

の発現を検索するために、beta-Gal染色を行った。

また、Hvj-lacZ 100 µgをメスニホンザルの大槽に注入し、7日後に灌流固定し、脳を取り出し、40µmの切片を作成し、同様の処理を行い、導入遺伝子の発現を検索した。

さらに遺伝子導入を行い得た細胞の種類を同定するために、抗neurofilament抗体、抗GFAP抗体による免疫組織化学的検討を行った。

8. 血行動態解析用 DSA システムの開発

DSA データをコンピューターに取り込み、各ピクセル毎に造影剤の平均通過時間をもとめ、流速を算出した。本計算理論によると血管走行の方向に影響されず、血管内血流速度を算出することができる。この流速値を擬似カラー化してそれぞれの血管を表示した。

C. 研究結果

1. 実験的大脳皮質損傷後の誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現とラジカルスカベンジャーによる発現抑制

損傷1日目ではiNOS発現細胞は認められなかったが、3日目にはiNOSを発現する細胞が創内及び創近傍の脳組織内に多数出現した。その形態的特徴よりiNOS発現細胞のほとんどがマクロファージであった。損傷7日目にはこれらのiNOS陽性細胞数は大きく減少した。この損傷3日目のiNOS発現細胞の増加はhydroxyl radical scavengerである1, 2-bis(nicotinamido) propane 投与により明らかに抑制された。

2. 脳虚血病態におけるオスモライトの変動

局所脳虚血モデルでは、24時間後に損傷側皮質において水分含量は有意に増加したが、対側皮質や、断頭モデルでは水分含量の増加は認めなかった。

アミノ酸の変動については、局所脳虚血6時間後に同側大脳皮質でアラニンとGABAは上

昇し、24時間後にGABA、アスパルテートやグルタミン酸、NAA(N-acetyl aspartate)は減少した。アラニンは24時間後においても上昇していた。断頭モデルでは、GABAとアスパルテートは6時間後に上昇したが、グルタミン酸、グルタミンについては24時間後でも変化は認めなかった。アラニンは24時間後に上昇を示した。NAAは24時間後に低下していた。

代表的なメチルアミンの変化としては、局所脳虚血モデルで24時間後にクレアチンは減少し、GPC(glycerophosphocholine)は変化しなかった。また、ミオイノシトールは局所脳虚血モデルでは有意の変化を示さず、断頭モデルでは24時間後に増加を認めた。

総量としてのオルガニックオスモライトの変化をまとめると、局所脳虚血モデルでは24時間後の同側大脳皮質においてオルガニックオスモライトは乾燥脳重量あたり対象の58.7%に低下していた。対側皮質や断頭モデルにおいては、オルガニックオスモライトのこのような変化は認められなかった。

3. 虚血性脳浮腫における水チャンネル蛋白アクアポリンの発現

正常群およびsham群では脳表、脳室壁、および視索上核にAQP4 mRNAの発現を認めた。中大脳動脈閉塞3日後には梗塞周辺大脳皮質でmRNAの発現は有意に増強し、閉塞7日後にはやや減弱したが、正常群およびsham群に比べると強く発現している傾向が認められた。

T2強調MRIでは1日後に手術部位および同側白質に比較的限局した信号強度の上昇を認め、3日後には周辺皮質を主としてより広範囲に信号強度上昇を認めた。7日後では信号強度変化範囲はやや縮小し、また不均一化していた。

4. カイニン酸誘発痙攣モデルでのグルタミン酸トランスポーター遺伝子発現の変動

10mg/kgカイニン酸腹腔内投与により全体

の21.2%の動物は痙攣発症2時間以内に死亡した。痙攣を生じた生存動物は全体の63.8%であり、全体の15%の動物では痙攣は誘発されなかった。

海馬標本よりのノーザンブロットによる解析では、4.5kbにGLAST mRNAのバンドが検出され、痙攣発症12時間後より有意の増加を見、48時間後には対照の3.5倍に増加しその後減少した。

次に局在を検討するために *in situ* hybridizationを行った。生理食塩水のみを投与した対照群では、GLAST mRNAの発現は小脳のBergman gliaに強い発現を認めたが、大脳での発現は乏しかった。痙攣誘発ラットでは、12時間後に海馬での発現増加を認め、48時間後に最も強いシグナルを認めた。海馬全体で発現を認めたが、特にCA3、hilusで強い発現を見た。7日後にはこのようなGLAST mRNAの発現は消失した。カイニン酸を投与されたにもかかわらず痙攣をおこさなかったラットでの検討では、前記の発現増加は明らかではなかった。マイクロオートラジオグラムでは、このような発現が主に非神経細胞に生じていることが確認された。

5. 脳虚血急性期における血中エラスターゼの測定

本測定系における血中PMN elastase値の正常範囲は 150 ~ 240 □/lであるが、脳梗塞患者では2名とも発作2日後にのみ頸静脈血中のPMN elastase が極端に高値を示した（それぞれ 796 および 1290 □/l）。動脈血中 PMN elastase は正常範囲内にとどまった。また PMN数自身は両患者で上昇がみられず、PMN一個あたりのelastase 値も発作2日後にのみ上昇がみられた。両患者とも発作2日後の早朝に神経症状の悪化がみられ、頭部CT スキャンにより出血性梗塞が疑われた。また脳内出血患者の4例ではPMN elastase 値の上昇は認

められなかった。

6. コラーゲンペレットによる NGF 脳内投与法の検討

NGF 溶液群では6時間後より特に投与側尾状核において急激な NGF 濃度の上昇がみられたが (2144.0ng/g tissue)、1日後には極めて低値となった (29.19ng/g tissue)。また他部位への分布も限られていた。

これに対し、NGF ミニペレット群では尾状核においてもその濃度上昇は極めて緩やかであり (6時間後に62.90 ng/g tissue)、1日後にわずかなピーク (72.04 ng/g tissue) を示し、3日後も 60.38 ng/g tissue と濃度は維持され、10日後まで高値が持続した

(27.58 ng/g tissue)。さらに NGF の空間的分布を検討すると、対側尾状核はもとより小脳内まで広く分布することが確認された。

7. bcl-2遺伝子の広範囲脳内導入による脳保護療法への基礎実験

lacZ遺伝子発現は脳幹、小脳、上位頸髄に強く、多数の細胞に観察され、脳幹深部の細胞にまで認められた。注入部位よりも吻側の海馬の神経細胞においても発現が観察された。より吻側の大脳では発現はまばらであった。Neurofilamentと二重染色してみると、lacZ遺伝子発現している細胞の多くが、形態的にも、neurofilament発現もともなうことから、神経細胞であると考えられた。一方GFAPとの二重染色では明らかなグリア細胞へのlacZ遺伝子取り込みは見られなかった。Hvj-bcl-2 10µgを同様に注入して抗bcl-2抗体による免疫染色を行っても、分布はlacZ遺伝子発現と同様であった。

サルにおける検討では、lacZ遺伝子発現は上位頸髄、脳幹、小脳、海馬に観察されたが、ラットに比べると、発現は弱い傾向にあった。

8. 血行動態解析用 DSA システムの開発

本 DSA システムを用いることにより脳血

管の鮮明な擬似カラー画像を得ることができた。算出された血管内流速は、例えば非病的所見の頸部内頸動脈で約 258 ml/min であり、電磁血流計などで得られた値に近いものであった。また血管狭窄部前後における流速変化、動脈瘤内における血液乱流、脳動静脈奇形塞栓前後における血管内血流および周辺組織の血液灌流変化を鋭敏に画像化できることが明らかとなった。

D. 考察

1. 実験的大脳皮質損傷後の誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現とラジカルスカベンジャーによる発現抑制

損傷3日目には創内及び創近傍の脳組織内に多数のiNOS発現細胞が出現した。これらの細胞はその形態的特徴よりほとんどがマクロファージと考えられた。このiNOS発現細胞の出現時期は、すでに報告した血中一酸化窒素代謝産物 (NO end products, NO₂+NO₃) の上昇時期 (Yamanaka et al., Neurosci Lett. 194: 124, 1995) とも一致していた。またこの出現はhydroxyl radical scavengerである 1, 2-bis (nicotinamido) propane 投与により明らかに抑制され、損傷脳においてフリーラジカルが産生され、これが iNOS 誘導の一因になることが示唆された。

2. 脳虚血病態におけるオスモライトの変動

局所脳虚血モデルにおいては、24時間後の同側大脳皮質の水分含量の増加及びオルガニックオスモライトの減少が認められた。オルガニックオスモライトの構成成分のうちのアミノ酸については、24時間後にアラニンは上昇していたが、他は減少し総量も減少した。アラニンの上昇については、嫌気解糖の亢進とグルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ活性によるものと考えられる。局所脳虚血病態下での細胞外液中のアミノ酸濃度が興奮性アミノ酸を中心として上昇していることが、

脳内マイクロダイアリス法を用いた実験によりこれまでに明らかになっており、細胞内より細胞外への移動が強く示唆されている。本実験では、細胞内外の総量としてのアミノ酸を測定しており、マイクロダイアリスの結果とあわせるならば、細胞外液中での周囲組織への拡散や残存脳血流による移動が生じていることが推測される。細胞外液での濃度勾配形成に乏しく残存血流もない断頭モデルの実験結果は、アラニン、アスパルテート、GABAは上昇したが、グルタミン酸、グルタミン、タウリンなどには変化を認めず、前述の推測を指示するものである。

24時間後の組織中オルガニックオスモライトの総量は、断頭モデルでは変化なく、局所脳虚血モデルでは減少を示した。アミノ酸における場合と同様に組織外への流失が考えられた。血流完全途絶下ではオルガニックオスモライトの総量は変化せず、細胞内外での移動にとどまる。人為的に低張液を全身性に投与して脳腫張を誘導した場合にオルガニックオスモライトは減少することがこれまで報告されている。脳浮腫が惹起される病態下においては、脳組織内のオルガニックオスモライトは組織外に排泄されることにより総量として減少し、ホメオスタシスを維持する努力が為されているものと考えられた。

3. 虚血性脳浮腫における水チャンネル蛋白アクアポリンの発現

脳梗塞後のAQP4 mRNA発現の時間経過は、浮腫の発生、消退におおむね平行しており、この水チャンネル蛋白の増減が虚血性脳浮腫の発生に関与する可能性が考えられた。このような脳浮腫病態の分子レベルでの解明は、その対処法に新たな視点を開くものと期待される。

4. カイニン酸誘発痙攣モデルでのグルタミン酸トランスポーター遺伝子発現の変動

カイニン酸投与を受けたものの痙攣を来さなかったラットではGLAST mRNAの発現増加を認めなかったことより、痙攣誘発ラット海馬で認められたGLAST mRNAの発現増加は痙攣発作に伴って生じたことが明らかである。

腹腔内にカイニン酸を投与した場合に海馬細胞外液中のグルタミン酸濃度が上昇することが報告されている。他方、海馬スライスにカイニン酸を投与した場合のスライスよりのグルタミン酸の放出はマイクロダイアリシス法による生体内での結果に比しはるかに大きいものであり細胞外に放出されるグルタミン酸が、生体内においては処理されることが推測される。GLASTはグリア細胞に存在し細胞外のグルタミン酸を細胞内に取り込む機能を有している。今回の実験で認められたGLAST mRNAの発現増加は、カイニン酸投与により上昇した細胞外グルタミン酸がトリガーとなっているものと考えられる。

GLASTの発現増加は興奮性アミノ酸による神経傷害を防止する方向に機能すると考えられるが、蛋白レベルでの発現増加には少なくとも6-12時間を要し、保護作用の発揮のためには時間的に遅く有効性は期待しがたい。他の誘導条件、誘導物質の開発により、あらかじめ発現増多を生じさせておくことにより一次脳損傷に引き続く二次的な興奮性アミノ酸による神経傷害を防止する手段となり得る可能性がある。

5. 脳虚血急性期における血中エラスターゼの測定

今回の検討により、出血性梗塞をきたした患者において頸静脈血中 PMN elastase 値が上昇することが示された。大腿動脈血中では上昇がみられないことから、この上昇は脳内病態と関連すること、さらにPMN数には増加がみられず、さらにPMN 一個あたりのPMN elastase 値が上昇していることから、PMN の

活性化がこの酵素の産生ないし遊離と関連することが示唆された。PMN elastase 値の上昇と症状悪化との関連が想定され、今後の治療法検討面で大きな意義を有する所見と考えられる。

6. コラーゲンペレットによる NGF 脳内投与法の検討

本ミニペレットを用いることにより、大型動物脳内へも NGF が広く到達し、また1~2週間にわたって生理学的に有効と推定される濃度(>1ng/ml)が維持されることが明らかとなった。この薬物動態は一定濃度のNGF が比較的長時間維持される点で NGF 溶液の投与時とは著しく異なっており、NGF の脳内投与法としてより優れていると考えられる。

7. bcl-2遺伝子の広範囲脳内導入による脳保護療法への基礎実験

従来、Hvj liposome法では非分裂細胞への遺伝子導入効率が不良であるとの指摘がなされてきたが、今回の検討では比較的良好な遺伝子導入が神経細胞に認められた。新型のHvj-AVE liposomeを使用したことで、非常に良い遺伝子導入効率の結果を得たと考える。bcl-2遺伝子導入による保護効果を検証していくことが可能となった。

8. 血行動態解析用 DSA システムの開発

本システムは従来の DSA による情報のほとんどが形態的なものに過ぎず、血行動態把握の面で大きな不備があったのに対し、血管内血流速度あるいは組織内血液灌流量の定量的評価をも可能とした画期的なものと考ええる。本システムにより形態情報としての血管走行と機能情報としての血流速度を融合して表示することにより、脳循環障害患者の病的血行動態の詳細を把握し、より適切な治療方針立案に役立つものと考えられる。

E. 結論

本研究により脳損傷急性期の病態には、マ

クロファージやマイクログリアなどの活発な活動やそれにとまう一酸化窒素 (NO) の産生、オスモライトの変化、水チャンネル蛋白アクアポリン mRNA、グルタミン酸トランスポーター GLAST mRNA 発現など、分子レベルの細胞内応答が多数関与していることが示された。そして治療法の開発のためには薬剤あるいは物質の投与システム drug delivery system (DDS) の開発が必要であり、ミニペレットを用いての NGF 投与が大型動物に対しても有効な DDS であることが示された。また、今後各種の脳保護遺伝子の細胞内導入が企図されると思われるが、遺伝子導入法として新型の Hvj-AVE liposome が有用であることを確認した。さらには臨床患者での血行動態把握のために血行動態解析用 DSA システムの開発に成功し、脳虚血急性期患者における血中エラスターゼの測定意義を示すことができた。

しかし、今回の知見から鑑みても、脳損傷の病態にはさらに多種多様の細胞や分子レベルの反応が関与しているものと想像される。また、このような個々の反応は互いに関連しつつ病態の全体像を構成するものと考えらる。今後ともさらに多くの細胞レベル、分子レベルの反応とともにそれらの相互関連を明らかにし、脳損傷病態の解明に努めるとともに、新たな脳保護法の開発に努めたい。

F. 研究発表

1) 論文発表

Fujita T, Yoshimine T, Hayakawa T, et al: The cellular dynamics of microglia and macrophage in reaction to cerebral stab wound in rats. *Acta Neurochir* 140: 275-279, 1998

Hagihara Y, Saitoh Y, Kaneda Y, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Arita N: Brain protection by the transfection of *bcl-2* gene into the entire central nervous system (CNS). *Restor*

Neurol Neurosci 13:221-222, 1998

Hirata M, Yoshimine T, Kato A, Hirabuki N, Nakamura H, Ito M, Hayakawa T: Computational imaging of cerebral perfusion by real time processing of DSA images. *Neurol Res* 20:327-332, 1998

Iwatsuki K, Kumura E, Yoshimine T, Yamamoto K, Sato M, Hayakawa T: Increase in juglar levels of polymorphonuclear neutrophil elastase in patients with acute cerebral infarction. *Neurol Res* 20:397-402, 1998

Nonaka M, Kohmura E, Yamashita T, Shimada S, Tanaka K, Yoshimine T, Tohyama M, Hayakawa T: Increased transcription of glutamate-aspartate transporter (GLAST/GluT-1) mRNA following kainic acid-induced limbic seizure. *Mol Brain Res* 55:54-60, 1998

Nonaka M, Yoshimine T, Kohmura E, Wakayama A, Yamashita T, Hayakawa T: Changes in brain organic osmolytes in experimental cerebral ischemia. *Neurol Sci* 157:25-30, 1998

Takemoto O, Yoshimine T, Muhammad AKMG, Maruno M, Yamamoto S, Fujioka K, Koseki N, Takada Y, Sano A, Maeda H, Hayakawa T: Distribution of nerve growth factor in cat brains following topical application of solution or minipellet. *Neurol Res* 20:116-120, 1998

Yamanaka K, Kumura E, Yoshimine T, Hayakawa T, et al: Cellular expression of inducible nitric oxide synthase following cortical incision and its modulation by hydroxyl radical scavenger, 1,2-bis (nicotinamido) propane. *Neurosci Res* 31:347-350, 1998

分担研究報告書（脳科学研究事業「中枢神経系外傷に関する研究」）

「二次的脳損傷における microglia, macrophage の役割に関する研究」

分担研究者	種子田 護	近畿大学医学部脳神経外科学	教授
協力研究者	片岡 和夫	近畿大学医学部脳神経外科学	助教授
	朝井 俊治	近畿大学医学部脳神経外科学	講師

研究要旨：二次的脳損傷にはNOなどの free radical 発生，強い炎症反応を生じる prostaglandin, extracellular matrix破壊をきたす proteaseなどが関与しうる。in vivo実験では macrophage や microglia はこうした反応に深く関わり，こうした細胞由来の plasminogen activator が二次的脳損傷に関与しうるということが明らかとなった。in vitro実験では macrophage および microglia はさまざまな刺激にて urokinase type plasminogen activator や NO, prostaglandin の発現することが明らかとなった。NO の誘導型合成酵素 iNOS は低温下（30℃）でも mRNA の発現を認めたが，prostaglandin の誘導型合成酵素 COX-2 は低温下では常温（37℃）に比べ mRNA 発現の抑制を認めた。低体温はこれらの二次的脳損傷に関与しうる反応を抑制することが期待される。

A. 研究目的

脳損傷後引き続いて生じる二次的神経細胞損傷にたいする microglia, macrophage の関与について検討し，低体温療法が microglia, macrophage による神経細胞障害性にどう影響しているかを解明する

B. 研究方法

in vivo実験：mice 脳に stab wound を作成し，stab wound 周囲の細胞応答と組織損傷を検討した。

in vitro 実験：mice 由来の microglia, macrophage を分離培養し常温および低温下でのそれらの細胞応答について検討した。

C. 研究結果

in vivo実験：stab wound 周囲には受傷早期より microglia, macrophage 細胞の出現を認めた。protease である plasminogen activator 活性を抑制する PAI-1 が欠損した mice では control にくらべて有意に損傷の拡大を認め，一方では血管新生の有意な増加を認めた。

in vitro実験：microglia, macrophageは低温下（30℃）で常温下（37℃）に比べphagocytic functionが抑制された。またNOの誘導型合成酵素iNOSは低温下でもcytokine刺激によりmRNAの発現を認めしたが、prostaglandinの誘導型合成酵素COX-2は低温下では常温に比べmRNA発現の抑制を認めた。microglia, macrophageではurokinase type plasminogen activatorのより強い発現を認める一方、tissue type plasminogen activatorの発現は低いことが明らかとなった。

D. 考察

線溶系proteaseであるplasminogen activatorは脳外傷後の二次的脳損傷形成のみならず組織修復に関係する血管新生に関与しうることが明らかとなった。また脳損傷にはmacrophage, microgliaの細胞応答が病態を修飾している可能性が明らかとなった。2種類のplasminogen activatorの中でurokinase type plasminogen activatorがより深く関与している可能性が高いことが明らかとなった。またmacrophage, microgliaはさまざまな刺激によりfree radicalとなりうるnitric oxideを発生させたり、炎症反応に関与するprostaglandinを発生させることが明らかとなった。低体温はproteaseの活性を減弱させる。さらにmacrophage, microgliaのphagocytic functionを抑制し、prostaglandinの誘導型合成酵素の発現を抑制することが明らかとなった。これらは低体温療法が脳損傷後の二次的損傷の拡大を抑制するメカニズムと考えられる。

E. 結論

脳外傷後の二次的脳損傷形成にmacrophage, microglia由来のprotease, nitric oxide, prostaglandinなどの関与が示唆され、それらの一部は低体温により抑制されることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・ 片岡和夫, 朝井俊治, 松尾 理, 上嶋 繁, 種子田 護: 脳損傷後血管新生におけるplasminogen activator inhibitor-1についての検討. 神経外傷 21:63-66,1998
- ・ Kawabata A, Kuroda R, Minami T, Kataoka K, Taneda M: Increased vascular permeability by a specific agonist of protease-activated receptor-2 in rat hindpaw. Br J Pharmacol 125:419-422,1998
- ・ Kataoka K, Asai T, Sakata I, Taneda M: Remote lesion in the substantia nigra caused by striatopallidal abscess. Acta Neurochir (Wien) in press:1999
- ・ Kinoshita A, Kataoka K, Taneda M: Multilevel vertebral body replacement with a titanium mesh spacer for aneurysmal bone cyst. Min Inv Neurosurg in press: 1999
- ・ Kataoka K, Asai T, Ueshima S, Matsuo O, Kuroda R, Carmeliet P, Collen D, Taneda M: Tissue type plasminogen activator does not contribute to nigral degeneration following striatopallidal lesion. Neurosci Lett (in press) 1999
- ・ Kataoka K, Taneda M, Asai T,

Kinoshita A, Ito M: Structural fragility and inflammatory response of ruptured cerebral aneurysms. A comparative study between ruptured and unruptured cerebral aneurysms. Stroke (in press) 1999

2. 学会発表

・ 片岡和夫, 朝井俊治, 松尾理, 種子田護: 脳損傷後血管新生における plasminogen activator inhibitor-1 についての検討. 第21回日本神経外傷学会1998年3月京都

・ 朝井俊治, 片岡和夫, 松尾理, 種子田護: 線条体損傷後の黒質神経細胞変性における tPA の役割についての検討. 第21回日本神経外傷学会1998年3月京都

・ 片岡和夫, 種子田護, 住井利寿, 中村英剛, 朝井俊治: 脳動脈瘤が破裂に至るメカニズムの解明. 第23回日本脳卒中学会1998年6月札幌

・ 片岡和夫, 朝井俊治, 岩崎弘充, 松尾理, 種子田護: 虚血性脳損傷・組織修復での microglia 由来線溶系因子の役割. 第57回日本脳神経外科学会1998年10月札幌

・ 片岡和夫, 種子田護, 朝井俊治, 山田恭史, 木下章, 伊藤守: 破裂脳動脈瘤壁における炎症反応. 第57回日本脳神経外科学会1998年10月札幌

・ 朝井俊治, 片岡和夫, 松尾理, 種子田護: 二次的黒質神経細胞変性における microglia 由来 tPA の関与の可能性について. 第57回日本脳神経外科学会1998年10月札幌

