

## 審査の結果の要旨

氏名 古屋一英

本研究は細菌性リポ多糖類の低量投与による前処置 (preconditioning) によって局所脳虚血での耐性誘導を行い、そのシグナル伝達の上流に位置すると思われるセラミドの関与を明らかにするため、自然発症高血圧ラットによる中大脳動脈閉塞モデルを使用しセラミドの動態および外因性セラミド投与による脳梗塞体積の縮小効果を見たものであり、下記の結果を得ている。

1. 低濃度の LPS (0.9 mg/kg) とコントロールである生理食塩水を自然発症高血圧ラット (SHR と略) に経静脈的に投与後 24, 48, 72, 96 時間後及び 7 日後に手術的に中大脳動脈を閉塞し、この 24 時間後に脳梗塞体積を 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色により測定し比較した。48, 72, 96 時間前投与のシリーズでコントロール群に比し LPS 群で有意に梗塞体積の減少が観察され、LPS 前投与は梗塞体積をコントロール群に比しそれぞれ 22.8 % ( $P < 0.05$ )、25.9 % ( $P < 0.02$ )、20.5 % ( $P < 0.02$ ) 減少させた。耐性誘導の効果は 72 時間前投与のものが最大であり前投与後 72 時間までが耐性が成熟するまでの期間であることが示された。
2. 無処置の SHR を用いての中大脳動脈灌流域の脳皮質の含有セラミドを逆相 HPLC により測定しこれを基礎値として前処置後のラット脳皮質のセラミドを測定した。LPS 投与群の脳皮質では投与 6 時間から 12 時間の間にセラミドは上昇し始め 12 時間の時点で基礎値の 149 % に上昇、その後さらに 24 時間、48 時間と上昇し続けた (182 %) が、72 時間の時点では下降し基礎値の 132 % であった。コントロール群との比較では 12, 18, 24, 48 時間の時点でのセラミドが有意に高かったが 72 時間の時点では両群間の差は消失した。  
また LPS 或いは生理食塩水投与前に採血し得られた血清中のセラミドを基礎値とし血清のセラミドを測定したところ、LPS 投与群の血清中ではセラミドは 24 時間後にピークに達し基礎値の約 2 倍に上昇したが、その後速やかに下降し 48 時間後には基礎値のレベルに戻った。これは 72 時間後も同様であった。コントロール群では測定したどの時間においてもセラミドの上昇は見られず、両群では 24 時間目の差が有意であった。

この血液中でのセラミド上昇の由来については血液を低濃度 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) と高濃度 (100  $\mu\text{g/ml}$ ) の LPS 及び生理食塩水と共に 24 時間インキュベートした後測定を行ったが、24 時間後でも LPS を生体内に投与した時の値には到達していないことから血液中でのセラミドの由来を血液細胞、特に白血球に求めることは困難であると考えられた。

3. セラミドアナログの投与実験においては、まず C2-セラミド 100  $\mu\text{g/kg}$  を経脳槽的に投与してから中大脳動脈を閉塞したところコントロール群と比較し有意な脳梗塞体積の縮小が見られた ( $P < 0.05$ )。次に C8-セラミド 1  $\text{mg/kg}$  を LPS と同様、経静脈的に投与し 24 時間後、48 時間後に中大脳動脈閉塞を行った群と中大脳動脈閉塞 5 分後に注入した群を作成し脳梗塞体積を比較検討したところ LPS 前投与の時と同様、コントロール群に比し梗塞体積を縮小させる効果があることが判明し ( $P = 0.007$ ) セラミドによる虚血耐性の誘導が可能であることが明らかとなった。

以上、本論文は LPS を用いた preconditioning によるラット中大脳動脈閉塞までの虚血耐性獲得期間において一過性にセラミドが上昇することを初めて示したものであり、また内因性セラミドの動態に一致させた外因性セラミドの投与実験から脳梗塞体積の縮小を示したものである。本研究はこれまで未知であった LPS による虚血耐性獲得の過程でのシグナル伝達解析に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。