— 原 著 —

脳虚血時の脳組織 Leukotrienes 産生に 対する Vitamin A の影響

桂 研一郎

日本医科大学第2内科学教室 (主任: 赫 彰郎教授)

日本医科大学第2生化学教室 (指導: 吉野芳夫教授)

The effect of vitamin A on leukotriene production in the ischemic rat brain

Kenichiro Katsura

The Second Department of Internal Medicine (Chief: Prof. Akiro Terashi), Department of Biochemistry
(Director: Prof. Yoshio Yoshino), Nippon Medical School

Human plasma leukotriene C_4 (LTC_4) levels of cerebral infarcted patients showed a significant increase and plasma vitamin A (VA) levels showed a significant decrease compared to the normal plasma obtained from age-matched control. Therefore, the effect of VA on leukotriene (LT) levels and the progress of cerebral edema were investigated in VA deficient Wistar rat brains. Incomplete global cerebral ischemia was induced by occluding the bilateral common carotid arteries (BLCO) with clips. Wistar rats were made VA deficient by feeding them a vitamin A deficient diet for 5 weeks on a specific pathogen free status. After 3 hours of BLCO the blood was reperfused by removing the clips. After each period of reperfusion, the rat brain was fixed by freezing in situ and used for assaying leukotrienes, vitamin A, and water content.

Slow reacting substance of anaphylaxis ($LTC_4 + LTD_4 + LTE_4$) levels showed an increase at the end of BLCO in the VA deficient group and the high levels persisted for 30 min and then decreased to the control level. Brain water contents were elevated significantly at the 30 min phase of reperfusion. With VA administration, the water contents tended to be lower than in the VA deficient group at any phase. Histologically, after ischemia and reperfusion, Evans blue extravasation and marked spongoid formations around small vessels were observed in the VA deficient rats only.

These facts indicate that VA functions to stabilize cell membranes and suppress ischemic cerebral damage.

Key words: leukotriene, vitamin A, cerebral edema, cerebral ischemia

緒 言

脳虚血時に生じる脳浮腫および脳循環障害に影響する物質に脳内遊離脂肪酸、特にアラキドン酸に始まる代謝物がある¹⁾。prostaglandins (PGs) はアラキドン酸よりサイクロオキシゲナーゼを介して生じる代謝物であり、leukotrienes (LTs) はリポキシゲナーゼを介して生じる極めて生理活性の強い代謝物である²⁾。これらのアラキドン酸代謝物は、血管収縮、血管痙攣、

血小板凝集、血管透過性亢進などの多大な影響を示す³⁻⁵⁾。LTs は白血球、リンパ球系以外に上皮細胞系でも多く産生される。

vitamin A (VA) の主要な生理活性には上皮細胞の分化、誘導を促進する作用があり、過剰の VA 投与では血液脳関門を 10~20% 通過しうる⁶⁾。VA 欠乏ラットでは上皮細胞の形成、コラーゲン合成、傷の修復等が抑制される傾向があり^{7,8)}、VA 投与は皮膚の傷の治療に有効である^{9,10)}。また炎症時に VA が消費されることも報告されている^{11,12)}。さらに神田ら¹³⁾によると、VA は炎症時に生じるアラキドン酸代謝物である LTs の産生を抑制することが示されてきている。

したがって脳虚血時に産生され、組織障害増悪の一

Correspondence to Kenichiro Katsura, The Second Department of Internal Medicine, Nippon Medical School First Hospital, 3-5-5, Iidabashi, Chiyoda-ku, Tokyo, 102 Japan

因と考えられる LTs を VA が抑制し細胞保護的に働く可能性が推測される。著者はまず脳血管障害患者血中の leukotriene C_4 および VA の動態を検討した。さらに両側総頸動脈結紮および再開通では脳浮腫を起こすことが難しい Wistar ラットを用い、これを VA 欠乏状態にして虚血負荷をかけ、脳組織 LTs 値の動き、脳含水量の変化、血清 VA、血清 vitamin E 値の変動について検討した。

実験材料および方法

(1) ヒト血漿

脳梗塞患者 17 名(男性 12 名, 女性 5 名), 年齢 70 ± 8 歳について検討した。診断は脳 CT 所見ならびに「脳卒中の診断基準に関する研究班」の診断基準¹⁴⁾によって確定した。脳卒中重症度スケール¹⁵⁾では中等度で grade 6~9 を選んだ。しかし 37.5°C 以上の発熱患者は除いた。対照は年齢を患者と合わせた血圧正常, 精神神経学的に異常なくかつ心肺循環系, 糖代謝, 脂質代謝に異常を認めない健康な 15 名(年齢 68 ± 6 歳)とした。採血は早朝空腹時に肘静脈より 3.8% クエン酸入りの真空採血管にて行い、直ちに 1,000 g, 20 分間遠心分離し、得られた血漿に 4 倍量の氷冷エタノールを加え血漿-エタノール溶液とし、測定まで -80°C にて保存しておいた。

(2) Vitamin A 欠乏ラットを用いた実験方法

1) 脳スライスの leukotrienes 産生能

3 週齢の SPF (specific pathogen free)-Wistar ラットを SPF 条件下で 5 週間 VA 欠乏食で飼育し、VA 欠乏ラットを作成した。VA 欠乏食は日本クレア社が Takahashi らの処方¹⁶⁾にて調整したものを用いた。VA 欠乏ラットをエーテル麻酔後断頭し、脳をすばやく取り出し、1 mm の厚さに切り出しハックス培養液で洗浄後使用した。試料の重量は約 100 mg とした。試料を多孔型シャーレ中のハックス培養液に移し、5% CO_2 , 37°C にて 15 分間放置する。反応終了時に 10 μg インドメタシンを加え混和後脳組織と反応液を分け反応液中の leukotrienes を下述の方法にて測定した。対照として正常 Wistar ラットを 3 日間 VA 欠乏食で飼育し腸管よりの VA の吸収を抑制した後、断頭後直ちに脳を取り出し、反応液中の leukotrienes を測定した。

2) Leukotrienes の測定

ヒト血漿-エタノール溶液は、8,000 g, 30 分間遠心分離し、得られた上清に 10 倍量の蒸留水を加え試料と

Fig. 1 Method of plasma leukotriene radioimmunoassay

Fig. 2 Method of brain tissue leukotriene radioimmunoassay

した (Fig. 1)。

ラット大脳は 0.2~0.3 g を 7.5 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.9) 1 ml 中で氷冷下にてホモジェナイズ, 4 ml,

エタノールを加え、4,000 rpm, 4℃, 15 分間遠心分離したのち上清に 10 倍量の蒸留水を加え試料とした (Fig. 2). Salari らの方法¹⁷⁾を改変して抽出操作を行った。すなわちエタノール 20 ml, 蒸留水 20 ml を順次 SepPak C₁₈ カートリッジに通して前処置を行い¹⁸⁾, 次に試料をこのカートリッジに通した。このカートリッジに蒸留水 20 ml, 石油エーテル 20 ml を通し水溶性物質と中性脂質の除去操作の後にメタノール 4 ml を通し¹⁹⁾, 溶出した LTs を含む分画を窒素ガス下で濃縮後この分画を radioimmunoassay (RIA) 法により測定した。RIA は New England Nuclear (NEN) 社の Leukotriene C₄/D₄/E₄ [³H] RIA kit および Amersham 社の Leukotriene C₄ [³H] RIA kit を用いた。NEN の kit の抗体のクロスリアクティビティーは LTC₄ 100%, LTD₄ 100%, LTE₄ 65% であることより脳組織 LTs を測定するのに用いた。Amersham の kit は抗体のクロスリアクティビティーが LTC₄ 100%, LTD₄ 1.6%, LTE₄ 0.2% であることより脳梗塞患者血漿および HPLC 後の検体を測定した。上記の方法での LTs の回収率は 70% であった。

3) 高速液体クロマトグラフィー

血漿および組織中の LTC₄ の測定は、阻害物質が多く多段階の精製過程を経ないと正確な測定値が得られない。そこで LTC₄ の RIA 法の抽出法の信頼度を確かめるために SepPak C₁₈ を通したものと、SepPak C₁₈ 後さらに高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用い分画した試料について RIA 法にかけて比較した (Fig. 3)。

メタノール分画を窒素ガス下に濃縮した後、溶媒 (65% メタノール, 35% 蒸留水, 0.02% 酢酸, 0.03% 2NaEDTA, pH 4.9) に展開した。HPLC は NovaPak C₁₈ 逆相カラムを用い流速 1.0 ml/min で行い、紫外吸光 270 nm および ³H/¹⁴C detector (Packard Trace 7140) にてモニターした。まもなく [³H] LTC₄ を加えた血漿を HPLC にかけてその retention time を求めておき、その時間に分画を集め RIA の検体とした。

4) Vitamin A の測定

vitamin A の抽出はヒトの場合、血清 0.1 ml を 1% ピロガロール-エタノール 0.5 ml と蒸留水 0.75 ml に混和し、n-ヘキサン 2.5 ml で 2 回抽出した。ラット脳組織は 0.2~0.3 g を 60% KOH 水溶液と 0.5 ml の 1% ピロガロール-エタノール 0.5 ml に混和した。15 分間煮沸水溶液中で加水分解し、水冷後蒸留水 0.5 ml と混和し、その後 2.5 ml n-ヘキサンで 2 回抽出した。

Fig. 3 Profile of leukotriene standards extracted from plasma after mixture 1-³H-LTC₄
●—● LTC₄ concentration

vitamin A の測定は Thompson らの方法²⁰⁾を改変し Em 465 nm, Ex 330 nm で分光蛍光検出器付 HPLC で測定した。この時内部標準物質として retinyl-acetate を用いた (Fig. 4)。vitamin A の回収率は 93% であった。

5) 脳虚血の作成および vitamin A の投与

エーテル麻酔下にて VA 欠乏ラットの頸部前面を正中切開し両側総頸動脈を剝離露出させ Yasargil クリップにより 3 時間にわたり両側総頸動脈を閉塞 (bilateral common carotid arteries occlusion; BLCO) した。クリップを解除することにより血行を再建し血液再開通モデルを作成した。再開通後各々の時間にてラット脳を freezing in situ 法²¹⁾にて液体窒素で固定した。直ちに脳を取り出し重量を計測し、-80℃にて測定まで保存した。3 時間虚血群は、3 時間の両側総頸動脈結紮を施行した後、そのまま freezing in situ にて固定し脳を摘出した。対照群には同様の手術を施行し BLCO を施行しないものを用いた。

vitamin A の投与は虚血作成前 1 時間および虚血作成 2 時間後に VA 1.2 mg/kg ずつ腹腔内に投与し VA 投与群とし、対照としては生理食塩水を同様に投与し VA 欠乏群とした。ラットの血圧 (収縮期血圧) は tail-cuff 法にて測定した。

Fig. 4 Methods of plasma and tissue vitamin A measurement

6) 脳含水量の測定

摘出した脳の湿潤重量を測定した後、直ちに脳を真空凍結乾燥器（大亜真空技研社）により72時間真空凍結乾燥を行った。乾燥後脳の乾燥重量を測定し、湿潤重量と乾燥重量から脳組織含水量を算出し、湿潤重量に対する脳組織含水量の比率を%で表し、この比率を脳浮腫の指標とした。

7) Evans blue による血管透過性亢進の観察

VA 欠乏ラットの3時間虚血後30分再開通時の血管透過性亢進による血漿成分の血管外漏出をみるために、再開通30分前に尾静脈より2% evans blue を注入した。対照として正常 Wistar ラットを3日間 VA 欠乏食で飼育し、腸管よりの VA の吸収を抑制した後、同様の虚血負荷をかけ evans blue を注入して

観察した。

8) 光学顕微鏡による脳組織細胞傷害の観察

3時間虚血および30分再開通を行い4%ホルムアルデヒド-リン酸緩衝液（pH 7.4）を左心室より約20分間かけて灌流固定し、VA 欠乏群と VA 投与群を比較観察した。脳は取り出した後、さらに一晚同固定液中に浸漬した。光顕用に樹脂包埋したブロックより切片を作成し、ヘマトキシリン-エオシン染色を行い検鏡した。

測定値はすべて mean ± S.E. で表し、統計学的有意差は Student's unpaired t-test にて行った。試薬はすべて特級のものを使用し、水は蒸留水を用いた。実験器材はポリプロピレン製材もしくはシリコナイズドグラスを用いた。

Fig. 5 Comparison between plasma LTC₄ and vitamin A on acute phase of human cerebral infarction

結 果

1. ヒト血漿 LTC₄および vitamin A 濃度

脳梗塞急性期患者血漿 LTC₄は正常コントロール 0.131 ± 0.010 ng/ml (n=11) に対し 0.210 ± 0.020 ng/ml (n=17) となり、有意 ($p < 0.01$) に高値をとった。一方 VA 濃度は正常 46.5 ± 9.0 μg/dl (n=14) に対し 29.0 ± 10.1 μg/dl (n=11) と有意 ($p < 0.05$) に低値をとった (Fig. 5)。

2. 高速液体クロマトグラフィー

[³H] detector により [³H] LTC₄の retention time は16分であった。量的に少ないため270nm 紫外吸光では LTC₄に相当する peak はみられなかった。SepPak と HPLC を組み合わせた方法にて14検体を測定し、SepPak のみの抽出の場合の測定値との相関係数を求めたところ $r = 0.858$ であった ($p < 0.001$)。したがって RIA の精製過程および測定は信頼できると考えられた (Fig. 3)。

3. VA 欠乏ラット

VA 欠乏ラットは肝臓中の VA がほぼ枯渇しているが、血液中にはまだある程度の量が残存し、細胞の可逆性がまだ保たれている状態のラットを作成した。肝臓中の VA は正常ラットの 80.1 ± 6.8 μg/g に比較して 4.0 ± 0.98 μg/g と著しく低値をとっていた。脳組織 VA は正常の 0.07 ± 0.004 μg/g に比較して 0.02 μg/g 以下を示した。血清 VA は正常の 61.7 ± 3.2 μg/dl

Table 1 Comparison between vitamin A deficient rat and normal rat

	Normal(n=5)	VA def.(n=5)
Blood pressure (mmHg)	116 ± 6.1	126 ± 4.1
Serum vitamin A (μg/dl)	61.7 ± 3.2	18.9 ± 3.4
Serum vitamin E (μg/g)	0.83 ± 0.10	0.89 ± 0.08
Brain vitamin A (μg/g)	0.07 ± 0.004	< 0.02
Liver vitamin A (μg/g)	80.1 ± 6.8	4.0 ± 0.98

dl に対し 18.9 ± 3.4 μg/dl と 1/3 に低下していた。しかし血圧、血清 vitamin E は正常ラットと有意の差はみられなかった (Table 1)。

4. 脳組織スライスの leukotriene 産生能

正常ラットの LTC₄産生能は 0.30 ± 0.06 ng/g brain (n=4) であったが、VA 欠乏ラットでは 13.7 ± 4.01 ng/g brain (n=4) であり、VA 欠乏ラットでは有意 ($p < 0.05$) に LTC₄産生が亢進したことが推察された (Fig. 6)。

5. 脳組織 leukotriene の虚血および再開通による経時的变化

VA 欠乏群では、脳組織 LTs レベルは、対照群の 0.291 ± 0.07 ng/g brain (n=5) に対し180分虚血群では 0.828 ± 0.12 ng/g (n=6), $p < 0.05$ と著明に上昇し、以後30分再開通群では 0.717 ± 0.128 ng/g (n=9), $p < 0.05$ と依然として高値をとっていたが、再開通150分では 0.468 ± 0.099 ng/g (n=4), n.s. と前値に

Table 2 Plasma concentration of vitamin A and vitamin E

		Sham control	180 min occlusion	30 min reperfusion	150 min reperfusion
VA def.	Vitamin A ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	18.9 ± 3.4 (n=5)	18.1 ± 5.1 (n=3)	18.5 ± 3.8 (n=5)	17.3 ± 2.5 (n=5)
	Vitamin E (mg/dl)	0.89 ± 0.08 (n=5)	0.84 ± 0.01 (n=3)	0.86 ± 0.06 (n=5)	0.92 ± 0.12 (n=5)
VA def. + vitamin A	Vitamin A ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	49.8 ± 1.7 (n=5)	53.1 ± 5.7 (n=5)	50.1 ± 3.3 (n=4)	50.7 ± 3.2 (n=4)
	Vitamin E (mg/dl)	0.91 ± 0.03 (n=5)	$1.16 \pm 0.07^*$ (n=5)	0.94 ± 0.05 (n=4)	$1.26 \pm 0.08^*$ (n=4)

*Statistical recognition compared to sham control, $p < 0.01$

Fig. 6 Leukotriene production of brain slice, comparing between normal and VA def. rat

Fig. 7 Vitamin A deficient rat bilateral common carotid arteries occlusion (BLCO) and reperfusion

*compared to sham control, $p < 0.05$ **compared to VA def. + vitamin A, 180 min occlusion, $p < 0.05$

戻る傾向を示した。VA 投与群では対照は 0.246 ± 0.04 ng/g (n=5), 180 分虚血では 0.518 ± 0.06 ng/g (n=6) をとり, 30 分再開通では 0.612 ± 0.083 ng/g (n=9), 150 分再開通では 0.37 ± 0.06 ng/g (n=5) となり, 全体に VA 欠乏群より低値をとる傾向を示した。特に 180 分虚血時では VA 投与群は VA 欠乏群に比較して有意 ($p < 0.05$) に低値をとった (Fig. 7)。

6. ラット血清 vitamin A および vitamin E 濃度の虚血および再開通による経時的変化

VA 欠乏群では, 血清 VA レベルは, 対照が 18.9 ± 3.4 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (n=5), 180 分虚血では 18.1 ± 5.1 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (n=3), 30 分再開通では 18.5 ± 3.8 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (n=5), 150 分再開通では 17.3 ± 2.5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (n=5) を示し, 対照に比較して有意の変化は起こらなかった。VA 投与群では, 血清 VA レベルは対照が 49.8 ± 1.7 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (n=5),

180 分虚血では 53.1 ± 5.7 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (n=5), 30 分再開通 50.1 ± 3.3 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (n=4), 150 分再開通 50.7 ± 3.2 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (n=4) を示し, 対照に比較して有意の変化は起こらなかった (Table 2)。

VA 欠乏群では, 血清 vitamin E レベルは, 対照が 0.89 ± 0.08 mg/dl (n=5), 180 分虚血 0.84 ± 0.01 mg/dl (n=3), 30 分再開通 0.86 ± 0.06 mg/dl (n=5), 150 分再開通 0.92 ± 0.12 mg/dl (n=5) を示し, 対照に比較して有意の変化は示さなかった。VA 投与群では血清 vitamin E レベルは, 対照 0.91 ± 0.03 mg/dl (n=5), 180 分虚血 1.16 ± 0.07 mg/dl (n=5), 30 分再開通 0.94 ± 0.05 mg/dl (n=4), 150 分再開通 $1.26 \pm$

Fig. 8 Vitamin A deficient rat bilateral common carotid arteries occlusion (BLCO) and reperfusion
*compared to sham control, $p < 0.05$

Photo 1 Frontal coronary sections of vitamin A (VA) deficient rat brain perfused with Evans blue. Rat brain was prepared with 3 hours bilateral common carotid arteries occlusion and 30 min reperfusion. The Evans blue extravasation was observed in VA deficient rat brain slice (arrow).

Photo 2 Light micrographs of brain cortex of vitamin A (VA) deficient rats treated with 30 min reperfusion after 3 hours bilateral common carotid arteries occlusion (BLCO), (H-E staining). VA deficient group (A, $\times 100$ and B, $\times 400$). VA administered group (C, $\times 100$ and D, $\times 400$). Spongiform formation around capillary venules were observed in VA deficient group (arrow).

0.08 mg/dl (n=4) を示した。対照に比較して 180 分虚血および 150 分再開通では有意 ($p < 0.01$) に高値を示した (Table 2)。

7. 脳含水量の虚血および再開通における経時的变化

VA 欠乏群では対照が $78.89 \pm 0.25\%$ (n=5), 180 分虚血は $79.23 \pm 0.74\%$ (n=5), 30 分再開通 $79.58 \pm 0.61\%$ (n=5), 150 分再開通 $78.96 \pm 0.48\%$ (n=5) を示した。対照と比較して 30 分再開通で有意 ($p < 0.05$) の上昇を示した。VA 投与群では VA 欠乏群に比較してどの時期においても低値をとる傾向 ($p < 0.10$) を示した (Fig. 8)。

8. Evans blue による血管透過性の観察

VA 欠乏ラットに evans blue を注入した場合左大脳半球深部において evans blue の血管外漏出を認めた (Photo 1)。正常ラットに投与した場合 evans blue の血管外漏出はみられなかった。

9. 3 時間虚血および 30 分再開通時の虚血性細胞傷害

VA 欠乏群では 3 時間虚血後 30 分再開通にて大脳皮質の微小血管周囲に膠細胞の腫大がみられ、時に血管周囲に浮腫性変化がみられた。VA 投与群では微小血管周囲の浮腫は著明に抑制されていた (Photo 2)。

考 察

LTC₄, LTD₄ および LTE₄ を構成成分とする SRS-A は強力な気管支平滑筋の収縮物質であり、また血液脳関門の透過性亢進を引き起こす物質として知られている³⁾。最近これらの LTs が脳組織、特に血管上皮細胞および灰白質の細胞で産生されることが報告されている^{22,23)}。また脳虚血が細胞内カルシウムイオンの上昇を引き起こし、フォスホリパーゼを活性化し膜リン脂質より遊離脂肪酸を放出する。遊離脂肪酸の中でもアラキドン酸は速やかに PGs や LTs に代謝されることが確かめられている^{24,25)}。またアラキドン酸をはじめとする多価不飽和脂肪酸や LTC₄ が正常ラット脳組織に in vivo に添加されると脳浮腫を引き起こすこともよく知られている^{1,26)}。

VA は暗順応反応、細胞の分化誘導、成長促進等の生理活性を有する。VA は小腸より吸収され、VA エステルとなり肝臓に蓄えられる。肝臓より放出される VA は RBP (retinol binding protein) と結合し、さらに

PA (prealbumin) と蛋白複合体を形成し、血液中を輸送される。一方異常 PA のサブユニットは家族性ポリアミロイドニューロパシーの沈着アミロイド成分であることが明らかにされている²⁷⁾。血中の VA は血液脳関門を通過し脳組織中へ移行することが確かめられている⁹⁾。さらに VA 欠乏ラットは感染しやすく、死亡しやすいことが認められている²⁸⁾。すなわち VA 欠乏になるとともに身体全体の抵抗力が弱くなると考えられる。神田ら¹³⁾によるとラット下部皮膚局所の熱傷処置により肺に LTC₄ の産生を生じ、VA の顕著な消耗が生じることが報告されている。VA 欠乏ラットに VA を投与しておくことと熱傷によって生じる LTC₄ の上昇が有意に抑制されている。また VA が in vitro にて LTs 産生抑制作用を示すことが報告されている²⁹⁾。

今回研究を始めるにあたりヒトの脳血管障害患者の血漿において LTC₄ と VA の変化を観察し (Fig. 5)、脳梗塞急性期に LTC₄ は有意に上昇³⁰⁾し、VA は有意の低下を示した。VA の低下が LTC₄ 上昇の直接的な影響かどうか不明だが、LTC₄ 上昇がヒト血漿 VA レベルの低下の一因となっていることが推察される。また VA 欠乏ラットの脳切片の LTs 産生をみる実験で、VA 欠乏ラット脳の LTs 産生が正常ラットの約 40 倍の値をとった (Fig. 6)。VA に細胞の正常機能の維持という生理活性があり、また LTs は炎症や損傷時に細胞膜より遊離することを考えると、VA 欠乏状態では細胞膜の脆弱性が亢進しており、LTs が産生されやすい状態にあることが推察される。前もって VA を投与すると、細胞膜の安定性が上昇し、LTs の産生が抑制される可能性がある。

VA は正常時に体内に多量に存在するためその作用を検討するには単に投与実験を行っただけでは内因性 VA の影響が出現し効果の判定が困難となる。一方 VA の LTs 産生抑制作用を認めても、それが VA の生体内濃度で常に発揮される生理活性であるか、または VA の大量投与により生じる薬理作用であるかの判別が難しい。そこで今回 VA 欠乏ラットを作成し、VA の投与を行ってその効果を検討した。一方 vitamin E 欠乏では脳軟化、脳血管内皮細胞の広汎な傷害が観察されることが報告されている³¹⁾が、VA 欠乏ラットと正常ラットは血圧、血清 vitamin E 値にはほとんど変化はなかった (Table 1)。VA 投与群にて虚血、再開通時の血清 vitamin E 値が対照群に比較して有意の高値をとった (Table 2)。これは VA 投与により、細胞膜の正常機能が回復し、vitamin E を輸送する血中リポ

プロテインの移動に相違が生じた可能性が考えられる^{32,33)}。しかし vitamin E には LTs 産生を抑制する活性はみられない³⁴⁾。

血管性脳浮腫 (vasogenic edema) の発現の一因となっていることが推察される脳組織 LTs は、VA 欠乏群で 3 時間虚血にて有意の増加を示し、再開通 30 分でも依然として有意に高値を示した。脳組織 LTs は VA 投与群の虚血および再開通 30 分においても同様に高値を示したが、すべての時期で VA 欠乏群のほうが VA 投与群より高値を示した。3 時間虚血時では、有意に VA 投与で LTs の上昇が抑制された結果が得られた。高血圧自然発症ラットを虚血および再開通することにより脳組織中で cyclic-AMP が低下³⁵⁾し、脳組織 LTC₄ の上昇が生じ、5-リボキシゲナーゼ抑制剤投与で LTC₄ の上昇および脳含水量が抑制されたことが報告されている³⁶⁾。今回著者の得た VA 投与の結果はこの 5-リボキシゲナーゼ阻害剤と相似するものである。ラット総頸動脈閉塞および再開通モデルでは細胞性浮腫 (cytotoxic edema) のほかに、vasoconstriction や細胞膜透過性の亢進、血漿蛋白の漏出を伴った血液脳関門の障害による血管性脳浮腫を伴うことが知られている^{37,38)}。一方、一般に Wistar ラットの虚血および再開通モデルでは、急速には脳浮腫が誘導され難い³⁵⁾。しかし Fig. 8 に示したように今回の実験でも VA 欠乏 Wistar ラットの 3 時間虚血および 30 分再開通にて有意に脳含水量の増加を示した。VA 投与により有意の含水量の抑制は起こらなかったが、すべての時期で VA 投与群のほうが含水量は低値をとる傾向を示した。VA 欠乏ラットの虚血および再開通の脳において evans blue の血管外漏出を認めた。脳組織切片でも VA 欠乏ラットでは微小血管周囲に浮腫像がみられ、VA 投与でその抑制が認められた。したがって、血管性脳浮腫が VA 投与により改善傾向を示したと考えられる。

ヒトにおいては脳微小血管の老化現象により、脳組織への VA の供給が障害される可能性があり、また微小な脳血管障害により VA の消耗が亢進して、局所的に VA 欠乏に陥る部位が生ずることが考えられる。このような場所に脳虚血が生じると、LTs 産生が亢進しやすく、血管性脳浮腫が起こりやすいと考えられる。本研究より VA の状態により脳虚血時の LTs 産生が抑制され、血管性脳浮腫の抑制もできる可能性が示唆された。

結 論

脳卒中患者の血漿の LTs および VA の動態を検討した後、VA 欠乏 Wistar ラットの両側総頸動脈閉塞および再開通モデルにおいて LTs および VA の関連について検討した結果、以下の結論を得た。

- 1) 脳梗塞急性期患者血漿中では LTC₄ は有意に高値を示し、VA は有意に低値を示した。
- 2) VA 欠乏 Wistar ラット脳組織 LTs は脳虚血 180 分でも有意に高値を示した。脳含水量は再開通 30 分でも有意に高値を示した。
- 3) VA 投与により脳組織 LTs は有意に抑制され、脳含水量は低下する傾向を示した。
- 4) VA 欠乏 Wistar ラット 3 時間虚血後 30 分再開通にて脳皮質微小血管周囲に浮腫像がみられ、VA 投与によって改善傾向がみられた。
- 5) VA は虚血性脳障害に対し防御的な作用を有していることが示唆された。

稿を終えるにあたり、本研究を行うにあたって種々の御鞭撻、御助言をいただきました日本医科大学第 2 生化学教室の神田佳和講師をはじめとする各位、第 2 内科学教室脳浮腫研究班の片山泰朗講師、清水 純博士、南澤宏明博士をはじめとする各位に深甚なる謝意を表します。また病理所見の御校閲を賜りました日本医科大学第 2 病理学教室浅野伍朗教授に深謝いたします。

なお本論文の内容の一部は、第 28, 29 回日本神経学会総会(昭和 62 年 4 月, 昭和 63 年 5 月)、第 12 回日本脳卒中学会総会(昭和 62 年 5 月)、アジア・オセアニア神経会議(昭和 62 年 9 月)、台北プロスタグランジン・ロイコトリエン会議(昭和 63 年 5 月)において発表した。

文 献

- 1) Chan, P.H. and Fishman, R.H.: Brain edema; Introduction in cortical slices polyunsaturated fatty acids. *Science*, 201, 358~360, 1978.
- 2) Wolfe, L.S.: Eicosanoids; Prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes, and other derivatives of Carbon-20 unsaturated fatty acids. *J. Neurochem.*, 38, 1~14, 1982.
- 3) Black, K.L. and Hoff, J.T.: Leukotrienes increase blood brain barrier permeability following intraparenchymal injections in rats. *Ann. Neurol.*, 18, 349~351, 1985.
- 4) Ellis, E.F., Nies, A.S. and Oates, J.A.: Cerebral arterial smooth muscle contraction by thromboxane A₂. *Stroke*, 8, 480~483, 1977.
- 5) Rosenbloom, W.I.: Constricting effect of leukotrienes on cerebral arterioles of mice. *Stroke*, 16, 262~263, 1985.
- 6) Pardridge, W.M., Sakiyama, R. and Coty, W.A.: Restricted transport of vitamin D and A derivatives through the rat blood-brain barrier. *J. Neurochem.*, 44, 1138~1141, 1985.

- 7) Jetten, A.M.: Action of retinoids and phorbol esters on cell growth and the binding of epidermal growth factor. *Ann. NY Acad. Sci.*, 128, 200~217, 1981.
- 8) Seifter, E., Growley, L.V., Rettura, G., Nakao, K., Gruber, C., Kan, D. and Levenson, S.M.: Influence of vitamin A on wound healing in rats with femoral fracture. *Ann. Surg.*, 181, 836~841, 1975.
- 9) Burgoon, C.F., Graham, J.H., Urbach, F. and Musgonung, R.: Effect of vitamin A on epithelial cells of skin; The use of vitamin A in the treatment of diseases characterized by abnormal keratinization. *Arch. Dermatol.*, 87, 63~80, 1963.
- 10) Lee, K.H. and Tong, T.G.: Mechanism of action of retinyl compounds on wound healing. II. Effect of active retinyl derivatives on granuloma. *J. Pharm. Sci.*, 59, 1195~1197, 1970.
- 11) 神田佳和, 山本正雅, 前田美穂, 佐藤久美子, 吉野芳夫: 炎症と vitamin A. 炎症, 3, 475~476, 1983.
- 12) 神田佳和: 腫瘍および炎症に関する Vitamin A の作用. 日医大誌, 50, 128~133, 1983.
- 13) 神田佳和, 南澤宏明, 白鳥辰治, 可世木久幸, 久安早苗, 吉野芳夫: 熱傷ラットの肺における eicosanoids の動態に対する vitamin A の影響. 炎症, 8, 229~232, 1988.
- 14) 田崎義昭: 神経病学: 血管系を中心に. 日医新報, No. 3175, 3~16, 1985.
- 15) The EC/IC Bypass Study Group: The International cooperative study of extracranial/intracranial arterial anastomosis (EC/IC bypass study) methodology and entry characteristics. *Stroke*, 16, 397~406, 1985.
- 16) Takahasi, Y.I., Smith, J.E., Winick, M. and Goodman, D.S.: Vitamin A deficiency and development in the rat. *J. Nutr.*, 105, 1299~1310, 1975.
- 17) Salari, S.H., DwVoe, I.W. and Powell, W.A.: Inhibition of leukotriene B₄ synthesis in human polymorphonuclear leukocytes after exposure to meningococcal lipopolysaccharide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 104, 1517~1524, 1983.
- 18) Powell, W.S.: Rapid extraction of oxygenated metabolites of arachidonic acid from biological samples using octadecylsilyl silica. *Prostaglandins*, 20, 947~957, 1980.
- 19) Isono, T., Koshihara, Y., Murota, S., Hukuda, Y. and Furukawa, S.: Measurement of immunoreactive leukotriene C₄ in blood of asthmatic children. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 130, 486~492, 1985.
- 20) Thompson, J.N., Erdody, P., Brien, R. and Murry, T.K.: Fluorometric determination of vitamin A human blood and liver. *Biochem. Med.*, 5, 67~89, 1971.
- 21) Ponten, U., Ratcheson, R.A., Salford, L.G. and Sjesjö, B.K.: Optimal freezing conditions for cerebral metabolites in rats. *J. Neurochem.*, 21, 1127~1138, 1973.
- 22) Asano, T., Goto, O. and Koide, T.: Ischemic brain edema following occlusion of the middle cerebral artery in the rat. II. Alteration of the eicosanoid synthesis profile of brain microvessels. *Stroke*, 16, 110~113, 1985.
- 23) Moskowitz, M.A., Kiwak, K.J., Hekimian, K. and Levine, L.: Synthesis of compounds with properties of leukotrienes C₄ and D₄ in gerbil brains after ischemia and reperfusion. *Science*, 224, 886~889, 1984.
- 24) Marison, J. and Wolge, L.S.: Origin of the arachidonic acid released post-mortem in rat forebrain. *Biochim. Biophys. Acta*, 574, 25~32, 1979.
- 25) Avelandano, M.I. and Bazan, N.G.: Rapid production of diacylglycerols enriched in arachidonate and stearate during early brain ischemia. *J. Neurochem.*, 25, 919~920, 1975.
- 26) Black, K.L.: Leukotriene C₄ induces vasogenic cerebral edema in rats. *Prostaglandins Leukotrienes Med.*, 14, 339~340, 1984.
- 27) Costa, P.P., Figueira, A.S. and Bravo, F.R.: Amyloid fibril protein related to prealbumin in familial amyloidotic polyneuropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 4499~4503, 1978.
- 28) Bieri, J.G., McDaniel, E.G. and Rogers, W.E.: Survival of germ free rats without vitamin A. *Science*, 163, 574~575, 1969.
- 29) 神田佳和, 久安早苗, 桂研一郎, 南澤宏明, 吉野芳夫: Endotoxin 処置肺組織切片の eicosanoids 産生誘導に対する VA, VAA の抑制作用. 炎症, 8, 519~523, 1988.
- 30) Katsura, K., Minamisawa, H., Katayama, Y., Shimizu, J., Goto, T., Urushiyama, K., Terashi, A., Kanda, Y. and Yoshino, Y.: Plasma levels of leukotriene C₄, B₄, slow reacting substance of anaphylaxis in chronological phases of cerebrovascular disease. *Prostaglandins*, 36, 655~667, 1988.
- 31) Fisher, V.W. and Nelson, J.S.: Cerebrovascular changes in tocopherol-depleted chicks, fed linoleic acid. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 32, 474~483, 1973.
- 32) Gerber, L.E. and Erdman, J.W.: Effect of retinoic acid and retinyl acetate feeding upon lipid metabolism in adrenalectomized rats. *J. Nutr.*, 109, 580~589, 1979.
- 33) Shukla, R.R. and Srivastava, U.K.: Vitamin A and biochemical development. *Biol. Neonate*, 46, 285~290, 1984.
- 34) Goetzl, E.J.: Vitamin E modulates the lipoxygenation of arachidonic acid in leukocytes. *Nature*, 288, 183~185, 1980.
- 35) Katayama, Y., Sugimoto, S., Inamura, K. and Terashi, A.: Susceptibility to insult in hypertensive rats; Correlation between degree of ischemia and hypertension. *Jpn. Circ. J.*, 50, 258~264, 1986.
- 36) Minamisawa, H., Terashi, A., Katayama, Y., Kanda, Y., Shimizu, J., Shiratori, T., Inamura, K., Kaseki, H. and Yoshino, Y.: Brain eicosanoid levels in spontaneously hypertensive rats after ischemia with reperfusion; Leukotriene C₄ as a possible cause of cerebral edema. *Stroke*, 19, 372~377, 1988.
- 37) 島健, 山本光生, 岡田芳和, 魚住徹, 石原博文, 宮崎正毅: SHR 両側総頸動脈結紮による脳虚血. 脳と神, 31, 1235~1243, 1979.
- 38) 石原島繁彦: 虚血性脳浮腫における血液脳関門: とくに内皮細胞と星状膠細胞の細胞膜変化についての電顕組織化学的研究. 神経病理学, 6, 341~354, 1985.

(受付: 1989年 3月30日)