

## 論文内容の要旨

論文題目 虚血耐性下における脳梗塞の進展様式  
— MRI による長期的観察を中心に —

指導教官 桐野高明教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 朱立東

### 背景と目的

近年、虚血耐性という現象が脳虚血分野において注目を浴びている。これは種々の非致死的なストレスを負荷しておく、ある一定時間後に加わる本来致死的な虚血侵襲に対して一時的に抵抗性が得られる現象である。非致死的な虚血負荷により脳細胞には HSP70 をはじめとする保護因子が誘導される。虚血耐性はこのような細胞レベルでの内因性防御機構の活性化によって発現するものと考えられている。

局所脳虚血後の虚血耐性現象に関する多くの実験では、虚血後 24 時間に耐性が発現し、その結果脳梗塞の体積が縮小するとされている。しかし、耐性によって縮小した脳梗塞のその後の進展様式および長期転帰については明確にされていない。また、非致死的な虚血侵襲によって誘導される虚血耐性は局所脳血流の改善効果に依るものではないと報告されているが、虚血負荷以外の刺激による虚血耐性獲得の場合には、脳血流の関与の解析はいまだ充分になされていない。従って、虚血耐性の作

用機序のなかで脳血流が関与する可能性は完全に否定できないのが現状である。

本研究の目的の一つは、長期的観察を通じて、虚血耐性下における脳梗塞進展様式及び虚血耐性による脳保護作用の長期的効果を明らかにすることである。その経過と結果を客観的に示すため、本研究では細菌性リポ多糖類(LPS)前処置による局所脳虚血耐性モデルを用い、MRIの所見に基づき、虚血耐性下における脳梗塞の進展様式を最長3ヶ月の期間で経時的に観察するとともに、虚血耐性の脳保護作用の長期効果について検討した。

また、虚血耐性における脳血流の関与を明らかにするため、本研究では永久局所脳虚血モデルを作成し、LPSの前処置が梗塞周辺部の脳血流にどのような影響を及ぼすのかを観察し、特に超急性期のみならず虚血後14日目までにおける変化についても検討した。さらに、局所脳虚血時に生じる脳浮腫が局所の循環に悪影響を及ぼし、虚血性脳損傷を増悪させる可能性について検討した。すなわち、LPS前投与が虚血性脳浮腫を軽減するか否かについて、永久局所脳虚血における脳水分含量の時間経過を検討することとした。

今回の実験では、LPSの前投与により、虚血周辺部での脳血流の低下が有意に抑制されていることが明らかとなったため、本研究ではLPSの前投与がeNOSの発現を介して脳血流を温存し、神経細胞保護作用を果たしているのではないかと考え、eNOSの経時的な発現も検討することとした。また、虚血耐性獲得機構に内因性防御機構の関与を検討するため、HSP70の蛋白発現も経時的に観察した。

## 方法と結果

自然発症高血圧ラット(SHR)にLPS(0.9 mg/kg)を経静脈的に投与し72時間後に左中大脳動脈完全閉塞を行った。対照として生理食塩水を静脈内に投与したSHRを用いた。虚血後24時間にTTC染色にて梗塞体積を測定した。その結果、コントロール群では $186.6 \pm 24.6 \text{ mm}^3$ 、LPS群では $134.3 \pm 19.4 \text{ mm}^3$  ( $p < 0.01$ )であり、今回の方法による中大脳動脈閉塞では大脳皮質に局限する均一な脳梗塞を再現性よく作成できること、そしてLPSが虚血耐性誘導効果を持つことがわかった。このモデル系にて7.05テスラの動物用MRIを用い脳梗塞後6、24時間、4、7、14日目および1ヶ月、3ヶ月目に拡散強調画像(DWI)およびT<sub>2</sub>強調画像(T<sub>2</sub>WI)を撮影した。虚血より6時間後から、各観察時点における梗塞体積及び%梗塞体積は、LPS群はコントロール群に比してすべて有意に減少を示し、虚血14日後ではコントロール群 $160.1 \pm 17.4 \text{ mm}^3$ 、LPS群 $102.7 \pm 13.5 \text{ mm}^3$  ( $p < 0.01$ )であり、虚血3ヶ月後ではコントロール群 $155.5 \pm 20.9 \text{ mm}^3$ 、LPS群 $101.7 \pm 19.3 \text{ mm}^3$  ( $p < 0.01$ )であった。MRIの撮影を終えた14日目及び3ヶ月に、脳の摘出とニッスル染色を行い、組織学的な脳梗塞体積とT<sub>2</sub>WIによる脳梗塞体積を比較した結果、MRIでの病変部位の体積と組織学的な梗塞体積とはほ

ば一致した。虚血後 4 日目まではコントロール群での梗塞拡大が著明である一方、LPS 群では 6 時間以降の変化は明らかではなく、乾燥重量法による脳水分含量の測定並びに ADC、T<sub>2</sub> 値の解析結果から、この差はコントロール群での水分含量の有意な上昇によるものと思われた。レーザードップラー血流計による局所脳血流 (rCBF) の測定結果では、梗塞周辺部 (peri-infarcted area) の rCBF において、LPS 群では虚血 30 分後からも段階的に部分回復する傾向を示したが、コントロール群では虚血 6 時間後までも減少し続け、虚血後 14 日間にわたり LPS 群で有意な rCBF の増加が認められた。

ウエスタンブロット解析では、eNOS は虚血後 6 時間から、HSP70 は虚血後 24 時間から、それぞれの発現が LPS 群においてコントロール群より明らかに亢進していたことが分かった。また、LPS 単独投与後 24、48、72 時間における eNOS、HSP70 発現の経時的変化を検討したところ、eNOS の発現量は投与後 24 時間から時間の経過とともに増大していたのに対し、LPS の投与による HSP70 の発現量の変化は観察されなかった。

## 考察

本研究では、LPS 前投与により虚血耐性が誘導され、永久中大脳動脈閉塞による梗塞体積が有意に縮小することを示した。その梗塞巣の縮小効果は虚血後 6 時間の時点で明らかとなり、3 ヶ月後の慢性期まで有意であることが明らかとなった。LPS の前投与による虚血耐性は、脳梗塞の増大を一時的に抑制するものではなく、最終的に脳梗塞体積を減らすことが判明した。

本研究では、LPS 前投与によって虚血性脳浮腫が抑制されることが明らかとなったため、虚血後 24 時間から 7 日目までに観察された 2 群間の梗塞体積差の拡大は、2 群における虚血性脳浮腫の発生・進行の違いによるものと考えられた。虚血性脳浮腫は血液脳関門 (BBB) の機能障害による脳血管の透過性亢進などが原因であり、さらに BBB の機能障害にはフリーラジカルの関与が指摘されている。LPS 投与後脳組織中の抗酸化酵素 Mn-SOD の活性は増加し、耐性誘導発現の時間経過と一致していることが報告されており、LPS 前投与による脳浮腫抑制の機序については Mn-SOD の活性増加によりフリーラジカルが消去されるのではないかと推定している。

本研究では、LPS 前投与により梗塞周辺部の血流がコントロールより有意に保たれていることが見出され、神経保護作用に寄与していると考えられた。eNOS 由来の NO は、血管拡張作用、抗血小板作用、白血球の内皮接着抑制作用により、主に抗虚血作用を示す。今回の実験では、LPS 投与後 72 時間の耐性誘導期では eNOS の誘導が平行してみられ、また、脳虚血後 14 日目まで発現の亢進が持続し、かつその発現量変化の時間経過は本研究での局所脳血流測定結果とほぼ合致していることが

わかった。従って、LPS 前投与は、eNOS 発現の誘導を介して微小循環を改善させ、ペナンプラにおける残存脳血流を維持させることによって、脳虚血障害の進展を抑制していると考えられた。

今回のウエスタンブロットによる結果では、虚血後 24 時間から 14 日目までの観察期間で、LPS 前投与群の HSP70 蛋白は非投与群より圧倒的に多く発現することが認められた。分子シャペロン作用以外、HSP70 の抗アポトーシス作用も明らかにされつつあることから、LPS 前投与により誘導された HSP70 蛋白は障害細胞に重要な保護作用を果たし、神経保護効果に関与すると思われた。

以上、本実験では LPS による脳虚血耐性が脳梗塞の進展を早期から抑制し、最終的に脳梗塞の体積を減らしたことを示した。耐性を獲得した脳では、虚血性脳浮腫や残存脳血流の低下が抑制されて障害が軽減されることが確認された。また、虚血耐性下における虚血後 HSP70 蛋白発現の上昇が、内因性保護因子を賦活化することによって虚血侵襲に対する抵抗性を増大させるものと考えられた。虚血耐性現象に対する研究は、未知の内因性保護機構の共通的な経路を発見することにもつながる可能性があり、新規の薬剤などにより耐性誘導が可能となれば、新しい治療法へと発展するのではないかと考えられた。