

ラット中大脳動脈閉塞再灌流モデルにおけるフリーラジカル とサイトカインの脳虚血に対する影響

—フリーラジカル消去剤Tirilazadの脳保護と
LPS誘導TNF- α の脳虚血への関与について—

藤田保健衛生大学大学院
医学研究科・外科学I専攻（指導教授：神野哲夫）

二 宮 敬

1. 緒 言

現代の脳卒中の死亡率は、悪性新生物、心臓疾患に次、第3位で、以前の第1位であった昭和40年代の時代の比し、その死亡率は減少してきた。しかしながら、その罹患率は、むしろ、増加傾向にあり、これから、高齢化社会が進むにつれ、その患者の増加も予想される。特に脳梗塞は、数の上で、脳出血、くも膜下出血を上回っており、脳卒中の70%近くを占めている。また、脳出血、クモ膜下出血においても、それぞれの病態に引き続く細胞虚血が、その予後を左右する。そのため、脳虚血の予防、治療、病態の解明は、脳卒中全体に対する対策においても非常に重要なものと思われる。そしてまた、脳虚血の治療ひいては予防のために臨床的技術の進歩をすすめるのと同時に、分子生物学的レベルでの脳虚血のメカニズムを解明し、治療戦略の確立をすることは、非常に重要な課題である。

そこで、今回、ラットの脳梗塞モデルの作成し、分子生物学的的手法を取り入れながら、A. フリーラジカルによる脳虚血障害—フリーラジカル消去剤tirilazadの脳保護作用—、B. サイトカインによる脳虚血障害—LPSとTNF- α の脳虚血への関連—からの視点に立つて研究に取り組んだ。

本実験では脳梗塞の動物実験モデルとして、ナイロン糸を頸動脈より挿入することで中大脳動脈を閉塞し、また糸を抜くことで再灌流を可能とする中大脳動脈閉塞再灌流ラットモ

デルを使用した。一般に脳虚血（梗塞）モデルは、脳全体に均一に虚血負荷をかける「全脳虚血」と主幹動脈閉塞で虚血負荷をかけて、より臨床的梗塞の病態に近い「局所脳虚血モデル」との2つに分けられる。今回のモデルは、局所脳虚血モデルに分類される。また、この局所脳虚血モデルにおける中大脳動脈の閉塞方法として、経頭蓋に中大脳動脈を露出、焼灼する手法が原型で、その後、侵襲を軽減するため、クリップ等による機械的閉塞、光学的閉塞が開発された。これらの方法は確実に動脈の閉塞・解除ができる点ですぐれるが、脳、血管損傷、髄液の漏出などの直接損傷の可能性が高いという問題点がある²。一方、閉塞部の不確実性、閉塞の不充分性、血管内壁の損傷などの可能性はあるものの、その直接的な損傷を避けるため、頭蓋骨を開けることなく、動脈血管内に塞栓物を入れ、動脈閉塞を行うモデルが作られた。今回は、ラジカル、サイトカインなどの分子的原因の脳虚血における関与を調べることを主眼とするため、開頭による二次的作用を排除でき、再灌流が可能であるこの頭蓋骨を開けずに動脈閉塞を行うモデルで実験を行った。

2. 実 験

A. フリーラジカルによる脳虚血—フリーラジカル消去剤tirilazadの脳保護作用—

1) 本実験の背景

脳組織が虚血により障害を受けた場合、主

な虚血障害を拡大させる分子レベルでの要因として、カルシウムイオンの細胞内過流入、細胞内アシドーシス、そして、フリーラジカルの産生などが関与し、特にフリーラジカル、活性酸素は、虚血時や再灌流などの際、脳障害の重要な要因である過酸化脂質の産生に大きな役割を果たしている。^{3,4}

このようなことから、21-aminosteroids (lazaroids) は、過酸化脂質の産生阻害剤として、その役割を期待された。この薬剤は、グルココルチコイド受容体を介さずに、グルココルチコイド、 α -トコフェラル (ビタミンE) 等の抗酸化物質に類似した作用をもち、フリーラジカル消去剤として細胞膜保護作用を有することが知られている。⁶

Lazaroid類の中で、特に良く知られているのが、tirilazad mesylateであり、今までに、外傷、くも膜下出血、脊髄損傷などの中枢神経系障害に対してその効果が研究されている。しかしながら、これらの研究において、局所脳虚血または全脳虚血への有効性は一定していない。その上、フリーラジカルは脳損傷直後より産生され、それ自体の影響は非常に短く、^{10,11} 中枢神経損傷の進行過程のなかで、効果的な治療を得るには、ある特定のタイミングに処置がなされなければならない。もし、この治療のタイミング (therapeutic window) を外れれば、フリーラジカル消去剤としての tirilazad の神経保護的な治療効果を引き出すことは困難であることが予想される。

そこで、今回の実験で、ラット中大脳動脈閉塞再灌流モデルを使用し、des-methyl-tirilazad (U-74389G) の神経保護における効果を調べた。U-74389Gはtirilazadのステロイド骨格の16位にメチル基を加えたもので、薬物動態学的または薬力学的にはtirilazadとほぼ同等の特性があるとされている。¹² 本実験では、U-74389G投与による脳梗塞領域の増減を計測し、本剤の脳保護作用を検討した。同時に、

中大脳動脈閉塞期と再灌流期での局所脳血流変化の測定を試みた。さらに、脳損傷の程度の指標とされているneuron-specific enolase (NSE) の血清値変化からも、U-74389Gによる細胞膜保護作用を検討した。

2) 実験方法

モデルとして、Charles River Breeders社から購入した体重250~300gのSprague-Dawley種のおスラットを使用した。

これらの動物は、実験まで、自由な餌食と水分摂取状態に置かれ、昼行性の照明下で管理された。

a) 局所脳虚血の作成

中大脳動脈領域の局所脳梗塞を作成するため、ナイロン糸を外頸動脈血管内から内頸動脈を経由し中大脳動脈分岐部まで挿入した。¹⁴

まず、麻酔は、メタファン (metofane) 吸入にて導入し、その後ペンタバルビタール (pentobarbital) を、50mg/kgを腹腔内投与し麻酔を維持した。また、気道分泌物による気道閉塞を予防するため、硫酸アトロピン 0.18mg/kgを、麻酔導入後、腹腔内投与した。

呼吸は自発呼吸にて維持させた。そして体温維持のため、温度自動調節のパットを使用し、直腸温を37°Cに維持した。また、採血と血圧測定のため、右鼠径動脈にポリエチレンカテーテル (PE-50) を挿入し、ルート確保を行った。

Pco₂, Po₂, pH, 測定には、ABL 30 Acid-Base Analyzer (Radiometer社) を使用し、血糖値はテストペーパー (TRACE) を使用し、血糖測定モニター TRACER II (Boehringer Mannheim社) にて測定した。ヘマトクリット値は、MICRO-HEMATOCRIT CAPILLARY TUBES (VWR社) を使用して、血液を採取し、遠心後、計測された。

手術手技は次のごとく行った。手術用顕微

鏡下にて、まずラットの腹側頸部正中切開にて、右総頸動脈、外頸動脈、内頸動脈を露出した。総頸動脈を分岐部より中枢側約8mmの部位で6-0絹糸により、後ではずせるように結紮し、外頸動脈を分岐部より抹消側5mmのところまで6-0絹糸で完全に結紮した。次に、外頸動脈起始部に軽く糸をかけて、縛ったり、緩めたりできる状態にしたのち、内頸動脈の分岐部近くにクリップをかけ、血流を遮断した。引き続き、外頸動脈の完全結紮部と外頸動脈分岐部の間の動脈壁に小切開を加えてナイロン糸の挿入部を作った。閉塞に使用するナイロン糸は、加熱にて先端を丸くした3-0モノフィラメントナイロン糸で、挿入口より、これを外頸動脈内腔へ挿入し、外頸動脈起始部をあらかじめかけてあった糸(6-0絹糸)で縛り、出血を防ぐ。その後、このナイロン糸を丁寧に外頸から内頸動脈内腔へ方向を変え、ゆっくりと、頭蓋外内頸動脈から頭蓋内内頸動脈へ挿入し、僅かに抵抗を感じ、糸が挿入出来なくなる長さ(分岐部より、糸の先端が18-21mm)まで挿入した。この位置にてWillsの動脈輪の右中大脳動脈起始部で中大脳動脈を閉塞したことになる。

虚血部の再灌流は、1時間(血清NSE測定モデルでは3時間)閉塞の後に行った。閉塞時と同様に麻酔後、ナイロン糸挿入部を露出し、外頸動脈周囲にかけてあった絹糸を緩め、ナイロン糸を抜去し、直ちに外頸動脈を完全に結紮、総頸動脈の結紮をはずして、総頸動脈から内頸動脈への血流を再灌流させた。

b) 局所脳血流測定

皮質局所脳血流は中大脳動脈閉塞前10分、閉塞中の1時間、再灌流後1時間に、レーザードップラー血流計にて、コントロール7匹、治療群4匹に対して測定した。

測定部位にドリルで皮質に損傷を与えないように頭蓋骨に小孔をあけ、直径0.8mmのレーザードップラーのプロベを円蓋部硬膜の0.1

mmの高さで固定し、組織灌流測定器(Transonic, Ithaca, NY)に連結した。

測定ポイントは、ポイントAとして中大脳動脈閉塞側の右大脳半球のプレグマの後方1mm、正中より5.4mmの位置、ポイントBとして、プレグマの後方1mm、正中より2.1mmの位置、ポイントCとして、プレグマの後方1mm、正中より3.4mmの位置で測定した。そして、コントロールとして、非虚血側の左大脳半球に、ポイントDとして、プレグマの後方1mm、正中より5.4mmの位置(ポイントAと対称の位置)で測定した。それぞれのポイントでの閉塞中・再還流後の脳血流値を閉塞前の基礎平均値の百分率で表示した。

c) 神経学的運動機能評価

神経学的運動機能評価を再灌流後24時間後にコントロール5匹、治療群5匹に対して行った。神経運動機能を6段階に評価しスコア化した。スコア1:正常、スコア2:完全に左前脚を伸ばせない、スコア3:左前脚を回しながら歩行、スコア4:左側に転倒、スコア5:脳虚血に関連した死亡とした。

d) 脳虚血損傷範囲の評価

神経病理学的分析を11匹のコントロールと9匹の治療群に行い虚血範囲を評価した。

断頭後、脳を取り出し、20分間冷凍し、2mm幅前額断にてスライスした。梗塞範囲を同定するために、37℃に遮光保温した2% triphenyltetrazolium chloride (TTC) 液に、スライスした試料を20分間浸した。これにより、梗塞部位は、赤紫に染色せず白色となり、虚血部位を同定できる。その後、試料を10%ホルマリン溶液にて固定した。

梗塞範囲の数値化のため、イメージングシステム(Jandel Scientific, San Rafael, CA)のデジタルビデオスクリーンの上に前額断連続切片を画像に取り込み、染色されていない梗塞巣の面積を算出した。梗塞領域の体積はそれぞれの梗塞面積とスライス幅をかけ合わ

せることで算出し、梗塞側大脳半球と対側大脳半球の両方の体積を測定した。梗塞の範囲は絶対値とパーセント値で表示した。また、梗塞巣体積算出はSwansonらによる方法に基づき、梗塞側脳半球の皮質から対側半球の皮質の体積を引き算し脳浮腫を算出し、脳浮腫による梗塞範囲の補正を行った^{15,16}。梗塞巣の測定は大脳外套 (pallium) と線条体部 (striatum) を分けて測定した。

また、コントロール群と治療群それぞれの全サンプルについて、視交叉での前額断切片で梗塞範囲を重ね合わせ、梗塞巣のトポグラフィ (topography) を描いた。

e) 血清NSE値測定

血清NSE値は偽手術群 (手術は行うがナイロン糸が挿入されなかったもの) 4例, MCA閉塞再還流に担体のみ投与群4例, そして, MCA閉塞再還流後U-74389G投与群6例に対して, 手術後24, 48, 72時間後に測定を行った。

スタンダードとしてヒトNSEを用いたNSE-selective radioimmunoassay (Pharmacia Inc., Uppsala, Sweden) を使用した。Iodine-125 NSE抗体 (抗ウサギ血清) を23°Cで, 3時間, 基準濃度のNSE, または, 血清 (50 μ l) と共に培養した。Sephacrose anti-rabbit immunoglobulin G antibodyを使用し, ラベルされたNSEをラベルされていないNSEから分離した。Iodine-125をカウントし, standard curveより, NSE濃度を決定した。分析感度は, 150pg per tubeで, EC₅₀は1,200pg per tubeであった。NSE血清値は, ng/mlで統一した。

f) U-74389G (Pharmacia & Upjohn Co., Kalamazoo, MI) の投与

U-74389G治療群で, 中大脳動脈閉塞開始10分後と, 3時間後の2回に, 3 mg/kgのU-74389Gを経静脈的に30秒かけて注射した。

また, NSE測定群では, 上記の静脈注射に

加え, 中大脳動脈閉塞後16時間後と24時間後に, 腹腔内に, U-74389G 10mg/kgがそれぞれ注射された。

g) 統計学的分析

生理学的検査, 梗塞範囲と浮腫範囲の体積, 局所脳虚血評価, そして, NSE濃度をt検定にて比較した。パラメータデータでない神経運動評価スコアはWilcoxon rank sum検定にて比較した。p (probability) < 0.05を統計学的有意とした。

3) 結果

a) 生理学的評価

表1における閉塞前時のデータは中大脳動脈閉塞 (MCAO) の10分前に計測し, 閉塞中時のデータはMCAO後, 10分, 30分, 60分後に測定, 再灌流後のデータは灌流後, 10分, 60分後に測定したものある。数値は平均値 \pm 標準偏差で表示している。コントロール群とU-74389G治療群との間において, 閉塞前, 閉塞中, 再還流後の平均動脈圧 (MABP), PaO₂, PaCO₂, pH, ヘマトクリット値, 体温, 血糖値に統計学的有意差は認めなかった。

b) 局所脳血流 (rCBF) 測定

表2と図1において, 中大脳動脈閉塞中と再灌流後のrCBF変化を示した。

表2の数値は平均値 \pm 標準偏差で表示している。閉塞中 (MCA occlusion) データは, 図1における各ポイントの閉塞後10分毎の計6回, 再灌流 (reperfusion) のデータは再灌流後10分毎の計3回と60分後1回の計測値 (百分率表示) を平均したものである。図1でのグラフはそれぞれの測定時間における平均を平均値 \pm standard errorで表示している。A線は虚血の中心域, B, C線は虚血周囲域, D線は正常域での局所血流変化を示している。

動脈閉塞前の基準値においては, コントロール群と治療群間に統計学的有意差を認めなかった。

表1 生理学的評価

Variable	Preocclusion		MCA Occlusion		Reperfusion	
	Control	U-74389G	Control	U-74389G	Control	U-74389G
MABP, mm Hg	109 ± 5	103 ± 6	104 ± 5	101 ± 3	104 ± 10	98 ± 6
PaO ₂ , mm Hg	77.8 ± 8.0	81.6 ± 5.8	80.2 ± 11.3	88.3 ± 8.2	87.8 ± 11.4	82.4 ± 1.5
PaCO ₂ , mm Hg	39.0 ± 2.2	34.8 ± 2.9	38.0 ± 4.3	33.5 ± 0.5	36.1 ± 6.3	34.2 ± 0.2
pH	7.36 ± 0.01	7.40 ± 0.03	7.40 ± 0.05	7.41 ± 0.02	7.41 ± 0.05	7.44 ± 0.00
Hematocrit, %	39.1 ± 3.3	37.3 ± 1.7	38.6 ± 2.4	40.0 ± 2.0	37.4 ± 5.6	41.0 ± 2.9
T, °C	37.0 ± 0.2	37.2 ± 0.3	37.0 ± 0.1	37.5 ± 0.2	36.9 ± 0.1	37.0 ± 0.1
Glucose, mg/dL	136 ± 17	123 ± 5	127 ± 11	121 ± 3	136 ± 10	121 ± 12

表2 局所脳血流 (rCBF) の測定結果

Point	MCA Occlusion		Reperfusion	
	Control	U-74389G	Control	U-74389G
A (Ischemic core)	22.4 ± 7.6	25.5 ± 10.9	69.7 ± 16.7	84.1 ± 19.3*
B (Periphery of ischemic core)	53.7 ± 13.9	58.9 ± 21.3	79.3 ± 22.4	101.1 ± 4.2*
C (Periphery of ischemic core)	47.2 ± 15.4	43.6 ± 12.5	78.2 ± 23.3	98.8 ± 20.0*
D (Contralateral hemisphere)	96.5 ± 9.8	101.0 ± 4.9	101.3 ± 8.7	102.3 ± 8.5

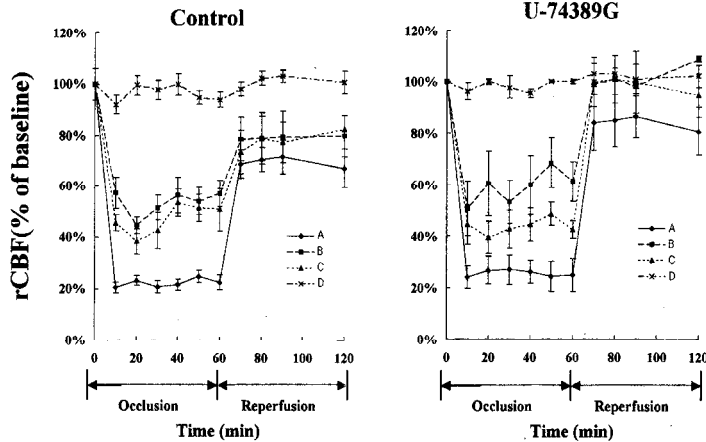


図1 局所脳血流の中大脳動脈閉塞/再灌流による変化

MCAO中におけるrCBFの変化は閉塞後急速に減少し、虚血中心であるポイントAでは、コントロール及び治療群について、それぞれ基線の22.4%、25.5%、虚血周囲に当たるポイントBでは基線の53.7%、58.9%、ポイントCにおける値は47.2%、43.6%であった。虚血対側の対側の大脳半球であるポイントDでのrCBFは有意な低下を認めなかった。これらの結果より、動脈閉塞中における局所脳血流の二群間で統計学的有意差を認めなかった。

これに対し、再灌流後の脳血流の回復において、両群間に有意差を認めた。ポイントAにおいて治療群が基線の84.1%まで改善を示

したのに対しコントロール群では69.7%までの改善に留まっていた ($p < 0.05$)。同様に、ポイントBでは治療群が101.1%であるのに対してコントロール群が79.3%、ポイントCでは治療群が98.8%に対してコントロール群が78.2%に留まった。いずれにおいても治療群で有意な改善を認めている。

c) 神経学的運動機能評価

中大脳動脈閉塞後24時間の再灌流の時点で、コントロール群の60%の動物が神経学的運動異常を認め、これら神経運動機能の平均スコアは 0.6 ± 0.49 (表3)であった。これに対して治療群では神経学的欠損を認めたものはな

かった（平均スコアは0）。ただし、統計学的に有意差を両者間に認めていない（Wilcoxon rank sum test $p=0.12$ ）。

d) 神経病理学的評価

表4はコントロール群とU-74389G治療群との神経病理学的結果を示している。数値は平均値±標準偏差で表示している。

コントロール群の浮腫体積で補正した梗塞領域の体積（total corrected for edema）は53.5mm³であり、一方、U-74389G治療群の梗塞体積は14.1mm³と有意に減少していた（ $p<0.005$ ）。しかしながら、基底核部位における梗塞領域の体積が27%の減少を示しているものの、統計学的有意差を認めていない。

それに対し、脳外套領域における梗塞領域の体積の減少は著しく、コントロール群の梗塞体積平均が39.4mm³であったのに対して治療群では1.4mm³に過ぎなかった。

図2では、視交差レベルでの前額断面における脳梗塞範囲を重ね合わせて作成した図である。梗塞範囲を塗りつぶし、その濃淡で表示した。100%のラットに梗塞がみられた範囲、少なくとも50%のラットに梗塞がみられた範囲、50%未満のラットにみられていた範囲の三段階に分け描出した。

コントロール、治療群とも、100%のラッ

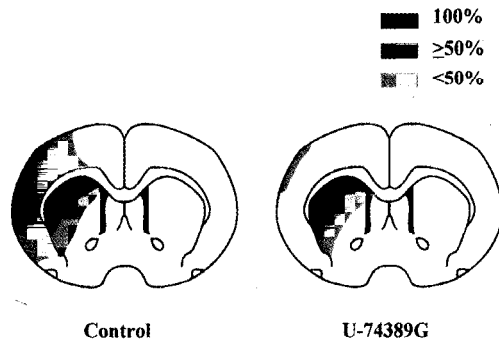


図2 トポグラフィ（topography）での梗塞領域の比較

トの線条体に梗塞があることが認められる。両群の $\geq 50\%$ のラットに、主に基底核の内側に梗塞を認めている。また、コントロール群において、 $\geq 50\%$ のラットに皮質最外側の梗塞を認めるのに対し、U-74389G治療群では、 $< 50\%$ のラットに認めるのみである。さらに、コントロール群の $< 50\%$ のラットでは、皮質の背側外側、腹側外側に梗塞が認められているのに対し、U-74389G治療群では同部に梗塞巣を認めていない。

e) NSE血清値評価

NSE血清値レベルの閉塞後24時間後（Day 1）、48時間後（Day 2）、72時間後（Day 3）の変化を図3にて示している。白塗りバーは偽手術（sham）群、黒色バーは担体

表3 神経学的運動機能評価スコアの結果

Group	Score					Mean	±SD
	0	1	2	3	4		
Control	2	3	0	0	0	0.60	0.49
U-74389G	5	0	0	0	0	0.00	0.00

表4 梗塞体積・面積・浮腫測定結果

Parameter	Control	U-74389G	P
Infarct volume			
Striatum, mm ³	37.4±10.0	27.4±7.7	0.069
Pallium, mm ³	30.3±21.0	1.4±4.0	0.009*
Total, mm ³	67.7±20.0	28.8±9.0	0.001*
Edema volume	14.2±6.9	14.1±7.8	0.656
Infarct volume			
Total corrected for edema, mm ³	53.5±20.8	14.1±7.8	0.001*
Infarct area			
% coronal section at the optic chiasm	23.6±4.3	9.7±2.3	0.000*

(vehicle)のみ投与群, 斜線バーはU-74389G治療群を示しており, 図表内の表示はa: vehicle群対sham群で有意 ($p < 0.05$), b: U-74389G群対vehicle群で有意 ($p < 0.05$), ns: U-74389G群対vehicle群で有意でないことをそれぞれ示す。

閉塞後3時間後再灌流モデルにて, 偽手術した群と中大脳動脈閉塞した上に担体のみを投与した群を比較すると, 担体のみを投与群は, 偽手術群に対して再灌流後24時間でNSEレベルが3.2倍, 48時間後において2.2倍, 72時間後で2.4倍の有意な増加を示している ($p < 0.05$)。

次に, U-74389G治療群では, 逆に担体投与群と比べ, 再灌流後24時間においてNSEレベルが36%減少, 48時間後において17%減, 72時間後において43%の減少を認めている。ただし, 統計学的有意差は, 72時間後のデータのみに認めた。

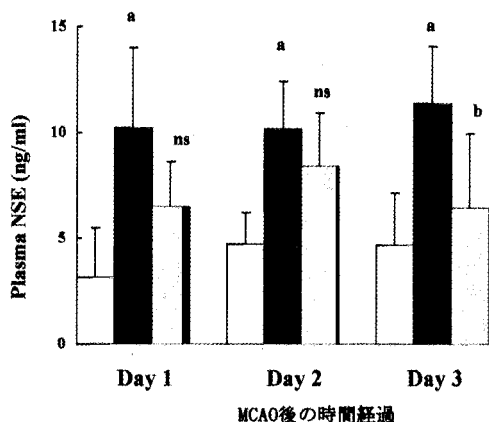


図3 血清NSE値変化

3) 考察

今回の実験では, 中大脳動脈閉塞再灌流ラットモデルで, des-methyl-tirilazad (U-74389G)の脳虚血に対する治療効果を検討した。脳梗塞範囲の縮小, 局所脳血流の改善, 運動麻痺の改善, 血清NSE値の低下の結果よ

り, tirilazadの脳保護的有効性が示された。

U-74389G投与により脳梗塞範囲を抑制したことは, すでに報告されているtirilazad mesylate効果の結果と同様であった。

さらに, 今回の実験では, 皮質に対する虚血からの保護はほぼ完全であったのに対して, 線条体部位での効果は有意でなく, 脳の部位における虚血への脳保護の効果に差異が見られた。しかしながら, すでにいくつかの報告で認められているtirilazadの抗浮腫効果については, 今回の実験では, 明らかではなかった。また, U-74389G治療群による梗塞領域の減少は, 虚血中心領域と虚血周辺域の両者における再灌流後の血流回復に比例していた。

Tirilazadによる脳血流の梗塞領域増減への関与について, これまでの報告ではtirilazadのrCBFに対する効果は一定していない。Tirilazadが脳血流改善をさせているとの報告がある一方, その効果はないと報告しているものあり, 文献間の結果にずれがある。Tirilazadの有効性を研究するにあたり, その実験モデル, 実験方法, プロトコルの違いを検討する必要がある。特に実験モデルの特徴的傾向として, 「全脳虚血モデルまたは前脳虚血モデル」を使用している報告の多くが, 脳保護効果を認めていないとしている一方, 今回の実験にも使用した「局所虚血モデル」を使用している報告に有効性を認める傾向にある。このことは, Siesjöが指摘しているように, 局所虚血モデルは, 一般的に, 全脳または前脳虚血にみられる血流の減少ほど強くない上に, 組織学的特徴として, 「penumbra」という概念が存在していることに関係すると考えられる。Penumbraでは, 完全に虚血の陥っている部位 (the focus) を取り囲むように存在し, 電気生理学的に活動が低下しているが本質的に細胞が生存していると考えられ, ここに治療の可能性があると考えられる。そして, この局所虚血モデルでのpenumbraは,

側副血行路の存在に強く依存しており、中大脳動脈閉塞モデルでも、前大脳動脈や後大脳動脈から虚血中心部周囲へ血流の供給が考えられる。それに対し、全脳虚血モデルでは、penumbra概念を確立できにくく、治療余地が少ないと思われる。それゆえに、今回、U-74389Gによる虚血周辺域での脳血流改善が、主にpenumbra領域に作用し、その結果、「局所虚血」である本モデルに効果があったと考えられた。

Lazaroid系の薬剤による脳保護的効果は、損傷した組織への再灌流や酸素還元によってさらに産生されるlipid peroxidationカスケードを抑制することによるとされている。Hall³²は、中程度の脳虚血損傷の1分後という早期にhydroxyl radicalが形成され、その後約15分間にわたり高いレベルで認められると報告している。同様に、虚血直後に、虚血組織のfree arachidonic acidの濃度と代謝が著しく亢進したと報告されている³³。このことから、今回の実験では、中大脳動脈閉塞後10分でのU-74389Gの投与が神経保護効果を示した可能性が考えられた。また同様の中大脳動脈閉塞実験モデルにて、動脈閉塞2時間で再灌流したものでは、永久閉塞例に比べ梗塞範囲が少ないが、3時間閉塞例では、永久閉塞例と差がなかったとの報告から一定の時間を経過したものでは、治療効果を期待できないと考えられ、今回の実験における3時間後投与の効果については、今後検討を要する。そして、21-aminosteroidから有益な効果の効果を引き出すためには時間的要因は重要であり、薬剤投与のタイミングを検討する必要があると思われる。

さらに、今回の実験では、治療群のラットでほとんど皮質部に梗塞が認めず、治療効果があったのに対して、線条体部位においては、有意な梗塞巣の縮小はみられなかった。このことは、tirilazadは優先的に皮質下組織より

皮質部に効果的であると、これまでに報告されている^{35,36}。また、Memesawa³⁷は、今回と同様のモデルで、中大脳動脈閉塞後30分後には、皮質下に梗塞を認め始めるとしているのに対して、皮質部の梗塞が生じるには1時間は必要とすることから、皮質と皮質下間に虚血に対する閾値の違いがあることが示唆される。よって、さらに皮質下の保護を期待するためには、脳損傷直後より大量のラジカルが存在することからも、より早期の投与を必要とするのかもしれない。

次に、投薬量に関し、今回使用した薬量は、3 mg/kgで、永久局所閉塞モデルで投与量別効果の実験に基づいている。しかしながら、また前脳虚血モデルでの実験において、7 mg/kgでは梗塞体積を縮小したものの、3 mg/kgでは効果がなかったとの報告がある。したがって、局所閉塞再灌流モデルで、投与のタイミングと共に、投与薬量別で、どのような関係があるか更なる研究が必要と思われる。

また、臨床への関わりにおいて、recombinant tissue plasminogen activator (t-PA)による溶解療法が急性塞栓症に対する治療法として出現してきている^{39,40}。その際、t-PAの投与により、塞栓融解により血液や酸素が障害された脳組織に再灌流する際、フリーラジカル発生により再灌流障害可能性を広げる可能性がある。そのためtirilazadが、虚血カスケードにおける補足的段階で作用し、lipid peroxidationを抑制することが、治療上生じる再灌流障害を軽減させる可能性があり、臨床での使用も検討を要する。

近年、急性脳梗塞患者のrandomized clinical trialにて、tirilazad mesylateが機能予後に関して、有意な治療効果は無いと報告された⁴¹。しかし、これらは、一日6 mg/kgの投与量で連続3日間を投与され、平均発症後4.3時間で開始されていた。しかしながら、今回の実験から考えて、21-aminosteroidの神経保護

的効果を最大限引き出すには、より早期の投与を必要とするのかもしれない。また、化学的構造は違うものの、フリーラジカル消去剤としてedaravoneが脳梗塞急性期に伴う神経症候、日常生活動作障害、機能障害の改善効果を認められ、すでに本邦で臨床応用されている。この薬剤におけるラット中大脳動脈閉塞再灌流モデルにおいて、30分間の静脈内持続投与では、脳浮腫抑制効果があったものの、60分間の持続では、その効果はみられない。このように、臨床応用においても、薬剤投与のタイミング、血中薬剤濃度が重要な因子であることを裏付けている。

また、tirilazadは脳血管関門に対する透過性は限られているため、その効果は、主に血管内に限られる⁴³。近年、このようなことから容易に脳血管関門を透過しうるpyrrolopyrimidine (U-101033E) がantioxidant 製剤として開発されより高い効果が期待されている。

最後に、U-74389G投与が血清NSEレベルを減少させていることより、U-74389Gは細胞膜を保護安定化し、酵素の神経組織から血清への流出を減少させたことが示唆された。そして、今回の実験からも、局所脳虚血損傷縮小の治療効果の評価として血清NSEレベル測定は有用と考える。

B. サイトカインによる脳虚血障害-LPSとTNF- α の関連について-

1) 本実験の背景

サイトカインによる脳虚血障害の関与において、特にTNF- α は、interleukin-1 β とならんで、脳虚血に対する影響が検討されてきた。

Lavineらの研究は、ラット中大脳動脈閉塞(MCAO)再灌流モデルにおいて、閉塞後30分前後から急激な血中TNF- α の上昇が認められることを示した。そして、中大脳動脈の閉塞を行わない偽手術(sham)ではその上昇はみられず、TNF- α が局所脳虚血傷害のメディ

エーターとして作用していることを示した。また、中大脳動脈閉塞前1時間に抗TNF- α 抗体を事前投与しておくことで、抗体を投与されていない群に比し有意に梗塞範囲の減少することが確認され、TNF- α が脳虚血を増悪させる要因として働いていることが推測されている。

また、TNF- α は、炎症性のサイトカインとして理解され、エンドトキシン(リポサッカライド;LPS)を投与すると、血中に発現するペプチドとしてみつきり、特異的な腫瘍細胞にたいして障害的に働くことから、その名が知られるようになった⁴⁶。

そこで、本研究では、LPSを投与することにより、どのように血清TNF- α 値の変化が生じ、虚血に対してどのような影響を及ぼすかをLPS-TNF- α というネットワークを想定し検討した。

また、Feuersteinらの結果によれば、LPSの投与量により、ある一定の血清TNF- α 値に変化がみられことが知られている。10 μ g/kg以上のLPS投与では、TNF- α の血中濃度上昇は上限となり、3.6mg/kgの投与量は、ラットにとって非常に大量で、致死的に近い投与量となる。また0.1 μ g/kg以下のLPSの投与では、TNF- α は誘導されず、LPSが投与されていない状態と差異を認めていない。この結果に基づき今回、LPSの投与量を少量投与群として0.1 μ g/kg、中等量投与群として10 μ g/kg、大量投与群として3.6mg/kgを設定し、検討をすすめた。

また、LPSの誘導にて生じたTNF- α をブロックするため、抗TNF- α 抗体(anti-TNF- α Ab)の前処置を行い、LPS誘導のTNF- α の役割についても検討した。

2) 実験方法

ラットは、tirilazadの研究で使用したモデル同様に、Charles River Breeders社から購

入された体重250から300 gのSprague-Dawley種のオスを使用した。

餌食と水分摂取について、ラットは自由な状態に置かれ、昼行性の照明下で管理された。

a) 局所脳虚血の作製

Tirilazadの実験と同様の方法にて、ナイロン糸を、外頸動脈より、内頸動脈を経由し中大脳動脈分岐部まで挿入し、中大脳動脈を閉塞し、1時間後に再灌流した。

b) 局所脳血流測定

Tirilazadの実験と同様に、皮質局所脳血流は閉塞前、閉塞中、再灌流後1時間に、コントロール群7例、少量投与量群4例、大量投与群9例に対してレーザードップラー血流計で測定した。

測定部位はtirilazadの脳血流測定の実験と同様、ポイントA（虚血中心部位；ipsilateral）とポイントD（対照部位；contralateral）の二箇所で行った。閉塞前の基礎値を測定し、閉塞中、閉塞後の血流値を基礎値に対する百分率で表現した。

c) LPS投与

LPSとして、Eshcherichia coli lipopolysaccharide 0111:B4をSigma社より購入した。そして、これを滅菌生理食塩水に溶解し、それぞれ、LPS少量投与群として0.1 µg/kg、中等量投与群として10 µg/kg、大量投与群として3.6mg/kgとし、右鼠径静脈に留置したPE-50カテーテルから、ゆっくりと（約30秒）注射した。各群の投与は、右中大脳動脈閉塞20分前に注入された。

d) TNF-α血中濃度測定

血中TNF-α濃度は、商業的に購入可能なラット特異的酵素免疫学的測定キット（Genzyme Cambridge, MA, U.S.A）を用いて大量投与群4例、中等量投与群5例、少量投与量群4例に対して測定した。血液（300 µL）を20分前に左鼠径静脈に置かれたポリエチレンカテーテル（PE-50）から採血した。採血は、エ

ンドトキシン投与前、閉塞1時間後、2時間後、24時間後の4回行った。採血された全血は、4℃で10分間、回転数10,000rpmで血清と遠心分離し、これらの血清をTNF-α濃度測定まで-20℃下で保存した。

e) 抗TNF-α抗体投与

TNF-αの中和抗体として、polyclonal rabbit anti-mouse TNF-α neutralizing Ab（Genzyme, Cambridge, MA, U.S.A.）を使用。滅菌生理食塩水に溶かし、0.36mg/kgとして、鼠径静脈に留置したポリエチレンカテーテル（PE-50）より、抗TNF-α抗体前処置群の9匹のラットにLPS3.6mg/kg投与の45分前に注入した。

f) 脳虚血損傷範囲の評価

神経病理学的分析をコントロール群5例、大量投与群9例、中等量投与群4例、少量投与群5例に行った。Tirilazadの実験方法と同じく、断頭後、脳を取り出し、2mm幅で前額断にてスライスした。2% triphenyltetrazolium chloride（TTC）にて、梗塞範囲の同定を行った。また、視交叉での前額断切片での断面で、各群それぞれの全サンプルにおける梗塞範囲を重ね合わせ、梗塞巣のトポグラフィーを作製した。

別に、抗TNF-α抗体によって前処置されたLPS（3.6mg/kg）投与群についても、同様に梗塞領域の測定を行った。

g) 統計学的分析

生理学的検査、梗塞範囲と浮腫範囲の体積、局所脳虚血評価をt-検定にて比較した。p（probability）<0.05を統計学的有意とした。

3) 結果

a) LPSの投与による血清TNF-α値の変化

図4はLPS投与前と、MCAO後1時間、2時間、24時間後の各々の血清TNF-αレベルを大量、中等、少量投与群別に表している。各投与群とも、LPSの投与前においては、血清

TNF- α は認めず、LPS投与後、急速にTNF- α レベルは上昇し、MCAO後1時間に前後ピークを迎えている。この時に、LPS投与量に依存したTNF- α の増大がみられた。しかし、少量投与群では、MCAO後1時間のMCAOのみ(1,637 \pm 32pg/kg)と有意に変わらなかった。そして、2時間の時点で急速に減少しており(大量投与群でピークより53%の減少、中等量投与群で93%減、少量投与群で89%減少)、24時間後の時点では、ほぼLPS投与前のレベルまで戻っている。また、TNF- α の増加はLPSの投与量が多い群ほど高く、大量投与群が、もっと高いピーク(8,366 \pm 386pg/ml; mean \pm standard error)

を示し、次に中等量投与群(6,272 \pm 1,115pg/ml)が続き、少量投与群(1,254 \pm 571pg/ml)では、TNF- α の上昇パターンは同様の傾向を示しながらも、大量投与群のピーク値と比較して、15%のほどの上昇しがなく、あまりTNF- α の体循環への放出は認められていない。

b) 局所脳血流 (rCBF) 測定

図5のグラフはそれぞれの測定時間における平均値を平均値 \pm standard errorで表示している。Ipsilateral線は虚血の中心域、contralateral線は正常域での局所血流変化を示している。MCAO中における閉塞側のrCBFの変化は、コントロール群と少量投与群との間には有意差はなかったが、大量投与群では、コントロール群に比較し、有意に低下していた。次に、再灌流後、コントロール群では、中大脳動脈閉塞前の約70%レベルまで、脳血流の改善がみられているが、少量投与群では、さらに約80%レベルまで回復しており、コントロール群に対して、有意差をもって改善がみられた。一方、大量投与群では、再灌流後の脳血流の改善は、約30%前後に留まり、コントロール群に比し非常に低い改善率を示した。

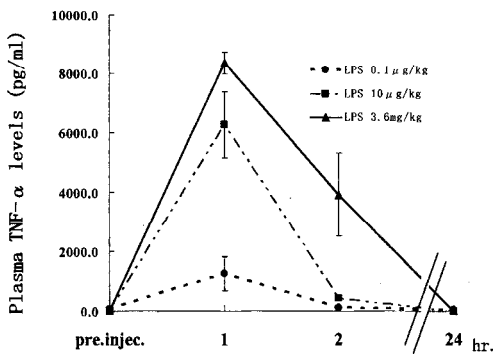


図4 LPS投与による血清TNF- α 値の変化

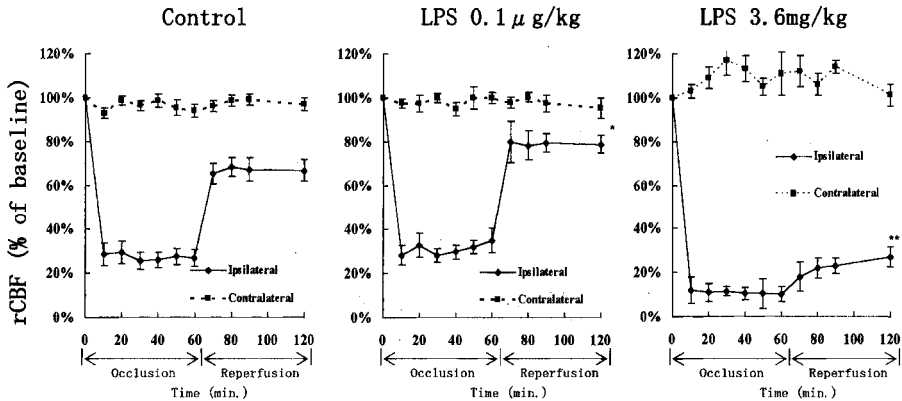


図5 局所脳血流 (rCBF) 測定

c) 神経病理学的評価

図6では、LPS大量投与群、中等量投与群、少量投与群の3群につき相対評価をするため、各投与群の脳梗塞範囲をコントロール群に対する比で表示した。図内の表示はコントロール群の平均体積を1としたときの相対値で各群の体積を表示し、* : control 対 LPS 0.1 μ g/kg, ** : control 対 LPS 10 μ g/kg, *** : control 対 LPS 3.6mg/kgでそれぞれ有意 ($p < 0.05$) であることを示し、ns : コントロール群に対しそれぞれの値が有意でないことを示している。

各投与群の脳梗塞範囲の体積の比較において、コントロール群に比し、LPS大量投与群、

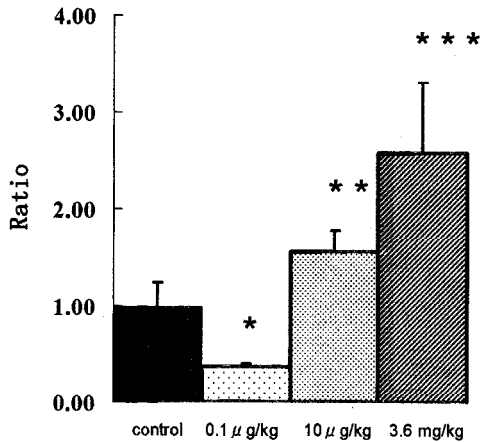


図6 全体の梗塞体積比

中等量投与群とも、それぞれ、2.57倍、1.55倍の有意な梗塞体積の増加を示し、大量投与群、中等量投与群に関しては、LPS投与量に比して、その梗塞範囲体積の増加を示している。一方、少量投与群では、有意差を以って、コントロール群の63%の梗塞体積減少がみられた。

次に、図7において、線条体領域 (striatum) と外套領域 (pallium) とに分けて、脳梗塞領域を検討した。

線条体領域においては、すべてのLPS投与群に梗塞巣を認めている。そして、少量投与群 (0.92倍) と中等量投与群 (0.92倍) は、コントロール群に比し、梗塞巣の大きさに有意な違いは認められなかったが、大量投与群では、線条体での梗塞範囲は1.47倍の増加を認めた。

一方、外套領域においては、中等量投与群と大量投与群では、それぞれ、1.90倍、2.57倍とコントロール群より広範囲の梗塞巣を示し、かつ、LPS投与量依存性に増加をみとめている。これに対し、少量投与群では、外套領域における梗塞巣を認めず、中等量から大量投与群と相反する結果を示した。

また、図8は、視交差レベルで、前額断面における脳梗塞範囲を重ね合わせたもので、大量投与群では、梗塞領域が線条体領域と外套領域の両方を含め、ほぼ大脳半球全体に存

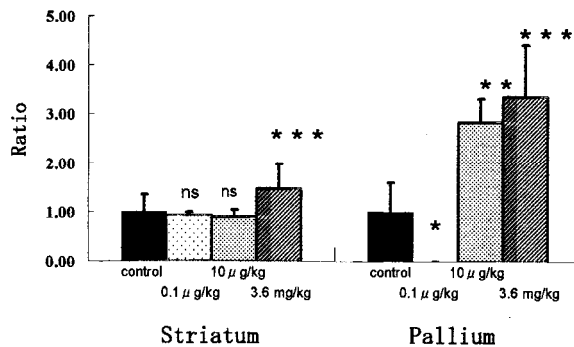


図7 場所別の梗塞体積比

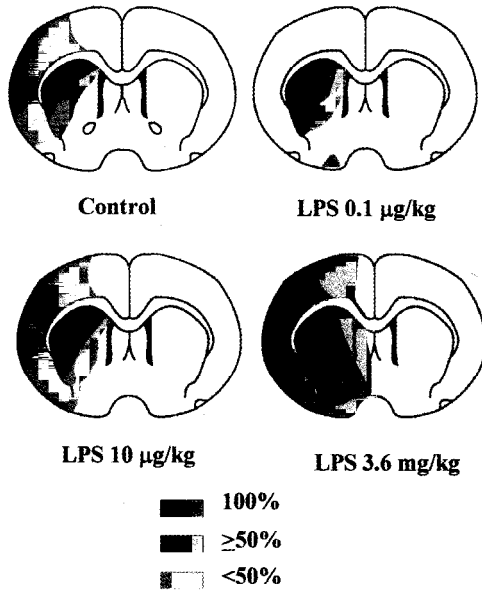


図8 トポグラフィー (topography) での梗塞範囲の比較

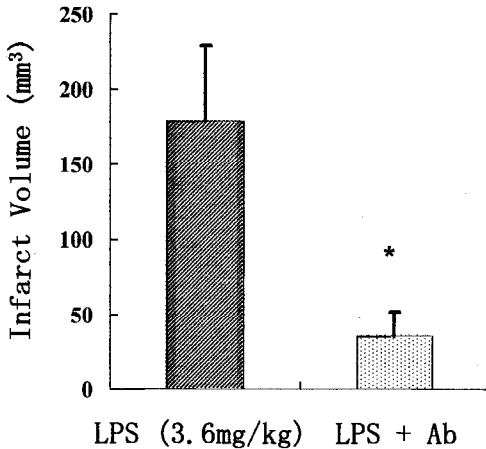


図9 抗TNF- α 抗体前処置による脳梗塞体積の変化

在している。また、中等量投与群においては、コントロールに比し線条体では大きな差異を認めないが、外套部でより大きな梗塞巣を示していた。

それに対し、少量投与群では、線条体領域においては、他の投与群を同様な傾向で梗塞巣と認めているものの、外套部には梗塞を認めなかった。

次に、図9はLPS3.6mg/kgを投与した群とanti-TNF- α Abにて前処置された群との梗塞範囲を比較したものである。anti-TNF- α AbでTNF- α を中和することにより、コントロール比し、71.4%の有意な梗塞巣の軽減がみられている。

3) 考 察

今回の実験において、LPS10 μ g/kg (ここでは、中等量とした) 以上の投与では、脳虚血を悪化させることが示され、LPSは基本的に虚血増悪因子として働くと考えられる。さらに、LPSの投与量に比例して、TNF- α が、体循環に放出されており、脳虚血を悪化される媒介としてTNF- α の存在が重要であることが示唆された。また、抗TNF- α 抗体で、TNF- α をブロックすることにより、脳虚血損傷を減じさせることから、TNF- α が直接的増悪因子と考えられた。

文献的に、TNF- α の脳虚血へのかかわりについて検討してみると、培養下ラット胎児の神経細胞の虚血モデルでTNFsが細胞内Caイオン濃度の増大を抑えたとの報告⁴⁷、TNF- α が抗活性酸素経路を活性化させていることから、TNF- α レセプターの欠損したノックアウトマウスでは、局所脳虚血による神経損傷が増大したとの報告⁴⁸、さらに、マウスにてMCAOの48時間前にTNF- α が脳室内投与された場合、梗塞巣の軽減をみたなどTNF- α が保護因子として働くとする報告がある。一方、マウスの中大脳動脈閉塞再灌流モデルにて抗TNF- α 抗体を投与することにより、梗塞範囲の減少を認めたとの報告⁴⁴や永久中大脳動脈閉塞ラットモデルにて、NMDAレセプターアンタゴニストやステロイド投与により、脳内TNF- α を減少させ、梗塞を減少させた⁵⁰などTNF- α が増悪因子として働くとの報告もある。このように、TNF- α の作用は文献により一定していないものの、虚血前後で投与あるいは誘発される

TNF- α は、虚血性脳障害の増悪因子とみなしているものが一般的であるようだ。そして、今回のモデルでもLPS 3.6mg/kgの投与で、梗塞範囲は増悪し、そして、このモデルにLPS投与45分前に抗TNF- α 抗体 (0.36mg/kg) で前処置しておくことで有意に脳虚血範囲を減少させることから、LPSによって放出されたTNF- α が脳虚血の増悪に関与していることがうかがわれる。そして、中大脳動脈の閉塞を行わない偽手術 (sham operation) 例ではTNF- α の上昇ないことから⁴⁴、虚血自体がTNF- α の誘導に関与しているとも考えられる。

またLPSの投与量に比例してTNF- α の体循環への放出量の増加と局所脳血流の低下を認めており、用量依存性に脳虚血障害を助長していることが示唆される。これは、脳卒中における敗血症の合併は非常に致命的であることを暗示し、そして、何らかの方法で、LPS、TNF- α をブロックすることが可能であれば、脳梗塞の有効な治療となりうる。

一方、少量投与では、コントロール群に比し、脳保護の結果を示した。その理由は不明であり、モデルとして閉塞部の不確実性を否定しきれないが、可能性として少量のLPSが脳血流を増加させたことやLPSにより誘発されたTNF- α のレベルが低かったことが関与しているかもしれない。特にLPSがNOを誘導し、これにより脳動脈の拡張を起こすとの報告⁵¹もあり、脳血流増加が何らかの関与を示唆する。

また、LPSによって、TNF- α 以外にも、IL-1、IL-6、IL-10などの多くのサイトカインを体循環に放出されており、この一部が、脳保護的に作用している可能性も否定できない。文献上、IL-1が一般的に虚血性障害を増悪する因子とみなされて^{54,55}おり、IL-6は、神経障害を軽減するとの報告⁵⁶もある。いずれにしろ、サイトカインネットワークは複雑に絡み合っ

ており、TNF- α の側面のみでの理解では、メカニズムを説明するのは困難と思われる。

さらに、虚血に対する耐性 (tolerance) に関する文献で、ラットMCAOの数日前に、LPSを投与しておく、梗塞範囲の減少がみられ、逆に、anti TNF- α Abの投与にて、その効果は消失するとする報告⁵⁷もあり、生体がLPSやTNF- α にさらされるタイミングによっては、虚血に対する効果はまったく正反対のものになる可能性がある。

3. 総 括

今回の研究では、虚血に対するフリーラジカルの組織損傷に対し、フリーラジカル消去剤であるtirilazadの有効性の評価と、TNF- α の脳虚血への影響につき検討してきた。

中大脳動脈閉塞再灌流ラットモデルに、tirilazadを動脈閉塞後10分後と3時間後に投与し、脳虚血の影響を軽減できる結果を得た。しかしながら、違った条件で同様の効果を得られるかは疑問であり、本剤にフリーラジカル消去剤としての薬理作用があったとしても実際に、その効果作用は、投与方法、投与の時期、投与量によって、大きく変化するものであることを他の文献とともに考察した。もちろん、種差、個体差によってもその効果は大きく変わってくることは充分推測可能である。

また、サイトカインネットワークの一部として、LPS-TNF- α 系の脳虚血に対する影響について検討し、LPS大量・中等量投与では、動脈閉塞後急激に高い濃度のTNF- α が血中に放出され、広範囲の梗塞を示した。しかし、少量投与群では、TNF- α の上昇はわずかで、梗塞巣は減少し、本来虚血の増悪因子であるLPSが投与量の変化で保護的因子にもなりうることも示唆された。

一方、LPS大量投与群にて、抗TNF- α 抗体をMCA閉塞前の投与しておくことにより、梗

塞巢の減少がみられ、LPS誘導によるTNF- α が脳虚血の増悪に関与していることが明らかになった。

脳虚血のメカニズムには、多段階で、多因子のものが関連しており、ある一面のみで、説明できるものではない。本研究においても、TNF- α 由来の障害とscavengerの関連については今後の課題である。そして、今回の研究以外にも、同じモデルにて、高血圧ラット(SHR; spontaneously hypertensive rat)と正常血圧ラットの比較により、SHRラットでは広範囲な梗塞巣を作り、脳毛細血管内皮におけるtissue plasminogen activator活性と、protein C活性が有意に減少していることが認められ、フリーラジカル・サイトカインの関与に加え、高血圧と凝固、線溶系の脳虚血への関与も示唆した。そして、TNF- α が凝固促進作用を有し、脳梗塞の増悪に関与しているとの報告もあり、それぞれ一つ一つの現象は、複雑に絡み合っており、脳虚血のメカニズムを解明するためには総合的に互いを関連づけていく必要がある。

小川は、「新・侵襲とサイトカイン」という本のなかで、「同一のサイトカインが作用しても、極端に言えば、生体の60兆個に及ぼす作用を、サイトカインの作用としてすべて覚えようというのはあまり意味がない。(中略)サイトカインは「何々せよ」という命令を送っているのではない、サイトカインは単にスイッチをonにする、あるいはoffにするだけだ。その後、細胞がどのような行動をとるかは、サイトカインの情報を受け取った細胞のほうがきめている。」⁶¹と述べ、受け手であ

る生体の状況により、同じサイトカインであっても、異なった作用をすることも強調している。そしてまた、「細胞はサイトカインの情報を受けて反応する際には、絶えずほかの細胞に、自己の反応を知らせているのである。これをcross-talkという。このcross-talkが次々にくりかえされて、やがて1つの平衡状態の達する。つまり、高次の制御機構などは存在せず、このcross-talkによる平衡状態のよって、結果的に臓器障害を避け、生体防御に向かっているのではないか、それがあたかも巧みな高次の制御機構のように見えるのではないか」⁶²とも述べ、サイトカインの側面からも、ある条件の一系統のみを検討して、生体全体の反応を解決することが無理であることを教えてくれている。

臨床においては、個々のそれぞれの情報を検討し、それが全体にいかに関わっているかを見極め、最終的に、生体全体として有意な方向へもっていけるかが脳虚血治療戦略のポイントであると思われる。生体内もまさしく情報に入り乱れ「情報戦争」の様を呈しており、その中でいかに有用な情報を選択しコントロールしていくかが重要であると思われる。

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導を賜りました脳神経外科学神野哲夫教授、University of Southern California (USC), School of Medicine, J. Gordon McComb教授; Berislav V. Zlokovic教授に深甚の謝意を捧げます。さらに、本研究に御指導・御協力頂きましたUSCでの共同研究員各位並びに本学教室員各位に厚く御礼申しあげます。

文 献

1) 二宮 敬, 加藤庸子, 佐野公俊, 山口幸子, 川瀬司, 大隈 功, 神野哲夫, 小倉裕子, 竹下 元, 片田和廣 (1996) 脳動脈瘤に対するチタンクリップ使用例のCT, MRIへの影響. CI研究18. 223-239.

2) 田村 晃, 中山比登志, 川合謙介 (1995) 脳虚血の動物実験モデル. 第12回ニューロトランスミッターと疾患研究会, 41-50.
3) Siesjö, B. K. (1992) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I. Pathophysiology. *J. Neurosurg.* 77. 169-184.