

Title	ラット中大脳動脈閉塞－再開通障害における好中球の役割に関する研究
Author(s)	松尾, 嘉之
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/39446">https://doi.org/10.18910/39446</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

ラット中大脳動脈閉塞一再開通傷害における  
好中球の役割に関する研究

1995年

松尾嘉之

## 目次

緒言	1
本論	
第一章 脳虚血再灌流後の好中球浸潤と組織傷害	3
第一節 脳虚血再灌流後の脳浮腫と好中球浸潤：時間経過の相関	3
第二節 脳虚血再灌流傷害における好中球の関与	11
第三節 考察と小括	16
第二章 脳虚血再灌流時の好中球によるフリーラジカルの産生	18
第一節 脳虚血再灌流によるラジカル産生の上昇と好中球の関与	18
第二節 好中球枯渇が脳内アスコルビン酸濃度および酸素分圧に与える影響	25
第三節 考察と小括	29
第三章 脳虚血再灌流傷害における細胞接着分子の役割	32
第一節 脳虚血再灌流による脳微小血管での ICAM-1 の発現と好中球浸潤	34
第二節 脳虚血再灌流後の好中球浸潤および組織傷害への接着分子の関与	38
第三節 考察と小括	41
第四章 脳虚血再灌流時の Platelet-activating factor (PAF) および Thromboxane A2 (TXA2) の役割	45
第一節 脳虚血再灌流傷害への PAF および TXA2 の関与	45
第二節 脳虚血再灌流時のラジカル産生への PAF および TXA2 の関与	50
第三節 脳虚血再灌流後の好中球浸潤への PAF および TXA2 の関与	54
第四節 考察と小括	55
第五章 総括と結論	58
謝辞	61
参考文献	62

## 緒言

近年、脳卒中などによる脳血管障害患者の死亡者数は減少し、今後もこの傾向は続くと思われる。しかし、高齢化の進行により痴呆を初めとする後遺症に苦しむ患者数は逆に増加しており、脳血管障害の進展抑制が今後さらに重要な課題になってくるのは明らかである。既に虚血性の脳血管障害が脳卒中の主要な原因の一つであることが明らかとされている(1)。現在、脳虚血の病態生理に関する基礎的な研究が著しく発展しており、実験的にはかなり効果が期待される薬剤についての報告が数多く見られる。しかしながら、脳血管障害急性期の治療は従来通り抗浮腫剤としての高浸透圧利尿剤の投与が最も有効な手段とされており、臨床的に有用性が明らかに認められる薬剤はほとんどない。

神経細胞は虚血変化に対して極めて脆弱であり、不可逆性の細胞死に至ることが知られている。虚血中あるいは虚血後に大量に遊離される興奮性アミノ酸、特にグルタミン酸が細胞死の過程に重要な役割を果たしているという仮説が提唱されている(2,3)。現在、このグルタミン酸仮説を受けて脳虚血傷害の治療薬としてグルタミン酸受容体遮断薬の開発が急ピッチで進められている。しかしながら、現在のところ必ずしもグルタミン酸受容体遮断薬が臨床上十分な治療結果を示していない。

最近、脳血管障害発症後数時間という超急性期に血栓を除去して（血栓溶解術、血管内脳外科手術）血流再開することによって虚血傷害を軽減しようとする施設が増えている。しかしながら、閉塞動脈の再灌流が得られたとしても、むしろ傷害が悪化する可能性があることも明らかになってきている(4,5)。また、一過性脳虚血発作を起こす患者では微小塞栓による虚血再灌流が頻繁に起こっており、再灌流自体が脳血管障害の進展に寄与している可能性が指摘されている。最近、この虚血再灌流による組織傷害が注目を集めており、好中球がその病態に重要な役割を演じている

ことが心臓や肺などの末梢臓器を用いた研究で明らかになりつつある(6-9)。感染症や炎症モデルの解析データをもとに、好中球による組織傷害のメカニズムとして多くの仮説が提出されているが、生化学的メカニズム（血管収縮因子，蛋白分解酵素，サイトカインの放出，フリーラジカル産生など）と，物理学的メカニズム（血管壁への血球付着による血流障害）の両者が関与していると考えられている。脳虚血再灌流傷害における好中球の関与を明確にする研究は少ないが，脳虚血再灌流時には補体活性化や各種サイトカイン，炎症性のメディエーターの放出が認められ，好中球を活性化する条件がそろっている。従って，好中球の組織侵入と活性化を最小限にとどめる方法が虚血性脳血管障害の新しい治療法となる可能性がある。

本研究ではヒトの虚血性脳血管障害の病態に近いとされるラット中大脳動脈閉塞モデルを用いて再灌流後の傷害進展における好中球の関与について検討した。

## 本論

### 第一章 脳虚血再灌流後の好中球浸潤と組織傷害

臨床および実験的に虚血再灌流傷害は好中球の浸潤および浮腫を伴い、急性期の炎症反応と酷似することが明らかである。好中球は活性酸素や蛋白分解酵素など細胞毒性を持ったメディエーターを放出することによって虚血再灌流傷害に関与することが予想されている (6-9)。Myeloperoxidase (MPO) は白血球のアズール顆粒内に存在する酵素として知られ (10)、既に皮膚、心筋、骨格筋などで MPO 活性が好中球浸潤の指標となることが報告されている (10-12)。近年、Barone等は MPO 活性を指標として脳虚血再灌流後に傷害部位への好中球の浸潤が認められることを報告した (13,14)。しかしながら、再灌流後の好中球浸潤の詳細な時間経過および組織傷害との相関について詳細に検討した報告は無かった。第一章では脳虚血再灌流後の好中球浸潤および組織傷害の時間経過を明らかにするとともに、ラット好中球枯渇抗体 (RP3) を用いて好中球の組織傷害における役割について検討した。

#### 第一節 脳虚血再灌流後の脳浮腫と好中球浸潤：時間経過の相関

ラット中大脳動脈閉塞再灌流後の好中球浸潤の時間経過を組織学的および生化学的 (MPO活性) に検討した。また、好中球浸潤と組織傷害の関係を検討するために水分含有量を指標として脳浮腫形成の時間経過について検討した。

## 実験方法

### 1) 実験動物：

12週令の雄性 Wistar ラット (270～320 g) を静岡実験動物 (株) より購入し、1週間以上予備飼育した後、実験に用いた。

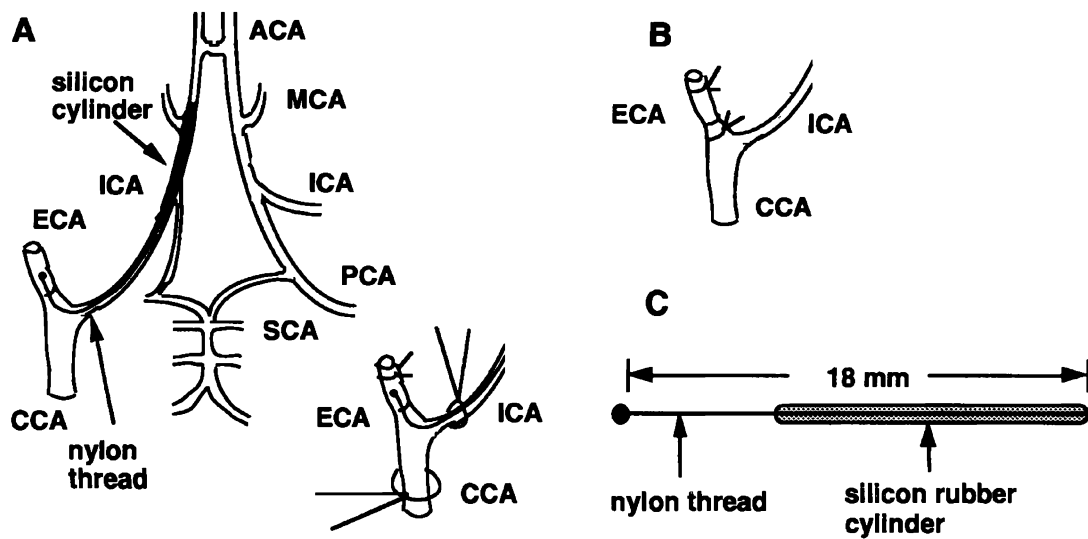


Fig. 1: Schematic representation of MCA occlusion-reperfusion model. Position of silicon rubber cylinder during occlusion of right middle cerebral artery (MCA) (A) and after recirculation (B). C: Silicon cylinder, ACA: anterior cerebral artery, PCA: posterior cerebral artery, ICA: internal carotid artery, ECA: external carotid artery, CCA: common carotid artery, SCA: superior cerebellar artery.

## 2) 局所脳虚血再灌流モデル：

局所脳虚血再灌流モデルは，Longa 等 (15) および Koizumi 等 (16) の方法を改良して作成した。ラットを 2% ハロタン麻酔下に，右総頸動脈 (CCA) を露出した。注意深く右外頸動脈を剥離し，結紮切断した。切断した右外頸動脈 (ECA) を翻転し，シリコン処理した 4-0 ナイロン栓止 (18 mm : Fig. 1; C) を右 ECA より右内頸動脈内 (ICA) へ挿入し，右中大脳動脈 (MCA) の起始部を閉塞した (Fig. 1; A)。栓止末端を ECA と結紮することによって血流の逆流を防ぎ，麻酔を解除した。一匹あたりの処置時間は 6-10 分であった。麻酔解除後ラットはヒートパッド上で 37℃ に維持し，20 分以内に左前肢の片麻痺を示したラットを虚血負荷成功例とした。処置したラッ

トの約 70 %が虚血負荷に成功し、約 30 %は片麻痺の程度が弱いためにデータから削除した。中大脳動脈閉塞 60 分後に再度麻酔下において栓止を抜去し、右総頸動脈から虚血部位への血流を再開させた (Fig. 1; B)。

### 3) 組織学的検討法：

虚血再灌流 6, 12, 24 時間後および 3, 7 日後にラットをペントバルビタール麻酔下で経心的にヘパリン加生理食塩水で脳を灌流し、4 %パラホルムアルデヒドで脳を灌流固定後、脳を取り出しパラフィン包埋した。病理組織学的評価のためパラフィン切片 (5  $\mu$ m) を Hematoxylin-Eosin (H.E.) 染色した。各切片は光顕下で観察し形態学的に好中球数をカウントした。データは各切片あたりの好中球数で表わした。

### 4) Myeloperoxidase 活性の測定：

虚血再灌流 6, 12, 24 時間後および 3, 7 日後にラットをペントバルビタール麻酔下で経心的に生理食塩水で脳を灌流後、脳を取り出した。氷上で取り出した脳を脳底動脈リングの前後をナイフにて切り落とし、Fig. 2 に示す 3 部位、A) 前大脳動脈支配下脳皮質 (虚血隣接部皮質; ACA), B) 中大脳動脈支配下脳皮質 (虚血部皮質; MCA), および C) 線条体 (虚血中心部; caudate putamen) にピンセットで分離した。分離後直ちにドライアイス上で凍結し、湿重量を測定した。

組織からの MPO の抽出は、Barone 等 (13,14) の方法を改良して行った。採取した組織はポリトロンホモゲナイザー (Ultra-Turrax, Junke & Kunkel Gmb & Co.) を使用して、20 倍量の 5 mMリン酸緩衝液 (pH 6.0, 4  $^{\circ}$ C) 中にホモゲナイズ (5 秒, 3 回) した後、30,000g (30分, 4  $^{\circ}$ C) で遠心分離する。上清を捨てた後にペレットを再び 20 倍量のリン酸緩衝液 (5 mM, pH 6.0) に懸濁し、30,000gで遠心分離 (30分, 4  $^{\circ}$ C) する。上清を除去した後、ペレットを 10 倍量の 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (Sigma Chemical Co) を含む 50 mMリン酸緩衝液



に懸濁し、室温で2分間インキュベートした。サンプルはドライアイス上で直ちに凍結し、凍結-融解および超音波処理（室温，10秒，Powersonic Model 50; Powersonic Inc.）を3度繰り返した。最後の超音波処理の後，4℃で20分間インキュベートし，12,500g（15分，4℃）で遠心分離した上清をMPOの活性測定(10)に使用した。

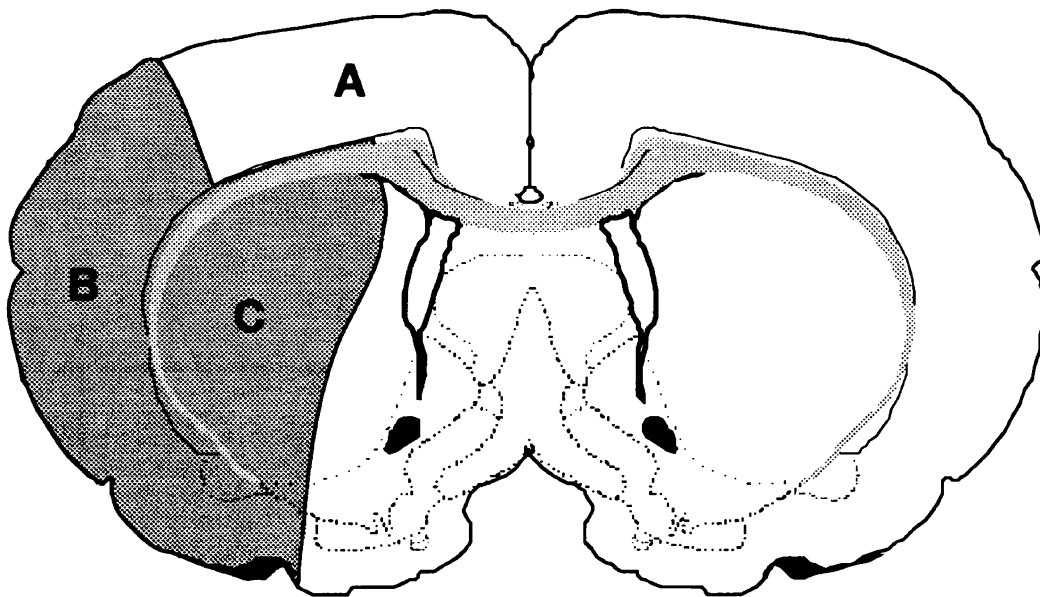


Fig. 2: Diagram of anatomic regions in a coronal section through the caudate putamen of the rat for tissue sampling in the measurement of brain water content and myeloperoxidase activity. A; frontoparietal cortex, motor area, supplied by anterior cerebral artery (ACA area). B; frontoparietal cortex, somatosensory area, supplied by middle cerebral artery (MCA area). C; caudate putamen. The shaded area represents typical ischemic areas.

MPO 活性は 0.167 mg/ml の o-dianisidine dihydrochloride (Sigma Chemical Co) と 0.0005% の hydrogen peroxide (Wako Pure Chemical Co) を含むリン酸緩衝液 (50 mM, pH6.0) 2.9 ml に上記操作で得られた上清 0.1 ml を加え，460 nm での吸光度の変化

率を測定した。25℃、1分間に1  $\mu$  moleの過酸化反応を起こす量のMPO活性を1 unit とした。

#### 5) 脳水分含有量の測定：

虚血再灌流 6, 12, 24 時間後および3, 7 日後にラットに苦痛を与えないように素早く断頭し、脳を取り出した。加湿箱内で脳を脳底動脈リングの前端、後端でナイフにて切断後、MPO 活性測定用のサンプルと同様にFig. 2 に示す ACA, MCA, Caudate putamen の三部位にピンセットにて分離した。各サンプルの湿重量を測定後、105℃にて24時間乾燥させた。乾燥重量を測定し、以下の式から水分含有量を求めて脳浮腫の指標とした。

$$\text{脳水分含有量 (\%)} = (\text{湿重量} - \text{乾燥重量}) / \text{湿重量} \times 100$$

### 実験結果

Fig. 3 に虚血半球内の組織学的に観察された浸潤好中球数 (per 5- $\mu$  m section) の時間経過を表わした。虚血半球内に浸潤する好中球数は再灌流 12 時間後から増加し (36.2 $\pm$ 6.3), 24 時間 (60.2 $\pm$ 5.8) から72 時間後 (68.6 $\pm$ 4.7) にピークとなり、再灌流から一週間後にはほとんど全ての例で好中球の浸潤は消失した。単球は再灌流 72 時間後から傷害部位への浸潤を認め、好中球が消失した一週間後には梗塞領域は単球の浸潤で満たされた。

Fig. 4 に虚血再灌流後の脳組織の MPO 活性の時間経過を表わした。虚血領域の大脳皮質にあたる MCA では虚血再灌流 12 時間後から MPO 活性が有意に上昇し、24 時間後にピークに達し、一週間後までに前値に復した (Fig. 4B)。線条体 (caudate putamen) では虚血再灌流 12 時間後から MPO 活性が有意に上昇し、72 時間後にピークに達し、一週間後にはほぼ前値に復した (Fig. 4C)。実際には虚血侵襲を受けない領域 ACA においても再灌流 24 時間後に有意な MPO 活性の上昇が認められた

(Fig. 4A)。虚血再灌流後の脳内 MPO 活性は組織学的に観察した好中球の浸潤と良く一致した。以上の結果は脳組織においても MPO 活性が好中球浸潤の指標として有効なことを示唆している。

Fig. 5 に脳浮腫の指標として虚血再灌流後の脳水分含有量の時間経過を表わした。脳水分含有量は再灌流 6 時間後には既に有意な上昇を示し、24～72 時間でピークに達し、1 週間後には前値に復した (Fig. 5A, B, C)。脳水分含有量の上昇は好中球浸潤が認められない再灌流 6 時間後から見られたが、そのピークおよび回復の時間経過は好中球浸潤の時間経過と良く一致した。

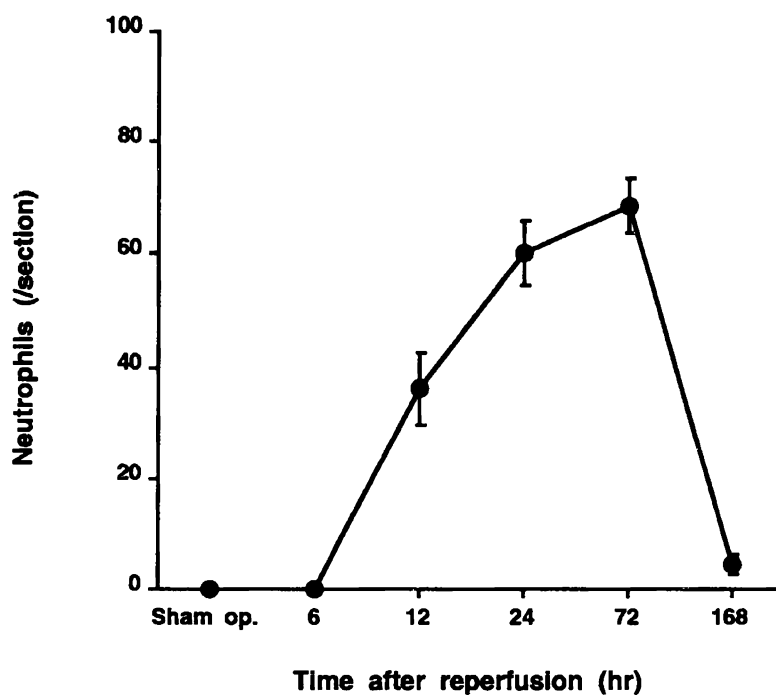


Fig. 3: Graph showing number of neutrophils in the ischemic hemisphere after 6, 12, 24 and 168 hours of reperfusion following 1 hour MCA occlusion. The results are expressed as neutrophils per 5  $\mu$ m section. Each point is mean  $\pm$  SEM of 5 to 7 animals.

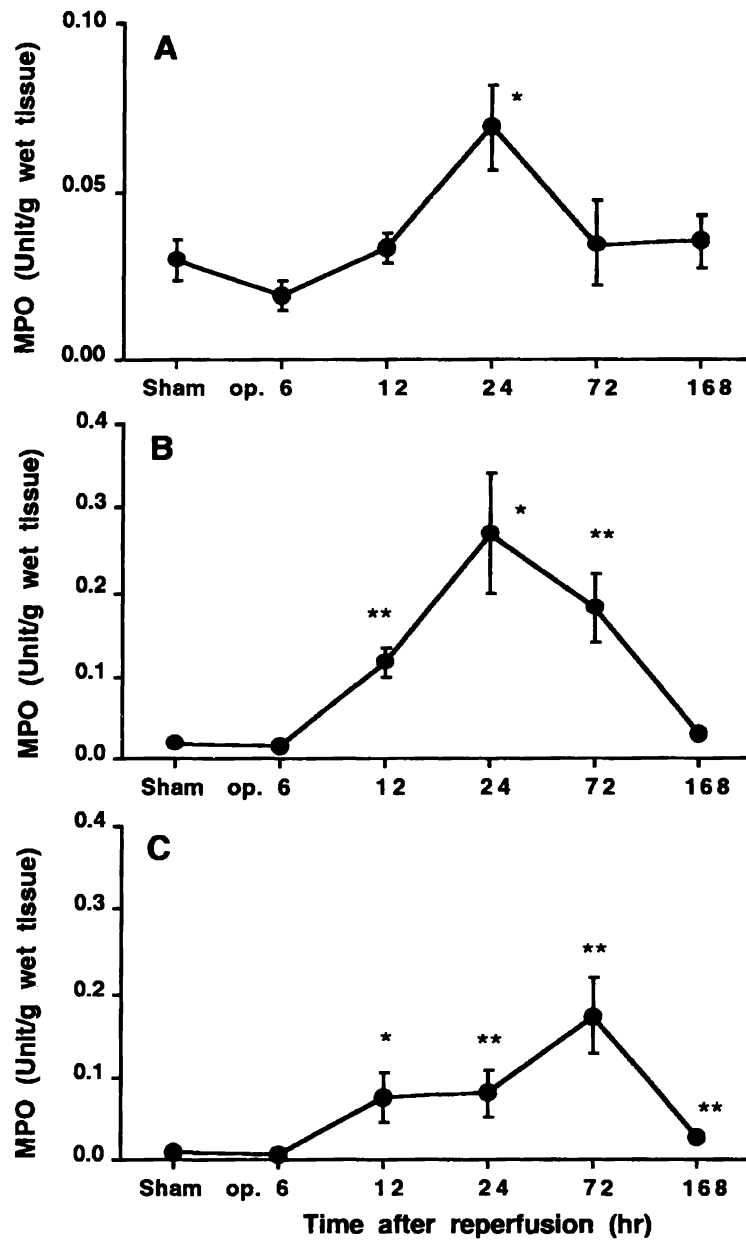


Fig. 4: Graphs showing myeloperoxidase (MPO) activity of ACA areas (A), MCA areas (B) and caudate putamen (C) after 6, 12, 24, 72 and 168 hours of reperfusion following 1 hour MCA occlusion. Each point is mean  $\pm$  SEM of 5 to 12 animals. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs., Sham op. (unpaired t-test).

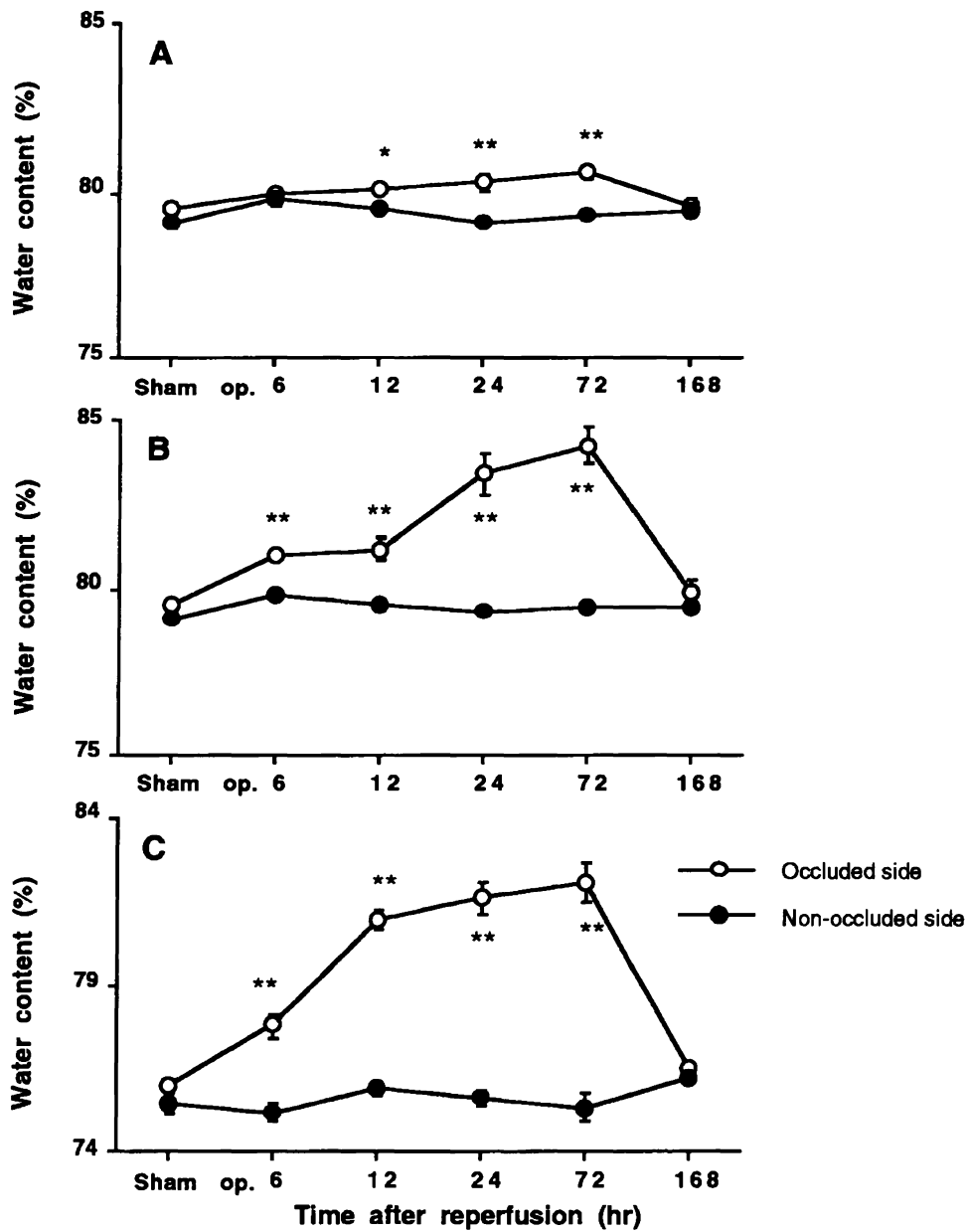


Fig. 5: Graphs showing water content of ACA areas (A), MCA areas (B) and caudate putamen (C) after 6, 12, 24, 72 and 168 hours of reperfusion following 1 hour MCA occlusion. Each point is mean  $\pm$  SEM of 5 to 11 animals. \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. Sham op. (unpaired t-test).

## 第二節 脳虚血再灌流傷害における好中球の関与

第一節で好中球浸潤および組織傷害の時間経過に相関が認められることが明らかとなった。そこで、第二節では好中球枯渇抗体 (RP3) を投与して好中球を選択的に枯渇したラットを用いることによって脳虚血再灌流傷害における好中球の役割について検討した。

### 実験方法

#### 1) 実験動物：

12週令の雄性 Wistar ラット (270~320 g) および10週令の雌性 Balb/c マウスを静岡実験動物 (株) より購入し、1週間以上予備飼育した後、実験に用いた。

#### 2) 好中球枯渇抗体 RP3 の作成：

好中球枯渇抗体 RP3 は RP3 産生ハイブリドーマ (17,18) を雌性 Balb/c マウスの腹腔内に投与することによって作製した。7~10日後に溜まった腹水を回収し、3,000rpm で10分間遠心した上清を好中球枯渇抗体として実験に使用した。RP3 は好中球に特異的に結合し、上記方法で得られた腹水はラット腹腔内への投与によって *in vivo* で他の血球には影響を与えずに好中球のみを枯渇させることが Sekiya 等 (17,18) によって報告されている。

#### 3) 脳虚血再灌流後の好中球浸潤および組織傷害に対するRP3の影響

脳虚血再灌流傷害への好中球の関与を検討するために好中球枯渇抗体 RP3 を処置したラットに一時間の中大脳動脈閉塞を施し、再灌流24時間後の脳内 MPO 活性、脳水分含有量、梗塞巣の面積の測定を行った。RP3 (3 ml/rat) は中大脳動脈閉塞24時間前と再灌流直後の2回腹腔内に投与した。対照群には同用量のリン酸緩衝生理食塩水を投与した。脳内 MPO 活性および脳水分含有量は前節同様に行った。梗塞サ

イズの測定は以下の方法にしたがった。

#### 4) 梗塞サイズの測定

虚血再灌流24時間後にラットをペントバルビタール麻酔下で経心的に0.2%ヘパリン加生理食塩水で脳を灌流後、脳を取り出した。脳は直ちに1mmの冠状断面に切断され、2% triphenyltetrazolium chloride (TTC: Wako Pure Chemical Co) に37℃で30分間暴露された。TTCに対して染色されなかった部分はミトコンドリアの傷害が存在していることを示し、この部分を画像解析 (Kontron M14, Zeiss) により梗塞サイズとして表わした。

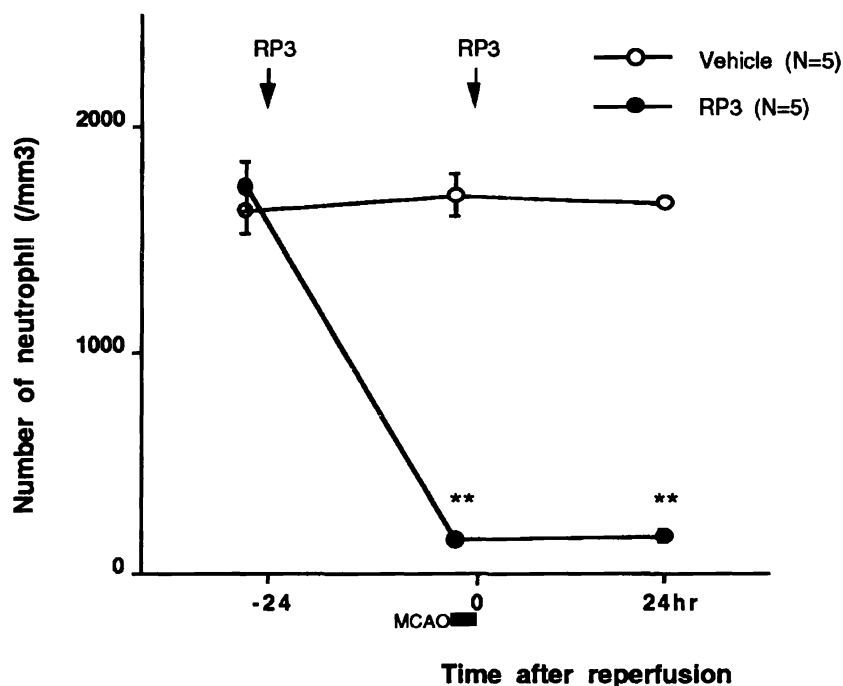


Fig. 6: Graph showing depletion of circulating neutrophils with the monoclonal antibody RP3. Treatment with RP3 (3 ml/rat, i.p. x 2) depleted circulating neutrophils during ischemia and reperfusion periods. MCAO; middle cerebral artery occlusion. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. Vehicle. (unpaired t-test).

## 実験結果

RP3 抗体を投与したラットでは虚血再灌流の実験期間を通して血中の好中球の選択的な枯渇が観察された (Fig. 6)。

対照群 (Vehicle) では脳虚血再灌流 24 時間後に好中球浸潤を反映する MPO 活性の著明な上昇を認めたが、好中球を枯渇したラットでは MPO 活性の上昇は全く認められなかった (Fig. 7)。

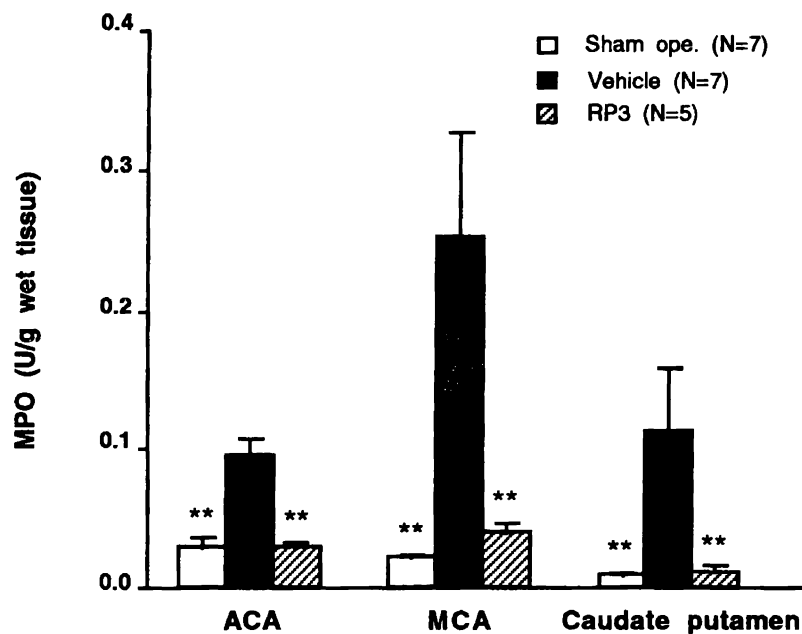


Fig. 7: Graph showing the effect of depletion of circulating neutrophils with RP3 (3 ml/rat, i.p. x 2) on increased brain myeloperoxidase (MPO) activity after 24 hours of reperfusion following 1 hour MCA occlusion. ACA: frontoparietal cortex supplied by anterior cerebral artery (ACA area). MCA: frontoparietal cortex supplied by middle cerebral artery (MCA area). Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs. Vehicle. (Dunnett's multiple range test).



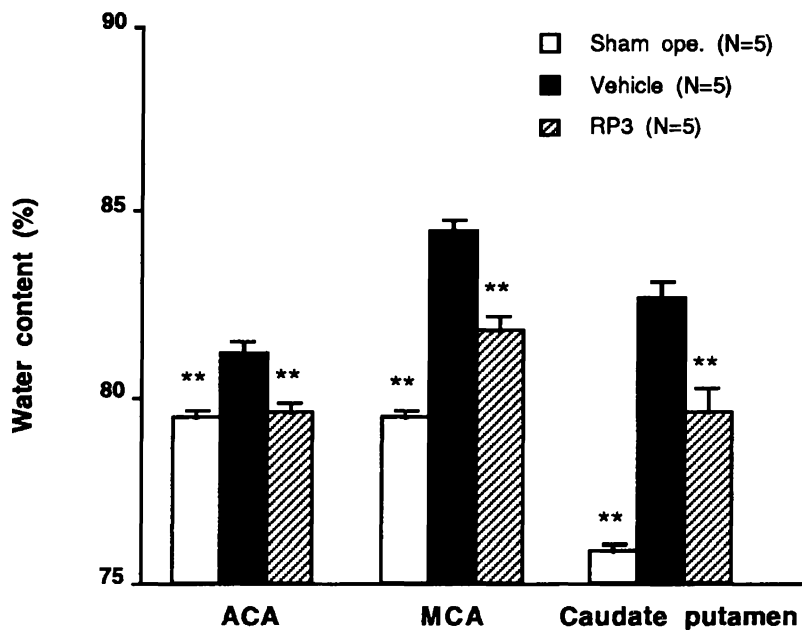


Fig. 8: Graph showing the effect of depletion of circulating neutrophils with RP3 (3 ml/rat, i.p. x 2) on increased brain water content after 24 hours of reperfusion following 1 hour MCA occlusion. ACA: frontoparietal cortex supplied by anterior cerebral artery (ACA area). MCA: frontoparietal cortex supplied by middle cerebral artery (MCA area). Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs. Vehicle. (Dunnett's multiple range test).

RP3の投与によって虚血側の各部位(ACA, MCA, caudate putamen)で脳浮腫の形成を表わす脳水分含有量の上昇が対照群と比較して有意に抑制された(Fig. 8)。特に、虚血隣接部のACAでは完全に脳浮腫の形成は抑制されていた。

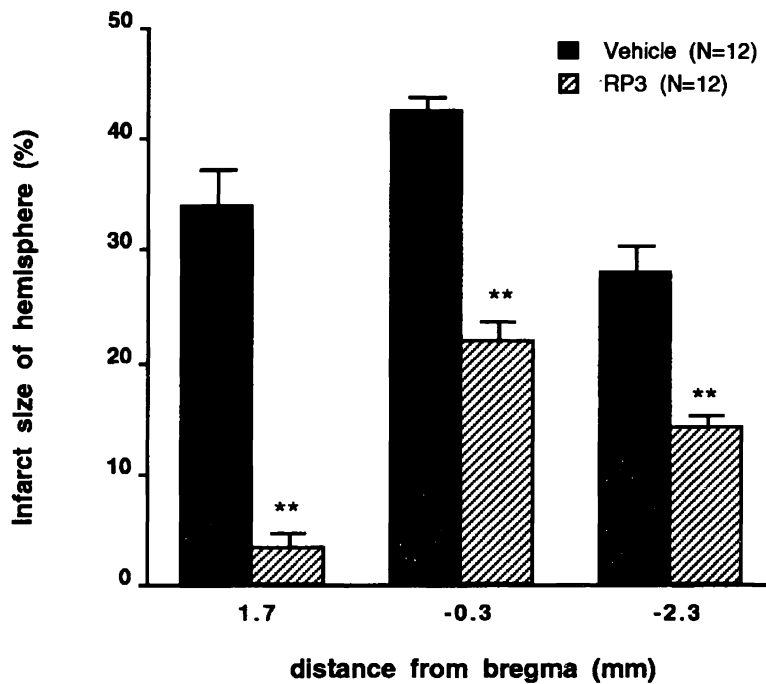


Fig. 9: Graph showing the effect of depletion of circulating neutrophils with RP3 (3 ml/rat, i.p. x 2) on infarct size (percent against ischemic hemisphere) of coronal level 1.7 mm anterior (bregma 1.7), 0.3 mm posterior (bregma -0.3) and 2.3 mm posterior to bregma (bregma -2.3) after 24 hours of reperfusion following 1 hour MCA occlusion. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs vehicle (Dunnett's multiple-range test).

対照群では脳虚血再灌流 24 時間後に虚血領域に一致して梗塞巣が認められた。RP3 投与群では各冠状断面 (bregma 1.7, -0.3, -2.3) で対照群と比較して有意に梗塞サイズが縮小されていた (Fig. 9)。

### 第三節 考察と小括

#### 考察

脳虚血再灌流後の好中球浸潤の指標として測定した MPO 活性は組織学的に観察された好中球浸潤の時間経過と良く一致しており、虚血再灌流後の脳組織においても MPO 活性が好中球浸潤の指標として有効であることが明らかとなった。また、RP3 抗体によって好中球を枯渇したラットでは脳虚血再灌流後の MPO 活性の上昇が見られないことから MPO 活性が好中球に由来することが確認できた。

単球も MPO 活性を有することが報告されているが (19)、今回の実験では単球の浸潤が虚血再灌流一週間後の傷害部位で著明に認められたにもかかわらず、MPO 活性は上昇していなかった。このことは、虚血再灌流後の MPO 活性への単球の関与は少ないことを示している。実際、Bradley 等 (10)は単球の MPO 活性は好中球に比較して非常に低いことを報告している。

今回の実験では、好中球浸潤は虚血再灌流後 12 時間後から認められ、24～72 時間後にピークとなり、一週間後には消失した。脳浮腫のピークおよび消失の時間経過も好中球浸潤と良く相関していた。しかしながら、脳水分含有量は好中球浸潤が認められない再灌流 6 時間後から有意に上昇しており、再灌流 6 時間後に認められる脳浮腫は好中球浸潤と無関係に進展したものと推測できる。

好中球は活性酸素や蛋白分解酵素など細胞毒性を持ったメディエーターを放出することによって虚血再灌流傷害に関与することが予想されている (6-9)。また、血管内皮細胞への粘着によって微小血管を閉塞し、虚血病変を助長することも報告されている (20,21)。これらの報告から血中の好中球を枯渇することは虚血再灌流傷害の進展を抑制する可能性が予想できる。そこで、今回の実験では好中球枯渇抗体 RP3 を用いて好中球を選択的に枯渇させたラットで脳虚血再灌流後の組織傷害について検討した。その結果、好中球の枯渇によって著明な脳浮腫の進展が抑制され、梗塞サ

イズも縮小された。特に、虚血隣接部にあたる ACA では脳浮腫は完全に抑制され、虚血中心部から虚血隣接部への病巣の拡大に好中球が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

今回実験で使用した RP3 抗体による好中球枯渇の詳細なメカニズムは明らかではないが、Sekiya 等 (18) は RP3 の投与後のラットの腹腔内に好中球を貪食したマクロファージが認められることを報告している。抗体が結合した好中球のマクロファージによる貪食が RP3 による好中球枯渇のメカニズムに関与しているのかもしれない。

#### 小括

- 1) 脳虚血再灌流後の脳内 MPO 活性の上昇および消退の時間経過は組織学的に観察した好中球浸潤の時間経過と良く一致しており、MPO 活性が脳組織への好中球浸潤の有効な指標となることが明らかとなった。
- 2) 一時間の中大脳動脈閉塞再灌流後、好中球は 6～12 時間後より傷害組織への浸潤を開始し、そのピークは 24～72 時間後であり、1 週間後には傷害組織内の好中球は消失し、単球の浸潤が優勢となった。
- 3) 一時間の中大脳動脈閉塞再灌流によって脳浮腫の形成が認められ、そのピークは 24～72 時間後であり、1 週間後には脳浮腫は解消していた。
- 4) 血中の好中球を枯渇し、組織内への好中球浸潤を抑制することによって脳虚血再灌流後の組織傷害は著明に抑制された。

これらの結果は虚血領域への好中球の浸潤が脳虚血再灌流後の組織傷害の進展に寄与していることを強く示唆している。

## 第二章 脳虚血再灌流時の好中球によるフリーラジカルの産生

最近の実験結果より虚血再灌流による組織傷害にフリーラジカルが関与することが明らかになりつつあり (22), フリーラジカルスカベンジャーが虚血再灌流後の脳組織傷害を抑制することが既に報告されている (23,24)。虚血再灌流時には PAF などの炎症性メディエーターが放出され, 活性化された好中球がフリーラジカルを産生して組織傷害に寄与することが予想される。近年, 心臓 (25) や小腸 (26) では好中球が虚血再灌流時の主要なラジカル産生源の一つであることが明らかとなりつつある。しかしながら, 脳虚血再灌流時のラジカル産生の上昇について好中球の関与を検討した報告はない。そこで, 第二章では好中球の脳虚血再灌流後のラジカル産生への関与を RP3 によって好中球を枯渇したラットを用いて検討した。

ラジカル種は反応性が高く寿命が短いため, 発生したラジカルを直接測定することは非常に困難である。最近では各種トラップ剤および電子スピン共鳴 (electron spin resonance: ESR) 法を使用することによって脳虚血再灌流時に発生したラジカルを間接的に測定することが可能となりつつある (27,28)。しかしながら, 外因性のトラップ剤は脳血流や代謝に影響を及ぼす可能性も考えられ, 病態時の反応を正確に捕えられないおそれもある。そこで本研究では内在性の比較的安定なラジカル種であるアスコルビン酸ラジカル (AR) をマイクロダイアリス法によって回収し, ESR 法で測定することによって, ラジカル産生の指標とした。

### 第一節 脳虚血再灌流によるラジカル産生の上昇と好中球の関与

ラット中大脳動脈閉塞再灌流時の虚血部の大脳皮質での AR 濃度の時間経過およびそれに対する好中球枯渇の影響について検討した。また, 測定された AR が実際に酸素ラジカルの産生を反映することを確かめるために superoxide dismutase (SOD) および

catalase の影響についても検討した。

## 実験方法

### 1) 実験動物：

12 週令の雄性 Wistar ラット (270~320 g) を静岡実験動物 (株) より購入し, 1 週間以上予備飼育した後, 実験に用いた。

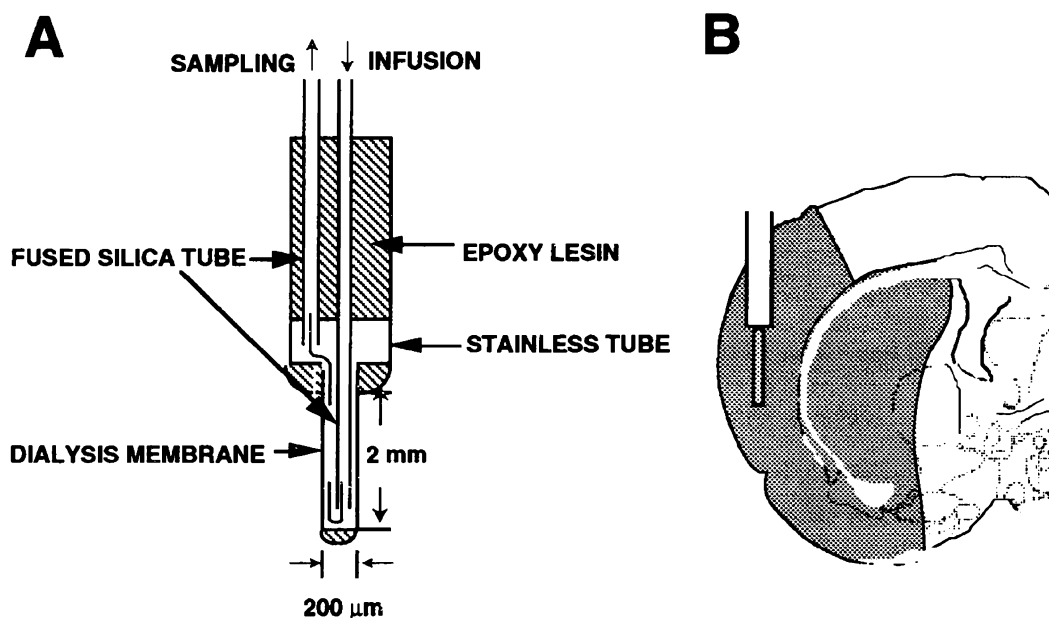


Fig. 10: Details of the dialysis tube (A) and the site of probe insertion (B).

### 2) 微小透析プローブの固定：

実験に使用した透析プローブの略図を Fig. 10 に示す。透析プローブは, 再生セルロース製の透析膜 (外径:  $200 \mu\text{m}$ ), ステンレスチューブ (23 G), フェーズドシリカチューブ (外径:  $150 \mu\text{m}$ , 内径:  $50 \mu\text{m}$ ) およびポリエチレンチューブ (PE 20, Clay Adams Inc) から成る。これらの接着にはエポキシ樹脂系接着剤を使用した。

透析膜は分子量 cut off, 50,000 Dalton で、長さ 2 mm のものを使用した。

ラットは、ペントバルビタール麻酔下で脳底位固定装置 (SR-6, Narishige) に固定した。頭皮を切開して頭蓋を露出させた後、Pellegrino 等 (29) の脳地図に従い、透析プローブを右半球の大脳皮質 (1.4 mm posterior and 6.0 mm lateral to the bregma and 4.0 mm ventral to the dura) に挿入後、歯科用セメントで頭蓋に固定した (Fig. 10)。透析プローブを挿入した部分は右中大脳動脈閉塞によって血流が遮断される部分である (5)。これらの動物は、麻酔および手術時の組織侵襲の影響を避けるために手術後 2 4 時間以上経過してから脳虚血実験に使用した。

### 3) アスコルビン酸ラジカルの測定:

動物は無麻酔、無拘束下で自由に行動できる環境のもとに測定を行った。大脳皮質に挿入した透析プローブ内を Ringer 液 ( $K^+$ : 4 mM,  $Na^+$ : 147 mM,  $Ca^{2+}$ : 3.1 mM,  $Cl^-$ : 157.2 mM) を用い、 $2.0 \mu\text{l}/\text{min}$  の流速で灌流した。灌流液はマイクロピペット内に回収し、10 分毎に ESR スペクトロメーター (JES-RE1X, JEOL) および ESR データ処理システム (ESPRIT 380, JEOL) を使用して灌流液中のアスコルビン酸ラジカルを測定した。測定は以下の条件で行った。

center field:  $336.0 \pm 0.5$  mT, microwave power: 20 mW, microwave frequency: 9.4 GHz,  
modulation frequency: 100 kHz, sweep gain: 2000, sweep time:  $1 \text{ s} \times 100$ .

安定した AR のピークを確認した後、実験に使用した。データは虚血負荷前の 3 回の測定値の平均を 100% として表わした。

### 4) 脳虚血再灌流後のアスコルビン酸ラジカル産生に対する Superoxide dismutase (SOD), catalase および好中球枯渇抗体 (RP3) の影響:

脳虚血再灌流時の AR の上昇が酸素ラジカルの産生を反映することを確かめるために SOD および catalase を投与したラットに一時間の中大脳動脈閉塞—再灌流を施した。SOD (50,000 Units/kg) および catalase (50,000 Units/kg) は再灌流 15 分前にラット

に尾静脈内投与した。対照群には同用量のリン酸緩衝生理食塩水を投与した。

脳虚血再灌流時のラジカル産生に対する好中球の関与について検討するために好中球枯渇抗体 (RP3) を投与したラットに一時間の中大脳動脈閉塞-再灌流を施した。RP3 (3 ml/rat) は中大脳動脈虚血 2 4 時間前と再灌流直後の 2 回腹腔内に投与した。対照群には同用量のリン酸緩衝生理食塩水を投与した。

脳虚血再灌流時の AR の測定は上記の方法に従って行った。

### 実験結果

Fig. 11 に虚血再灌流時の大脳皮質での典型的な AR の ESR signal を表わした。正常ラットの脳灌流液中に比較的安定な AR signal ( $aH=0.17$  mT,  $g=2.0057$ ) が検出できた (Fig. 11A)。脳灌流液中の AR 濃度を計算によって求めると  $0.80 \pm 0.04 \mu\text{M}$  ( $n=5$ ) であった。一時間の中大脳動脈閉塞中は AR signal の強度は有意に減弱した ( $64.4 \pm 7.4$  % of basal level, Fig. 11B, Fig. 13)。再灌流後, AR signal の強度は 30 分 ( $156.8 \pm 8.7$  % of basal level) および 1 時間後 ( $142.0 \pm 8.3$  % of basal level) に有意に増強し, 2 ~ 4 時間後までに前値に復し, 2 4 時間後 ( $163.4 \pm 9.8$  % of basal level) には再び増強する二相性の増加パターンを見せた (Fig. 11C, D, E, F, Fig. 13)。



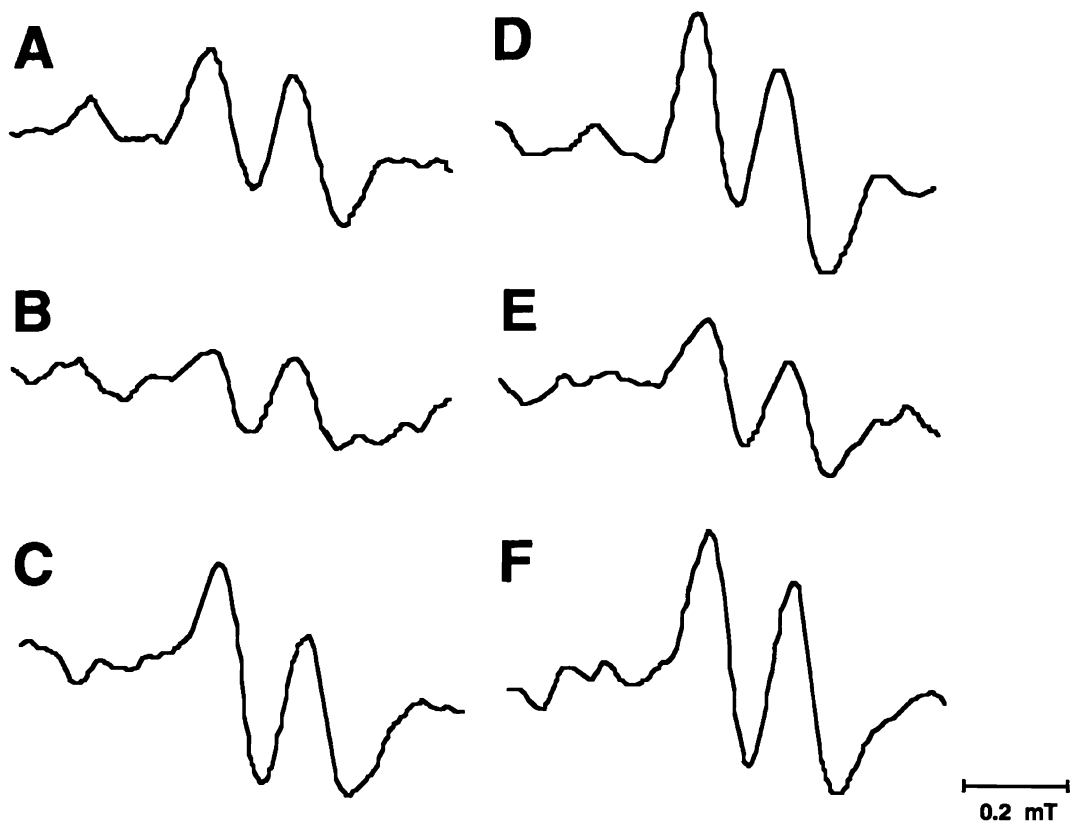


Fig. 11: Typical time course of ESR signals from cerebral cortex under the ischemia-reperfusion conditions. ESR spectra from control rats (A) exhibited a relatively stable doublet signal ( $aH = 0.17$  mT,  $g = 2.0057$ ) with the same parameters as AR. The AR signal intensity declined during MCA occlusion (B). Following reperfusion, the AR signal intensity increased at 30 minutes (C) and 1 hour (D), returned to near basal level by 3 hours (E), and increased again at 24 hours after reperfusion (F). AR; ascorbyl radical.

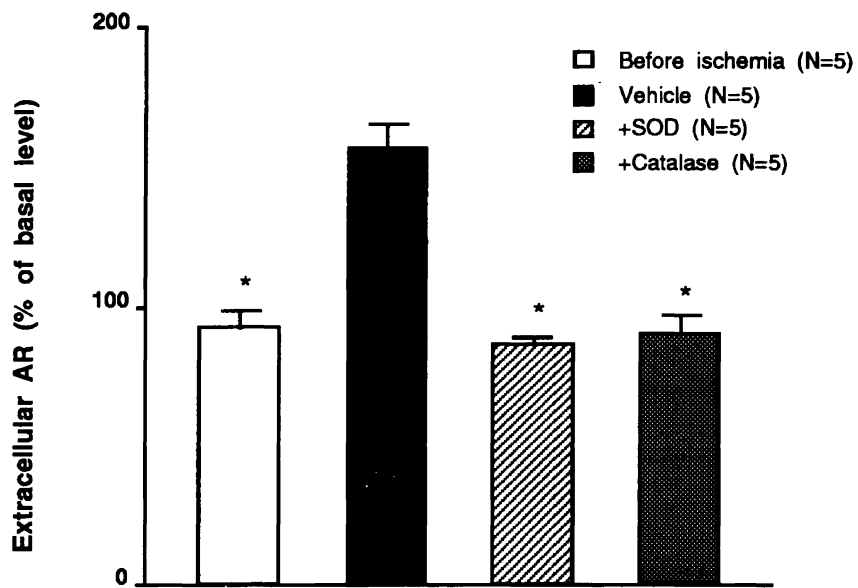


Fig. 12: Graph showing effects of SOD (50,000 Units/kg, i.v.) or catalase (50,000 Units/kg, i.v.) on the increase in extracellular AR formation after reperfusion. AR; ascorbyl radical. Each group consisted of 5 animals. Data are presented as the means  $\pm$  SEM. \* $P < 0.01$  vs. after reperfusion (Dunnett's multiple-range test).

虚血再灌流による AR signal の増強は SOD および catalase の投与によって完全に抑制された (Fig. 12)。これらの結果は虚血再灌流後の AR の増加が酸素ラジカルの産生を反映していることを示唆している。

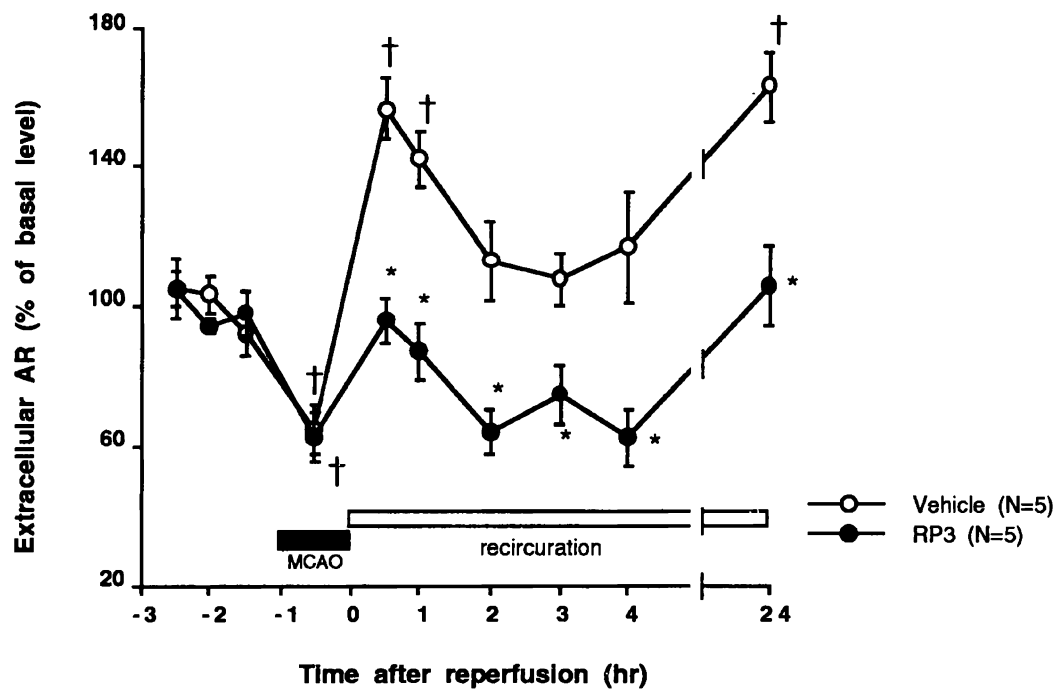


Fig. 13: Graph showing temporal profile of extracellular AR and the effect of neutrophil depletion with RP3 (3 ml/rat, i.p. x 2) under conditions of cerebral ischemia-reperfusion. AR; ascorbyl radical. Each group consisted of 5 animals. Data are presented as the means  $\pm$  SEM. † $p < 0.05$  vs. basal level; \* $p < 0.05$  vs. vehicle (unpaired t-test).

好中球を RP3 に投与によって枯渇したラットでは中大脳動脈閉塞中は対照群と同様に AR の減少が認められたが、再灌流後の AR signal の二相性の増強は完全に抑制された (Fig. 13)。

## 第二節 好中球枯渇が脳内アスコルビン酸濃度および酸素分圧に与える影響

AR signal の強度をラジカル産生の指標とした場合、好中球を枯渇することによって虚血再灌流後のラジカル産生の増加は完全に抑制されていた。しかしながら、好中球の枯渇が AR の前駆体となるアスコルビン酸の脳内濃度に影響することによって AR 濃度を減少させた可能性がある。また、好中球の枯渇によって脳循環動態が影響を受け、脳酸素分圧 (tissue PO<sub>2</sub>) が変化することによってアスコルビン酸の酸化が妨害され、AR が減少した可能性も否定できない。そこで、虚血再灌流時の細胞外アスコルビン酸および脳内酸素 (tissue PO<sub>2</sub>) 分圧の変化に対する好中球枯渇の影響について検討した。

### 実験方法

#### 1) 実験動物：

12 週令の雄性 Wistar ラット (270~320 g) を静岡実験動物 (株) より購入し、1 週間以上予備飼育した後、実験に用いた。

#### 2) 微小透析プローブおよび酸素電極の固定：

透析プローブは、第二章、第一節の AR の測定と同様のものを使用した。

酸素電極としては Carbon fiber 電極を使用した。すなわち、微小 Carbon fiber (直径 7 μm) をマイクロキャピラリーに封入し、エポキシ樹脂で接着固定後、電解処理 (0.2 V 3 角波; 2.5 Hz, 30 sec, 1 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) を施したものをを用いた。参照電極は銀塩化銀 (AgCl; 200 μm), 補助電極は銀線 (Ag; 200 μm) を使用した。

透析プローブもしくは酸素電極は第二章、第一節で AR 測定用のプローブを固定したのと同じ部位、すなわち、右半球の脳皮質 (1.4 mm posterior and 6.0 mm lateral to the bregma and 4.0 mm ventral to the dura) に挿入後 (Fig. 10), 歯科用セメントで頭蓋に固定した。これらの動物は、麻酔および手術時の組織侵襲の影響を避けるために手

術後 2 4 時間以上経過してから脳虚血実験に使用した。

3) アスコルビン酸および酸素分圧の測定：

動物は無麻酔，無拘束下で自由に行動できる環境のもとにアスコルビン酸および酸素分圧の測定を行った。

脳内のアスコルビン酸を回収するために大脳皮質に挿入した透析プローブ内を Ringer 液 ( $K^+$ : 4 mM,  $Na^+$ : 147 mM,  $Ca^{2+}$ : 3.1 mM,  $Cl^-$ : 157.2 mM) を用い， $2.0 \mu\text{l}/\text{min}$  の流速で還流した。灌流液中のアスコルビン酸の測定は Geigert 等 (30) の方法に従って行った。すなわち，回収された灌流液は 30 分毎に HPLC に注入し，陰イオン交換カラム ( $250 \times 4.6 \phi$ ，Shim-pack CLC-NH<sub>2</sub>，Shimadzu) によりアスコルビン酸を分離し，UV 検出器 (SPD-6A，Shimadzu) で 245 nm のピークを検出した。移動相の組成は 75% の acetonitrile を含む 2.5 mM potassium phosphate buffer (pH 2.6) で  $1.0 \text{ ml}/\text{min}$  の流速で流した。安定したアスコルビン酸のピークを確認した後，実験に使用した。データは虚血負荷前の 3 回の測定値の平均を 100% として表わした。

脳内酸素分圧 (tissue PO<sub>2</sub>) は酸素電極の設定電位を -0.75 V (vs. Ag/AgCl) に固定した際に流れる酸化電流を観察することによって測定した。データは AR およびアスコルビン酸と同様に虚血負荷前の 3 回の測定値の平均を 100% として表わした。

4) 脳虚血再灌流後の脳内アスコルビン酸濃度および酸素分圧に対する好中球枯渇抗体 (RP3) の影響：

脳虚血再灌流時の脳内アスコルビン酸濃度および酸素分圧に対する好中球枯渇の影響について検討するために好中球枯渇抗体 (RP3) を投与したラットに一時間の中大脳動脈閉塞—再灌流を施した。RP3 (3 ml/rat) は中大脳動脈虚血 2 4 時間前と再灌流直後の 2 回腹腔内に投与した。対照群には同用量のリン酸緩衝生理食塩水を投与した。

脳虚血再灌流時のアスコルビン酸および酸素分圧の測定は上記の方法に従って行っ

た。

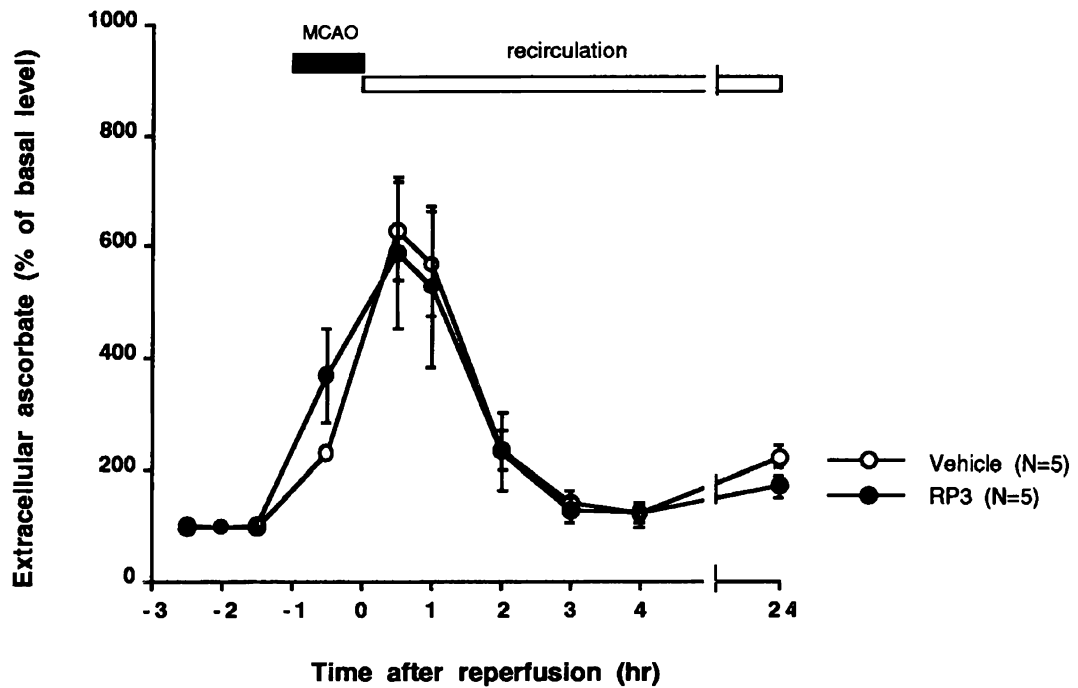


Fig. 14: Graph showing temporal profile of extracellular ascorbate and the effect of neutrophil depletion with RP3 (3 ml/rat, i.p. x 2) under conditions of cerebral ischemia-reperfusion. Each group consisted of 5 animals. Data are presented as the means  $\pm$  SEM.

### 実験結果

正常ラットの脳灌流液中のアスコルビン酸濃度は  $6.21 \pm 0.19 \mu\text{M}$  ( $n=5$ ) であった。アスコルビン酸濃度は中大脳動脈閉塞中から有意に上昇し ( $230.0 \pm 7.6$  % of basal level), 再灌流によって30分 ( $629.4 \pm 87.0$  % of basal level), 一時間後 ( $568.8 \pm 95.8$  % of basal level) にはさらに増加した (Fig. 14)。再灌流から4時間後 ( $122.8 \pm 15.4$  % of basal level) までに前値に復し, 24時間後 ( $224.0 \pm 17.1$  % of basal level) には再び増加していた (Fig. 14)。RP3による好中球の枯渇は虚血再灌流によるアスコルビン酸濃度

の変化には何ら影響を与えなかった (Fig. 14)。

正常ラットの大脳皮質の脳内酸素分圧 (tissue PO<sub>2</sub>) は  $38.2 \pm 2.4$  mm Hg (n=5) であった。脳内酸素分圧は MCAO によって  $9.2 \pm 2.0$  % of basal level にまで減少した (Fig. 15)。再灌流によって脳内酸素分圧は前値に比較して有意に上昇し ( $169.1 \pm 22.7$  % of basal level), 以降 24 時間後 ( $292.3 \pm 28.6$  % of basal level) まで緩やかに上昇し続けた (Fig. 15)。RP3 による好中球の枯渇は虚血再灌流 4 時間後までは脳内酸素分圧の変化には影響を与えなかったが, 24 時間後には対照群に比較してわずかではあるが有意な減少を示した (Fig. 15)。

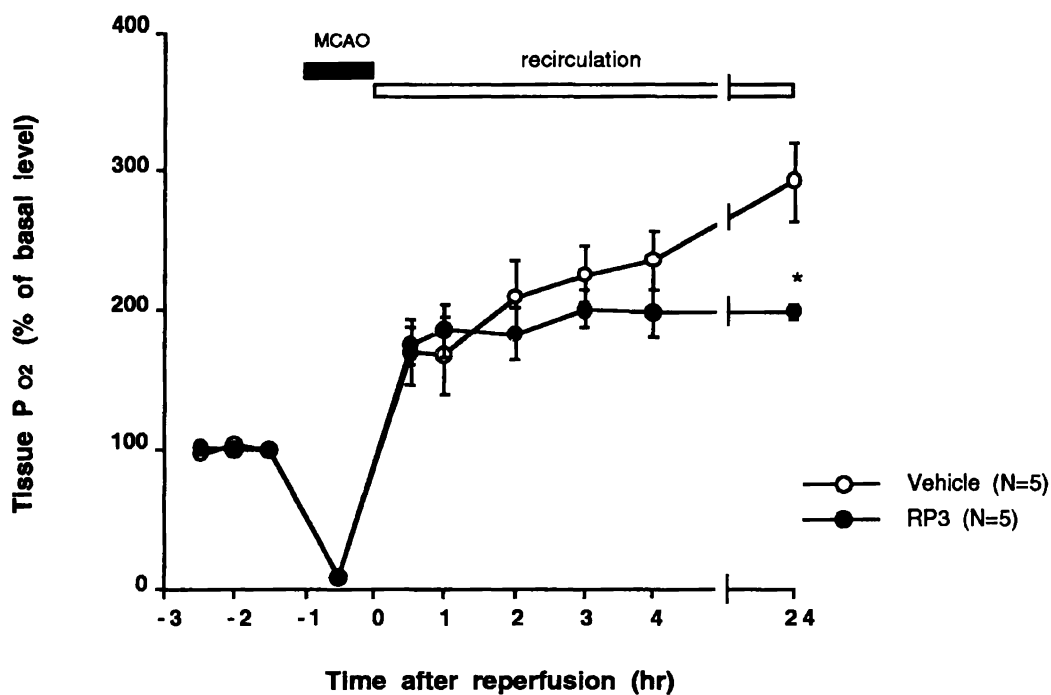


Fig. 15: Graph showing temporal profile of tissue PO<sub>2</sub> and the effect of neutrophil depletion with RP3 (3 ml/rat, i.p. x 2) under conditions of cerebral ischemia-reperfusion. Each group consisted of 5 animals. Data are presented as the means  $\pm$  SEM. \*p<0.05 vs. vehicle (unpaired t-test).

### 第三節 考察と小括

#### 考察

AR は内因性の抗酸化剤であるアスコルビン酸が一電子酸化されることによって産生される比較的安定なラジカル種である (31-35)。最近, AR は心臓の虚血再灌流時のラジカル産生の指標として有効であることが報告されている (36,37)。脳組織には特に高い濃度のアスコルビン酸が存在することから, 脳においても AR は虚血再灌流時のラジカル産生の有効な指標となる可能性がある (38,39)。実際, Kihara 等 (40) はマイクロダイアリシス法を用いることによって脳組織内の AR の測定が可能であることを報告している。今回の実験では同様の測定方法を用いて脳虚血再灌流後に脳組織内の AR が二相性に増加することを明らかにした。

AR の増加がラジカル産生を反映することを確かめるために, SOD および catalase の影響について検討した。その結果, 再灌流 15 分前の SOD および catalase の投与によって AR の増加は抑制されることが明らかとされた。さらに, 脳組織でのアスコルビン酸濃度の上昇によって AR が増加した可能性を否定するために, アスコルビン酸の測定も行っている。虚血中は脳組織中の AR は減少するにもかかわらず, アスコルビン酸濃度は増加した。つまり, AR とアスコルビン酸の濃度変化は平行しないことが明らかとされた。これらの結果は再灌流後の AR の上昇が酸素ラジカルの産生を反映することを示している。

活性化された好中球は superoxide ( $O_2^-$ ) および過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) などの活性酸素種を放出し, さらに鉄イオンとの触媒反応による反応性の高い hydroxyl radical ( $HO\cdot$ ) や一重項酸素 ( $^1O_2$ ) の産生を介して組織傷害に寄与することが予想される (41-43)。既に, 心臓の虚血再灌流時には好中球が活性化されており, ラジカル産生に寄与していることが報告されている (25)。最近, Nilsson 等 (26) は好中球上の接着分子 (CD11/CD18) に対する抗体を使用して, 好中球が小腸の虚血再灌流時の主要なラジ



カル産生源であることを報告している。今回の実験において好中球の枯渇によって脳虚血再灌流後の AR の増加は完全に抑制された。局所脳血流および組織内酸素分圧の変化によって AR の増加が抑制された可能性を否定するために、好中球の枯渇が虚血再灌流時の組織内酸素分圧に影響を与えないことも確認した。これらの結果は脳虚血再灌流時においても好中球が主要なラジカルの産生源の一つであることを強く示唆している。

脳内 AR は虚血再灌流直後（第一相）に増加し、2 時間後までに正常値に復し、24 時間後（第二相）に再び増加する二相性の増加を示した。一方、好中球の虚血領域への浸潤は第一章に示した様に再灌流 6～12 時間後から開始し、24 時間以降にピークとなった。これらの結果から脳虚血再灌流直後（第一相）のラジカル産生には循環血中の活性化好中球が関与し、再灌流 24 時間後（第二相）のラジカル産生には組織内へ浸潤した好中球が関与していることが推測された。

他臓器においては xanthine oxidase (XO) が虚血再灌流時のラジカル産生源として注目を集めている (44)。脳組織では他臓器に比較して XO が低レベルしか存在しないが、微小血管では XO 活性が高いことが知られている (45)。現在までに脳虚血再灌流時のラジカル産生における XO の役割について多数の検討が報告されているが (27,46,47)、その関与については統一した見解が未だ得られていない。今回の実験では好中球の枯渇によって再灌流後の AR の増加はほぼ完全に抑制された。もしかすると、XO に由来する酸素ラジカルはアスコルビン酸以外の生体内抗酸化機構 (e.g. tocopherol, glutathione, SOD, catalase) によって還元された可能性も考えられる。最近、Nilsson 等 (26) は小腸の虚血再灌流時の XO 由来のラジカルが好中球由来のものに比較して遥かに少ないことから、XO 由来のラジカルは直接組織傷害に関与するのではなく、むしろ好中球の活性化機構の一部として関与している可能性について言及している。脳虚血再灌流時にも XO は好中球活性化機構の一部として働いているのかもしれない。

## 小括

- 1) 一時間の中大脳動脈閉塞再灌流によって虚血部の大脳皮質部で再灌流後に二相性の AR の上昇が認められた。
- 2) SOD および catalase の投与によって再灌流後の AR の上昇は抑制された。このことから AR 濃度の上昇は酸素ラジカルの産生を反映するものであることが示唆された。
- 3) 血中の好中球を枯渇することによって二相性の AR 上昇は完全に抑制された。
- 4) 好中球の枯渇による AR の上昇抑制はアスコルビン酸濃度および組織内酸素分圧の変化を伴わないものであった。

これらの結果は好中球が脳虚血再灌流後の主要なラジカル産生源の一つであることを強く示唆している。

### 第三章 脳虚血再灌流傷害における細胞接着分子の役割

好中球の血管内皮への接着が組織内への浸潤過程の最初のそして必須のステップである(48,49)。血流に抵抗して、好中球が血管壁に接着するためには、まずセレクチンと糖鎖を介するローリングというステップが必要である(Fig. 16)(50)。ローリングにより速度を減じた好中球は活性化された好中球上のインテグリンファミリーと内皮細胞上の免疫グロブリンスーパーファミリー(Ig superfamily)との間の結合により血管内皮細胞と接着し、血管外へと遊走していく(Fig. 16)(51,52)。

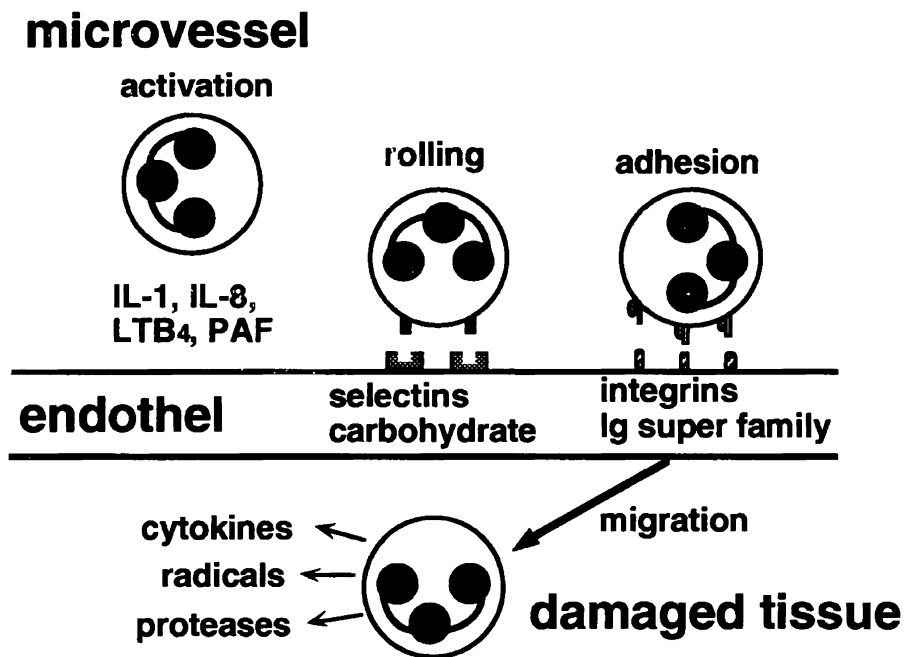


Fig. 16: Diagram of the proposed mechanisms for neutrophil migration to damaged tissue. The initial "rolling" step is mediated by selectins and carbohydrates. "Adhesion" and "migration" are mediated by integrins and Ig superfamily.

血管内皮細胞と白血球の結合には様々な接着分子が関与することが報告されており (Table 1), 治療への応用を考えれば, どの接着分子が脳虚血病巣への好中球の浸潤に重要であるかを明らかにする必要がある。

Table 1: Leukocyte and endothelial adhesion molecules

Leukocyte	Endothelial cell
(Selectin - Carbohydrate)	
SLex (CD15s)	P-selectin (CD62P)
	E-selectin (CD62E)
L-selectin (CD62L)	GlyCAM-1 (Sgp50)
	MAdCAM-1
(Integrin - Ig superfamily)	
LFA-1 (CD11a/CD18)	ICAM-1 (CD54)
	ICAM-2 (CD102)
Mac-1 (CD11b/CD18)	ICAM-1 (CD54)
p150,95 (CD11c/CD18)	?
VLA-4 (CD49d/CD29)	VCAM-1 (CD106)

第三章では免疫グロブリンスーパーファミリーに属するICAM-1 (CD54) と  $\beta$ 2インテグリン (CD11/CD18) の好中球浸潤への関与について検討した。CD11/CD18は三種の  $\alpha$  鎖 (CD11a, b, c) と共通の  $\beta$  鎖から成る二量体を形成しており, それぞれ, LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18) および p150,95 (CD11c/CD18) と呼ばれている (53)。ここでは特に血管内皮細胞上の ICAM-1 と好中球上の LFA-1 の関与について検討した。

## 第一節 脳虚血再灌流による脳微小血管での ICAM-1 の発現と好中球浸潤

中大脳動脈閉塞再灌流時の脳微小血管での ICAM-1 の発現様式の変化および CD11a/CD18 陽性細胞の浸潤の時間経過を抗ラット ICAM-1 抗体 (1A29) , 抗ラット CD11a 抗体 (WT1) , 抗ラット CD18 抗体 (WT3) , による免疫組織化学の手法を用いて検討した。

### 実験方法

#### 1) 実験動物：

12 週令の雄性 Wistar ラット (270~320 g) および 10 週令の雌性 Balb/c マウスを静岡実験動物 (株) より購入し, 1 週間以上予備飼育した後, 実験に用いた。

#### 2) 抗接着分子抗体の作成：

抗 ICAM-1 抗体 (1A29), 抗 CD11a 抗体 (WT1), 抗 CD18 抗体 (WT3) は各々の抗体の産生ハイブリドーマを雌性 Balb/c マウスの腹腔内に投与することによって作製した (54-56)。得られた腹水は硫酸-カプロイン酸法, もしくはプロテイン A カラムで粗精製し, 実験に用いた。

#### 3) 免疫組織学的検討：

ラットに一時間の中大脳動脈閉塞を施し, 再灌流 0, 1, 3, 6, 12, 24 時間後にペントバルビタール麻酔下で経心的に生理食塩水で脳を灌流し, OCT compound に凍結包埋した。凍結切片 (6  $\mu$ m) を作成し, 30 分間室温で風乾した後, 使用時まで -75  $^{\circ}$ C で保存した。免疫染色の前に 5 分間, 100% acetone 中で固定した。固定後の切片は PBS で三回洗浄し, 非特異的な抗体の結合を防ぐために 3% 正常馬血清と室温で 30 分間反応させた後, 抗接着分子抗体 (1A29, WT1, WT3) と室温で一時間反応させた。さらに, 0.3% の過酸化水素を含む methanol で内在性の peroxidase を不活化した後, ABC-免疫染色キット (Vector) を使用して発色させた。

## 実験結果

1A29 を用いて免疫染色を行うと、正常脳では弱い ICAM-1 の発現を示す血管が散見されるのみであったが、虚血再灌流後数時間を経て虚血領域の微小血管での ICAM-1 の発現増強が認められた (Fig. 17, Table 2)。すなわち、再灌流一時間後においては正常脳と大差なく弱い ICAM-1 の発現を認めただけであったが、3, 6, 12, 24 時間と時間が経つにつれて微小血管での ICAM-1 の発現は増強した (Fig. 17, Table 2)。

Table 2: Leukocyte infiltration and expression of ICAM-1 on capillary endothelial cells in rat brain after 1 hour of MCAO

	Sham	Time after reperfusion (hours)					
		0	1	3	6	12	24
Leukocyte infiltration*	-	-	-	-	-	+	++
ICAM-1 expression on capillaries†	±	±	±	+	++	++	++

\* The degree of leukocyte infiltration was shown as; -: none, +: mild, ++: moderate.

† The intensity of staining was shown as: ±: weakly positive, +: mildly positive, ++: moderately positive.

WT1 および WT3 を用いて免疫染色を行うと、CD11a, CD18 を発現する好中球の浸潤は正常脳および虚血再灌流 6 時間後までは認められなかったが、12 時間後以降、CD11a, CD18 を強く発現する好中球の傷害部位への浸潤が認められた (Fig. 18, Table 2)。

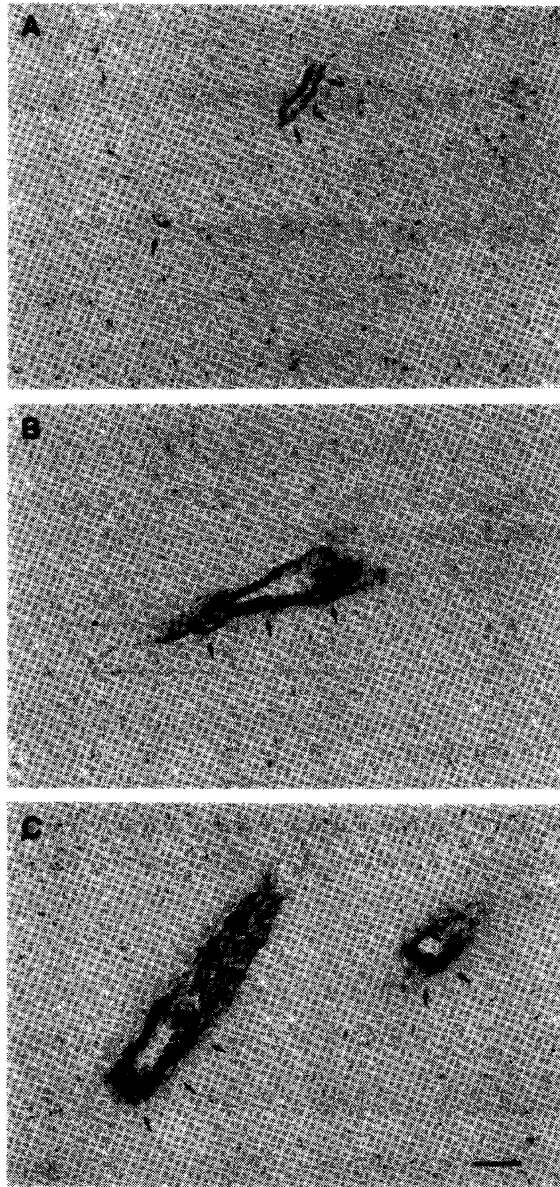


Fig. 17: Immunohistochemical study of ICAM-1 expression (arrows): There was only weak staining for ICAM-1 on the brain parenchymal capillary (A). ICAM-1 like immunoreactivity increased on the capillaries in the ischemic cortex after 6 (B) and 24 (C) hours of reperfusion following 1 hour MCA occlusion. Bar = 50  $\mu$ m.

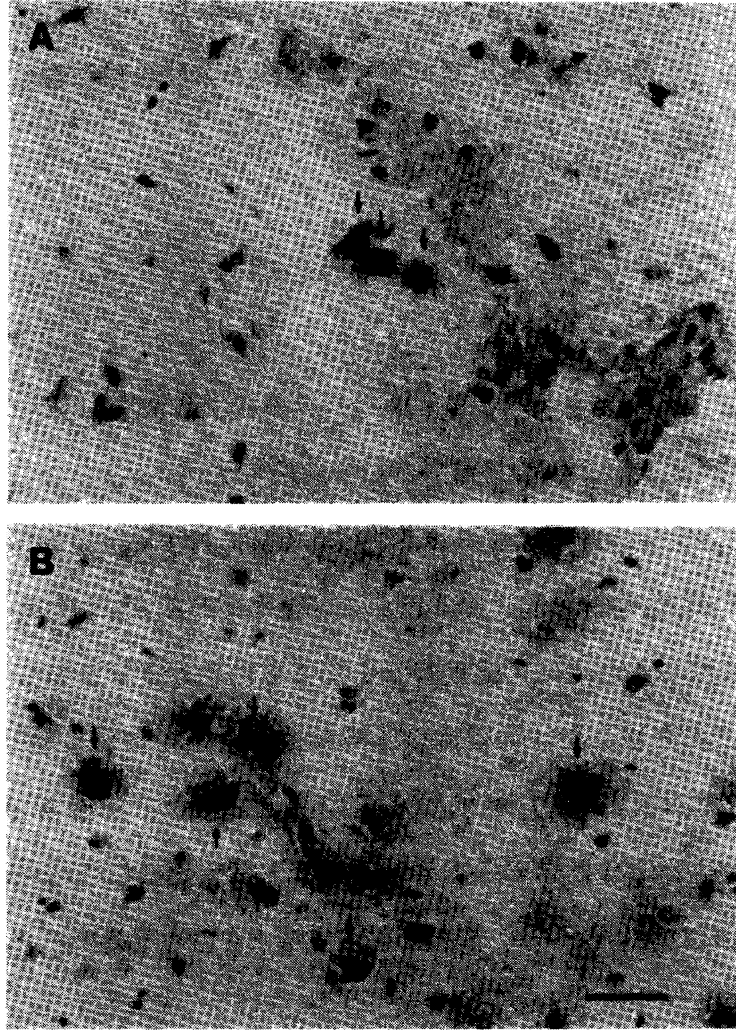


Fig. 18: Immunohistochemical study of CD11a and CD18 expression: Leukocytes began to infiltrate into the ischemic hemisphere between 6 and 12 hours after reperfusion following 1 hour MCA occlusion and almost all infiltrating leukocytes express CD11a and CD18. Photos show the infiltrating leukocytes stained to WT1 (anti-CD11a; A, arrows) and WT3 (anti-CD18; B, arrows) 12 hours after reperfusion. Bar = 20  $\mu$ m.



## 第二節 脳虚血再灌流後の好中球浸潤および組織傷害への接着分子の関与

接着分子に対する中和抗体（anti-ICAM-1; 1A29, anti-CD11a; WT1, anti-CD18; WT3）をラットに投与し、脳虚血再灌流後の好中球浸潤および組織傷害における接着分子の役割について検討した。

### 実験方法

#### 1) 実験動物：

12 週令の雄性 Wistar ラット (270~320 g) を静岡実験動物 (株) より購入し、1 週間以上予備飼育した後、実験に用いた。

#### 2) 脳虚血再灌流後の好中球浸潤および組織傷害に対する抗接着分子抗体の影響：

脳虚血再灌流後の好中球浸潤、脳浮腫および梗塞巣の拡大における細胞接着分子の関与について検討するために、抗接着分子抗体を投与したラットに一時間の中大脳動脈閉塞—再灌流を施した。再灌流 24 時間後に前述の方法に従って、脳組織の MPO 活性、水分含有量および梗塞サイズの測定をした。抗接着分子抗体 (1A29, WT1, WT3) は中大脳動脈閉塞の 15 分前および再灌流直後に 5 mg/rat を腹腔内に投与した。対照群には同用量のリン酸緩衝生理食塩水を投与した。

Table 3: Effects of antibodies on the number of circulating white blood cell and neutrophil.

	white blood cell (/mm <sup>3</sup> )		neutrophil (/mm <sup>3</sup> )	
	before ischemia	24hr after reperfusion	before ischemia	24hr after reperfusion
Vehicle (N=6)	7594±440	7514±271	1693±93	1658±17
1A29 (N=6)	7975±377	7688±408	1623±47	1641±70
WT1 (N=6)	7685±169	8015±324	1689±44	1684±85
WT3 (N=6)	7962±428	7717±420	1631±84	1646±105

## 実験結果

虚血再灌流 24 時間後の好中球浸潤を反映する MPO 活性の上昇は各抗接着分子抗体 (anti-ICAM-1; 1A29, anti-CD11a; WT1, anti-CD18; WT3) の投与によって虚血半球の各部位 (ACA, MCA, caudate putamen) で対照群 (Vehicle) と比較して有意に抑制された (Fig. 19)。なお、抗接着分子抗体の投与によって血中の白血球数および好中球数には変化は見られなかった (Table 3)。

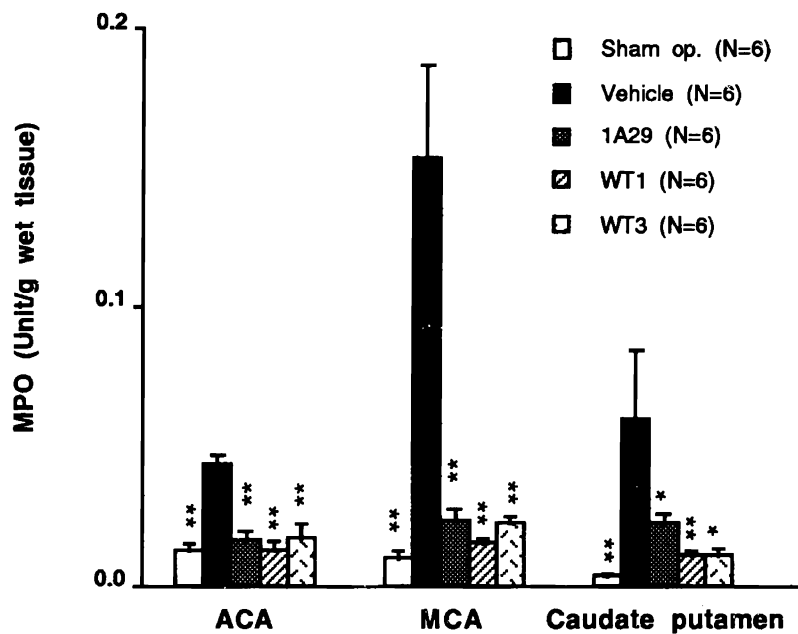


Fig. 19: Graph showing the effects of 1A29 (5 mg/kg, i.p. x 2), WT1 (5 mg/kg, i.p. x 2), and WT1 (5 mg/kg, i.p. x 2) on myeloperoxidase (MPO) activity in anterior cerebral artery (ACA) area, middle cerebral artery (MCA) area, and caudate putamen after 24 hours of reperfusion following 1 hour MCA occlusion. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs vehicle (Dunnett's multiple-range test).

各抗接着分子抗体（1A29, WT1, WT3）の投与は虚血側の脳皮質（ACA, MCA）で脳浮腫の形成を表わす再灌流 24 時間後の脳水分含有量の上昇を対照群と比較して有意に抑制した (Fig. 20)。しかしながら、線条体 (caudate putamen) では脳浮腫の形成を抑制しなかった (Fig. 20)。

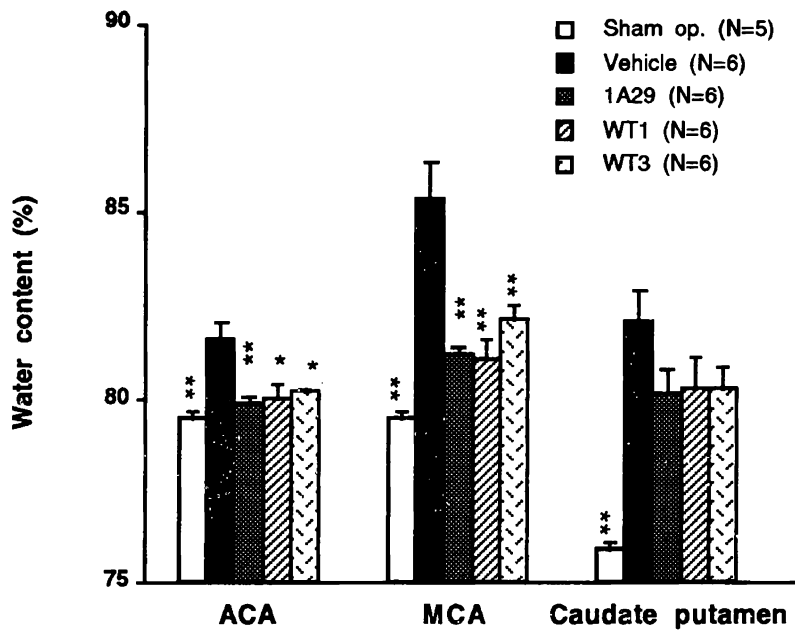


Fig. 20: Graph showing the effects of 1A29 (5 mg/kg, i.p. x 2), WT1 (5 mg/kg, i.p. x 2), and WT3 (5 mg/kg, i.p. x 2) on water content in anterior cerebral artery (ACA) area, middle cerebral artery (MCA) area, and caudate putamen after 24 hours of reperfusion following 1 hour MCA occlusion. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs vehicle (Dunnett's multiple-range test).

さらに、各抗接着分子抗体（1A29, WT1, WT3）の投与は再灌流 24 時間後の梗塞サイズも各冠状断面（bregma 1.7, -0.3, -2.3）で対照群と比較して有意に抑制した（Fig. 21）。

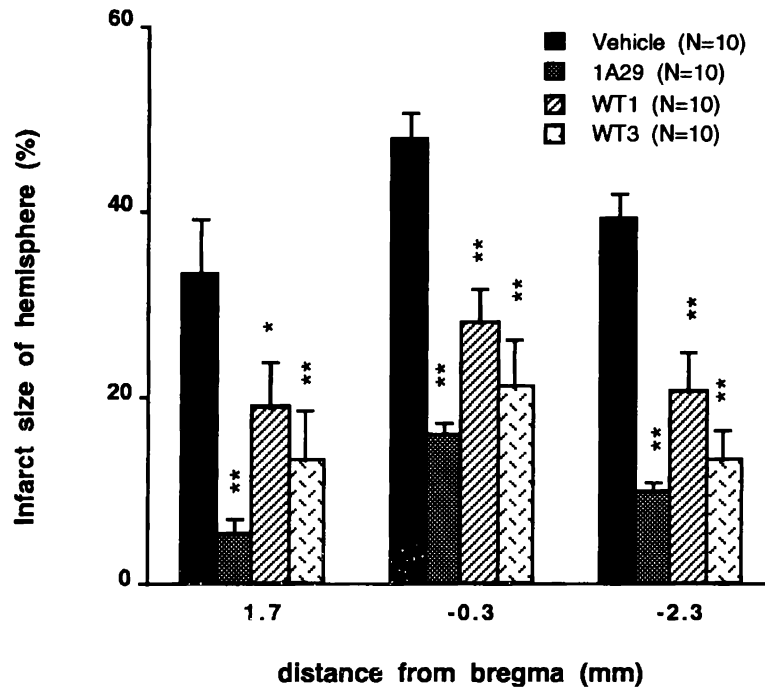


Fig. 21: Graph showing the effects of 1A29 (5 mg/kg, i.p. x 2), WT1 (5 mg/kg, i.p. x 2), and WT3 (5 mg/kg, i.p. x 2) on infarct size (percent against ischemic hemisphere) of coronal level 1.7 mm anterior (bregma 1.7), 0.3 mm posterior (bregma -0.3) and 2.3 mm posterior to bregma (bregma -2.3) after 24 hours of reperfusion following 1 hour MCA occlusion. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs vehicle (Dunnnett's multiple-range test).

### 第三節 考察と小括

#### 考察

Ig superfamily に属する血管内皮細胞上の ICAM-1 は虚血再灌流後の白血球の接着および浸潤の過程に関与することは良く知られている (51,52)。Yamazaki 等 (57) は心臓

の虚血再灌流後に細静脈の血管内皮細胞上で ICAM-1 の発現が増強することを報告している。正常の脳においても、血管内皮細胞およびグリア細胞上に ICAM-1 が発現しており、脳腫瘍および多発性硬化症といった炎症性の疾患で ICAM-1 の発現が増強していることが報告されている (58,59)。近年、Okada 等 (60) はヒヒを用いて二時間の中大脳動脈閉塞再灌流後、1～4 時間後に微小血管で一過性の ICAM-1 の発現の増強が認められることを明らかとした。それに対して、今回のラットを用いた実験では一時間の中大脳動脈閉塞再灌流後、微小血管上に再灌流 3 時間後から 24 時間以上の持続した ICAM-1 の発現増強を認めた。脳虚血再灌流後の ICAM-1 の発現の時間経過は虚血侵襲の度合いや種差によって左右されるのかもしれない。今回の実験では ICAM-1 の発現増強は虚血再灌流後数時間を経て認められた。ICAM-1 の発現には mRNA の合成が不可欠であることが培養ヒト内皮細胞を用いた実験で報告されており (61)、mRNA を介した ICAM-1 の新規合成が発現増強過程の律速段階になっているのかもしれない。

培養細胞系では様々な炎症性のメディエーター (lipopolysaccharide, interferon- $\gamma$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1) によって ICAM-1 の発現が増強することが報告されている (62-66)。しかしながら、in vivo での ICAM-1 の発現機構についての報告はほとんどない。近年、in vitro の系で interleukin-1 (IL-1) が血管内皮細胞上の ICAM-1 の発現を増強し (64)、CD11/CD18 に依存した白血球の内皮細胞への接着を惹起することが報告された (67)。IL-1 は脳組織内の様々な細胞 (microglia, neuron, astrocyte, endothelial cell) で合成されており (68)、虚血や痙攣発作などの侵襲に応答して脳内濃度が増加することが報告されている (69,70)。脳虚血再灌流時の IL-1 の増加が ICAM-1 の発現増強に関与しているのかもしれない。

CD11a および CD11c に比較して、CD11b および CD18 は炎症反応や虚血負荷に速やかに応答して細胞膜表面に増加する (71-73)。そこで、虚血再灌流後の好中球浸潤

に対する CD11b/CD18 (Mac-1) の関与については in vivo においても良く検討されている (57,74,75)。脳虚血傷害についてもウサギの脳塞栓モデルで ICAM-1 および CD18 の中和抗体が神経症状を改善したことが既に報告されている (76,77)。また, Chopp 等 (75) は CD11b に対する中和抗体 (anti-Mac-1) がラットの脳虚血再灌流後の組織傷害の進展を抑制することを明らかにしている。しかしながら, Mac-1 と同じ  $\beta_2$  インテグリンに属する LFA-1 (CD11a/CD18) の脳虚血時の好中球浸潤および組織傷害への関与について検討した報告はなかった。今回の実験で, CD11a, CD18 および ICAM-1 の中和抗体の投与によってラットの脳虚血再灌流後の好中球浸潤および組織傷害の進展が著明に抑制されることが明らかとなった。これらの結果は Mac-1 (CD11b/CD18) 同様に LFA-1 (CD11a/CD18) も脳虚血再灌流後の脳組織への好中球の浸潤および組織傷害の過程に関与していることを強く示唆している。

今回の実験で CD11a, CD18, ICAM-1 に対する中和抗体の投与は脳虚血再灌流後の組織傷害を著明に抑制した。しかしながら, 抗接着分子抗体の脳浮腫に対する効果は大脳皮質 (ACA and MCA areas) に限局されており, 線条体 (caudate putamen) では好中球浸潤が抑制されたにもかかわらず脳浮腫の形成は抑制しなかった。線条体は中大脳動脈閉塞によって虚血の中心部となるのに比較して, 大脳皮質は虚血隣接部および前大脳動脈 (ACA) 等の同側の血管系によって還流され易い部位に位置している。部位による虚血侵襲の度合いの違いが抗接着分子抗体に対する脳浮腫抑制作用の反応性の違いと関連しているのかもしれない。

#### 小括

- 1) 脳虚血再灌流によって微小血管での ICAM-1 の発現が増強した。ICAM-1 の発現が増強した後, CD11a, CD18 を強く発現した白血球の傷害部位への浸潤が認められた。

- 2) 抗接着分子抗体 of 投与によって脳虚血再灌流後の好中球浸潤は著明に抑制された。
- 3) 抗接着分子抗体 of 投与は脳虚血再灌流後の脳浮腫の形成および梗塞サイズの拡大を有意に抑制した。

これらの結果は脳虚血再灌流後の好中球の浸潤および組織傷害の進展の過程に血管内皮細胞上に発現する ICAM-1 と好中球上に発現する LFA-1 (CD11a/CD18) の相互作用が重要であることを強く示唆している。

## 第四章 脳虚血再灌流時の Platelet-activating factor および thromboxane A2 の役割

最近の研究によって血小板活性化因子 (platelet-activating factor, PAF) が脳虚血再灌流傷害に関与することが明らかになりつつある (78,79)。好中球に対する様々な作用 (化学走性, 凝集, 脱顆粒など) に加えて PAF は好中球からの活性酸素の放出を刺激することが報告されている (80,81)。さらに化学走化性を持つペプチドや phorbol ester によって活性化された好中球での活性酸素の産生を PAF は増強することも報告されている (82)。これらの報告は PAF による好中球でのラジカル産生の増強が脳虚血再灌流傷害に関与している可能性を示唆している。近年, Kato 等 (83) は PAF による好中球でのラジカル産生の増強が thromboxane A2 (TXA2) を介した反応であることを明らかとした。そこで第四章では脳虚血再灌流時の好中球の活性化における PAF および TXA2 の関与についてラジカル産生および好中球浸潤を指標として検討した。

### 第一節 脳虚血再灌流傷害への PAF および TXA2 の関与

PAF 拮抗薬 (Y-24180) および TXA2 拮抗薬 (S-1452) の脳虚血再灌流傷害に対する効果について検討した。

### 実験方法

#### 1) 実験動物:

12 週令の雄性 Wistar ラット (270~320 g) を静岡実験動物 (株) より購入し, 1 週間以上予備飼育した後, 実験に用いた。

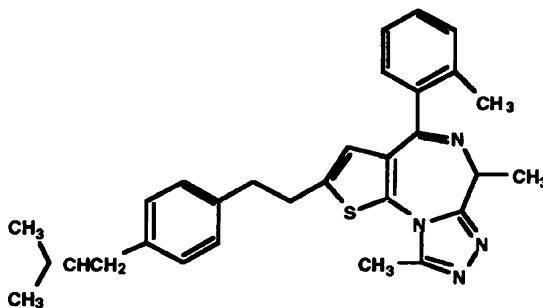
#### 2) 使用薬物:

4-(2-chlorophenyl)-2-[2-(4-isobutylphenyl)ethyl]-6,9-dimethyl-6H-thieno[3,2-f][1,2,4]triazol



lo[4,3-a][1,4]diazepine (Y-24180) を選択的な PAF 受容体の拮抗薬 (84) として, calcium(1R,2S,3S,4S)-(5Z)-(((phenylsulfonyl)aminobicyclo[2.2.1]hept-2-yl)-5-heptanoate dehydrate (S-1452) を選択的な TXA<sub>2</sub> 受容体の拮抗薬 (85) としてそれぞれ使用した (Fig. 22)。Y-24180 および S-1452 は塩野義製薬研究所で合成した。Y-24180 および S-1452 は 0.5% carboxymethylcellulose (CMC) に懸濁してラットに投与した。

**PAF receptor antagonist:  
Y-24180**



**TXA<sub>2</sub> receptor antagonist:  
S-1452**

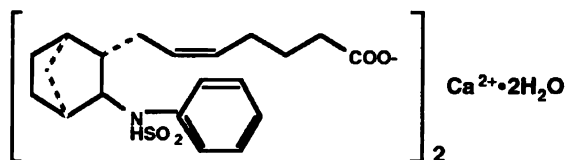


Fig. 22: Chemical structures of Y-24180 and S-1452

3) 脳虚血再灌流傷害に対する Y-24180 および S-1452 の影響:

脳虚血再灌流後の脳浮腫および梗塞巣の拡大における PAF および TXA<sub>2</sub> の関与について検討するために, Y-24180 および S-1452 を投与したラットに一時間の中大脳動脈閉塞—再灌流を施した。再灌流 2 4 時間後に前述の方法に従って, 脳組織の水分含有量および梗塞サイズの測定をした。Y-24180 (1, 3, 10 mg/kg) および S-1452 (5,

10, 50 mg/kg) は中大脳動脈閉塞の15分前に経口投与した。対照群には同用量の0.5% CMC を投与した。

### 実験結果

Y-24180 (1, 3, 10 mg/kg) および S-1452 (5, 10, 50 mg/kg) の投与によって再灌流24時間後の脳浮腫の形成を表わす脳水分含有量の上昇が虚血側の各部位 (ACA, MCA, caudate putamen) で用量依存的に抑制された (Fig. 23, Fig. 24)。その作用は Y-24180 は 3 mg/kg で、S-1452 は 10 mg/kg でそれぞれ最大となった (Fig. 23, Fig. 24)。そこで、以降の実験は抗脳浮腫作用が最大になった用量で行った。

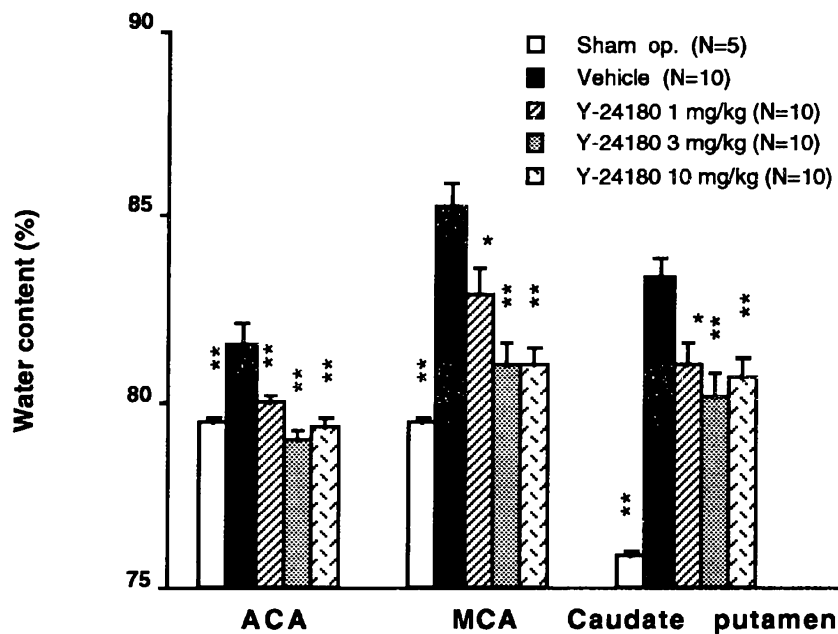


Fig. 23: Graph showing the effect of Y-24180 (1, 3, 10 mg/kg p.o.) on water content of anterior middle cerebral artery (ACA) areas, middle cerebral artery (MCA) areas, and caudate putamen after 24 hours of reperfusion following 1 hour of MCA occlusion. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs vehicle (Dunnett's multiple-range test).

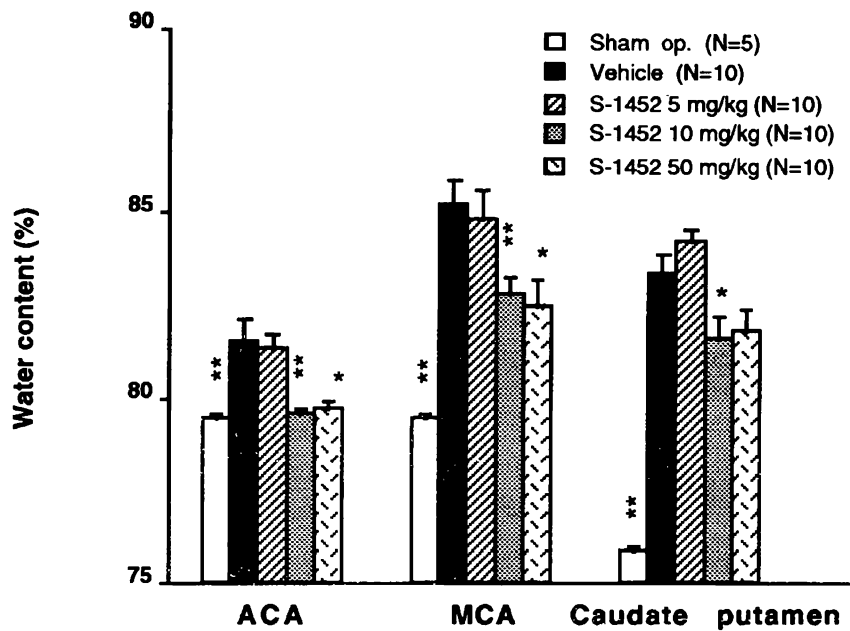


Fig. 24: Graph showing the effect of S-1452 (5, 10, 50 mg/kg p.o.) on water content of anterior middle cerebral artery (ACA) areas, middle cerebral artery (MCA) areas, and caudate putamen after 24 hours of reperfusion following 1 hour of MCA occlusion. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs vehicle (Dunnett's multiple-range test).

さらに、Y-24180 (3 mg/kg) および S-1452 (10 mg/kg) の投与は虚血再灌流 24 時間後の梗塞巣のサイズを各冠状断面 (bregma 1.7, -0.3, -2.3) で対照群と比較して有意に抑制した (Fig. 25)。

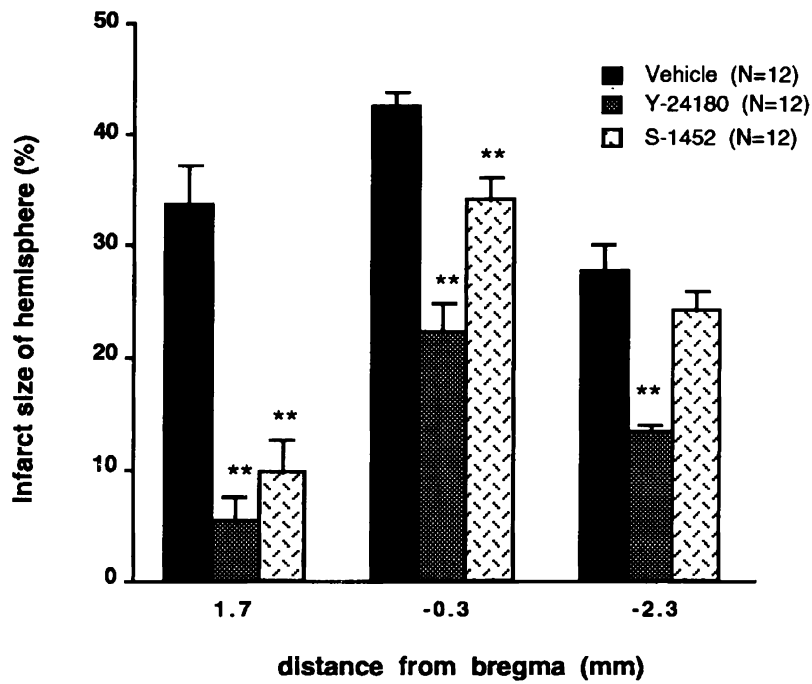


Fig. 25: Graph showing the effects of Y-24180 (3 mg/kg p.o.) and S-1452 (10 mg/kg, p.o.) on infarct size (percent against ischemic hemisphere) of coronal level 1.7 mm anterior (bregma 1.7), 0.3 mm posterior (bregma -0.3) and 2.3 mm posterior to bregma (bregma -2.3) after 24 hours of reperfusion following 1 hour MCA occlusion. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs vehicle (Dunnett's multiple-range test).

## 第二節 脳虚血再灌流時のラジカル産生への PAF および TXA<sub>2</sub> の関与

PAF 拮抗薬 (Y-24180) および TXA<sub>2</sub> 拮抗薬 (S-1452) を用いることによって脳虚血再灌流後のラジカル産生における PAF および TXA<sub>2</sub> の関与について検討した。

### 実験方法

#### 1) 実験動物：

12 週令の雄性 Wistar ラット (270~320 g) を静岡実験動物 (株) より購入し、1 週間以上予備飼育した後、実験に用いた。

#### 2) 使用薬物：

Y-24180 を選択的な PAF 受容体の拮抗薬として、S-1452 を選択的な TXA<sub>2</sub> 受容体の拮抗薬としてそれぞれ使用した。Y-24180 および S-1452 は 0.5% CMC に懸濁してラットに投与した。

#### 3) 脳虚血再灌流傷害に対する Y-24180 および S-1452 の影響：

脳虚血再灌流後のラジカルの産生における PAF および TXA<sub>2</sub> の関与について検討するために、Y-24180 および S-1452 を投与したラットに一時間の中大脳動脈閉塞—再灌流を施した。再灌流 2 4 時間後に前述の方法に従って、虚血部大脳皮質の AR、アスコルビン酸および脳内酸素分圧を測定した。Y-24180 (3 mg/kg) および S-1452 (10 mg/kg) は中大脳動脈閉塞の 1 5 分前に経口投与した。対照群には同用量の 0.5% CMC を投与した。

### 実験結果

対照群では脳虚血再灌流によって二相性の AR の増加が認められた (Fig. 26)。Y-24180 の投与によって再灌流後の AR の増加は第一相および第二相とも完全に抑制された (Fig. 26)。S-1452 の投与も再灌流後の AR の増加を有意に抑制した (Fig. 26)。

特に、再灌流 2 4 時間後の第二相の AR の増加は Y-24180 と同様に S-1452 の投与によっても完全に抑制された (Fig. 26)。

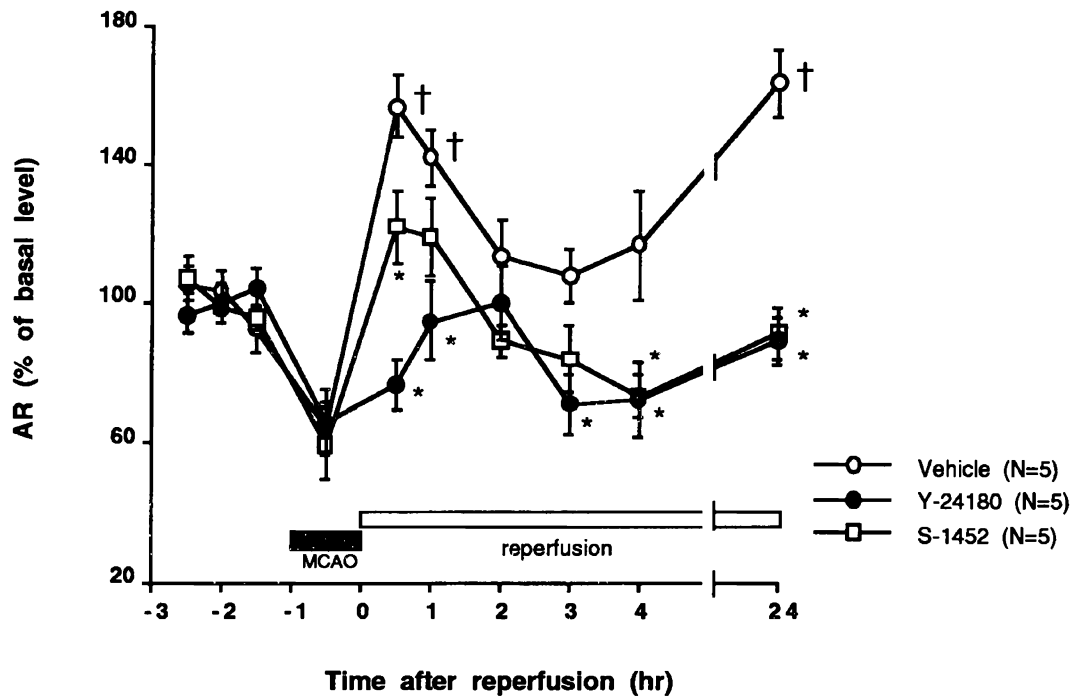


Fig. 26: Graph showing temporal profile of extracellular AR and the effects of Y-24180 (3 mg/kg p.o.) and S-1452 (10 mg/kg, p.o.) under conditions of cerebral ischemia-reperfusion. AR; ascorbyl radical. Each group consisted of 5 animals. Data are presented as the means  $\pm$  SEM. †p<0.05 vs. basal level (unpaired t-test); \*p<0.05 vs. vehicle (Dunnett's multiple-range test).

脳内アスコルビン酸濃度は中大脳動脈閉塞中から有意に上昇し再灌流によって30分、一時間後にはさらに増加した (Fig. 27)。再灌流から4時間後までに前値に復し、24時間後には再び増加していた (Fig. 27)。Y-24180 および S-1452 の投与は虚血再灌流によるアスコルビン酸濃度の変化には何ら影響を与えなかった (Fig. 27)。

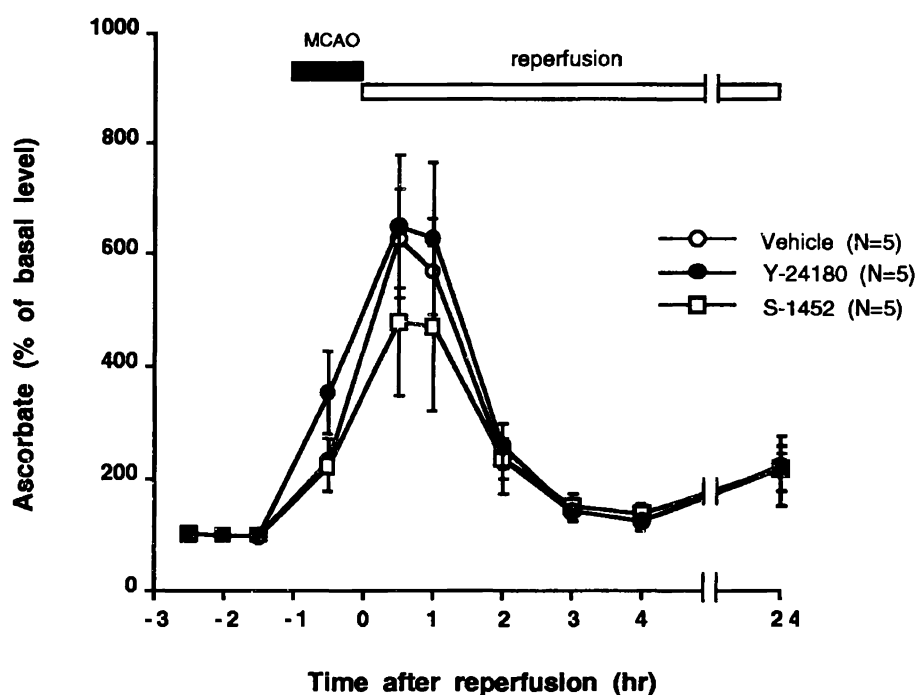


Fig. 27: Graph showing temporal profile of extracellular ascorbate and the effects of Y-24180 (3 mg/kg p.o.) and S-1452 (10 mg/kg, p.o.) under conditions of cerebral ischemia-reperfusion. Each group consisted of 5 animals. Data are presented as the means  $\pm$  SEM.

脳内酸素分圧は MCAO によって  $9.2 \pm 2.0$  % of basal level にまで減少した (Fig. 28)。再灌流によって脳内酸素分圧は前値に比較して有意に上昇し、以降 24 時間後まで緩やかに上昇し続けた (Fig. 28)。Y-24180 および S-1452 の投与は脳虚血再灌流による脳内酸素分圧の変化には影響を及ぼさなかった (Fig. 28)。

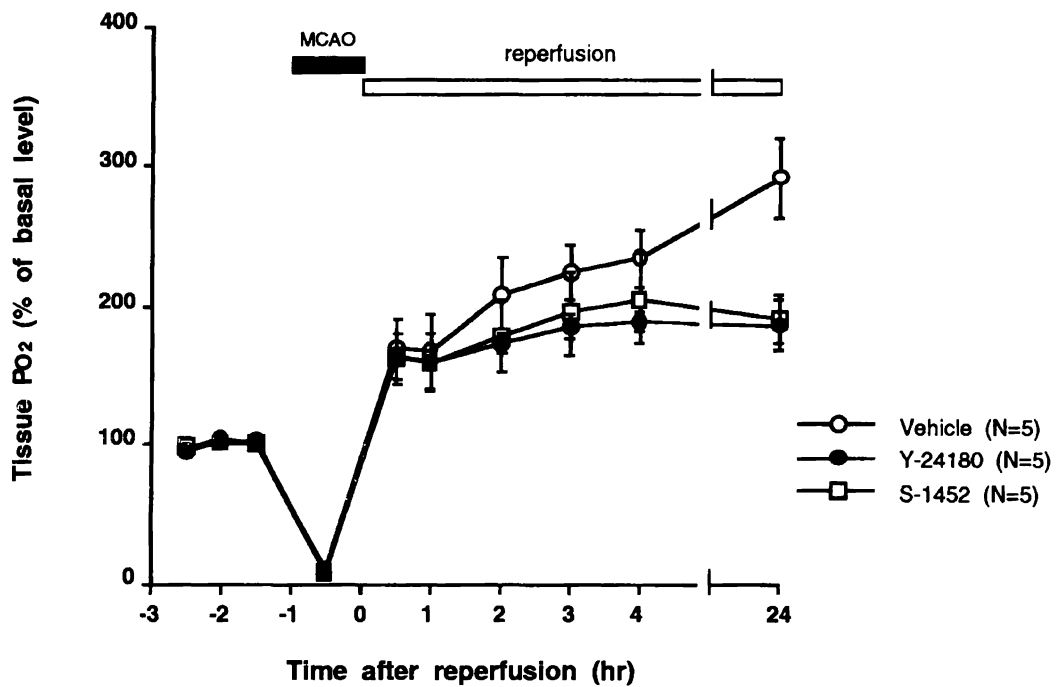


Fig. 28: Graph showing temporal profile of tissue PO<sub>2</sub> and the effects of Y-24180 (3 mg/kg p.o.) and S-1452 (10 mg/kg, p.o.) under conditions of cerebral ischemia-reperfusion. Each group consisted of 5 animals. Data are presented as the means  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs. vehicle (Dunnett's multiple-range test).



### 第三節 脳虚血再灌流後の好中球浸潤への PAF および TXA<sub>2</sub> の関与

近年、PAF および TXA<sub>2</sub> が接着分子の発現および好中球の血管内皮への接着に関与していることが報告されている (71,73,86)。そこで、Y-24180 および S-1452 の投与が脳虚血再灌流後の好中球浸潤に与える影響について検討した。

#### 実験方法

##### 1) 実験動物：

12 週令の雄性 Wistar ラット (270~320 g) を静岡実験動物 (株) より購入し、1 週間以上予備飼育した後、実験に用いた。

##### 2) 使用薬物：

Y-24180 を選択的な PAF 受容体の拮抗薬として、S-1452 を選択的な TXA<sub>2</sub> 受容体の拮抗薬としてそれぞれ使用した。Y-24180 および S-1452 は 0.5% CMC に懸濁してラットに投与した。

##### 3) 脳虚血再灌流傷害に対する Y-24180 および S-1452 の影響：

脳虚血再灌流後の好中球浸潤における PAF および TXA<sub>2</sub> の関与について検討するために、Y-24180 および S-1452 を投与したラットに一時間の中大脳動脈閉塞-再灌流を施した。再灌流 2 4 時間後に前述の方法に従って、虚血側の各部位の MPO 活性を測定した。Y-24180 (3 mg/kg) および S-1452 (10 mg/kg) は中大脳動脈閉塞の 1 5 分前に経口投与した。対照群には同用量の 0.5% CMC を投与した。

#### 実験結果

虚血隣接部にあたる ACA では Y-24180 および S-1452 の投与によって好中球浸潤を反映する虚血再灌流 2 4 時間後の MPO 活性の上昇が対照群と比較して有意に抑制された (Fig. 28)。しかしながら、虚血中心部にあたる MCA および caudate putamen では

Y-24180 および S-1452 の投与によって MPO 活性の上昇は抑制されなかった (Fig. 29)。

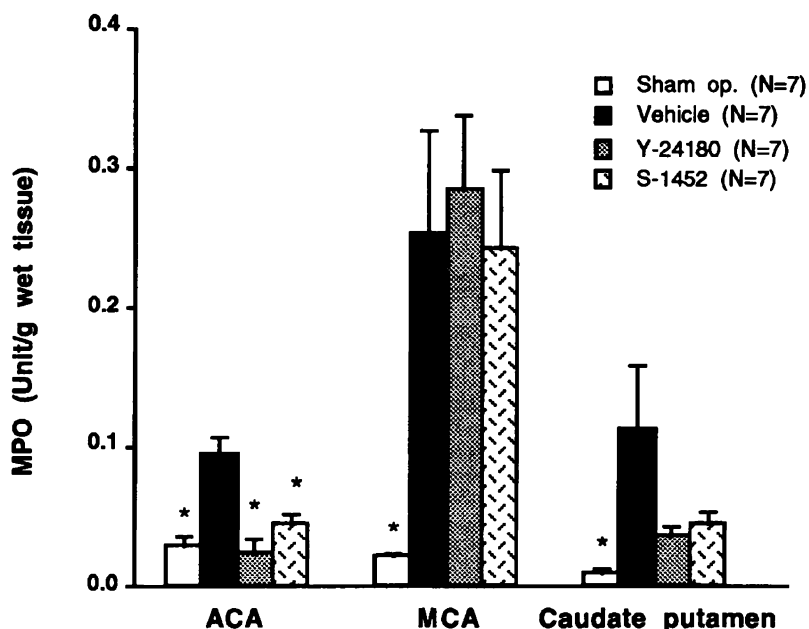


Fig. 29: Graph showing the effects of Y-24180 (3 mg/kg p.o.) and S-1452 (10 mg/kg, p.o.) on myeloperoxidase (MPO) activity in anterior cerebral artery (ACA) area, middle cerebral artery (MCA) area, and caudate putamen after 24 hours of reperfusion following 1 hour MCA occlusion. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs vehicle (Dunnnett's multiple-range test).

#### 第四節 考察と小括

##### 考察

血小板活性化因子 (PAF) は好中球を含む様々な細胞種 (basophil, platelets, monocyte, macrophage, endothelial cell) で産生されており (87,88), 血小板および好中球の活性化や血管透過性の亢進に関与し, 炎症性のメディエーターとして作用すると考えられている (87)。また, PAF は好中球での  $O_2^-$  産生を直接刺激することも報告されている (80,81)。Ko 等 (25) は心臓の虚血再灌流時に PAF が好中球での酸素ラジカルの産生

を刺激することを報告している。脳においても虚血再灌流時に PAF の産生が増加しており (89), PAF 受容体拮抗薬が組織傷害の進展を抑制することが報告されている (78,79)。しかしながら, 脳虚血再灌流時のラジカル産生における PAF の関与について検討されたことはなかった。今回の実験では脳虚血再灌流後の AR の増加が PAF 受容体拮抗薬, Y-24180 の前処置によって完全に抑制された。また, 虚血再灌流後の AR の増加は好中球での酸素ラジカルの産生を反映することを第二章で明らかにしている。これらの結果は脳虚血再灌流時においても PAF を介して好中球でのラジカル産生の増強が起こっていることを強く示唆している。

PAF の PAF 受容体への結合は  $\text{TXA}_2$  の産生を増加させることが報告されている (90)。最近, Kato 等 (83) は PAF による好中球での  $\text{O}_2^-$  の産生増加が  $\text{TXA}_2$  を介した反応であることを明らかにした。そこで, 脳虚血再灌流時のラジカル産生に対する  $\text{TXA}_2$  受容体拮抗薬, S-1452 の影響についても検討した。S-1452 も Y-24180 と同様に虚血再灌流後の AR の増加を著明に抑制した。このことは  $\text{TXA}_2$  も PAF と同様に脳虚血再灌流時のラジカル産生の増加に関与していることを示している。

最近, 虚血再灌流後に CD11/CD18 と ICAM-1 に依存した好中球と内皮細胞の接着が起こることが報告されており, この過程に PAF および PAF によって惹起された活性酸素種が関与していることが明らかとなりつつある (71,73)。また, Ishizuka 等 (86) は  $\text{TXA}_2$  が血管内皮細胞での ICAM-1 の発現に関与することを報告している。これらの報告は PAF および  $\text{TXA}_2$  の脳虚血再灌流後の好中球浸潤への関与を予想させ, Y-24180, S-1452 によるラジカル産生の抑制が好中球の接着および浸潤の減少に因るものである可能性が考えられた。今回の実験において Y-24180 および S-1452 は虚血隣接部 (ACA) での好中球浸潤を有意に抑制したが, ラジカル産生を測定した虚血部の大脳皮質 (MCA) では抑制しなかった。このことは, Y-24180 および S-1452 によるラジカル産生の抑制が好中球からのラジカル産生の抑制を反映したものであること

を示している。今回の実験において、Y-24180 および S-1452 が脳虚血再灌流傷害を著明に抑制することを示したが、虚血中心部での好中球からのラジカル産生抑制作用および虚血隣接部での好中球浸潤抑制作用が Y-24180 および S-1452 による神経細胞保護に関与しているのかもしれない。

#### 小括

- 1) PAF 拮抗薬 (Y-24180) および TXA<sub>2</sub> 拮抗薬 (S-1452) の投与によって脳虚血再灌流後の組織傷害が抑制された。
- 2) Y-24180 および S-1452 は脳内アスコルビン酸濃度および脳内酸素分圧の変化には影響を及ぼさずに、脳虚血再灌流後の虚血部大脳皮質でのラジカル産生の増加を抑制した。
- 3) Y-24180 および S-1452 は虚血隣接部では好中球浸潤を有意に抑制したが、虚血中心部での好中球浸潤には何ら影響を認めなかった。

これらの結果は虚血再灌流時の好中球の活性化に PAF および TXA<sub>2</sub> が関与することを強く示唆している。

## 第五章 総括および結論

### 総括

中枢神経系は免疫学的特権部位と呼ばれ、免疫系の監視を受けない特殊な部位と考えられてきた。そのため、梗塞巣で見られる免疫細胞の浸潤は長い間、単に修復過程の一部と考えられてきた。しかしながら、近年になって脳虚血侵襲後の比較的早期に虚血領域への免疫細胞の浸潤が見られること(13,14)、虚血侵襲によって神経系でのサイトカインの産生が促進することなどが明らかとなり(70,91)、脳虚血傷害の進展における免疫系の役割が注目されつつある。本研究では特に好中球が脳虚血再灌流傷害へどのように関与しているかについてラット中大脳動脈閉塞-再灌流モデルを用いて検討した。

一時間の中大脳動脈閉塞-再灌流後、6～12時間で好中球浸潤が開始し、24～72時間にピークとなり、一週間後には浸潤した好中球は消失していた。脳浮腫を組織傷害の指標とした場合、その進展の時間経過と好中球の浸潤との間に相関が認められた。好中球枯渇抗体 RP3 を用いて血中の好中球を選択的に枯渇したラットでは脳虚血再灌流後の好中球浸潤は認められず、脳浮腫の形成抑制および梗塞巣の縮小が認められた。特に虚血隣接部では脳浮腫の形成は完全に抑制されており、虚血病巣の拡大に好中球の関与が重要であることが推測された。

一時間の中大脳動脈閉塞-再灌流後に虚血部の大脳皮質で酸素ラジカルの産生を反映していると思われる AR の二相性（第一相：0～1時間後、第二相：24時間後）の増加を観察した。好中球枯渇抗体 RP3 を用いて血中の好中球を枯渇することによって二相性の AR 上昇は完全に抑制された。なお、好中球の枯渇は虚血再灌流時のアスコルビン酸濃度および組織内酸素分圧の変化に影響を与えなかった。これらの結果は好中球が脳虚血再灌流後の酸素ラジカルの主要な産生源の一つであることを強く

示唆している。また、好中球浸潤の時間経過から考えると、ラジカルの産生増加の第一相には循環血中の好中球が、第二相には組織内に浸潤した好中球がそれぞれ関与していることが予想された。

一時間の中大脳動脈閉塞再灌流によって再灌流3時間後から24時間以上の持続した微小血管でのICAM-1の発現増強が認められた。ICAM-1の発現が増強した再灌流12時間以降、CD11a, CD18を強く発現した好中球の傷害部位への浸潤が認められた。抗接着分子抗体 (anti-ICAM-1, anti-CD11a, anti-CD18) の投与は脳虚血再灌流後の好中球浸潤を抑制しただけではなく、脳組織傷害の進展も有意に抑制した。これらの結果は脳虚血再灌流後の好中球の浸潤および組織傷害の進展の過程に血管内皮細胞上に発現するICAM-1と好中球上に発現するLFA-1 (CD11a/CD18) の相互作用が重要であることを強く示唆している。

最近、虚血再灌流時の好中球からのラジカルの放出に細胞接着分子を介した内皮細胞との接着が重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある(26,92)。また、虚血再灌流時に発生する活性酸素種が細胞接着分子の発現の増強と好中球の内皮細胞への接着および組織浸潤の過程に関与することも報告されている(73,93)。脳虚血再灌流後の好中球でのラジカル産生、接着分子の発現増強および好中球の組織内浸潤が相互に如何に関連しているかを明らかにすることが組織傷害の機構を理解するために必要だと思われる。

PAF受容体拮抗薬(Y-24180)およびTXA<sub>2</sub>受容体拮抗薬(S-1452)が脳虚血再灌流後のラジカル産生および虚血隣接部での好中球浸潤を抑制した結果は好中球の活性化の過程にPAFおよびTXA<sub>2</sub>を介したメカニズムが存在することを強く示唆している。また逆にY-24180およびS-1452による好中球機能の抑制が両薬剤の脳虚血再灌流傷害の抑制作用のメカニズムとして関与しているのかもしれない。

今回の実験で好中球が脳虚血再灌流傷害の進展に重要な役割を演じていることが明

らかになった。また、好中球の活性化を様々な方法で抑制することによって、脳虚血再灌流後の組織傷害の進展を抑制できることも明らかとなった。一方、免疫細胞は傷害組織の修復過程に深く関与することは広く理解されている。虚血再灌流後の好中球浸潤は組織の傷害過程であると同時に修復過程の第一段階として関与している可能性も考えられる。組織傷害後の修復過程における好中球の関与については今後検討しなければならない課題である。

### 結論

- 1) 脳虚血再灌流後の組織傷害の進展と好中球浸潤の時間経過は良く相関しており、好中球を枯渇することにより組織傷害が抑制されたことから脳虚血再灌流傷害の進展に好中球が重要な役割を果たすことが明らかとなった。
- 2) 脳虚血再灌流によって活性化された好中球は活性酸素種を放出することで組織傷害の進展に寄与することが推測された。
- 3) 脳虚血再灌流後の好中球の浸潤および組織傷害の過程において血管内皮上の ICAM-1 と好中球上のインテグリンの結合が重要なステップとなることが明らかとなった。
- 4) 脳虚血再灌流時の好中球の活性化に PAF および TXA<sub>2</sub> が関与することが明らかとなった。

上記の結果は虚血再灌流傷害の進展における好中球の関与を明確にするとともに好中球の組織侵入と活性化を最小限にとどめる方法が虚血性脳血管障害の新しい治療法となる可能性を示唆するものである。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました恩師、大阪大学薬学部・馬場明道教授に深甚なる謝意を表します。また、ラット中大脳動脈閉塞-再灌流モデルにおける実験を御指導頂き、常に本研究を激励して頂きました関東脳外科病院神経病理研究所・小暮久也博士ならびに東北大学医学部神経内科教室・小野寺宏博士に深謝いたします。さらに、好中球枯渇抗体 RP3 産生ハイブリドーマを供与して頂いた山形大学医学部・仙道富士郎教授ならびに各種抗接着分子抗体産生ハイブリドーマを供与して頂いた大阪大学医学部附属バイオメディカル教育研究センター・宮坂昌之教授に深謝いたします。

また、本研究の機会を与えて頂いた塩野義製薬株式会社創薬第二研究所長・有田斉博士ならびに同研究所病態薬理部門長・米谷行男博士、この間、御指導、御討論をして頂きました同研究所・二宮光義博士に心より感謝いたします。併せて、実験に際し多大な御協力と御助言を頂きました塩野義製薬株式会社企画部・池田正人博士、同創薬第二研究所・木原毅博士ならびに諸氏に感謝の意を表します。



## 参考文献

- 1 ) Mohr, J.P., Caplan, L.R., Melski, J.W., Goldstein, R.J., Duncan, G.W., Kistler, J.P., Pessin, M.S. and Bleich, H.L., The Harvard Cooperative stroke registry: a prospective registry, *Neurology*, 28 (1978) 754-762.
- 2 ) Jorgensen, M.B. and Diemer, N.H., Selective neuron loss after cerebral ischemia in the rat: possible role of transmitter glutamate, *Acta Neurol. Scand.*, 66 (1982) 536-546.
- 3 ) Rothman, S.M. and Olney J.W., Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage, *Ann. Neurol.*, 19 (1986) 105-111.
- 4 ) Braunwald, E. and Kloner, R.A., Myocardial reperfusion: a double-edged sword?, *J. Clin. Invest.*, 76 (1985) 1713-1719.
- 5 ) Nagasawa, H. and Kogure, K., Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion, *Stroke*, 20 (1989) 1037-1043.
- 6 ) Granger, D.N., Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury, *Am. J. Physiol.*, 255 (1988) H1269-H1275.
- 7 ) Harlan, J.M., Leukocyte-endothelial interactions, *Blood*, 65 (1985) 513-525.
- 8 ) Lucchesi, B.R., Werns, S.W. and Fantone, J.C., The role of the neutrophil and free radicals in ischemic myocardial injury, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 21 (1989) 1241-1261.
- 9 ) Mullane, K.M., Westlin, W. and Kraemer, R., Activated neutrophils release mediators that may contribute to myocardial dysfunction associated with ischemia and reperfusion. In *Biology of the Leukotriens*, Acad.Sci., New York, 1988, pp. 103-121.
- 1 0 ) Bradley, P.P., Priebat, D.A., Christensen, R.D. and Rothstein, G., Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker, *J. Invest. Dermatol.*, 78 (1982) 206-209.
- 1 1 ) Smith, E.F., Egan, J.W., Bugelski, P.J., Hillegass, L.M., Hill, D.E. and Griswold,

- D.E., Temporal relation between neutrophil accumulation and myocardial reperfusion injury, *Am. J. Physiol.*, 255 (1988) H1060-1068.
- 1 2 ) Hillegass, L.M., Griswold, D.E., Brickson, B., and Albrightson-Winslow, C., Assessment of myeloperoxidase activity in whole rat kidney, *J. Pharmacol. Methods*, 24 (1990) 285-295.
  - 1 3 ) Barone, F.C., Hillegass, L.M., Price, W.J., White, R.F., Feuerstein, G.Z., Sarau, H.M., Clark, R.K. and Griswold, D.E., Polymorphonuclear leukocyte infiltration into cerebral focal ischemic tissue: myeloperoxidase activity assay and histologic verification, *J. Neurosci. Res.*, 29 (1991) 336-348.
  - 1 4 ) Barone, F.C., Schmidt, D.B., Hillegass, L.M., Price, W.J., White, R.F., Feuerstein, G.Z., Clark, R.K., Lee, E.V., Griswold, D.E. and Sarau, H.M., Reperfusion increases neutrophils and leukotriene B4 receptor binding in rat focal ischemia, *Stroke*, 23 (1992) 1337-1348.
  - 1 5 ) Longa, E.Z., Weinstein, P.R., Carlson, S. and Cummins, R., Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats, *Stroke*, 20 (1989) 84-91.
  - 1 6 ) Koizumi, J., Yoshida, Y., Nakazawa, T. and Ooneda, G., Experimental studies of ischemic brain edema. 1. a new experimental of cerebral embolism in rats which recirculation can be introduced in ischemic area, *Jpn. J. Stroke*, 8 (1986) 1-7.
  - 1 7 ) Sekiya, S., Gotoh, S., Yamashita, T., Watanabe, T., Saitoh, S. and Sendo, F., Selective depletion of rat neutrophils by in vivo administration of a monoclonal antibody, *J. Leukocyte Biol.*, 46 (1989) 96-102.
  - 1 8 ) Sekiya, S., Yamashita, T. and Sendo, F., Suppression of late phase enhanced vascular permeability in rats by selective depletion of neutrophils with a monoclonal antibody, *J. Leukocyte Biol.*, 48 (1990) 258-265.
  - 1 9 ) Bos, A., Wever, R. and Roos, D., Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes, *Biochim. Biophys. Acta.*, 525 (1978) 37-44.

- 2 0 ) Groggaard, B., Schurer, L., Gerdin, B. and Arfors, K., Delayed hypoperfusion after incomplete forebrain ischemia in the rat: the role of polymorphonuclear leukocytes, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 9 (1989) 500-505.
- 2 1 ) Mori, E., del Zoppo, G.J., Chambers, J.D., Copeland, B.R. and Arfors, K.E., Inhibition of polymorphonuclear leukocyte adherence suppresses no-reflow after focal cerebral ischemia in baboons, *Stroke*, 23 (1992) 712-718.
- 2 2 ) Hall, E.D. and Braughler, J.M., Central nervous system trauma and stroke, II Physiological and pharmacological evidence for involvement of oxygen radicals and lipid peroxidation, *Free Radic. Biol. Med.*, 6 (1989) 303-313.
- 2 3 ) He, Y.Y., Hsu, C.Y., Ezrin, A.M. and Miller, M.S., Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase in focal cerebral ischemia-reperfusion, *Am. J. Physiol.*, 265 (1993) H252-H256.
- 2 4 ) Liu, T.H., Beckman, J.S., Freeman, B.A., Hogan, E.L. and Hsu, C.Y., Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury, *Am. J. Physiol.*, 256 (1989) H589-H593.
- 2 5 ) Ko, W., Hawes, A.S., Lazenby, W.D., Calvano, S.E., Shin, Y.T., Zelano, J.A., Antonacci, A.C., Isom, O.W. and Krieger, K.H., Myocardial reperfusion injury: platelet-activated factor stimulates polymorphonuclear leukocyte hydrogen peroxide production during myocardial reperfusion, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 102 (1991) 297-308.
- 2 6 ) Nilsson, U.A., Schoenberg, M.H., Aneman, A., Poch, B., Magadum, S., Beger, H.G. and Lundgren, O., Free radicals and pathogenesis during ischemia and reperfusion of the cat small intestine, *Gastroenterology*, 106 (1994) 629-636.
- 2 7 ) Phillis, J.W. and Sen, S., Oxypurinol attenuates hydroxyl radical production during ischemia/reperfusion injury of the rat cerebral cortex: an ESR study, *Brain Res.*, 628 (1993) 309-312.

- 2 8 ) Zini, I., Tomasi, A., Grimaldi, A., Vannini, V. and Agnati, L.F., Detection of free radicals during brain ischemia and reperfusion by spin trapping and microdialysis, *Neurosci. Lett.*, 138 (1992) 279-282.
- 2 9 ) Pellegrino, L.J., Pellegrino, A.S. and Cushman, A.J., *A stereotaxic atlas of the rat brain*, Plenum Press, New York, 1979.
- 3 0 ) Geigert, J., Hirano, D. and Neidleman, S., High-performance liquid chromatographic method for the determination of L-ascorbic acid and D-isoascorbic acid, *J. Chromatogr.*, 206 (1981) 396-399.
- 3 1 ) Buettner, G.R., Ascorbate oxidation: UV absorbance of ascorbate and ESR spectroscopy of the ascorbyl radical as assays for iron, *Free Radic. Res. Commun.*, 9 (1990) 980-984.
- 3 2 ) Buettner, G.R. and Jurkiewicz, B.A., Ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: an EPR study, *Free Radic. Biol. Med.*, 14 (1993) 49-55.
- 3 3 ) Buettner, G.R., The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol and ascorbate, *Arch. Biochem. Biophys.*, 300 (1993) 535-543.
- 3 4 ) Frei, B., Stocker, C. and Ames, B.N., Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 (1988) 9748-9752.
- 3 5 ) Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C., The antioxidants of human extracellular fluids, *Arch. Biochem. Biophys.*, 280 (1990) 1-8.
- 3 6 ) Pietri, S., Culcasi, M., Stella, L. and Cozzone, P., Ascorbyl free radical as a reliable indicator of free radical-mediated myocardial ischemia and post-ischemic injury: a real-time continuous flow ESR study, *Eur. J. Biochem.*, 193 (1990) 845-854.
- 3 7 ) Sharma, M.K., Buettner, G.R., Spencer, K.T. and Kerber, R.E., Ascorbyl free radical as a real time marker of free radical generation in briefly ischemic and reperfused hearts: an electron paramagnetic resonance study, *Circ. Res.*, 74 (1994) 650-658.
- 3 8 ) Demopoulos, H.B., Flamm, E.S., Pietronigro, D.D. and Seligman, M.L., The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders, *Acta*

- Physiol. Scand. Suppl., 492 (1980) 91-118.
- 3 9 ) Moser, U., Uptake of ascorbic acid by leukocytes, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 498 (1987) 200-215.
- 4 0 ) Kihara, T., Sakata, S. and Ikeda, M., Role of free radicals in excitatory amino acids-induced neurotoxicity: direct detection of ascorbate radical in freely moving rats. In: *Oxygen radicals* (Yagi, K., Kondo, M. and Niki, E., eds), Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1992, pp429-432
- 4 1 ) Badwey, J.A. and Karnovsky, M.L., Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes, *Ann. Rev. Biochem.*, 49 (1980) 695-726.
- 4 2 ) Kukreja, R.C. and Hess, M.L., The oxygen free radical system: from equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection, *Cardiovasc. Res.*, 26 (1992) 641-655.
- 4 3 ) Weiss, S.J., Tissue destruction by neutrophils, *N. Eng. J. Med.*, 320 (1989) 365-376.
- 4 4 ) McCord, J.M., Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury, *N. Eng. J. Med.*, 312 (1985) 159-163.
- 4 5 ) Betz, A.L., Identification of hypoxanthine transport and xanthine oxidase activity in brain capillaries, *J. Neurochem.*, 44 (1985) 574-579.
- 4 6 ) Betz, A.L., Randall, J. and Martz, D., Xanthine oxidase is not a major source of free radicals in focal ischemia, *Am. J. Physiol.*, 260 (1991) H563-H568.
- 4 7 ) Lindsay, S., Liu, T.H., Xu, J., Marshall, P.A., Thompson, J.K., Parks, D.A., Freeman, B.A., Hsu, C.Y. and Beckman, J.S., Role of xanthine dehydrogenase and oxidase in focal cerebral ischemic injury to rat, *Am. J. Physiol.*, 261 (1991) H2051-H2057.
- 4 8 ) Furie, M.B., Naprstek, B.L. and Silverstein, S.C., Migration of neutrophils across monolayers of cultured microvascular endothelial cells, *J. Cell. Sci.*, 88 (1987) 161-175.
- 4 9 ) Furie, M.B. and McHugh, D.D., Migration of neutrophils across endothelial monolayers is stimulated by treatment of the monolayers with interleukin-1 or tumor necrosis factor- $\alpha$ , *J.*

Immunol., 143 (1989) 3309-3317.

- 5 0 ) Simmons, R.D. and Cattle, B.A., Sialyl ligands facilitate lymphocyte accumulation during inflammation of the central nervous system, *J. Neuroimmunol.*, 41 (1992) 123-130.
- 5 1 ) Diamond, M.S., Staunton, D.E., deFougerolles, A.R., Stacker, S.A., Garcia-Aguilar, J., Hibbs, M.L. and Springer, T.A., ICAM-1 (CD54): a counter receptor for Mac-1 (CD11b/CD18), *J. Cell. Biol.*, 111 (1990) 3129-3139.
- 5 2 ) Smith, C.W., Marlin, S.D., Rothlein, R., Toman, C. and Anderson, D.C., Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro, *J. Clin. Invest.*, 83 (1989) 2008-2017.
- 5 3 ) Sanchez-Madrid, F., Nagy, J.A., Robinson, E., Simon, P. and Springer, T.A., A human leukocyte differentiation antigen family with distinct  $\alpha$ -subunits and a common  $\beta$ -subunit: the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac-1) and the p150,95 molecule, *J. Exp. Med.*, 158 (1983) 1785-1803.
- 5 4 ) Tamatani, T. and Miyasaka, M., Identification of monoclonal antibodies reactive with the rat homolog of ICAM-1, and evidence for a differential involvement of ICAM-1, in the adherence of resting versus activated lymphocytes to high endothelial cells, *International Immunol.*, 2 (1990) 165-171.
- 5 5 ) Tamatani, T., Kotani, M. and Miyasaka, M., Characterization of the rat leukocyte integrin, CD11/CD18, by the use of LFA-1 subunit-specific monoclonal antibodies, *Eur. J. Immunol.*, 21 (1991) 627-633.
- 5 6 ) Tamatani, T., Kotani, M., Tanaka, T. and Miyasaka, M., Molecular mechanisms underlying lymphocyte recirculation. II. Differentiation regulation of LFA-1 in the interaction between lymphocytes and high endothelial cells, *Eur. J. Immunol.*, 21 (1991) 855-858.
- 5 7 ) Yamazaki, T., Seko, Y., Tamatani, T., Miyasaka, M., Yagita, H., Okumura, K., Nagai, R.

- and Yazaki, Y., Expression of intercellular adhesion molecule-1 in rat heart with ischemia/reperfusion and limitation of infarct size by treatment with antibodies against cell adhesion molecules, *Am. J. Pathol.*, 143 (1993) 410-418.
- 5 8 ) Cannella, B., Cross, A.H. and Raine, C.S., Adhesion-related molecules in the central nervous system. Upregulation correlates with inflammatory cell influx during relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis, *Lab. Invest.*, 65 (1991) 23-31.
- 5 9 ) Rosler, K., Neuchrist, C., Kitz, K., Scheiner, O., Kraft, D. and Lassmann, H., Expression of leukocyte adhesion molecules at the human blood-brain barrier (BBB), *J. Neurosci. Res.*, 491 (1992) 365-374.
- 6 0 ) Okada, Y., Copeland, P.R., Mori, E., Tung, M., Thomas, W.S. and del Zoppo, G.J., P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion, *Stroke*, 25 (1994) 202 - 211.
- 6 1 ) Sugama, Y., Tirupathi, C., Janakidevi, K., Anderson, T.T., Fenton, J.W., II and Malik, A.B., Thrombin-induced expression of endothelial P-selectin and intercellular adhesion molecule-1: a mechanism for stabilizing neutrophil adhesion, *J. Cell. Biol.*, 119 (1992) 935-944.
- 6 2 ) Birdsall, H.H., Induction of ICAM-1 on human neural cells and mechanisms of neutrophil-mediated injury, *Am. J. Pathol.*, 139 (1991) 1341-1350.
- 6 3 ) Birdsall, H.H., Lane, C., Ramser, M.N. and Anderson, D.C., Induction of VCAM-1 and ICAM-1 on human neural cells and mechanism of mononuclear leukocyte adherence, *J. Immunol.*, 148 (1992) 2717-2723.
- 6 4 ) Dustin, M.L., Rothlein, R., Bhan, A.K., Dinarello, C.A. and Springer, T.A., Induction by IL1 and Interferon-g: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1), *J. Immunol.*, 137 (1986) 245-254.
- 6 5 ) Piera-Smith, T.H., Broketa, G., Hand, A. and Korn, J.H., Regulation of ICAM-1 expression and function in human dermal fibroblasts by IL-4, *J. Immunol.*, 148 (1992)

1375-1381.

- 6 6 ) Wong, D. and Dorovini-Zis, K., Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide, *J. Neuroimmunol.*, 39 (1992) 11-22.
- 6 7 ) Arnaout, M.A., Lanier, L.L. and Faller, D.V., Relative contribution of the leukocyte molecules Mo1, LFA-1, and p150,95 (LeuM5) in adhesion of granulocytes and monocytes to vascular endothelium is tissue- and stimulus-specific, *J. Cell. Physiol.*, 137 (1988) 305-309.
- 6 8 ) Lechan, R.M., Clark, T.B.D., Cannon, J.G., Shaw, A.R., Dinarello, C.A. and Reichlin, S., Immunoreactive IL-1  $\beta$  localization in the rat forebrain, *Brain Res.*, 514 (1990) 135-140.
- 6 9 ) Minami, M., Kuraishi, Y., Yamaguchi, T., Nakai, S., Hirai, Y. and Satoh, M., Convulsants induce interleukin-1  $\beta$  mRNA in the rat hypothalamus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171 (1990) 832-837.
- 7 0 ) Minami, M., Kuraishi, Y., Yabuuchi, K., Yamazaki, K. and Satoh, M., Induction of interleukin-1  $\beta$  mRNA in rat brain after transient forebrain ischemia, *J. Neurochem.*, 58 (1992) 390-392.
- 7 1 ) Arnould, T., Michiels, C. and Remacle, J., Increased PMN adherence on endothelial cells after hypoxia: involvement of PAF, CD18/CD11b, and ICAM-1, *Am. J. Physiol.*, 264 (1993) C1102-C1110.
- 7 2 ) Vedder, N.B. and Harlan, J.M., Increased surface expression of CD11b/CD18 (Mac-1) is not required for stimulated adherence to cultured endothelium, *J. Clin. Invest.*, 81 (1988) 676-682.
- 7 3 ) Yoshida, N., Granger, D.N., Anderson, D.C., Rothlein, R., Lane, C. and Kvietys, P.R., Anoxia/reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells, *Am. J. Physiol.*, 262 (1992) H1891-H1898.



- 7 4 ) Seekamp, A., Mulligan, M.S., Till, G.O., Smith, C.W., Miyasaka, M., Tamatani, T., Todd III, R.F. and Ward, P.A., Role of  $\beta 2$  integrins and ICAM-1 in lung injury following ischemia-reperfusion of rat hind limbs, *Am. J. Pathol.*, 143 (1993) 464-472.
- 7 5 ) Chopp, M, Zhan, R.L., Chen, H., Li, Y., Jiang, N. and Rusche, R., Postischemic administration of an anti-Mac-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in rats, *Stroke*, 25 (1994) 869-876.
- 7 6 ) Bowes, M.P., Zivin, J.A. and Rothlein, R., Monoclonal antibody to the ICAM-1 adhesion site reduces neurological damage in a rabbit cerebral embolism stroke model, *Exp. Neurol.*, 119 (1993) 215-219.
- 7 7 ) Clark, W.M., Madden, K.P., Rothlein, R. and Zivin, J.A., Reduction of central nervous system ischemic injury in rabbits using leukocyte adhesion antibody treatment, *Stroke*, 22 (1991) 877-883.
- 7 8 ) Oberpichler, H., Sauer, D., Rossberg, C., Mennel, H.D. and Klieglstein, J., PAF antagonist ginkgolide B reduces postischemic neuronal damage in rat brain hippocampus, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 10 (1990) 133-135.
- 7 9 ) Panetta, T., Marcheselli, V.L., Braquet, P., Spinnewyn, B., Bazan, N.G., Effects of platelet activating factor antagonist (BN52021) on free fatty acids, diacylglycerols, polyphosphoinositides and blood flow in the gerbil brain: inhibition of ischemia-reperfusion induced cerebral injury, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 149 (1987) 580-587.
- 8 0 ) Shaw, J.O., Pinkard, R.N., Ferrigni, K.S., McManus, L.M. and Hanahan, D.J., Activation of human neutrophils with 1-O-hexadecylphosphorylcholine (platelet activating factor), *J. Immunol.*, 129 (1981) 1250-1255.
- 8 1 ) Smith, R.J., Bowman, B.J. and Iden, S.S., Stimulation of the human neutrophil superoxide anion-generating system with 1-O-hexadecyl/octadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine, *Biochem. Pharmacol.*, 33 (1984) 973-978.

- 8 2 ) Vercellotti, G.M., Yin, H.Q., Gustafson, K.S., Nelson, R.D. and Jacob, H.S., Platelet-activating factor primes neutrophil responses to agonists: role in promoting neutrophil-mediated endothelial damage, *Blood*, 71 (1988) 1100-1107.
- 8 3 ) Kato, M., Tokuyama, K., Morikawa, A., Kuroume, T. and Barnes, P.J., Platelet-activating factor-induced enhancement of superoxide anion generation in guinea-pigs, *Eur. J. Pharmacol.*, 232 (1993) 7-12.
- 8 4 ) Takehara, S., Mikashima, H., Muramoto, Y., Terasawa, M., Setoguchi, M. and Tahara, T., Pharmacological actions of Y-24180, a new specific antagonist of platelet activating factor (PAF): II. Interactions with PAF and benzodiazepine receptors, *Prostaglandins*, 40 (1990) 571-583.
- 8 5 ) Ohtani, M., Matsuura, T., Watanabe, F. and Narisada, M., Enantioselective synthesis of S-1452, an orally active potent thromboxane A<sub>2</sub> receptor antagonist, *J. Org. Chem.*, 56 (1991) 2122-2127.
- 8 6 ) Ishizuka, T., Suzuki, K., Kawakami, M., Kawaguchi, Y., Hidaka, T., Matsuki, Y. and Nakamura, H., DP-1904, a specific inhibitor of thromboxane A<sub>2</sub> synthesizing enzyme, suppresses ICAM-1 expression by stimulated vascular endothelial cells, *Eur. J. Pharmacol.*, 262 (1994) 113-123.
- 8 7 ) Braquet, P., Touqui, L., Shen, T.Y. and Vargaftig, B.B., Perspectives in platelet-activating factor research, *Pharmacol. Rev.*, 39 (1987) 97-145.
- 8 8 ) Yue, T.L., Lysko, P.G. and Feuerstein, G., Production of platelet-activating factor from rat cerebellar granule cells in culture, *J. Neurochem.*, 54 (1990) 1809-1811.
- 8 9 ) Kumar, R., Harvey, S., Kester, N., Hanahan, D. and Olson, M., Production and effects of platelet-activating factor in the rat brain, *Biochim. Biophys. Acta.*, 963 (1988) 375-383.
- 9 0 ) Salzer, W.L. and McCall, C.E., Primed stimulation of isolated perfused rabbit lung by endotoxin and platelet-activating factor induces enhanced production of thromboxane and lung injury, *J. Clin. Invest.*, 85 (1990) 1135-1143.

- 9 1 ) Yamasaki, Y., Matsuo, Y., Matsuura, N., Onodera, H., Itoyama, Y. and Kogure, K.,  
Transient increase of cytokine-induced neutrophil chemoattractant, a member of IL-8  
family, in ischemic brain areas after focal ischemia in rats, *Stroke*, 26 (1995) 318-323.
- 9 2 ) Gillinov, A.M., Redmond, J.M., Zehr, K.J., Wilson, I.C., Curtis, W.E. and Bator, J.M.,  
Inhibition of neutrophil adhesion during cardiopulmonary bypass, *Ann. Thorac. Surg.*, 57  
(1994) 126-133.
- 9 3 ) Sellak, H., Franzini, E., Hakim, J. and Pasquier, C., Reactive oxygen species rapidly  
increase endothelial ICAM-1 ability to bind neutrophils without detectable upregulation,  
*Blood*, 83 (1994) 2669-2677.