

一過性前脳虚血後の海馬における組織学的変化

—特にアストロサイトの役割について—

佐藤 真也

一過性脳虚血後の神経細胞の変化については多くの報告がなされているが、アストロサイトについての検討は少ない。本研究では、砂ねずみの一過性前脳虚血後の海馬 CA 1, CA 3 領域のアストロサイトの組織学的変化を、Hematoxylin Eosin 染色 (HE 染色), Grial Fibrillary Acidic Protein に対する免疫組織化学染色 (GFAP 染色), Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate diaphorase に対する酵素組織化学染色 (NADPH-d 染色) 等を行い、経時的に観察し比較検討した。その結果 HE 染色では、CA 1 領域において虚血後 3 日目に錐体細胞が虚血性変化を起し、5 日目以降にアストロサイトやマクロファージなどの非錐体細胞が増加することを認めた。一方、CA 3 領域では錐体細胞の虚血性変化は認められず、非錐体細胞の増加も認められなかった。GFAP 染色では、虚血後 2 日目に CA 1, CA 3 領域において足突起および胞体が増大した反応性アストロサイトが出現した。これら GFAP 陽性部位を画像処理し定量評価すると、CA 1 領域では 4 日目にその総面積が最大になり、5 日目以降も反応性は持続する傾向にあったが、CA 3 領域では反応性アストロサイトは出現するもののその数は増加せず、6 日目以降は反応性は低下する傾向にあった。NADPH-d 染色では、対象群の海馬において Nitric Oxide Synthase (NOS) 含有神経細胞がわずかに認められるのみで虚血による変化は認めなかった。このように、虚血後 2 日目より CA 1 および CA 3 領域に反応性アストロサイトが出現し、CA 1 領域で反応が持続し CA 3 領域で低下したことは、虚血後の神経細胞に対して反応性アストロサイトが積極的に関与していると考えられた。また NADPH-d 染色における結果により、虚血後のグリアの機能としての NO の関与は否定的となったが、今後さらに検討を必要とするものとする。

(平成 8 年 1 月 11 日採用)

A Morphological Study in the Gerbil Hippocampus following Transient Ischemia with Special Reference to the Role of the Astrocyte

Shinya SATO

The role of the astrocyte in delayed neuronal cell death in the hippocampus of the gerbil is not well understood. Morphological changes following ischemic insult in CA 1 and CA 3 of the gerbil hippocampus were investigated by hematoxylin-eosin (H & E) staining, an immunohistochemistry using an antibody against glial fibrillary acidic protein (GFAP), and enzyme histochemistry of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase (NADPH-d).

In the CA 1, changes due to ischemia in pyramidal neurons was observed on the third day after transient ischemia and an increase in the number of nonpyramidal cells such as, astrocytes, microglia and macrophages was found fifth operative day. However, neither ischemic changes of pyramidal cells, nor increase in the number of nonpyramidal cells were observed in the CA 3, during six days following ischemia.

GFAP immunohistochemistry revealed strong reaction of astrocytes, an elongation of the foot processes and an increase in the size of cytoplasm, in both the CA 1 and CA 3 on the second operative day. In the CA 1, an increase in the size of reactive astrocytes reached a peak on the fourth day after ischemia, while no increase was observed in the CA 3. Furthermore, the increase in the size of reactive astrocytes continued after six post operative day in the CA 1, while a decrease in the size of reactive astrocytes was observed in the CA 3.

NADPH-d histochemistry showed that a small number of Nitric Oxide Synthase (NOS)-containing neurons were present in the hippocampus. No morphological changes were recognized over six days following transient ischemia.

In this study, a different glial reaction was observed in the area between CA 1 and CA 3, indicated by the fact that in CA 1, reactive astrocytes continued to maintain an increase in size after six days, but did not in CA 3. These results suggest that astrocytes may play an important role such as, releasing neurotoxic or neuroprotectory substances, in selective neuronal cell death after ischemic insult in the gerbil hippocampus. Furthermore, in this study no morphological changes in NOS-containing neurons were observed in either CA 1 or CA 3. It could be stated that NO might have little effect on selective neuronal death. However, further studies are needed to elucidate the functional role of the astrocyte in the hippocampus following ischemia. (Accepted on January 11, 1996) *Kawasaki Igakkaishi* 21(3): 225-236, 1996

Key Words ① Gerbil ② Hippocampus ③ Ischemia
④ Astrocyte ⑤ Gial fibrillary acidic protein (GFAP)
⑥ Imaging analysis
⑦ Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase (NADPH-d)

はじめに

アストロサイト (astrocyte) は、神経細胞の軸索伸長の補助、血液脳関門の形成、神経細胞活動のための環境形成¹⁾などの他に神経組織の修復にも大きく関わっており、中枢神経系機能の恒常性を維持する上で重要な役割を果たしていることが知られている。

一過性前脳虚血後の遅発性神経細胞死^{2),3)}の

病態は、神経細胞に主眼を置いて観察した研究が多く、アストロサイトの役割を形態学的に検討した報告は少ない。

今回、一過性前脳虚血後に遅発性神経細胞死が認められる海馬 CA 1 領域と、認められない CA 3 領域について²⁾、アストロサイトの形態学的変化を免疫組織化学的手法を用いて経時的に比較観察した。また最近、内皮依存性弛緩因子である nitric oxide (NO) が遅発性神経細胞死の病態に関与している可能性が示唆されている

ことから、NO合成酵素であるNO synthaseの分布をnicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase (NADPH-d) 組織化学染色により経時的に観察した。

対象及び方法

1. 対象

60～80 gの成熟(12～13週齢)雄性砂ネズミ(Mongolian gerbil) 42匹を用いた。

2. 方法

実験群：

42匹の動物につきpentobarbital(Nembutal[®], 50 mg/kg, i.p.) 麻酔後頸部を正中切開し両側総頸動脈を露出,これをmicrovascular clip TKS-1(協和時計工業社)で血流を5分間遮断した。その後クリップを解放し血流再開を確認,閉創した。手術操作中,animal blanket controller(日本光電社)を用いて直腸温を一定とした(37±0.5°C)。

これらの動物を手術0日(偽手術,コントロール),術後1日,2日,3日,4日,5日,6日の群に分け,各群6匹ずつ,pentobarbital麻酔下に200 mlの生理食塩水および200 mlの4% formaldehyde (FA)液を経時的に注入し灌流固定(約10分間)を行った。その後これら6匹をさらに3匹ずつに分け,以下の染色を行った。なお,偽手術,コントロール群は麻酔後両側総頸動脈の露出のみを行い,6日後に灌流固定を行った群とした。

(1) H.E.染色:灌流固定終了後脳を摘出し4% FAでさらに12時間後固定,alcohol, xyleneで脱水後パラフィン包埋し,ミクロトームで5 μmの切片を作製してH.E.染色を行った。

(2) GFAP免疫組織化学染色:灌流固定終了後脳を摘出し,4% FAでさらに12時間後固定した後,20% sucrose溶液に12時間浸した。その後クリオスタットにて30 μmの凍結切片を作製し,これを0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)に浸漬した。引き続き0.5% H₂O₂および

1% normal bovine serumに室温にてそれぞれ30分間反応させ内因性peroxidase活性と非特異性抗原を除去した。ついでrabbit anti-cow GFAP抗体(DACO社,1:2000)に4°Cで24時間反応させた。さらにlabelled streptoavidin biotin法(LSABキット,DACO社)により,biotin標識goat anti-rabbit IgG,streptoavidin-peroxidaseにそれぞれ室温で10分間反応後,3,3'-diaminobenzidine tetra-hydrochlorideにて発色させた。これをalcohol, xyleneにて脱水後,Entellan[®](MERCK社)を用いて封入した。

(3) NADPH-d酵素組織化学染色:(2)と同様の切片を使用し,すみやかに0.1 mg/ml nitroblue tetrazolium (SIGMA社)および1.0 mg/ml β-NADPH (SIGMA社)を含む0.3% Triton-X加0.1 M phosphate buffer (pH8.0)に室温で30-60分浸した。その後Entellan[®]にて封入した。

3. 評価法

(1) H.E.染色を行った標本の海馬のCA1, CA3領域において,1視野中(×400)で錐体細胞層が視野X軸方向中央に配列するように検鏡し,正常な形態を示す錐体細胞数及び錐体細胞以外の細胞(非錐体細胞)数を計測した。同様にhematoxylinで後染色を行ったGFAP染色標本でGFAP陽性細胞数を計測し各々の領域で比較した。

(2) 上に述べたGFAP染色の染色性を客観的に評価するためにIBAS-2000(Zeiss社)を用いて(150×150) μm²の面積内における染色領域の和をGFAP陽性面積として算出し,GFAP陽性面積をCA1, CA3領域において比較検討した。

4. データ解析

各群の計数値の平均値±標準偏差を求め,コントロールに対する%として表した。

各グループにおける比較はWilcoxon検定⁴⁾を行い,p<0.05を有意とした。

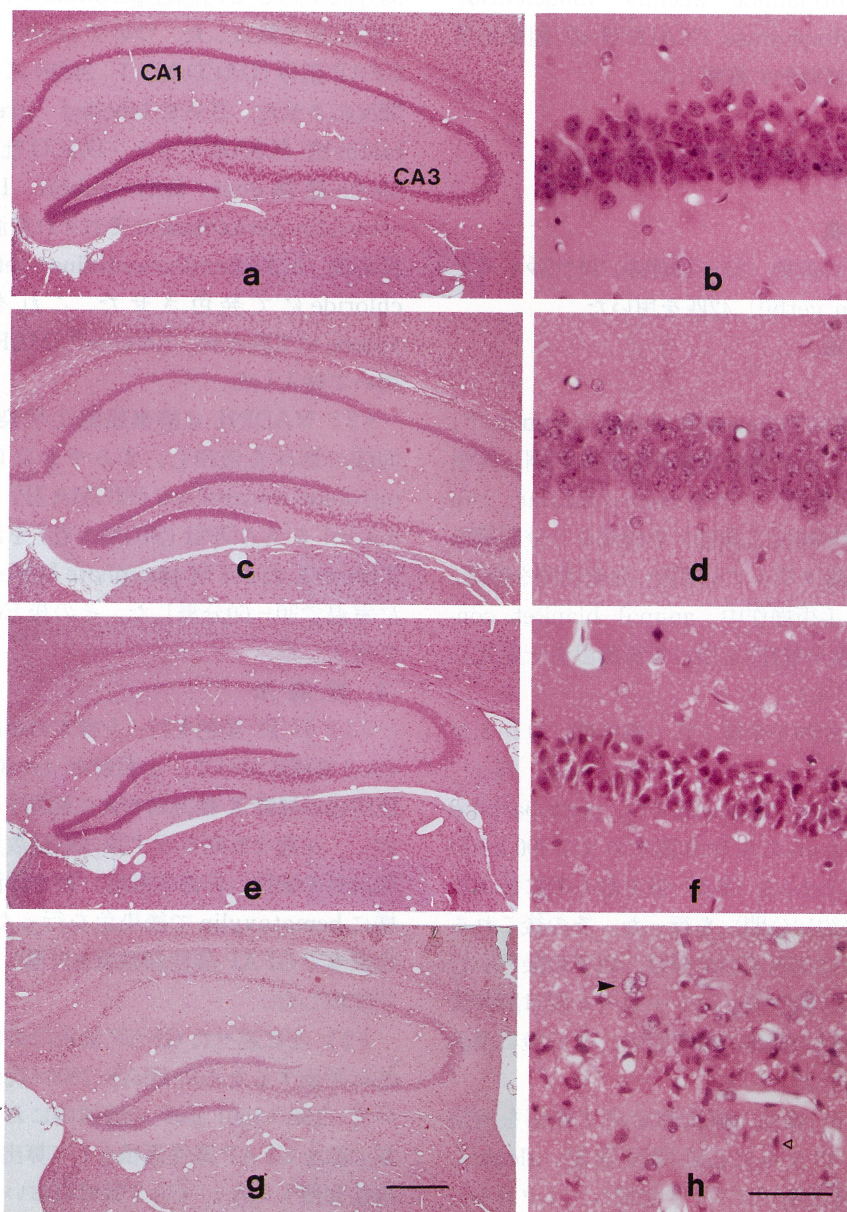


Fig. 1. Photomicrographs of H.E. staining in the CA in control animals (a) (b), 2 days (c) (d), 3 days (e) (f) and 6 days (g) (h) following transient ischemia. (a, c, e, g-hippocampus b, d, f, h-CA 1 resion) No significant differences were found between control and second postoperative days in the shape and size of pyramidal cells. On the third days, all pyramidal cells were observed to have shrunk. The shrunken cells were observed to disappear on day 6 following transient ischemia, while nonpyramidal cells such as, astrocytes, microglia and macrophages were still observe around the pyramidal cell layer of the CA 1. The bar indicates 500 μ m (a, c, e, g) and 50 μ m (b, d, f, h). arrow head : astrocyte open triangle : microglia

結 果

一過性前脳虚血後2日目にCA1, CA3両領域において、胞体、足突起の増大したアストロサイトが神経細胞死の有無に関わらず出現した。

1. H.E. 染色による錐体細胞と非錐体細胞の

変化

1) 形態的变化

① CA1領域 (Fig. 1)

錐体細胞は、2日目 (Fig. 1c, d) までコントロール (Fig. 1a, b) と比べ変化がないが、3日目には全例においてほとんど全ての錐体細胞は萎縮し、核と胞体の区別が困難であった (Fig.

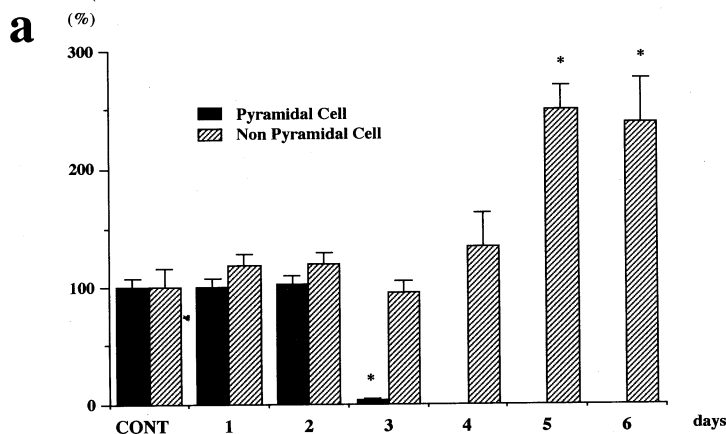


Fig. 2a. The mean number of pyramidal (filled bar) and nonpyramidal cells (shadowed bar) in the CA1 per unit area. Values were represented by the percentage of that of the control animals. * $p < 0.05$ The number of pyramidal and nonpyramidal cells was not change until 2 days following operation. Three days following operation, the number of normal pyramidal cells had significantly decreased, while that of nonpyramidal cells was unchanged. On the 5th and 6th day following operation, no normal pyramidal cells were observed, while the number of nonpyramidal cells had significantly increased.

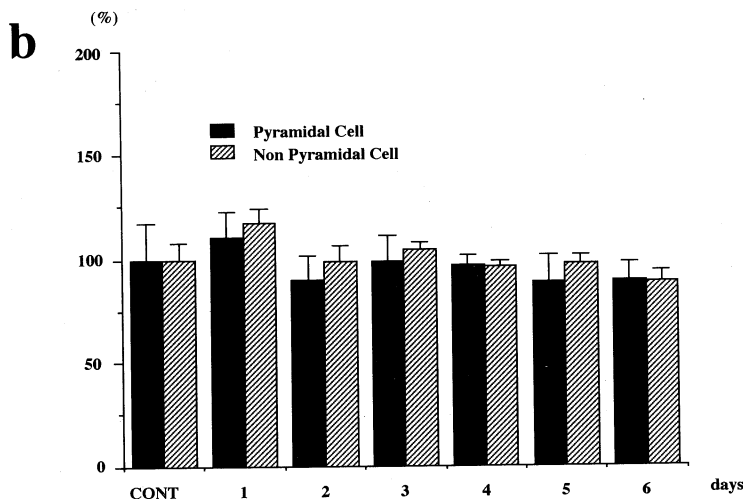


Fig. 2b. The mean number of pyramidal (filled bar) and nonpyramidal cells (shadowed bar) in the CA3 per unit area. Values were represented by the percentage of that of the control animals. The numbers of pyramidal and nonpyramidal cells were not significantly changed from day 1 to days 6 following operation.

1e, f). 6日目になると錐体細胞はほとんど脱落していた (**Fig. 1g, h**).

4日目になると明るく大型の核をもつアストロサイトが錐体細胞層周辺に出現し始め, 6日目には脱落した錐体細胞層内にアストロサイト, ミクログリアの出現を認めた (**Fig. 1h**).

② CA3領域

錐体細胞, 非錐体細胞ともに経時的变化を認めなかった.

2) 細胞数の変化 (**Fig. 2**)

CA1領域では錐体細胞が3日目まで有意に減少し4日目以降には消失していた. 一方, 非錐体細胞は5日目以降有意に増加した (**Fig. 2a**).

CA3領域では錐体細胞, 非錐体細胞ともに特に変化を認めなかった (**Fig. 2b**).

2. GFAP染色によるアストロサイトの変化

1) 形態的变化 (**Figs. 3, 4, 5**)

① 海馬全体及びCA1領域

コントロール群では, GFAP陽性細胞は海馬全体にびまん性に存在するが, CA1領域におけるGFAP陽性細胞の染色性はCA3領域を含め他の領域に比べ強かった. しかしながら, 錐体細胞層内にはGFAP陽性細胞は認められなかった (**Fig. 3a**). 個々の細胞では足突起は細長く, 足突起における染色性が著明であった (**Fig. 4a**). 2日目, H.E.染色では明らかな変化は認められなかったが, GFAP染色では海馬全体の染色性が増加し, アストロサイトの足突起の錐体細胞層内への伸長が認められた (**Fig. 3b**). また個々の細胞では足突起の太さ, 長さともにコントロールに比べ増大し, 胞体も軽度増大していた (**Fig. 4b**). 4日目では, 海馬全体でCA1領域の染色性が他の領域に比べ強かった (**Fig. 3c**). また明らかな核の増大を認めた (**Fig. 4c**). 6

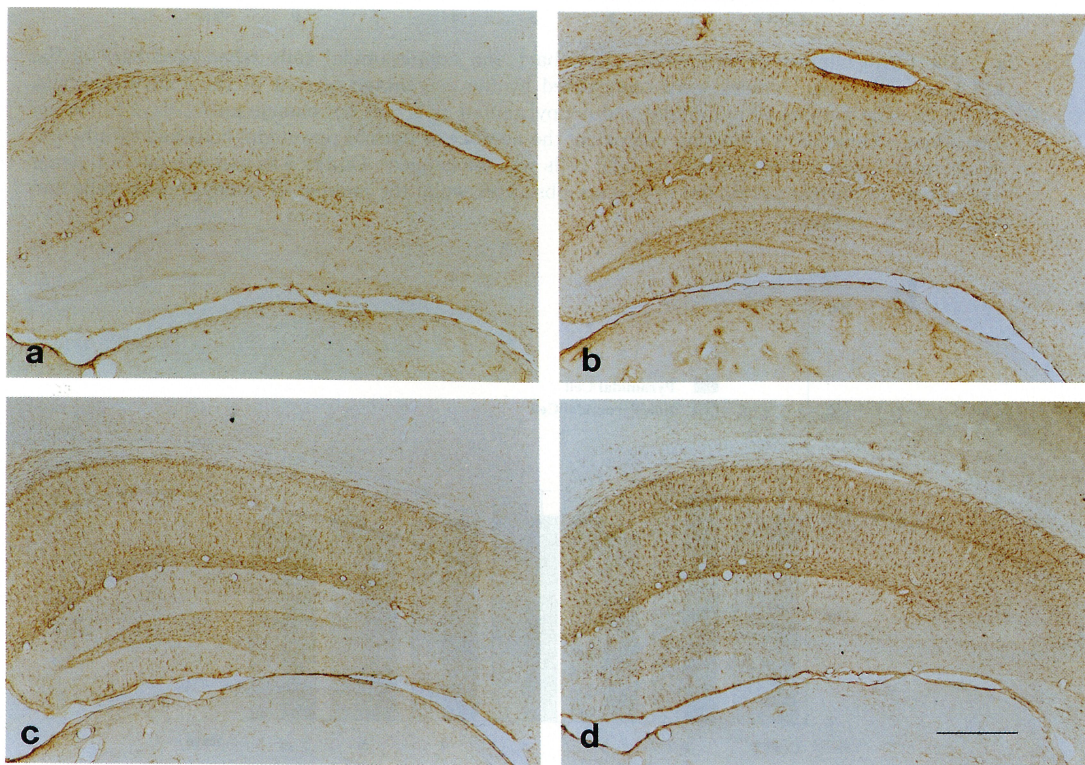


Fig. 3. Photomicrographs of GFAP immunohistochemistry in the hippocampus in the control animals (**a**), on 2 days (**b**), 4 days (**c**), and 6 days (**d**) following operation. Reactive astrocytes were appeared 2, 4 and 6 days following operation. The density of astrocytes in the hippocampal CA1 region increased in 6th day following operation. The bar indicates 500 μm .

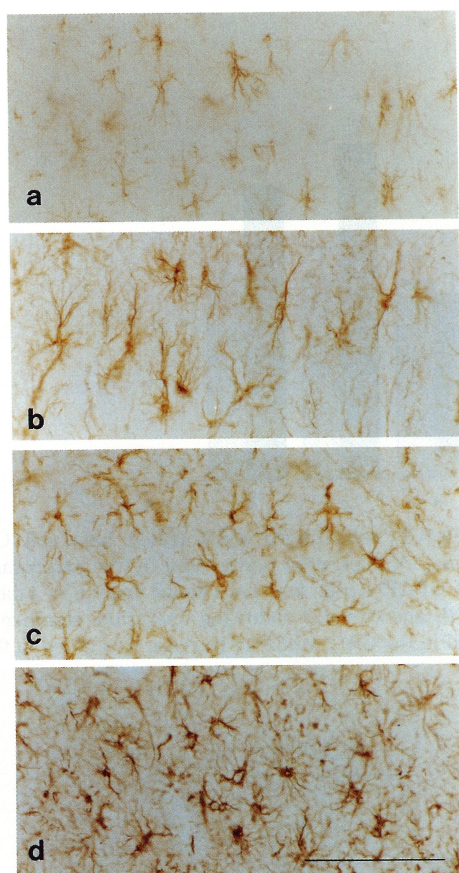


Fig. 4. Photomicrographs of GFAP immunohistochemistry in the CA 1 in control animals (a), 2 days (b), 4 days (c), and 6 days (d) following operation. The same changes were observed as in Figure 3. The bar indicates 100 μ m.

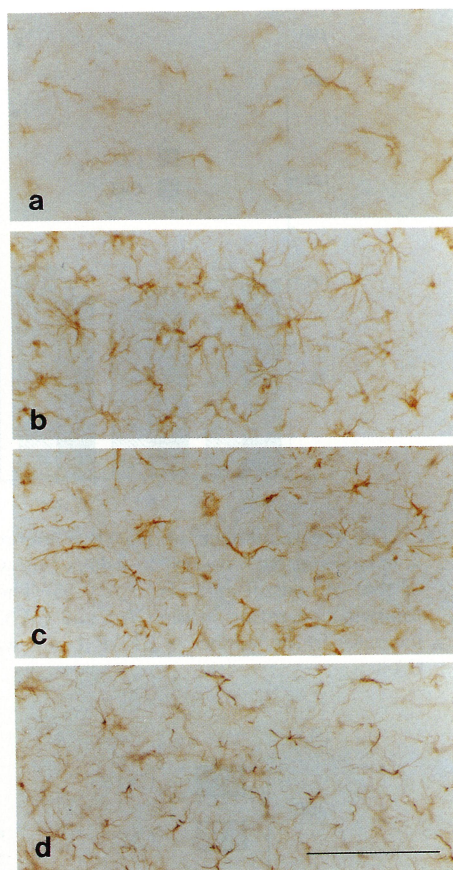


Fig. 5. Photomicrographs of GFAP immunohistochemistry in the CA 3 in the control animals (a), 2 days (b), 4 days (c), and 6 days (d) following operation. Reactive astrocytes appeared 2, 4 and 6 days following operation. The density of the astrocytes increased 4 days following operation. These changes in the CA 3 were smaller than that of the CA 1. The bar indicates 100 μ m.

日目では、錐体細胞層内に浸潤したアストロサイトの染色性がさらに高度となり、核もさらなる増大を認めたが、足突起は4日目に比べ短くなっていた (Figs. 3d, 4d)。

② CA 3 領域

コントロール群では、CA 1 領域に比べやや小さい胞体と細い足突起をもつ GFAP 陽性細胞が認められた (Fig. 5a)。2日目、4日目では、胞体、足突起ともに増大しているが、あまり差は認められなかった (Fig. 5b, c)。6日目では GFAP 陽性細胞の染色性は4日目に比べ低下していた (Fig. 5d)。

2) 細胞数の変化 (Fig. 6)

CA 1 領域において5日目以降で有意な増加を認めたが、CA 3 領域では有意な変化は認められなかった。

3) 画像解析 (Fig. 7)

CA 1 領域では虚血後2日目においてコントロールに比べ有意な GFAP 陽性面積の増加を認めた。4日目もさらに増加傾向を示し、6日目は軽度減少するものの2日目に比べ増加していた。CA 3 領域においても2日目においてコントロー

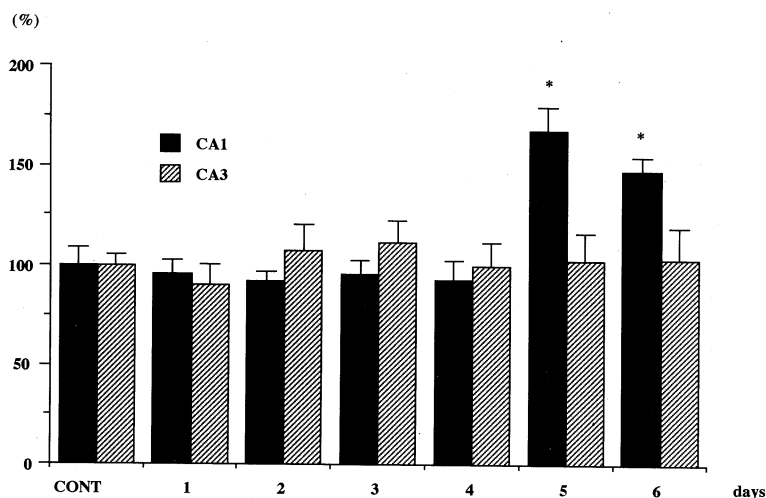


Fig. 6. The mean number of GFAP-immunoreactive (GFAP-I) cells in the CA1 (filled bar) and CA3 (shaded bar) from 0 to 6 days following operation. Values were represented by the percentage of that of control animals. * $p < 0.05$. The number of GFAP-I cells was not changed from 1 to 4 days following operation in the CA1 and CA3. On the 5th and 6th day following operation, significant increases in the number of GFAP-I cells were observed in the CA1, while no increase was noted in the CA3.

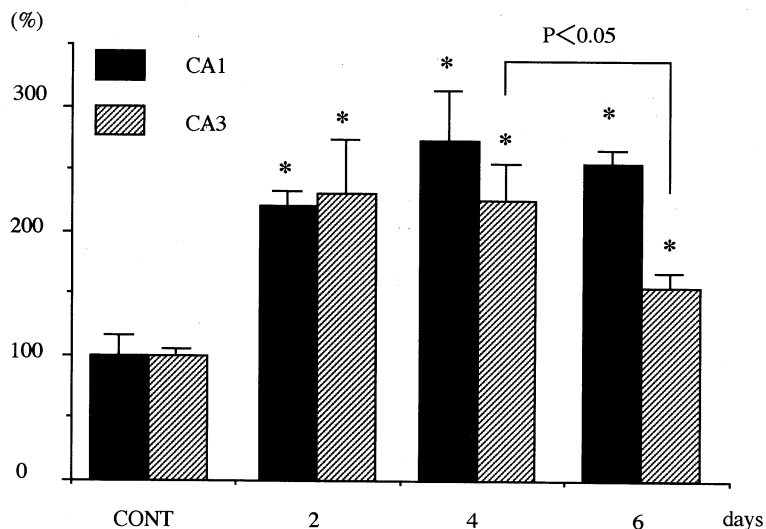


Fig. 7. The total areas of GFAP-immunoreactivities in the CA1 (filled bar) and the CA3 (shaded bar) in the control animals, 2 days, 4 days and 6 days following operation, measured by a computer assisted analysis system (IBAS). Values were represented by the percentage of that of control animals. * $p < 0.05$. A significant increase was observed in both the CA1 and CA3 on 2, 4 and 6 days following operation.

ルに比べ有意な増加を認めたが、2日目から4日目にかけては変化なく6日目において4日目と比べ有意な低下を認めた。

3. NADPH-d 組織化学による形態学的変化

(Fig. 8)

コントロールのCA1領域の錐体細胞層内および周辺に径20~30mmのNADPH-d陽性神経細胞が少数認められた(Fig. 8a, b)が、虚血

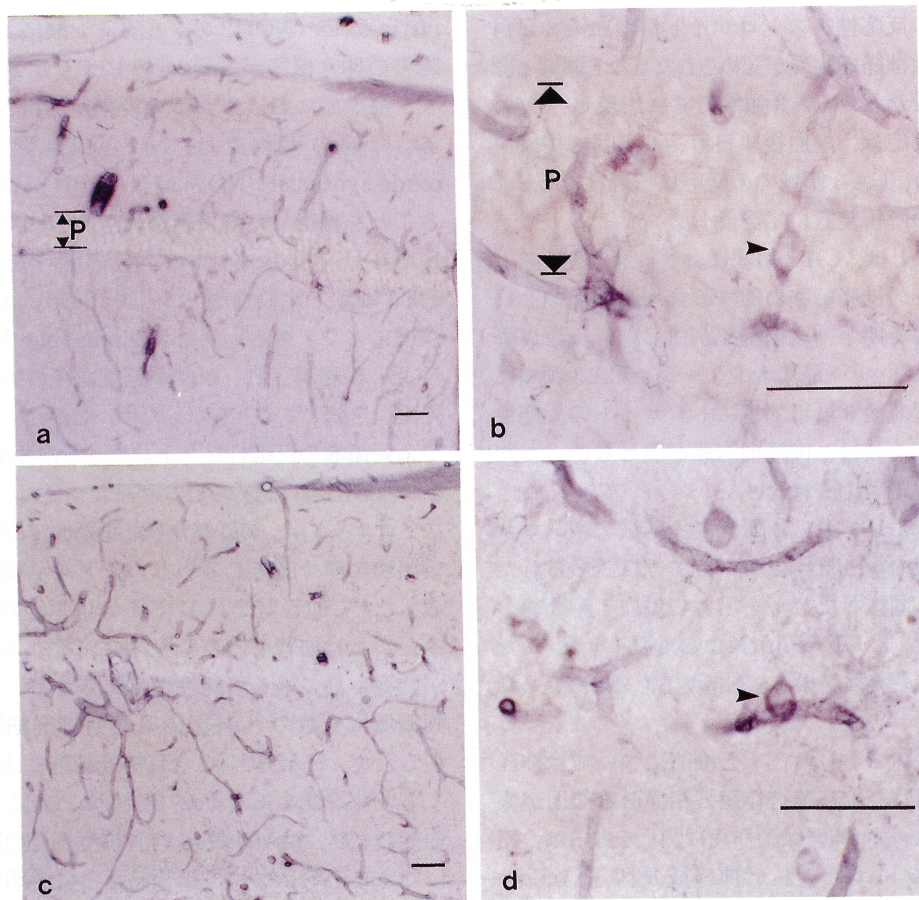


Fig. 8. Photomicrographs of NADPH-diaphorase positive neurons in the CA1 in the control animals (a, b) and on the 4th day following operation (c, d). No significant changes of NADPH-d positive neurons near the CA1 were observed between the control and specimens obtained on the 4th day following operation. P: pyramidal cell layer. The bar indicates 50 μ m. arrow head: NOS-containing neuron

後3日目以降も NADPH-d 陽性神経細胞の数および形態に特に変化は認められなかった (Fig. 8c, d). NADPH-d 陽性アストロサイトは認められず、また経時的变化も認めなかった (Fig. 8c, d). しかし、海馬全域において血管の染色性が4日目では増加していた (Fig. 8c, d).

考 察

一般に反応性アストロサイト (reactive astrocyte) とは、正常に比べ大型の核や胞体、長い足突起をもつアストロサイトで、従来より

その出現は何らかの病態の存在を示唆するとされている⁵⁾. また、細胞骨格を形成する直径約 10 nm の中間径フィラメントの一種である glial fibrillary acidic protein (GFAP) の含有量が増加し、免疫組織化学的手法により同定し得ることが知られている⁶⁾.

本実験では一過性脳虚血後のアストロサイトの役割を、上記の方法において経時的に観察することにより検討することを目的としたが、in vivo におけるこのような報告は少なく、また客観的指標を取り入れて観察した文献はほとんどない.

今回、反応性アストロサイトが虚血後2日目に遅発性神経細胞死が認められたCA1領域と認められなかったCA3領域で共に出現し、CA1領域の反応は、虚血後4日目、6日目も持続するものの、CA3領域での反応は一過性であることを画像解析装置にて評価しえた。

このことは、CA1領域における反応性アストロサイトの神経細胞に対する作用が虚血後2日目までの早期と神経細胞死が生じた4日目以降とで異なるものと思われた。一方、CA3領域において虚血後6日目でアストロサイトの反応性が低下したのは、神経細胞死が生じなかったためであると考えられた。

いずれにしても、本研究で反応性アストロサイトが虚血後2日目においてすでに認められたことは、同様なモデルを用いて虚血4時間後の海馬領域にGFAPmRNAの増加を示したKindyらの実験結果⁷⁾を支持するものと考えられた。

反応性アストロサイトの機能については神経保護作用及び神経障害作用の相異なる作用が報告されている。神経保護作用に関して古川は、反応性アストロサイトが神経成長因子(nerve growth factor: NGF)を合成することを示し⁸⁾、ShigenoらはNGFの脳室内投与で遅発性神経細胞死の出現を抑制することを示した⁹⁾。またTanakaらは、本実験と同様のモデルで虚血早期の反応性アストロサイトにおいて免疫組織化学的にグルタミン合成酵素が強陽性に染まることを示し、反応性アストロサイトが過剰のグルタミン酸をグルタミン合成酵素によりグルタミンにすることにより不活化し、神経細胞に対して保護作用を有するとした¹⁰⁾。今回の結果からも反応性アストロサイトがNGFやグルタミン合成酵素を発現し神経保護作用を示した可能性が考えられ、2日目のGFAP陽性面積増加は反応性アストロサイト内のNGFの合成やグルタミン合成酵素の活性を反映しているものと思われた。

一方、虚血早期のCA1領域におけるアストロサイトの神経障害性作用についての報告は少ない。最近、内皮依存性血管弛緩因子である

nitric oxide(NO)¹¹⁾のグルタミン酸による神経障害の仲介機序がSnyder¹²⁾により示されて以来、脳虚血におけるNOの役割が注目されている。今回の実験では、NO合成酵素(nitric oxide synthase: NOS)がNADPH-dに依存することを利用した酵素組織化学的手法である¹³⁾NADPH-d染色を行い、NOの関与をCA1、CA3領域で比較検討した。Pallardyは、虚血浸襲によりアストロサイトのinducible-NOS(i-NOS)が誘導され、NOが脳虚血後の神経細胞死を引き起こすことを示した¹⁴⁾。しかし、本研究では両領域の反応性アストロサイトにNADPH-d活性の出現は認められなかった。このことはアストロサイトが、NOを介した遅発性神経細胞死の出現に深く関与していないことを示唆している。ただし血管壁でNADPH-d染色性の増強をみたことは血管の内皮細胞や平滑筋からiNOSが誘導されている可能性が考えられる。さらに両領域に少数のNADPH-d含有神経細胞が存在したが、NADPH-d含有神経細胞には虚血による変化を認めることができなかったことから血管および、NADPH-d含有神経細胞の脳虚血に対する応答については今後さらに解明する必要があるものと考えられる。

一過性前脳虚血後にみられる神経細胞の選択的脆弱性の発生機序の一つとして、グルタミン酸-カルシウム説が考えられている。すなわち前シナプス神経終末より過剰のグルタミン酸が放出され¹⁵⁾、それに伴い後シナプス神経細胞内へのカルシウムの流入が起き、カルパインに代表される蛋白分解酵素や様々な物質を活性化¹⁶⁾し神経細胞死をきたすとするものである。一方、アストロサイトもグルタミン酸を始め各種神経伝達物質に対する受容体を有し、種々の神経伝達物質により細胞内カルシウムが変化することが報告されている¹⁷⁾。このことから本研究で得られたCA1領域とCA3領域の反応性アストロサイトの経時的変化の違いは、神経細胞死の有無と関係していると思われ、そのメカニズムとして神経細胞と同様にグルタミン酸を介している可能性がある。

アストロサイトの組織修復作用についてはよく知られているところである。本実験においても従来の報告どおり、CA 1 領域の錐体細胞は3日目に虚血性変化を起こしその後脱落し、アストロサイトによる組織修復が認められた。アストロサイトの組織修復において、病巣作成後3.5—4日の間にアストロサイトの分裂がおこることより⁹⁾、本実験のCA 1 領域で、4日目に観察された大型のアストロサイトの核は、組織修復に伴うアストロサイトの細胞分裂によるものであり、引き続き5日目にアストロサイトの数的増加が観察される結果となった。

また、修復期においてはミクログリアも多く認められた。H.E.染色における非錐体細胞数の増加率が、GFAP 陽性細胞数の増加率に比べ高いのはミクログリア増加の関与によるものと考えられる。ミクログリアは脳内で修復に関した貪食作用や免疫に関する作用を有している¹⁸⁾と言われているが、不明な点が多く一過性脳虚血後における役割は今後の検討課題としたい。

ま と め

1. 一過性前脳虚血後の海馬 CA 1, CA 3 領域における組織学的変化、特にアストロサイトの経時的変化について検討した。

2. 反応性アストロサイトは虚血後の神経細胞死の有無に関わらず出現した。

3. 反応性アストロサイトは虚血後初期には神経保護を、神経細胞死以後は修復作用へとその役割を変化させると思われた。

4. 初期の神経保護作用について今後解明する必要がある。

稿を終えるにあたり、直接ご指導、ご校閲いただきました川崎医科大学救急医学教室、小濱啓次教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、種々の御助言を賜りました福田助教授を始め、救急医学教室の諸先生方に感謝致します。

なお、本研究の一部は平成7年度川崎医科大学プロジェクト研究費(7-609)によったことを付記し、感謝の意を表します。

文 献

- 1) 中嶋一行, 高坂新一: 中枢グリア細胞の役割. 「神経精神薬理」東京, 星和書店. 1994, pp 249—259
- 2) Kirino T: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus. *Brain Res* 239: 57—69, 1982
- 3) Kirino T, Sano K: Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Acta Neuropathol* 62: 201—208, 1984
- 4) Neil AW, Matthew JH: *Introductory statistics*. 2nd ed, Arizona, Addison-Wesley. 1987, pp 608—618
- 5) 生田房弘: Astrocyte と頭蓋内圧亢進. *Neurosurgeons* 12: 7—14, 1993
- 6) Lawrence FE, Albert CHY, Yuen LL: Astrocytic response to injury. *Prog in Brain Res* 94: 353—365, 1992
- 7) Kindy MS, Bhat AN, Bhat NR: Transient ischemia stimulates glial fibrillary acid protein and vimentin gene expression in the gerbil neocortex, striatum and hippocampus. *Mol Brain Res* 13: 199—206, 1992
- 8) 古川昭栄, 古川美子: アストロサイトにおける神経成長因子合成 —その生理的意義と調節機構—. *細胞* 25(1): 10—14, 1993
- 9) Shigeno T, Mima T, Takakura K: Amelioration of delayed neuronal death in the hippocampus by nerve growth factor. *J Neurosci* 11: 2914—2919, 1991
- 10) Tanaka H, Araki M, Masuzawa T: Reaction of astrocytes in the gerbil hippocampus following transient ischemia: Immunohistochemical observations with antibodies against glial fibrillary acidic

- protein, glutamine synthetase, and S-100 protein. *Exp Neurol* 116 : 264—274, 1992
- 11) Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S : Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327 : 524—526, 1987
 - 12) Dawson VL, Dawson TM, London ED, Brecht D, Snyder SH : Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 6368—6371, 1991
 - 13) Vincent SR, Kimura H : Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46 : 755—784, 1992
 - 14) Demerile-Pallardy S, Lonchampt MO, Chabrier PE, Braquet P : Nitric oxide synthase induction in glial cells : Effect on neuronal survival. *Life Sci* 52 : 1883—1890, 1993
 - 15) Choi DW : Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1 : 623—634, 1988
 - 16) Siman R, Noszek JC : Excitatory amino acids activate calpain and induce structural protein breakdown in vivo. *Neuron* 1 : 279—287, 1988
 - 17) Finkbeiner SM : Glial calcium. *Glia* 9 : 83—104, 1993
 - 18) 松本 陽 : ミクログリアの形態と機能. *細胞* 25 : 20—25, 1993