

ラット脳幹内軸索損傷により惹起される顔面神経の逆行性変性に対するエリスロポエチンの神経保護効果の検討

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4496

ラット脳幹内軸索損傷により惹起される顔面神経の逆行性変性に対する エリスロポエチンの神経保護効果の検討

金沢大学大学院医学系研究科脳医科学専攻脳機能制御学
(旧講座名：脳神経科学)
(主任：山下純宏教授)

東 良

本研究の目的は、成熟ラットの定位的脳幹内軸索損傷による顔面神経核の逆行性変性モデルを用いて、変性過程における一酸化窒素 (nitric oxide, NO) と内在性エリスロポエチン (erythropoietin, EPO) ならびにEPO受容体 (EPO-receptor, EPO-R) の発現に注目することで逆行性変性過程の詳細を調べ、さらに遺伝子組み替えヒトエリスロポエチン (recombinant human EPO, rhEPO) の腹腔内投与による神経細胞保護効果を検討することである。脳幹内の顔面神経軸索を定位脳的に切断することにより、ほぼすべての顔面神経細胞は逆行性変性に陥る。その経時的生存率 (生存数) は、健常側に比して第7病日で $61.4 \pm 2.5\%$ ($471 \pm 25/768 \pm 30$)、第14病日で $24.7 \pm 3.3\%$ ($170 \pm 19/687 \pm 17$)、第28病日で $2.8 \pm 1.4\%$ ($22 \pm 13/794 \pm 75$) であった。組織学的検討において、正常組織では星状膠細胞膜がEPO陽性、顔面神経細胞膜がEPO-R陽性、かつそれぞれの細胞はNADPH-diaphorase陰性であった。顔面神経軸索損傷により、顔面神経核周辺にEPO陽性星状膠細胞が集積した。一方、生存顔面神経細胞に占めるNADPH-diaphorase陽性細胞の比率 (数) は、第4病日で $20.3 \pm 2.7\%$ ($255 \pm 55/1244 \pm 116$)、第7病日で $47.0 \pm 2.6\%$ ($451 \pm 75/956 \pm 132$)、第14病日で $99.0 \pm 7.2\%$ ($604 \pm 70/608 \pm 43$)、第28病日で $90.5 \pm 2.7\%$ ($130 \pm 9/151 \pm 19$) であった。rhEPOを連日腹腔内投与 (5000U/kg) することにより、NADPH-diaphorase陽性顔面神経細胞の比率は有意に低下し、第7病日で $34.7 \pm 1.3\%$ ($385 \pm 11/1111 \pm 44$)、第14病日で $75.3 \pm 4.9\%$ ($572 \pm 64/761 \pm 96$)、第28病日で $80.9 \pm 4.9\%$ ($164 \pm 39/201 \pm 37$) であった。一方、生存神経細胞は、第7病日で $75.5 \pm 6.0\%$ ($530 \pm 27/704 \pm 57$)、第14病日で $42.6 \pm 6.7\%$ ($300 \pm 59/702 \pm 32$)、第28病日で $8.2 \pm 0.5\%$ ($57 \pm 11/703 \pm 145$) と有意に増加した。以上の結果より、ラット顔面神経脳幹内軸索損傷モデルに対してrhEPOを外因性に投与することで、顔面神経細胞の逆行性変性、脱落を抑制することが示された。この神経保護効果は、脳幹内損傷顔面神経細胞の逆行性変性、脱落にNOによる酸化ストレスが関与し、外因性rhEPOがこれを抑制したためと推察された。

Key words facial nerve axotomy, retrograde degeneration, erythropoietin, nitric oxide, brain stem

軸索損傷後に修復過程が遂行されるためには、神経細胞の生存、維持が必要条件である。末梢神経では軸索損傷後、軸索の再生機構がただちに作用するが、中枢神経の損傷ではWaller変性により遠位側軸索が変性したままである上に、損傷部から中枢側に向って生ずる逆行性変性により急激に神経細胞が脱落し^{1)~4)}、その後の軸索再生さらには機能回復はより困難なものとなる。齧歯類における逆行性変性は、個体の年齢や軸索の切断部位によってその程度が異なることが知られている。例えば末梢神経組織内で顔面神経軸索が切断された場合、幼弱ラットでは神経細胞は逆行性変性に陥るものの、成熟ラットでは変性を免れ軸索を再伸長する⁵⁾。一方、成熟ラットにおいて軸索損傷部位が脳幹近傍や内耳道内であると、茎乳突孔より遠位の頭

蓋外損傷時に比べ、神経細胞の変性度は重篤である⁶⁾⁷⁾。成熟ラットの顔面神経逆行性変性現象はMattssonら⁸⁾が初めて報告したもので、頭蓋内脳幹外顔面神経 (末梢神経) 軸索切断後1ヶ月で約7割の神経細胞が細胞死に至る。最近、増谷は定位脳的に脳幹内顔面神経軸索を切断することにより比較的容易に再現性のある顔面神経核の逆行性変性ラットモデルを作成し、茎乳突孔出口部損傷と脳幹内損傷における顔面神経細胞の変性、脱落を詳細に比較検討し、第28病日における顔面神経細胞は、末梢側損傷群で約90%生存するのに対し、中枢側損傷群では著しい逆行性変性により約3%の生存率にしかすぎないことを報告した⁹⁾。末梢神経移植操作によりこの変性はある程度抑制できるものの機能回復には至らず、この重篤な逆行性変性機構

平成16年2月17日受付、平成16年6月7日受理

Abbreviations: BDNF, brain-derived neurotrophic factor; EPO, erythropoietin; EPO-R, erythropoietin-receptor; GDNF, glial cell derived neurotrophic factor; GFAP, glial fibrillary acidic protein; L-NAME, L^G-nitro-L-arginine methyl ether; NMDA, N-methyl-D-aspartate; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; NOS, nitric oxide synthase; PB, phosphate buffer; PFA, paraformaldehyde; rhEPO, recombinant human erythropoietin

の詳細ならびにその抑制に関する糸口は不明のままである。

逆行性神経細胞変性を誘発する因子として、グリア細胞由来神経栄養因子 (glial cell derived neurotrophic factor, GDNF)、脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 等の神経成長栄養因子とその受容体の欠落、アポトーシス因子、フリーラジカル等が推測されている^{216)~13)}。フリーラジカルに属する一酸化窒素 (nitric oxide, NO) はL-アルギニンを基質としNO合成酵素 (NO synthase, NOS) により生成され、平滑筋弛緩作用¹⁴⁾、感染防御反応や炎症反応の調節作用¹⁵⁾をはじめとするさまざまな生理作用を媒介するが、神経細胞においても生成され、神経伝達物質様作用、細胞内セカンドメッセンジャーとしての役割等を有している¹⁶⁾¹⁷⁾。

疎水性の165のアミノ酸からなる分子量30kDの糖蛋白質である¹⁸⁾エリスロポエチン (erythropoietin, EPO) は、造血作用のほか神経の発生と発達、脳の恒常性の維持を担っていると考えられている¹⁹⁾²⁰⁾。さらに、遺伝子組み替えヒトエリスロポエチン (recombinant human EPO, rhEPO) の投与により、培養神経細胞におけるアポトーシス抑制作用、グルタミン酸毒性による神経細胞死に対する抑制作用²¹⁾²²⁾、損傷脊髄の二次性炎症や乏突起膠細胞のアポトーシスの抑制²³⁾、脳梗塞の軽減²⁴⁾など、rhEPOによる脳脊髄虚血や外傷後の神経細胞死抑制作用が注目されつつあり、近年この作用にNOの関与が示唆されている²⁵⁾²⁶⁾。特に顔面神経に関しては、産生されたNOが細胞死を誘発するとの報告がある一方で^{10)~12)}、神経保護作用を示すとの報告²⁷⁾²⁸⁾もみられ、NOが顔面神経に対して障害作用あるいは神経保護作用を持つのか依然として不明である。

本研究では、成熟ラット定位的脳幹内顔面神経軸索切断モデルを作成し、顔面神経細胞の逆行性変性を誘導し、本変性過程におけるNOの役割をNADPH-diaphorase染色を用いて検討した。またEPO、EPO-Rの発現とその局在を免疫組織化学を用いて、さらにrhEPO腹腔内投与の神経保護効果とNOの発現変化に与える影響を解析することにより、rhEPOによる神経細胞死抑制機構の詳細を検討した。

対象および方法

I. 実験動物

実験動物として体重250gから300gの雄性ウイスターラット (n=66) を用いた。使用は金沢大学宝町地区実験指針に従った。ラットはステンスケージに1匹ずつ入れ、実験時以外は水と餌を自由に摂取できるようにした。手術および標本摘出はすべて5%抱水クロラール (0.01ml/g) の腹腔内投与による麻酔下に行った。

II. 実験モデルの作成

頭頂部を剃毛後、ラットを定位脳装置に固定した。頭頂部正中に約3cmの皮膚切開を加え前方はブレグマ、尾側は大後頭孔まで露出した。直径5mmの鋼製ドリルで横静脈洞を避けて右後頭骨に7mm×20mmの骨窓を開けた。脳幹内の顔面神経膝部はブレグマから尾側に10mm、腹側に8mm、正中から1mm外側に存在するので²⁹⁾、マイクロメスを水平から45度下方の角度に固定し、横静脈洞の損傷を避け、経小脳的に脳幹内顔面神経軸索膝部で顔面神経を切断した。具体的にはマイクロメスを45度前下方に傾けて固定し、先端をブレグマに合わせ、外側に1mm、尾側に1.5mm、腹側に13.5mm移動した点を切断開始点とした。そこから前方に1mm、上方に1mmずつ、それぞ

れ交互に合計5mmずつマイクロメスを移動することで脳幹内顔面神経軸索を切断した。完全顔面神経軸索切断がえられたことは、麻酔覚醒後手術翌日まで損傷側の頬髭に全く動きが見られないことで確認した。また、術後より灌流固定までの間にわずかでも損傷側の頬髭に動きが見られた場合には、不完全損傷として実験の対象より除外した。

III. 固定

脳幹損傷群として第1, 4, 7, 14, 28病日に各3匹, rhEPO投与群として第1, 4, 7, 28病日に各3匹, 第14病日に9匹, それぞれ抱水クロラール麻酔下に開胸し、左心室より灌流固定を行った。灌流液には100mMリン酸緩衝液 (phosphate buffer, PB) (pH7.4) に溶解した4%パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde, PFA) 溶液を用いた。灌流固定後、断頭し脳を取り出し、顔面神経核および脳幹内顔面神経軸索を含むように下丘下端から延髄門部の間の脳幹を摘出した。4% PFA-PB中に浸し、4℃にて24時間浸透させた後、脱水処理しパラフィンに包埋した。顔面神経核を含む部分を厚さ20 μ mの厚さで薄切し、連続切片を作製した。生存細胞数の計測には20 μ mの切片を7スライスごと選択した。また一部4 μ mの切片を作製し、免疫組織化学的検討に用いた。

NADPH-diaphorase組織化学では、rhEPO投与群と非投与群をそれぞれ損傷後、第1, 4, 7, 14, 28病日に各3匹ずつ麻酔下に開胸し、左心室より灌流固定を行った。PBS (pH7.4) にて還流後、100mMPB (pH7.2) に溶解した14%ピクリン酸加4%パラホルムアルデヒド液にて還流固定を行った。灌流固定後、断頭し脳を取り出し、4℃にて4時間浸透させた。さらに20%果糖液に入れ一晩置いた。気化した二酸化炭素を組織に噴射し凍結させた後、顔面神経核を含む部分を40 μ mの厚さで薄切し、3スライス毎の連続切片を作製した。

IV. 免疫組織学的検討

免疫染色はアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (avidin-biotin-peroxidase complex) 法にて行った。キシレン (和光純薬, 大阪) を用いて厚さ4 μ mの組織切片を脱パラフィン後、100%, 90%, 80%, 70%のエタノールにて順に親水し、100mMPBS (pH7.4) で洗浄、3%過酸化水素加メタノールにて内因性ペルオキシダーゼを失活させた。ED-1, EPO, EPO-Rの免疫染色では0.1%トリプシン0.1%CaCl₂水溶液にて20分処理した。100mMPBSで洗浄後、非特異的反応抑制のため、EPO, EPO-Rの免疫染色では5%スキムミルク (Difco Laboratories, Detroit, USA) を室温で4時間反応させ、グリア線維性酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP), ED-1の免疫染色では30分反応させた。一次抗体として抗GFAPポリクローナルIgG抗体 (300倍希釈) (DAKO, Glostrup, Denmark), 抗ED-1モノクローナルIgG抗体 (250倍希釈) (Serotec, Oxford, UK) を室温で10分、抗EPOポリクローナルIgG抗体 (200倍希釈 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), 抗EPO-RポリクローナルIgG抗体 (1000倍希釈 Santa Cruz Biotechnology) を4℃で24時間反応させた。対応するビオチン化二次抗体 (Vector Laboratories, Durham, USA) を20分間反応させた。各反応後に100mMPBS (pH7.4) で洗浄し、発色はアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合法と0.005%過酸化水素加0.02%ジアミノベンチジン (Sigma, St.Louis, USA) 処置にて行った。

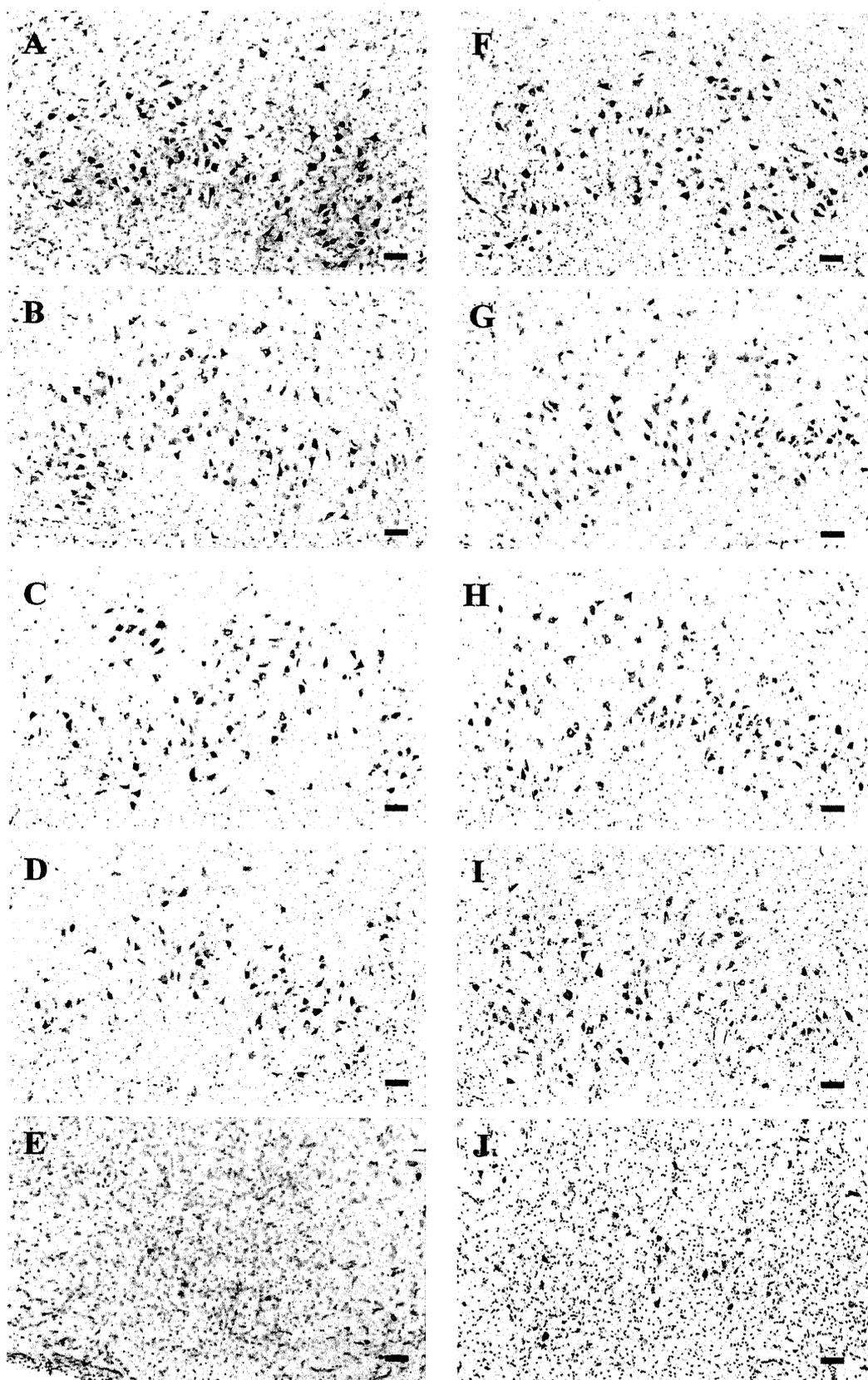


Fig. 1. Light micrographs with cresyl violet staining of the brainstem at the level of facial nucleus. (A and F; non-injury side, B and G; brainstem injury on day 1, C and H; brainstem injury on day 4, D and I; brainstem injury on day 7, E and J; brainstem injury on day 28, A-E; brainstem injury not treated with rhEPO, F-J; brainstem injury treated with rhEPO 5000 U/kg body weight). Almost a half of motoneurons died in the brainstem injury model on day 7 (D) compared to non-injury side (A). Almost all motoneurons died in the brainstem injury model on day 28 (E). Significant number of facial motoneurons remained on the lesioned side with rhEPO injection of 5000 U/kg on day 7 (I) compared to non-treated model (D) and on day 28 (J) compared to non-treated model (E). Scale bar 0.1mm.

V. 生存細胞数のカウント

ニッスル染色を用いて生存細胞数を計測した。厚さ $20\mu\text{m}$ の組織切片をキシレンで脱パラフィン後、100%エタノールに2回通し、100%エタノールに浸透したまま2時間室温で放置した。2%クレシルエヒトバイオレット水溶液 (Sigma) 2ml, 0.4g

の酢酸ナトリウム、ならびに0.6mlの水酢酸を200mlの蒸留水に溶解した混合液中で45分間反応させ、95%、100%エタノールで順に脱水し、100%キシレンで透徹し、エンテランにて封入した。生存神経細胞のカウントはHottingerら³⁰⁾の方法に基づいて行った。顔面神経細胞以外のグリア系細胞、すなわちア

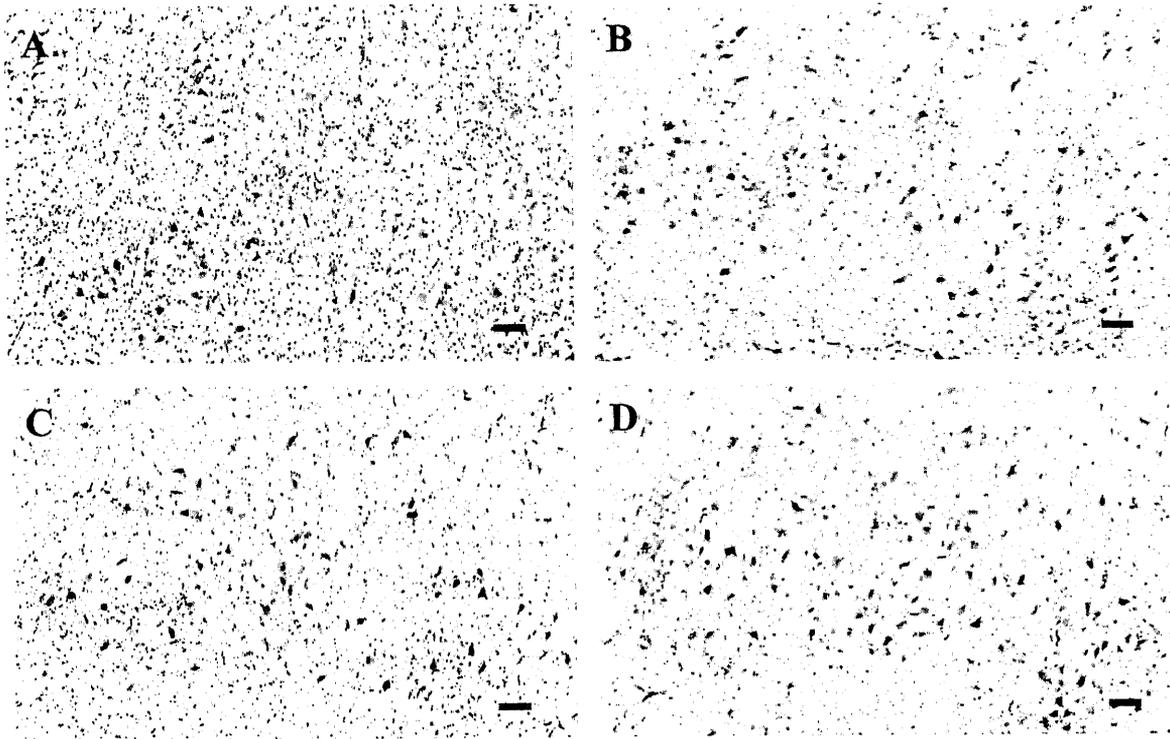


Fig. 2. Light micrographs with cresyl violet staining of the brainstem at the level of facial nucleus. (A; brainstem injury not treated with rhEPO on day14, B; brainstem injury on day14 treated with rhEPO 500 U/kg body weight, C; brainstem injury on day14 treated with rhEPO 5000 U/kg body weight, D; brainstem injury on day14 treated with rhEPO 10000 U/kg body weight) Significant number of facial motoneurons remained on the lesioned side with rhEPO injection of 500 U/kg (B), 5000 U/kg (C) 10000 U/kg (D) compared to non-treated model (A). Scale bar 0.1mm.

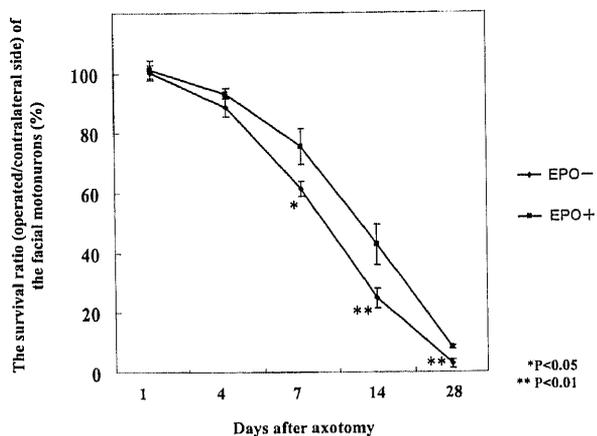


Fig. 3. Survival ratio (operated/contralateral side) of the facial motoneurons treated with rhEPO (5000 U/kg) on day 1, 4, 7, 14, and 28. Data are $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ indicate a significant difference.

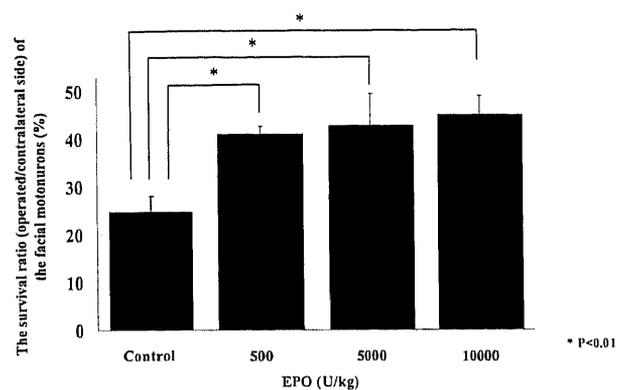


Fig. 4. Survival ratio (operated/contralateral side) of the facial motoneurons on treated with rhEPO day 14. Data are $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $p < 0.01$ indicates a significant difference.

ストロサイトやマイクログリアを除外するため直径 $20\mu\text{m}$ 以下の細胞は除外し、ニッスル染色によって核と核小体が明染されるもののみをカウントした。健常側の細胞数に対する損傷側の生存細胞数の比率を神経細胞生存率とした。

VI. NADPH-diaphorase 組織化学

Nicholsら³⁰⁾の方法に基づいて行った。40 μm の厚さで薄切した組織切片を100mMPBで15分洗浄したのち、0.3%の

Triton X-100を溶解した100mMPB (PB-T) にて15分洗浄した。0.5mg/mlのNADPH (Sigma), 0.1mg/mlのニトロブルーテトラジウム (nitro blue tetrazolium, NBT) (Sigma) を、0.3%のPB-Tで溶解した混合液中で37度、45分間反応させた。染色後、PBSで洗浄しプレバラートにのせ乾燥させた。アルコールで処理後、キシレンで透徹し、エンテランにて封入した。

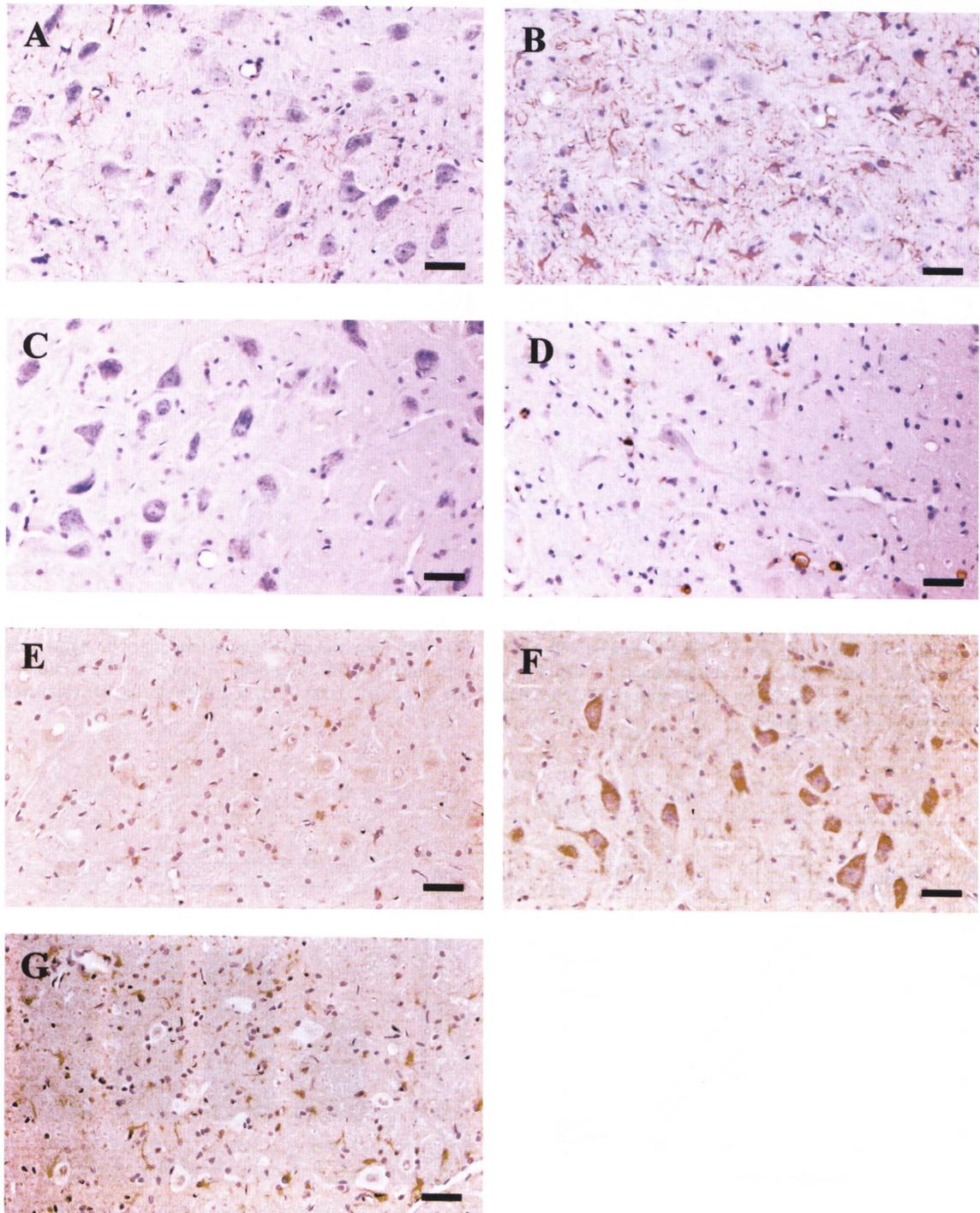


Fig. 5. Immunostaining for GFAP, ED-1, EPO and EPO-R.GFAP (A; non-injury side, B; brainstem injury on day14), ED-1 (C; non-injury side, D; brainstem injury on day14) and EPO (E; non-injury side, G; brainstem injury on day14) immunoreactivity were increased on lesioned side (B,D,G) than non-injury side (A,C,E). EPO-R (F; normal tissue) immunoreactivity was found in soma of the facial motoneurons. Scale bar 40 μm .

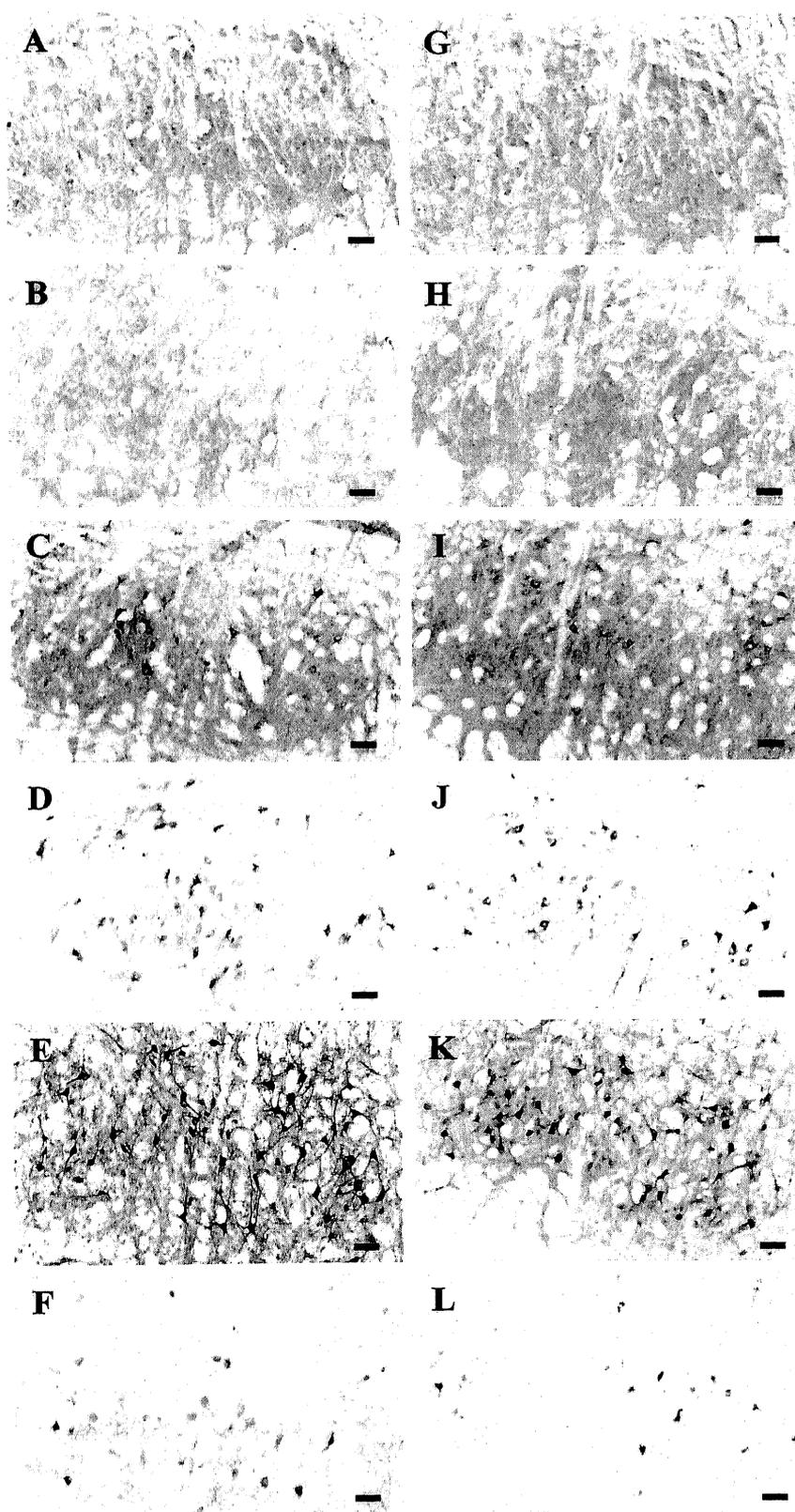


Fig. 6. NADPH-diaphorase reactivity in the facial neurons of the lesioned side (A and G; non-injury side, B and H; brainstem injury on day 1, C and I; brainstem injury on day 4, D and J; brainstem injury on day 7, E and K; brainstem injury on day 14, F and L; brainstem injury on day 28, A-F; brainstem injury not treated with rhEPO, G-L; brainstem injury treated with rhEPO 5000 U/kg body weight). Note the lack of NADPH-d staining normal tissue (A, G) and on day 1 (B, H). Note also the marked increase in NADPH-d reactivity both in terms of staining intensity and number of labeled neurons with time course in facial nucleus after brainstem injury. The NADPH-d expression were markedly decreased in the rhEPO-treated rats (5000 U/kg) (J, K, L) as compared with that in non-treated model (D, E, F). Scale bars 0.1mm.

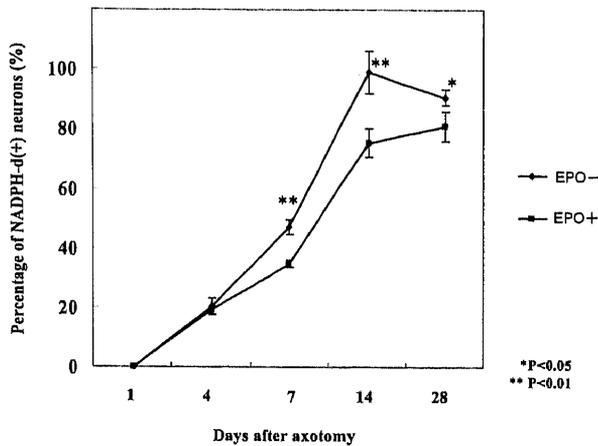


Fig. 7. Time course of NADPH-d reactivity in the facial nucleus on the lesioned side with or without treatment of rhEPO 5000 U/kg on days 1, 4, 7, 14, 28. Data are $\bar{x} \pm SD$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ indicate a significant difference.

VII. NADPH-diaphorase 陽性細胞

NADPH-diaphorase 組織化学において NADPH-diaphorase 陽性顔面神経細胞をカウントした。さらに、NADPH-diaphorase 染色を行った切片と対応する連続切片をニッスル染色し、核と核小体が明染されるものを生存神経細胞とした。生存神経細胞に対する NADPH-diaphorase 陽性細胞を比率で表した。

VIII. エリスロポエチン投与

rhEPO (中外製薬, 東京) をそれぞれ、500 単位/kg ($n=3$), 5000 単位/kg ($n=30$), 10000 単位/kg ($n=3$) ごとに腹腔内投与した。投与間隔は手術の 24 時間前, 手術直後, 以後 24 時間ごとに連日投与した。手術後 1 日目, 4 日目, 7 日目, 14 日目, 28 日目にそれぞれ屍殺し灌流固定した。

IX. 統計学的検討

測定値は全て平均 ± 標準偏差で示した。生存率, 及び NADPH-diaphorase 陽性率の評価にはまず二元配置分散分析法 (two-way ANOVA) を, 第 14 病日における生存率の評価では一元配置分散分析法 (one-way ANOVA) を行い, その後 Turkey-Kramer 法を用い 2 群間の比較を行った。

成 績

I. 顔面神経細胞生存率

定位脳的に脳幹内顔面神経膝部を切断することにより, 損傷部位より末梢側の脳幹内顔面神経軸索は Waller 変性に陥り, これとともに逆行性に顔面神経細胞体に変化が現れた。損傷をうけた細胞核は偏在しニッスル染色に対する染色性が低下した後、その数は急激に減少した。各群における生存顔面神経細胞数をニッスル染色後に計測したところ, 脳幹内顔面神経軸索損傷後, 第 1, 4, 7, 14, 28 病日 (各 $n=3$) での非損傷側 (図 1A) に対する損傷側の顔面神経細胞生存率 (損傷側の生存顔面神経細胞数 ± 標準偏差 / 非損傷側生存顔面神経細胞数 ± 標準偏差) は, 第 1 病日で $100.3 \pm 2.5\%$ ($718 \pm 34/715 \pm 21$) (図 1B), 第 4 病日で $88.5 \pm 3.1\%$ ($585 \pm 45/661 \pm 44$) (図 1C), 第 7 病日で $61.4 \pm 2.5\%$ ($471 \pm 25/768 \pm 30$) (図 1D), 第 14 病日で $24.7 \pm 3.3\%$ ($170 \pm 19/687 \pm 17$) (図 2A), 第 28 病日で $2.8 \pm 1.4\%$ ($22 \pm 13/794 \pm 75$) (図 1E) であった。

このモデルに対し rhEPO を 5000 単位/kg 連日腹腔内投与したところ (rhEPO5000 群), 第 1, 4, 7, 14, 28 病日 (各 $n=3$) での健常側 (図 1F) に対する損傷側の顔面神経細胞生存率 (生存数) は, 第 1 病日で $101.2 \pm 3.0\%$ ($695 \pm 37/687 \pm 17$) (図 1G), 第 4 病日で $93.1 \pm 1.8\%$ ($672 \pm 42/722 \pm 51$) (図 1H), 第 7 病日で $75.5 \pm 6.0\%$ ($530 \pm 27/704 \pm 57$) (図 1I), 第 14 病日で $42.6 \pm 6.7\%$ ($300 \pm 59/702 \pm 32$) (図 2C), 第 28 病日で $8.2 \pm 0.5\%$ ($57 \pm 11/703 \pm 145$) (図 1J) となった。rhEPO5000 群は非投与群と比較して第 7, 14, 28 病日において, 有意に神経細胞生存率が上昇した (図 3)。

第 14 病日において, rhEPO 非投与群, rhEPO を 500 単位/kg 連日腹腔内投与した群 (rhEPO500 群), rhEPO 5000 群, rhEPO を 10000 単位/kg 連日腹腔内投与した群 (rhEPO10000 群) 間で, 神経細胞生存率を比較し, rhEPO 投与量による顔面神経細胞生存効果を検討したところ, 非投与群で $24.7 \pm 3.3\%$ ($170 \pm 19/687 \pm 17$) (図 2A), rhEPO500 群で $40.9 \pm 1.6\%$ ($303 \pm 25/743 \pm 81$) (図 2B), rhEPO 5000 群で $42.6 \pm 6.7\%$ ($300 \pm 59/702 \pm 32$) (図 2C), rhEPO10000 群で $44.8 \pm 4.1\%$ ($340 \pm 81/754 \pm 144$) であった (図 2D)。各 rhEPO 投与群は非投与群と比較して有意に神経細胞生存率が上昇していた ($p < 0.01$)。しかし, rhEPO500 群, rhEPO5000 群, rhEPO10000 群の間では生存率に有意差は認めなかった (図 4)。

II. 免疫組織化学

顔面神経軸索損傷後第 14 病日において, 正常脳幹及び非損傷側脳幹に比べて顔面神経核周辺に GFAP 陽性星状膠細胞の細胞数が増加した (図 5A, B)。正常及び非損傷側脳幹では ED1 陽性マイクログリアは認めなかったが, 第 14 病日の損傷側顔面神経核周辺に ED1 陽性マイクログリアを認めた (図 5C, D)。正常及び非損傷側脳幹では星状膠細胞の細胞質は EPO 弱陽性所見を示し (図 5E), 顔面神経細胞の細胞質は EPO-R 強陽性を示した (図 5F)。第 14 病日の顔面神経核周辺にみられた反応性星状膠細胞の細胞質が EPO 強陽性を示し (図 5G), その数は増加していた。

III. NADPH-diaphorase 組織化学

正常組織, 第 1 病日ともに NADPH-diaphorase 陽性顔面神経細胞はみられなかった (図 6A, B, G, H)。第 4 病日では残存顔面神経細胞の約 2 割に NADPH-diaphorase が陽性となり, NADPH-diaphorase 陽性顔面神経細胞の生存神経細胞に対する比率 (NADPH-diaphorase 陽性顔面神経細胞数 / 生存顔面神経細胞数) は, $20.3 \pm 2.7\%$ ($255 \pm 55/1244 \pm 116$) (図 6C), 第 7 病日では $47.0 \pm 2.6\%$ ($451 \pm 75/956 \pm 132$) (図 6D), 第 14 病日では $99.0 \pm 7.2\%$ ($604 \pm 70/608 \pm 43$) (図 6E), 第 28 病日では $90.5 \pm 2.7\%$ ($130 \pm 9/151 \pm 19$) (図 6F) であった。

RhEPO5000 群における, 第 1, 4, 7, 14, 28 病日での NADPH-diaphorase 陽性顔面神経細胞の全生存神経細胞における比率は, 第 4 病日で $19.1 \pm 1.3\%$ ($240 \pm 16/1255 \pm 37$) (図 6I), 第 7 病日で $34.7 \pm 1.3\%$ ($385 \pm 11/1111 \pm 44$) (図 6J), 第 14 病日で $75.3 \pm 4.9\%$ ($572 \pm 64/761 \pm 96$) (図 6K), 第 28 病日で $80.9 \pm 4.9\%$ ($164 \pm 39/201 \pm 37$) (図 6L) となり, rhEPO 投与群は非投与群に対し第 7, 14, 28 病日において有意に NADPH-diaphorase 陽性顔面神経細胞の比率が低下した (図 7)。

考 察

本研究で用いた脳幹内顔面神経軸索損傷モデルは, 中枢神経

組織内での軸索損傷モデルとして瀰漫性軸索損傷や脳幹部腫瘍、血管障害などに起因する脳幹内顔面神経軸索損傷後の神経核の変性機構を解明する目的に考案されたもので⁸⁾、今回の検討でその再現性が明確に示され、非常に有用なモデルであると思われた。

NADPH-diaphorase 組織化学を用いて神経細胞の変性過程における NO の発現を評価したところ、正常、非損傷側及び脳幹内軸索切断直後の顔面神経核には NO 陽性所見はみられなかったが、第 14 病日ではほぼすべての顔面神経細胞が強陽性となり、ほとんどの神経細胞が脱落する第 28 病日までその染色性は継続してみられた。すなわち第 14 病日までの時間経過と共に、NADPH-diaphorase 陽性細胞の絶対数と陽性率の両者はともに増加し、第 28 病日ではわずかに残った顔面神経細胞はほぼ全てが NO 陽性を示した。NO は不安定で生体内では半減期が 3~5 秒³²⁾と非常に短いフリーラジカルで、検出、定量することは極めて困難なことから、代わりに NO 合成酵素 (NOS) 活性の間接測定が広く行われている。NOS には神経型 NOS (nNOS)、血管内皮型 NOS (eNOS)、誘導型 NOS (iNOS) の 3 種類のアイソザイムが存在するが、NADPH-diaphorase 組織化学は軸索損傷を受けた motoneuron の実験系では、このうち nNOS の分布と一致するとされている¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾²⁷⁾²⁸⁾。視神経軸索切断後の網膜神経節細胞³³⁾、顔面神経内耳道内軸索損傷後¹⁰⁾や脊髄根引き抜き損傷後¹³⁾の運動神経細胞の逆行性変性は L^G-nitro-L-arginine methyl ether (L-NAME) をはじめとする NOS 阻害薬の投与により抑制されることから、軸索切断後の逆行性変性には NO を介する酸化ストレスが関与していると考えられている。その一方で、逆行性変性をきたさない成熟ラット茎乳突孔出口部末梢軸索損傷モデルでは、NADPH-diaphorase 陽性顔面神経細胞を認め、逆行性変性を免れ得ない幼弱ラット末梢損傷モデルでは NADPH-diaphorase 陽性顔面神経細胞を認めないこと²⁷⁾、さらに nNOS 発現下の培養系に NOS 阻害薬 7-nitroindazole を投与すると神経毒性を示すことから、NO はむしろ神経保護に働いているとの報告もみられる³⁴⁾。この一見矛盾した 2 つの解釈は、NO の発現量の差異により機能を異にする、すなわち NO は低発現量では神経保護作用を、高発現量では神経障害作用を示すものと推察されている²⁷⁾。今回の脳幹内軸索損傷モデルでは、これまでに報告されたいずれのモデルよりも損傷部位が中枢側で作成されており、時間経過とともに NO 陽性細胞が増加するとともに第 28 病日にはほとんどの神経細胞が激しい逆行性変性をきたし、かつ顔面神経核に NO が高発現していたことは、高発現量の NO が神経障害作用を示すとする仮説を支持ものであると考えられた。今後、NO の定量を試みるとともに、NO の発現量を制御することで中枢神経軸索損傷後に惹起される逆行性変性を抑制可能か否かを検討することが、NO の対神経作用の詳細を明確にし得るものと考えられた。

本モデルに rhEPO を腹腔内連日投与 (5000 単位/kg) することにより、顔面神経細胞の生存率は第 7 病日、第 14 病日、第 28 病日ともに有意に上昇し、脳幹内軸索損傷に対する rhEPO の神経保護効果が明確に示された。これまで、rhEPO 投与により、脳弓切断モデルにおける cholinergic neuron²⁵⁾、中大脳動脈閉塞モデルにおける虚血神経細胞³⁶⁾³⁷⁾、脊髄損傷モデルにおける損傷神経細胞³⁸⁾および乏突起膠細胞²³⁾等の細胞死を抑制することが報告されているが、motoneuron の逆行性変性ならびに脱落を抑制するとしての報告は見られない。従って今回の結果は、

EPO の motoneuron 保護作用をはじめ明確に示したものである。脊髄損傷モデル²³⁾、虚血モデル²⁵⁾等においては、EPO の神経機能保護効果はその用量に依存するとされている。本実験で、第 14 病日にて 500 単位/kg、5000 単位/kg、10000 単位/kg 投与群間で容量依存性の有無を評価したところ、容量依存性に生存細胞数が増加する傾向は見られるものの、統計学的には有意差はみられなかった。この理由として、500 単位/kg の rhEPO 腹腔内投与が顔面神経保護に関する最大効果を示すに既に十分量である可能性、逆行性変性過程に伴い EPO レセプターが減少しているために結合できる EPO 量に限界がある可能性³⁹⁾、または、腹腔内に投与した rhEPO が一定量以上、脳内に取り込まれない可能性等が考えられる。現在 rhEPO を腹腔内投与した際の血中濃度を測定中であり、今後更なる検討を行う予定である。

¹²⁵I を用いた検討によれば、これまでに成熟マウスの海馬、内包、皮質、中脳に特異的に EPO の結合する領域が⁴⁰⁾、細胞レベルでは神経細胞、星状膠細胞に EPO が、また神経細胞、星状膠細胞、血管内皮細胞に EPO-R の存在が明らかにされている³⁷⁾⁴¹⁾⁴²⁾。腎臓や肝臓で作られた EPO は通常血液脳関門を通過しないことから⁷⁾⁴³⁾、中枢神経系には造血系とは独立した EPO/EPO-R システムが存在すると考えられている。脳内では、EPO は神経細胞及び星状膠細胞より産生、分泌され、オートクラインまたはパラクライン様式に神経細胞に作用し、神経発達や恒常性の維持に関与すると考えられている³⁷⁾⁴⁴⁾。本実験では、非損傷顔面神経核で星状膠細胞に EPO、顔面神経細胞体の細胞膜に EPO-R 陽性所見が観察され、軸索損傷後には神経核周囲に増加した星状膠細胞の EPO 発現が増強したことから、軸索損傷後における神経核周囲の活性化星状膠細胞は、EPO を発現することで変性過程の顔面神経細胞に対し神経保護の方向に働いていると推測される。しかし、外因性 rhEPO の投与により逆行性変性の抑制効果がみられたことは、軸索損傷後にグリアより分泌される内因性 EPO だけでは保護効果は不十分で、軸索切断顔面神経細胞の生存維持には一定量以上の EPO が必要であることを示唆している。

脳幹内顔面神経軸索損傷後、第 7 病日、第 14 病日、第 28 病日において rhEPO 投与群は非投与群と比べ、NADPH-diaphorase 陽性率は有意に減少し、かつ神経細胞の生存率は有意に増加した。この結果から、rhEPO は nNOS の発現を抑制することにより NO などの酸化ストレスを減少させ、逆行性変性を抑制すると推測された。脳虚血再灌流モデルに rhEPO を投与すると、過酸化脂質の指標であるマロンジアルデヒド (malondialdehyde) と NO が減少するとともに、海馬における遅発性神経障害が軽減すること²⁵⁾、培養神経細胞の EPO-R が活性化されると NMDA (N-methyl-D-aspartate) より誘発されるアポトーシスが抑制されること²⁶⁾などから、NO を介した神経細胞死は EPO により抑制されると考えられている。その機序として、細胞膜上の EPO-R の活性化により、NF- κ B を介したシグナル伝達系が働き抗アポトーシス作用を示す可能性²⁶⁾³⁹⁾⁴⁵⁾、スーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase, SOD)、グルタチオンペルオキシダーゼ (glutathione peroxidase)、カタラーゼ (catalase) などの抗酸化物質の作用を増強させることで酸化ストレスを減弱させる可能性⁴⁴⁾、EPO が直接神経細胞の NO 産生量を低下させる可能性等があると考えられている²⁵⁾。神経栄養因子である GDNF、BDNF が脊髄神経根引き抜き損傷後の運動神経細胞体の nNOS 発現を低下させ、神経細胞の変性

を抑えることが知られている¹²⁾。rhEPOを投与することで有意にnNOSの発現が抑制され、かつ同時に顔面神経細胞の生存率が上昇した今回の実験結果から、EPOはGDNF、BDNFと同様にNOの発現を抑える作用をもつ神経栄養因子のひとつであることが示唆された。しかし、各種神経栄養因子の酸化ストレス抑制作用は未だ十分に解明されておらず、今後本モデルを用いて各種神経栄養因子投与下におけるNOならびにNOにより引き起こされる、パーオキシナイトライト (ONOO⁻) やヒドロキシラジカル (\cdot OH) などの、各種フリーラジカルを検討することは、神経変性機構の解明の糸口となりうると思われる。rhEPOは貧血に対する治療薬としてすでに臨床応用されており、安全性の確立した医薬品である。しかし、貧血状態でない生体内にrhEPOを投与すると、本来もつ造血作用により赤血球数、ヘモグロビン値は上昇し多血症となる欠点がある。近年EPOの神経保護作用を呈するアミノ酸配列が特定され⁴⁶⁾、造血作用を持たないEPOの開発が現在すすめられており、神経保護効果のみを有する薬剤の開発もさほど遠くない⁴⁷⁾。rhEPOを用いて、脳幹内顔面神経軸索損傷に惹起される顔面神経の逆行性変性を抑制するアプローチは、今後の中枢神経系の機能温存ならびに機能回復に有効な手段のひとつとなるであろう。

結 論

ラット脳幹内顔面神経軸索損傷モデルを用いて、顔面神経細胞のNOの発現を調べ、さらにrhEPOの腹腔内投与による顔面神経細胞死の抑制効果を検討し、以下の結果を得た。

1. 脳幹内顔面神経軸索損傷により、顔面神経細胞の生存率は第7病日で61.4%、第14病日で24.7%、第28病日で2.8%であった。rhEPOを腹腔内に投与したところ、顔面神経細胞の生存率は第7病日で75.5%、第14病日で42.6%、第28病日で8.2%となり、非投与群と比較してその生存率は有意に上昇した。

2. 免疫組織化学的に顔面神経細胞にEPO-Rの発現を認めた。また、損傷後第14病日で星状膠細胞にEPOの発現を強く認めた。損傷後第14病日でGFAP陽性星状膠細胞及びED-1陽性マクログリアの細胞数の増加を認めた。

3. NADPH-diaphorase組織化学による顔面神経細胞のnNOS発現の検討では、損傷後第7病日で47.0%、第14病日で99.0%、第28病日で90.5%の神経細胞が陽性となった。rhEPO投与により第7病日で34.7%、第14病日で75.3%、第28病日で80.9%と、その陽性率を有意に減少させた。

以上より、ラット脳幹内顔面神経軸索損傷モデルにおいてrhEPOを外因性に投与することにより、顔面神経細胞の変性、脱落を抑制することが可能であった。これは外因性EPO投与がNOを介した神経細胞障害機構を抑制したものと推察された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導と御校閲を賜りました金沢大学大学院医学系研究科脳医学専攻脳機能制御学山下純宏教授に深甚なる謝辞を表します。また、直接の御指導を賜りました同講座の長谷川光広助教授、感覚運動病態学の伊藤真人助手に心から感謝致します。また、御校閲を賜りました藤沢弘範講師、標本作製に御協力頂いた今村明子文部技官に感謝の意を捧げます。さらに、御支援と御協力を頂きました金沢大学大学院医学系研究科脳医学専攻脳機能制御学の皆様に深く感謝致します。

本論文の要旨は第15回神経損傷の基礎シンポジウム (2003, 東京)、第19回神経組織の成長、再生、移植研究会 (2004, 岐阜) において発表された。

文 献

- 1) Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. *J Neurocytol* 18: 671-683, 1989
- 2) Goldberg JL, Barres BA. The relationship between neuronal survival and regeneration. *Ann Rev Neurosci* 23: 579-612, 2000
- 3) Hasegawa M, Seto A, Uchiyama N, Kida S, Yamashita T, Yamashita J. Localization of E-cadherin in peripheral glia after nerve injury and repair. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 424-434, 1996
- 4) Fukaya K, Hasegawa M, Mashitani T, Kadoya T, Horie H, Hayashi Y, Fujisawa H, Tachibana O, Kida S, Yamashita J. Oxidized galectin-1 stimulates the migration of Schwann cells from both proximal and distal stumps of transected nerves and promotes axonal regeneration after peripheral nerve injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 62: 162-172, 2003
- 5) Snider WD, Elliott JL, Yan Q. Axotomy-induced neuronal death during development. *J Neurobiol* 23: 1231-1246, 1992
- 6) Mattsson P, Meijer B, Svensson M. Extensive neuronal cell death following intracranial transection of the facial nerve in the adult rat. *Brain Res Bull* 49: 333-341, 1999
- 7) Dai CF, Kanoh N, Li KY, Wang Z. Study on facial motoneuronal death after proximal or distal facial nerve transection. *Am J Otol* 21: 115-118, 2000
- 8) 増谷剛. ラット脳幹内顔面神経膝部軸索損傷モデルにおける顔面神経核の逆行性変性機構の抑制に関する研究. *十全医会誌* 118: 348-361, 2002
- 9) Berkelaar M, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ. Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci* 14: 4368-4374, 1994
- 10) Run-Sheng R, Seng-Kee L, Kian-Hian Y. The role of nitric oxide in facial motoneuronal death. *Brain Res* 698: 163-168, 1995
- 11) Chang HM, Ling EA, Lue JH, Wen CY, Shieh JY. Melatonin attenuates neuronal NADPH-d/NOS expression in the hypoglossal nucleus of adult rats following peripheral nerve injury. *Brain Res* 873: 243-251, 2000
- 12) Wu W, Li L, Yick LW, Chai H, Xie Y, Yang Y, Prevetie DM, Oppenheim RW. GDNF and BDNF alter the expression of neuronal NOS, c-Jun, and p75 and prevent motoneuron death following spinal root avulsion in adult rats. *J Neurotrauma* 20: 603-612, 2003
- 13) Wu W, Li L. Inhibition of nitric oxide synthase reduces motoneuron death due to spinal root avulsion. *Neurosci Lett* 153: 121-124, 1993
- 14) Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987
- 15) Akaïke T. Infections and NO. *Masui* 50: 24-30, 2001
- 16) Karen S, David S. Nitric Oxide in excitable tissues: Physiological Roles and Disease. *J Clin Invest* 100: 2424-2429, 1997
- 17) Papa S, Skulachev VP. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol Cell Biochem* 174: 305-319, 1997

- 18) Erslev AJ. Erythropoietin. *N Engl J Med* 324: 1339-1344, 1991
- 19) Juul SE, Yachnis AT, Rojiani AM, Christensen RD. Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. *Pediatr Dev Pathol* 2: 148-158, 1999
- 20) Juul SE, Yachnis AT, Christensen RD. Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus. *Early Hum Dev* 52: 235-249, 1998
- 21) Siren AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 4044-4049, 2001
- 22) Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 76: 105-116, 1997
- 23) Gorio A, Gokmen N, Erbayraktar S, Yilmaz O, Madaschi L, Cichetti C, Di Giulio AM, Vardar E, Cerami A, Brines M. Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9450-9455, 2002
- 24) Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10526-10531, 2000
- 25) Calapai G, Marciano MC, Corica F, Allegra A, Parisi A, Frisina N, Caputi AP, Buemi M. Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation. *Eur J Pharmacol* 401: 349-356, 2000
- 26) Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature* 412: 641-647, 2001
- 27) Mariotti R, Peng ZC, Kristensson K, Bentivoglio M. Age-dependent induction of nitric oxide synthase activity in facial motoneurons after axotomy. *Exp Neurol* 145: 361-370, 1997
- 28) Rossiter JP, Riopelle RJ, Bisby MA. Axotomy-induced apoptotic cell death of neonatal rat facial motoneurons: time course analysis and relation to NADPH-diaphorase activity. *Exp Neurol* 138: 33-44, 1996
- 29) Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, second edition, Sydney, 1986
- 30) Hottinger AF, Azzouz M, Deglon N, Aebischer P, Zurn AD. Complete and long-term rescue of lesioned adult motoneurons by lentiviral-mediated expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the facial nucleus. *J Neurosci* 20: 5587-5593, 2000
- 31) Nichols K, Staines W, Krantis A. Neural sites of the human colon colocalize nitric oxide synthase-related NADPH diaphorase activity and neuropeptide Y. *Gastroenterology* 107: 968-975, 1994
- 32) Czapski G, Goldstein S. The role of the reactions of .NO with superoxide and oxygen in biological systems: a kinetic approach. *Free Radic Biol Med* 19: 785-794, 1995
- 33) Koeberle PD, Ball AK. Nitric oxide synthase inhibition delays axonal degeneration and promotes the survival of axotomized retinal ganglion cells. *Exp Neurol* 158: 366-381, 1999
- 34) Andoh T, Lee SY, Chiu CC. Preconditioning regulation of bcl-2 and p66shc by human NOS1 enhances tolerance to oxidative stress. *FASEB J* 14: 2144-2146, 2000
- 35) Konishi Y, Chui DH, Hirose H, Kunishita T, Tabira T. Trophic effect of erythropoietin and other hematopoietic factors on central cholinergic neurons in vitro and in vivo. *Brain Res* 609: 29-35, 1993
- 36) Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sakaki S, Masuda S, Sasaki R. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 26-32, 1998
- 37) Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 643-651, 1999
- 38) Sekiguchi Y, Kikuchi S, Myers RR, Campana WM. Erythropoietin inhibits spinal neuronal apoptosis and pain following nerve root crush. *Spine* 28: 2577-2584, 2003
- 39) Campana WM, Myers RR. Erythropoietin and erythropoietin receptors in the peripheral nervous system: changes after nerve injury. *FASEB J* 15: 1804-1806, 2001
- 40) Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Bauer C, Gassmann M. Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3717-3720, 1995
- 41) Masuda S, Nagao M, Takahata K, Konishi Y, Gallyas F Jr, Tabira T, Sasaki R. Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J Biol Chem* 268: 11208-11216, 1993
- 42) Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R. A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem* 269: 19488-19493, 1994
- 43) Marti HH, Gassmann M, Wenger RH, Kvietikova I, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Trentz O, Bauer C. Detection of erythropoietin in human liquor: intrinsic erythropoietin production in the brain. *Kidney Int* 51: 416-418, 1997
- 44) Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4635-4640, 1998
- 45) Campana WM, Myers RR. Exogenous erythropoietin protects against dorsal root ganglion apoptosis and pain following peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci* 18: 1497-1506, 2003
- 46) Campana WM, Misasi R, O'Brien JS. Identification of a neurotrophic sequence in erythropoietin. *Int J Mol Med* 1: 235-241, 1998

47) Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, Torup L, Sager T, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Ghezzi P, Villa P, Fratelli M, Casagrande S, Leist M, Helboe L, Gerwein J, Christensen S, Geist MA, Pedersen LO,

Cerami-Hand C, Wuerth JP, Cerami A, Brines M. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6741-6746, 2003

Neuroprotective effects of recombinant human erythropoietin on adult rat facial nucleus following nerve transection in the brainstem Ryo Higashi, Department of Neurosurgery, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 – J. Jusen Med Soc., 113, 34 – 44 (2004)

Key words facial nerve axotomy, retrograde degeneration, erythropoietin, nitric oxide, brain stem

Abstract

It is known that oxidative stress and massive production of nitric oxide (NO) have been implicated in the retrograde degeneration following facial nerve axotomy, and that oxidative damage in variety of experimental neuropathologies might be reduced by recombinant human erythropoietin (rhEPO). This study was aimed to ascertain whether rhEPO exerts its neuroprotective effect on the lesioned facial nucleus after nerve transection in the brain stem. After the facial nerve axotomy in the brainstem by stereotaxic procedure, the survival ratio of motoneurons in the facial nuclei was $25.0 \pm 2.4\%$ on day 14 and $2.8 \pm 1.4\%$ on day 28 compared to the contralateral intact side. Immunohistochemically, EPO was detected on astrocytes, and EPO-R was detected on facial motoneurons in normal tissue. EPO expression was seen in reactive astrocytes around the facial nucleus on lesioned side on day 14. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d) histochemistry showed that the facial motoneurons were not stained with NADPH-d in normal tissue and on day 1. However, increased NADPH-d activity was detected in the facial motoneurons on day 4 and later. The number of NADPH-d positive neurons and the intensity increased steadily along with survival time, and almost all motoneurons were stained on day 14. Daily administration of rhEPO (5000 U/kg) markedly decreased the number of NADPH-d positive cells and the intensity on day 14 ($75.3 \pm 4.9\%$). The survival ratio of motoneurons in the facial nuclei with the rhEPO administration (5000 U/kg daily) was $42.6 \pm 6.7\%$ on day 14 and $8.2 \pm 0.5\%$ on day 28. These findings suggest that EPO has a neuroprotective property to the retrograde degeneration of facial nucleus after axotomy in the brainstem, and this is explained either by suppressing the neuronal nitric oxide synthase (nNOS) activity and/or by reducing the NO-mediated neurotoxicity in the lesioned motoneurons.