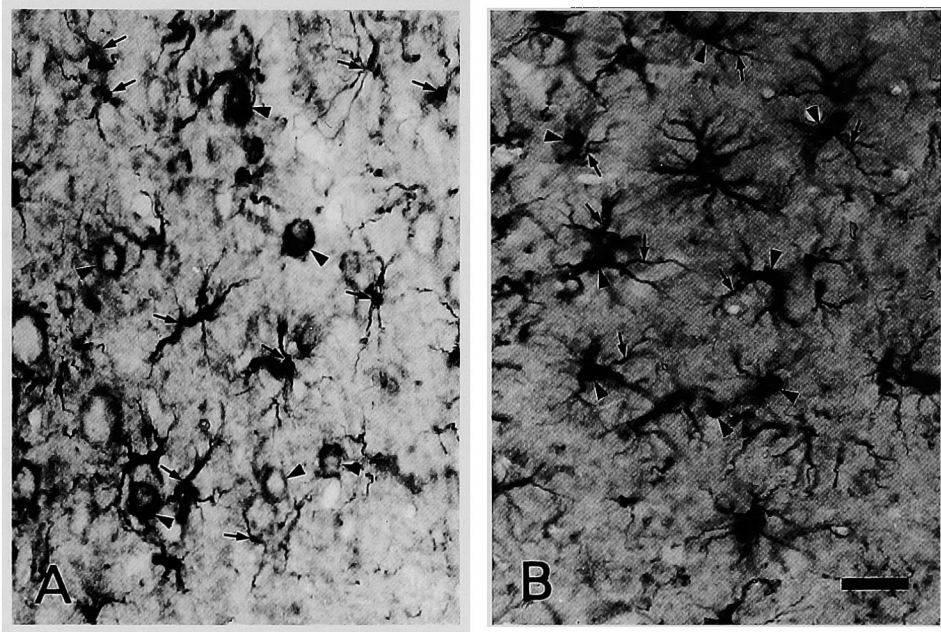


図3 抗 Mn-SOD ポリクローナル抗体と抗 GFAP モノクローナル抗体(A), 抗Cu/Zn-SOD ポリクローナル抗体と抗 GFAP モノクローナル抗体による二重標識(B), スケール: $30\mu\text{m}$
 A. 感覚運動領野第III層における Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性の錐体細胞 (矢頭) で, GFAP 様免疫反応陽性を示すもの (矢印) は見られなかった。
 B. 感覚運動領野第III層における Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞 (小型円形の細胞体に注目, 矢頭) の殆ど全ては GFAP 免疫反応陽性 (突起に注目, 矢印) であった。

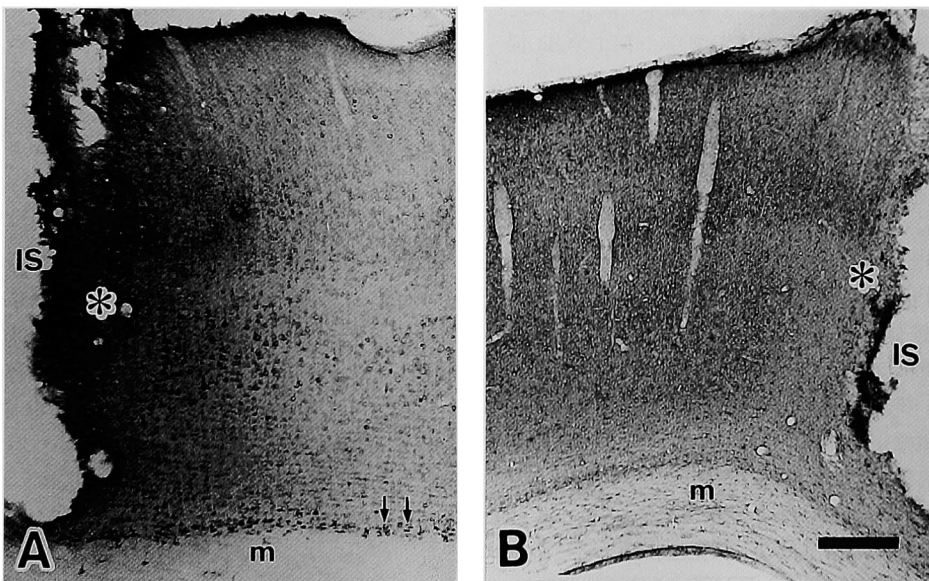


図4 FeCl_3 注入後の注入部位とその隣接皮質部に見られた Mn-SOD 様 (A, 注入2時間後) および Cu/Zn-SOD 様 (B, 注入6時間後) 免疫組織化学反応陽性細胞。
 * : 注入隣接部皮質, IS : 注入部位, m : 皮質下白質, 矢印 : 層状配列した Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞, スケール: $200\mu\text{m}$ 。

の Mn-SOD 様および Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞数を計測した。FeCl₃ 注入例では、局所性出血や壊死を起こした注入部位(図 4 A および B ; IS) の外縁から 300-500 μ m 幅の狭い範囲(図 4, * ; 注入隣接部皮質)内で、Mn-SOD 様および Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞数に変化が見られた(図 4 A および B)。

1) Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞

注入後 2 時間で、FeCl₃ 注入例の注入隣接部皮質における Mn-SOD 様免疫反応陽性細胞数は、酸性化生食水注入例や生食水注入例のそれらよりも著しく多かった ($p < 0.01$) が、他方、FeCl₃ 注入 6 時間後の Mn-SOD 様免疫反応陽性細胞数は、酸性化生食水注入例や生食水注入例と比較しても有意差は認められなかった(図 5 A)。

2) Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞

注入隣接部皮質に観察された Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞数は、FeCl₃ 注入後 2 時間では、酸性化生食水注入例や生食水注入例のそれらとくらべて有意差がなかったが、注入後 6 時間では、FeCl₃ 注入例の Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞数は他 2 溶液注入例にくらべて有意に多かった ($p < 0.01$; 図 5 B)。

なお、注入後 2 および 6 時間間における Mn- および Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞数のうち、酸性化生食水注入例と生食水注入例との間では有意差はなかった。また、大脳皮質感覚運動領野への FeCl₃ 注入後、注入側の前頭葉や後頭葉皮質における Mn- および Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞数を注入 2 時間後と 6 時間後とで計測したが、いずれも無処置例の陽性細胞数と比較して有意の差がなかった(表 2)。

考 察

1. SODs 様免疫組織化学反応陽性細胞のラット脳内分布について:

今回、特異抗体⁷⁾による免疫組織化学的手法で Mn- および Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞の成体ラット脳内分布を調べたところ、

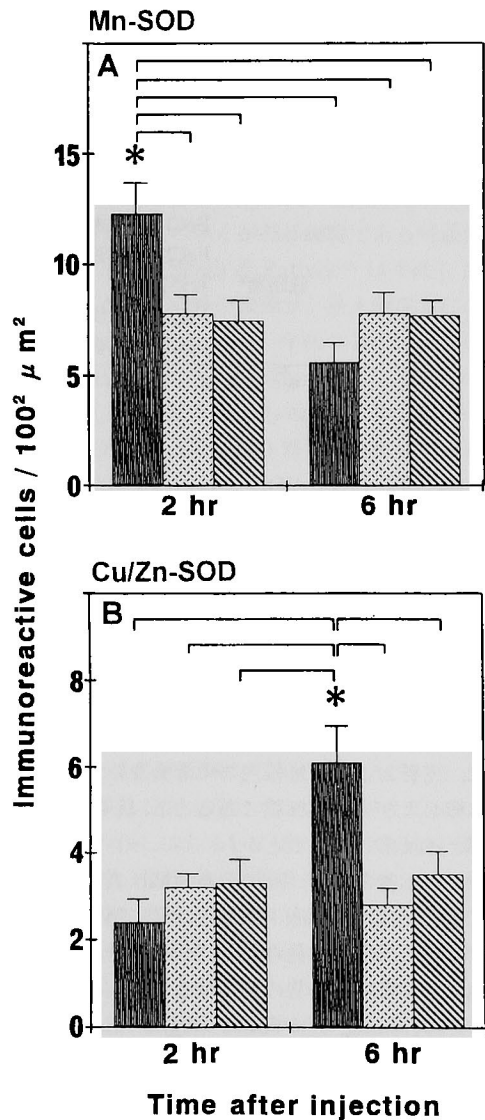


図 5 FeCl₃ (pH 1.8), 酸性化生食水 (pH 1.8) および生食水注入例における、注入隣接部皮質の Mn-SOD 様および Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞数の変化。

■ : FeCl₃ 注入例, □ (点線) : 酸性化生食水注入例, □ (斜線) : 生食水注入例

* : $p < 0.01$ で有意差のあった組み合わせ (N = 18)

A. Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞数の注入 2 時間および 6 時間後の変化。

B. Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞数の注入 2 時間および 6 時間後の変化。

表2 FeCl₃ 注入部より遠隔の大脳皮質における Mn-および Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞数

皮質部位	処 置	免疫反応陽性細胞数/100 ² μm ²	
		Mn-SOD	Cu/Zn-SOD
前頭葉*	無処置	5.3±0.8	3.6±0.5
	FeCl ₃ 注入後 2 時間	4.5±0.5	4.1±0.6
	FeCl ₃ 注入後 6 時間	4.5±1.1	3.9±0.6
後頭葉*	無処置	5.6±0.6	3.7±0.4
	FeCl ₃ 注入後 2 時間	5.8±0.8	4.0±0.5
	FeCl ₃ 注入後 6 時間	6.0±1.1	4.2±0.6

* : 注入側 平均値±標準偏差, N=10

生理状態下で Mn-SOD は脳内のすべての細胞に一様に存在するのではなく、陽性細胞の分布領域と密度に偏りが見られたのに対し、Cu/Zn-SOD は脳内に比較的均等に分布していることが判かった。

1) Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞の分布

抗 Mn-SOD 抗体で免疫染色される主な細胞は、皮質および神経核内の中等大ないし大型錐体形および多角形細胞であること、抗 GFAP 抗体とは反応しないことから、ニューロンであることが示唆された。その分布領域は表1と図2に示した様に、視床下部や辺縁系に属する諸構造で特に高密度に見られた。Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞の脳内分布が不均等であることは、Zhang ら⁸⁾が63歳から92歳の21例の人脳の剖検でも報告している。人脳では Mn-SOD 様免疫反応陽性ニューロンは新線条体、黒質、諸脳神経核、小脳皮質、海馬および網様体に多く、視床下部には少ないとしている。しかし、彼ら⁸⁾は分布密度の半定量的解析を行っておらず、今回のラットの所見と量的な比較はできないが、人脳での Mn-SOD 陽性細胞の出現領域を比べると、ラットのそれとかなり一致していた。

ラット脳を短時間虚血後、血流を再開させると、海馬 CA-1 領域の錐体細胞のほとんど全てが変性・壊死に陥るが、CA-3 領域の錐体細胞には変化がみられないこと¹²⁾、および Mn-SOD の活性も CA-1 で早期に減弱・消失すること¹³⁾が指摘されている。今回の観察でも CA-1 の錐

体細胞は CA-3 のそれに比べて Mn-SOD 陽性細胞が著しく少ないことが判明し、CA-1 の錐体細胞は虚血後の血液再灌流による酸素毒性に対する耐性が他の海馬皮質領域に比べて弱いことが示唆された。

今回の観察で、生理的条件下で Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞の分布密度が高い領域には、ドパミンニューロンの細胞体が多く認められる領域（視床下部弓状核、同脳室周囲層、同後側野、中脳中心灰白質¹⁴⁾）が含まれていた。ドパミンニューロンの神経終末では、ドパミンの代謝産物である 6-ヒドロキシドパミンが自動酸化を受ける過程で H₂O₂ が生成されることが知られている¹⁵⁾。ここにスーパーオキシド(O₂⁻)が存在し、しかも触媒量程度でも Fe³⁺ などの金属イオンが共存すれば、O₂⁻が金属イオンを Fe²⁺ などの遷移金属イオンに変換し、この遷移金属イオンが H₂O₂ を還元して細胞毒性の強いヒドロキシラジカルを発生させることになる¹⁵⁾。これを防御するため、ドパミンニューロンの神経終末では Mn-SOD の濃度が高い可能性が考えられ、この Mn-SOD を供給するためにドパミンニューロンの細胞体での産生量が多いのではないかと推論される。

グルタミンナーゼに対する免疫染色で、グルタメートを化学伝達物質としているニューロンを染めると、海馬 CA-3 錐体細胞と新皮質第 V 層および第 VI 層深部のニューロンが強く染まってくる¹⁶⁾が、これらの部位も Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞の分布域と重なっていた。

また、GABA 含有ニューロンの見られる領域(内側中隔核¹⁷⁾、対角帯¹⁷⁾、新皮質の非錐体細胞¹⁸⁾、小脳皮質¹⁸⁾、視床網様核¹⁸⁾¹⁹⁾の細胞体にも抗 Mn-SOD 抗体に対する免疫染色性が認められたが、その生理的意義については現在のところ明らかではない。

脳は鉄を比較的多く含む組織であり²⁰⁾、鉄を染め出す Perl-DAB 法といった組織化学染色²¹⁾、あるいはフェリチンに対する免疫組織化学法²²⁾²³⁾で嗅結節、外側中隔核、扁桃体中心核、視床下部室傍核、視索上核および視交叉上核、視床内側手綱核、蝸牛神経核、小脳プルキンエ細胞などで鉄含有ニューロンが多いことが判明した。これらの領域の多くが今回見られた Mn-SOD 様免疫反応陽性細胞の分布域と対応しており、同一ニューロン内に Mn-SOD と鉄が共存する可能性が高い。細胞内に存在する遊離鉄は、脂質過酸化反応に関与したり、すでに述べたように H_2O_2 が $\cdot OH$ に変換される際の重要な触媒²⁾として働いており、さらに鉄は生理活性物質の代謝や酸化反応に関係がある多種の酵素にも含まれており²⁰⁾、活性酸素と鉄との関連は密接である。

2) Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞の分布：

今回の観察では、脳内の Cu/Zn-SOD 様免疫反応陽性細胞は小型円形で、灰白質と白質ともほぼ均等に分布していた。しかも Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞の殆どすべてが抗 GFAP 抗体で二重標識されたことから、かなりのものがアストログリアである²⁴⁾と考えられた。

B. 大脳皮質内 FeCl₃ 注入後の SODs 免疫組織化学反応陽性細胞数の変動：

FeCl₃ を大脳皮質感覚運動領野に注入すると、注入部位に鉄イオンを介して酸化による傷害が惹起される¹⁰⁾が、今回の実験で注入部外縁より 300-500 μm 幅の狭い範囲の皮質(注入隣接部皮質)内で早期(注入後 2 時間)に Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞数の有意な増加が観察された。注入隣接部皮質の Mn-SOD 様免疫反応陽性細胞数の増加は一過性ではなく、注入 2-3 日後に再度観察される²⁵⁾。Mn-SOD 陽性細胞数が注入後増加する機序は今回の実験からは明瞭な事は言えないが、少なくとも FeCl₃ 注入直後

の Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞の増加は組織内に入って来た鉄イオンにより発生した活性酸素と密接に関連するものと考えられる。なお、*in vitro* で鉄イオン刺激による活性酸素種の増加は、グリア画分よりもニューロン画分で著しい²⁶⁾と報告されており、今回増加した Mn-SOD 陽性細胞の多くが神経細胞である可能性が高い。また、Singh & Pathak¹⁰⁾ は FeCl₃ 注入による SODs 活性の変動は、注入側皮質にのみ見られるとしているが、今回の FeCl₃ 注入後の免疫染色所見から、前に述べた様に、SODs の誘導は注入部外縁から 500 μm までの非常に狭い範囲の皮質(注入隣接部皮質)に限局していることがわかった。

FeCl₃ の注入により Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞も増加したが、Mn-SOD 様陽性細胞数の増加時期(2 時間後)に比し、かなり遅れ(6 時間後)ていた。Tsutsui ら²⁵⁾は、この増加が鉄イオン注入後 2 日目まで続くことを報告している。虚血後の血流再開により起こる脳障害とそれとともなう炎症ではインターロイキン-1 や腫瘍壊死因子(TNF)などのサイトカインが重要な役割を演じている²⁷⁾とされており、FeCl₃ 注入後しばらくして認められた GFAP 陽性の Cu/Zn-SOD 含有細胞数の増加は、炎症過程で産生されたサイトカインにより生じる活性酸素の消去と何らかの関連があるものと思われる。

結 論

1. 正常成体ラット脳における Mn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞は主として細胞体の大きい錐体形および多角形細胞であり、これらの多くは抗 GFAP 抗体で免疫染色されないこと、および細胞の形態からニューロンである可能性が示唆された。Mn-SOD 様免疫反応陽性細胞の脳内の分布は不均等で、神経核により分布密度に明らかな違いが見られた。特に高密度に見られた部位は視床下部、辺縁系諸核、視床網様核、青斑核および橋核であった。
2. Cu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性の細胞は小型円形の細胞体を持ち、灰白質内およ

び白質内ともにほぼ均等に分布しており、しかもこれらの殆どすべてが抗 GFAP 抗体で二重標識されたので、その大半はアストログリアと考えられた。

3. FeCl₃ を大脳皮質感覚運動領野に微量注入すると、注入部外縁から300-500 μ mの範囲内で注入後2時間および6時間後に、Mn-およびCu/Zn-SOD 様免疫組織化学反応陽性細胞がそれぞれ増加した。

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なご指導を賜りました徳永 毅教授（岡山大学医学部解剖学第三講座）に深謝いたします。また懇切なご指導と有益なご助言をいただいた筒井公子講師（同上）に心から感謝いたします。標本作製など多くの面で御援助下さいました竹内玲子氏（同上）に厚くお礼申し上げます。

なお、本研究は第19回日本神経科学大会（1996）において発表された。

文 献

- 1) Fridovich I : Superoxide dismutases. *Ann Rev Biochem* (1975) **44**, 147—159.
- 2) Halliwell B : Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* (1992) **59**, 1609—1623.
- 3) Dobashi K, Asayama K, Kato K, Kobayashi M and Kawaoi A : Immunohistochemical localization of copper-zinc and manganese superoxide dismutases in rat tissues. *Acta histochem Cytochem* (1989) **22**, 351—365.
- 4) Munim A, Asayama K, Dobashi K, Suzuki K, Kawaoi A and Kato K : Immunohistochemical localization of superoxide dismutases in fetal and neonatal rat tissues. *J Histochem Cytochem* (1992) **40**, 1705—1713.
- 5) Slot JW, Geuze HJ, Freeman BA and Crapo JD : Intracellular localization of the copper-zinc and manganese superoxide dismutases in rat liver parenchymal cells. *Lab Invest* (1986) **55**, 363—371.
- 6) Keller G-A, Warner TG, Steimer KS and Hallewell RA : Cu, Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (1991) **88**, 7381—7385.
- 7) Asayama K and Burr IM : Rat superoxide dismutases. Purification, labeling, immunoassay, and tissue concentration. *J Biol Chem* (1985) **260**, 2212—2217.
- 8) Zhang P, Anglade P, Hirsch EC, Javoy-Agid F and Agid Y : Distribution of manganese-dependent superoxide dismutase in the human brain. *Neurosci* (1994) **61**, 317—330.
- 9) Willmore LJ, Hiramatsu M, Kochi H and Mori A : Formation of superoxide radicals after FeCl₃ injection into rat isocortex. *Brain Res* (1983) **277**, 393—396.
- 10) Singh R, and Pathak DN : Lipid peroxidation and glutathione peroxidase, glutathione reductase, superoxide dismutase, catalase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in FeCl₃-induced epileptogenic foci in the rat brain. *Epilepsia* (1990) **31**, 15—26.
- 11) Paxinos G and Watson C : *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. (2nd. ed), Academic Press, San Diego (1986).
- 12) Ordy JM, Wengenack TM, Bialobok P, Coleman PD, Rodier P, Baggs RB, Dunlap WP and Kates B : Selective vulnerability and early progression of hippocampal CA 1 pyramidal cell degeneration and GFAP-positive astrocyte reactivity in the rat four-vessel occlusion model of transient global ischemia. *Exp Neurol* (1993) **119**, 128—139.
- 13) Liu X-H, Kato H, Nakata N, Kogure K and Kato K : An immunohistochemical study of copper/zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase in rat hippocampus after transient

- cerebral ischemia. *Brain Res* (1993) **625**, 29—37.
- 14) Björklund A and Lindvall O : Dopamine-containing systems in the CNS ; *in* Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol. 2, Classical Transmitters in the CNS. Björklund and Hökfelt eds, Elsevier, Amsterdam (1984) pp 55—122.
 - 15) Linert W, Herlinger E, Jameson RF, Kienzl E, Jellinger K and Youdim MBH : Dopamine, 6-hydroxydopamine, iron, and dioxygen. Their mutual interactions and possible implication in the development of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* (1996) **1316**, 160—168.
 - 16) Kaneko T and Mizuno N : Immunohistochemical study of glutaminase-containing neurons in the cerebral cortex and thalamus of the rat. *J Comp Neurol* (1988) **267**, 590—602.
 - 17) Gritti I, Mainville L and Jones BE : Codistribution of GABA- with acetylcholine-synthesizing neurons in the basal forebrain of the rat. *J Comp Neurol* (1993) **329**, 438—457.
 - 18) Ottersen OP and Storm-Mathisen J : Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. *J Comp Neurol* (1984) **299**, 374—392.
 - 19) Spreafico R, Battaglia G and Frassoni C : The reticular thalamic nucleus (RTN) of the rat. Cytoarchitectural, Golgi, immunocytochemical, and horseradish peroxidase study. *J Comp Neurol* (1991) **304**, 478—490.
 - 20) Hill JM : The distribution of iron in brain ; *in* Topocs in Neurochemistry and Neuropharmacology, Vol, 2, Brain Iron. Neurochemical and Behavioural Aspects, Youdim ed, Taylor & Francis Press, London, (1988) pp 1—24.
 - 21) Hill JM and Switzer RC : The regional distribution and cellular localization of iron in the rat brain. *Neurosci* (1984) **11**, 595—603.
 - 22) Tokunaga A, Ono K, Ono T, and Ogawa M : Magnocellular neurosecretory neurons with ferritin-like immunoreactivity in the hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei of the rat. *Brain Res* (1992) **597**, 170—175.
 - 23) Benkovic SA and Connor JR : Ferritin, transferrin, and iron in selected regions of the adult and aged rat brain. *J Comp Neurol* (1993) **338**, 97—113.
 - 24) Bignami A, Eng LF, Dahl D and Uyeda CT : Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res* (1972) **43**, 429—435.
 - 25) Tsutsui K, Wang Y, Ogawa M and Tokunaga A : Increase in number of Mn- and Cu, Zn-superoxide dismutase-like immunoreactive cells after injection of FeCl₃ into rat sensorimotor cortex ; *in* Free Radicals in Brain Physiology and Disorders, Packer L, Hiramatsu L and Yoshikawa T eds, Academic Press, San Diego, (1996) pp 197—202.
 - 26) Café C, Torri C, Bertorelli L, Tartara F, Tancioni F, Gaetani P, Baena RRY and Marzatico F : Oxidative events in neuronal and glial cell-enriched fractions of rat cerebral cortex *Free Rad Biol Med* (1995) **19**, 853—857.
 - 27) Yamasaki Y, Itoyama Y and Kogure K : Involvement of cytokine production in pathogenesis of transient cerebral ischemic damage, *Keio J Med*(1996) **45**, 225—229.

**Localization of Mn- and Cu/Zn-SOD-like immunoreactive cells
in the rat brain**

Wang YAN

Third Department of Anatomy

Okayama University Medical School

Okayama 700-8558, Japan

(Director : Prof. A. Tokunaga)

The localization of manganese (Mn) and copper-zinc (Cu/Zn) superoxide dismutase (SOD)-like immunoreactive (lir) cells in the normal rat brain and the change in numbers of both SOD-lir cortical cells after the injection of ferric chloride into the sensorimotor cortex were investigated immunohistochemically. Large and medium-sized cell bodies, pyramidal to polygonal in shape, were immunostained by anti-Mn-SOD antibody. Most of these were not immunolabeled by anti-GFAP antibody, suggesting that most of the Mn-SOD-lir cells are neurons. These cell bodies were distributed in some selected brain areas with different densities. The densest population of Mn-SOD-lir cells was found in the hypothalamic and limbic structures, and in some brain stem nuclei, such as the thalamic reticular nucleus, the locus ceruleus and the pontine nucleus. Anti-Cu/Zn-SOD antibody immunostained many small round cells throughout both white and gray matter, most of which were also immunolabeled by anti-GFAP antiserum. After intracortical injection of FeCl₃, the numbers of Mn- and Cu/Zn-SOD-lir cells per unit area within the adjacent narrow region of the injection site significantly increased 2 and 6 hr after the injection, respectively.