

論文内容の要旨

題目: 内因性抗酸化酵素の活性化と脳虚血耐性の誘導

Part I: 短時間虚血の前負荷による 内因性抗酸化酵素の活性化と脳虚血耐性の誘導

Part II: エンドトキシンアナログ、diphosphoryl lipid A前投与による脳虚血耐性の誘導

氏名 豊田 富勝

生体は致死的 (lethal) な環境下におかれればもちろん死に至る。しかしその環境が致死にいたるほどではない (sublethal) 状況であれば細胞は生き延び、そして次なる lethal な環境下において耐性を獲得する。この耐性獲得現象はほとんどすべての細胞、臓器で認められるものである。脳の場合には虚血状態における耐性獲得が広く注目されてきた。神経細胞障害をきたさない程度の短時間脳虚血の操作がその後起こる神経細胞死をきたすような脳虚血に対し耐性を獲得することが明らかにされた。脳の虚血耐性獲得にはストレス蛋白のみならずその他多様な機構が関与していることがこれまでの研究でわかってきている。内因性抗酸化酵素の誘導も脳虚血耐性獲得に関与している可能性が考えられている。今回のこの研究では内因性抗酸化酵素活性化と脳虚血耐性の誘導との関連性について実験した。Part Iでは短時間虚血の前負荷による脳の内因性抗酸化酵素活性の増強と虚血耐性獲得による脳保護効果を検討し、Part IIでは内因性抗酸化酵素増強効果のあるエンドトキシンアナログの前投与により虚血耐性が誘導されるかどうかを検討した

Part I

これまでの脳虚血耐性の誘導の研究は主に前（全）脳虚血モデルを用いて行われており、局所脳虚血モデルでも同様な脳虚血耐性現象がみられるのかあまり明らかではなかった。臨床において問題となる閉塞性脳血管障害の多くは局所脳虚血の病態であり局所脳虚血に対する耐性獲得、そのメカニズムの解明が必要である。この研究では短時間局所脳虚血の負荷強度の変化と脳虚血耐性誘導との関連を実験した。また内因性抗酸化酵素である SOD 活性との関連について実験した。

ラットを用い次のような脳虚血の前負荷を施した。1) シャム手術群、2) 20分間の両側内頸動脈閉塞のみ (BCAO群)、3) 20分間の中大脳動脈閉塞のみ (MCAO群)、4) 20分間の両側内頸動脈閉塞及び中大脳動脈閉塞 (3VO群)。前負荷の24時間後に60分間の両側内頸動脈及び中大脳動脈閉塞による局所脳虚血を施した。さらに48時間後に断頭して脳を取り出し、脳梗塞体積を測定した。これとは別に、上記4つのタイプの前負荷を施した24時間後に断頭して脳を取り出し、SOD 活性を測定した。前負荷のみではいずれのグループも脳梗塞は認められていない。

前負荷がシャム手術の場合と比較し、脳梗塞体積は BCAO 群で 11% の減少、MCAO 群で 41% の減少 ($p < 0.05$)、さらに 3VO 群では 46% の減少 ($p < 0.05$) を認めた。脳の内因性 SOD 活性はシャム手術群と比較し、BCAO 群で 2.5 倍、MCAO 群で 13 倍 ($p < 0.05$)、さらに 3VO 群では 25 倍の増強 ($p < 0.01$) を認めた。

この実験結果は脳梗塞にならない短時間局所脳虚血の前負荷を施すことによりその24時間後に行う最終脳虚血（局所脳虚血）に対して虚血耐性を誘導することを示

した。この前負荷は内因性抗酸化酵素である SOD 活性を増強し、その増強の程度と虚血耐性獲得による脳保護作用が比例することを明らかにした。脳における内因性抗酸化酵素の増強が脳虚血耐性誘導に大きく関与している可能性が考えられる。

Part II

エンドトキシンの少量投与もしくはエンドトキシンアナログの前投与によりエンドトキシンショックに対する耐性だけでなく、高酸素血症、くも膜下出血後の脳血管れん縮、心筋虚血にたいして保護効果があるという報告がある。いずれも内因性抗酸化酵素の誘導や、白血球浸潤の抑制により効果を示したとする実験結果が多い。活性酸素や白血球の浸潤は、脳虚血再灌流による神経細胞障害の因子として考えられている。局所脳虚血における耐性の誘導がエンドトキシンアナログの一種である monophosphoryl lipid A (MPL) 及び diphosphoryl lipid A (DPL) により可能かどうか、またこの薬剤投与の前処置がフリーラジカル障害や白血球浸潤の抑制によることを示す目的でこの実験を行った。エンドトキシンアナログ前投与の効果はラット一過性局所脳虚血モデルを用いて脳梗塞の体積でもって判定し、またエンドトキシンアナログの白血球浸潤抑制作用や抗酸化酵素の誘導作用の有無についてはミエロパーオキシダーゼ (MPO) 活性と内因性 SOD 活性を測定することによりその指標とした。

この実験では、ラットに DPL を静注、その 24 時間後に 3 時間の局所脳虚血を施し 24 時間の再灌流後に脳梗塞体積、MPO 活性、SOD 活性を測定した (虚血実験)。これとは別に DPL 投与のみで虚血を加えない脳での SOD 活性の変化をみた (無虚血実験)。いずれも対照群、MPL 100 µg/kg 投与群、MPL 200 µg/kg 投与群、

DPL 100 µg/kg投与群、そして DPL 200 µg/kg 投与群において調べた。

この実験により以下の点について結果が得られた。1) MPL の虚血24時間前投与ではその後の一過性局所脳虚血に対する保護作用が全く認められなかった。また PMNLs の浸潤の指標となるMPO 活性や内因性抗酸化酵素の一つである SOD 活性に対する影響も認められなかった。2) DPLの虚血24時間前投与によりその後の3時間の局所脳虚血に対する保護作用がみられ、DPL 200 µg/kg 投与群では脳梗塞体積で31%の減少を認めた。2) 一過性局所脳虚血24時間後には梗塞中心部、周辺部で多核白血球 (PMNLs) の浸潤の指標となるMPO活性が上昇するが DPL 200 µg/kg 投与群では梗塞周辺部で特に MPO 活性の低下が認められた。3) DPL の投与により正常脳の内因性 SOD 活性の上昇が認められた。対照群と比べ 100 µg/kg で2.2倍、200 µg/kg で4.3 倍の SOD活性の増強が認められた。4) 一過性局所脳虚血24時間後には梗塞周辺部で内因性 SOD 活性が上昇するが、対照群と比べ DPL 投与群では 100 µg/kg 投与群で1.2倍、200 µg/kg で2.2倍のさらなる SOD 活性の増強が認められた。

これらの結果により、DPL の虚血24時間前投与により、一過性局所脳虚血に対する脳保護作用が認められた。DPL と MPLではほぼ同じ薬理作用、免疫賦活作用があるといわれているがサイトカインの誘導や iNOS の発現程度、内因性抗酸化酵素活性増強作用の程度に違いがみられそのことが脳虚血に対する保護効果の差に影響を及ぼしたと考えられる。一過性局所脳虚血においては白血球の浸潤、フリーラジカルの産生が神経細胞障害の要因の一つとして考えられているが、DPLが白血球浸潤を抑制し、脳の内因性 SOD 活性を増強することで虚血耐性を誘導し脳保護作用を示したと考えられる。