— 原 著 —

虚血性脳浮腫発生における Bradykinin の関与に関する研究

神谷 達司

日本医科大学第2内科学教室 (主任: 赫 彰郎教授)

Studies on the involvement of bradykinin in the formation of ischemic brain edema

Tatsushi Kamiya

The Second Department of Internal Medicine, Nippon Medical School

Bradykinin (BK) is known to be involved in the inflammatory process causing various tissue reactions such as peripheral vasodilation and increased vascular permeability. The aims of this study was to investigate the involvement of the kallikrein-kinin system (K-K system) in the generation and progression of cerebral edema following an ischemic incident. First, after infusion of BK into the internal carotid artery, the cerebral water content was measured and electron microscopic observations were made to investigate changes of permeability using the horseradish peroxidase (HRP) tracer method. Secondly, the plasma and tissue BK levels, cerebral water content and energy metabolites (ATP, lactate and pyruvate) were measured at scheduled intervals. This was achieved using the cerebral ischemia model induced in spontaneously hypertensive rats (SHR) in which the common carotid artery were occluded (BLCO) with clips in both sides. The plasma and tissue BK were measured by radioimmunoassay. Furthermore, aprotinin and soybean trypsin inhibitor (SBTI), which specifically inhibit the K-K system, were applied to the same model and the effects on cerebral edema and metabolism were tested.

At three hours after infusion of BK, cerebral edema was observed on the infused hemisphere and an increase of pinocytosis in the vessels was observed in the electron microscopic study. The chronological observation of cerebral water content revealed that it started to increase after BLCO, reaching a peak level at 30 min after reperfusion, before decreasing slightly. The plasma BK levels also showed an increase at the end of BLCO and reached a peak level at 30 min after reperfusion, decreasing thereafter. The tissue BK levels elevated significantly at 30 min after reperfusion and returned to control levels at 60 min. The ATP levels decreased remarkably after BLCO, and then increased after 30 min of reperfusion. The lactate levels increased during ischemia and became higher at 30 min after reperfusion and then decreased. The pyruvate levels did not change during this time period.

In the treated group, aprotinin showed significantly lower levels of cerebral water content compared to the control. This group also showed lower lactate accumulation and preservation of ATP levels than the control. SBTI also had significantly lower water content than the control, but there was no difference in the metabolites.

These results showed that BK augments the progression of brain edema and that the BK level corresponded with progression of ischemic brain edema and the suppression of BK decreased edema formation. These novel findings indicate a close relationship between BK and ischemic brain edema.

Key words: bradykinin, ischemic brain edema, cerebral energy metabolites, SHR

緒 言

bradykinin (BK) は、炎症局所における chemical mediator であり、末梢血管拡張¹⁻⁴⁾、血管透過性亢進⁵⁻⁸⁾などを引き起こすことが知られている。また BK

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

は、血液凝固線溶素⁹⁾をはじめ、renin-angiotensin-aldosterone 系^{10,11)}, arachidonic acid 生合成^{12~15)}, 補体系¹⁶⁾, chatecholamine¹⁷⁾とも密接に関係し、多彩な生物反応を引き起こしていることも知られている。近年、脳浮腫の発現において kallikrein-kinin system の関与が報告^{18~20)}されている。すなわち、産生された kinin は脳血管を拡張させ、血管透過性を亢進し、血液脳関門にも影響を及ぼしていることが示唆されている。

今回、著者は BK の内頸動脈注入による脳浮腫発生に及ぼす BK の影響を検討し、また BK の脳虚血における脳浮腫発生への関与を検討するため、脳虚血における血中および脳組織 BK の変化と、脳浮腫発生との関連について検索した。さらに kallikrein enzyme inhibitor である aprotinin, soybean trypsin inhibitor (SBTI) を投与し、BK の脳虚血における脳浮腫の発現および脳エネルギー代謝に及ぼす影響も検討したので報告する。

研究材料および方法

(1) 研究材料

実験動物は、体重約 300 g 前後、収縮期血圧約 180 mmHg の 16 週齢前後の雄の高血圧自然発症ラット (spontaneously hypertensive rat; SHR) を使用した。

(2) 研究方法

1) BK 注入モデルにおける検討

BK 注入モデルは 2% halothane を含有する酸素吸入による麻酔下にて、SHR の頸部正面を正中切開して右総頸動脈、外頸動脈、内頸動脈を剝離露出し、右外頸動脈より逆行性にカテーテルを挿入し、右内頸動脈に 0.2 ml の生理食塩水に溶解された 3.6 μ g/kg の BK (和光純薬工業) を 60 秒かけて緩徐に注入して作成した。なお、外頸動脈より注入した溶液の内頸動脈への流入は実体顕微鏡により確認した。対照群には、同様の方法にて生理食塩水 0.2 ml を 60 秒かけて緩徐に注入したものを用いた。脳浮腫の検討は、BK 注入後 3 時間にてラットを断頭後に速やかに脳を摘出し左右大脳半球に分けそれぞれについて脳含水量を測定することにより行った。また、血液脳関門の変化の検討は、中大脳動脈領域の皮質における毛細血管周囲微細構造について電子顕微鏡的観察により行った。すなわち、BK 注入後 3 時間にてラットに 2% evans blue 1 ml に溶解した HRP (horseradish peroxidase, Sigma type II—mol. wt. : 40,000—) 70 mg を大腿静脈より

注入し、5 分後に 2% formaldehyde-0.25% glutaraldehyde-0.16 M sodium cacodylate (pH 7.4) により室温にて約 15 分間灌流固定し、中大脳動脈領域の頭頂葉皮質より厚さ 40 μ の切片を作成した。Graham and Karnovsky の方法²¹⁾に基づき diaminobenzidine-4HCl 25 mg を、0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) 50 ml に溶解した液に切片を 15 分間予備浸漬し、次いで同液に 0.01% H₂O₂ を加えた溶液にて、室温で 30 分間反応を行った。反応後、切片を 2% オスミウム酸により 1 時間後固定し、脱水、エポン包埋し、超薄切片を作成、酢酸ウラン、クエン酸鉛による二重染色を行い、透過型電子顕微鏡 (Hitach H-800) にて加速電圧 75 kV、直接倍率 5,000~20,000 倍で観察した。

2) 脳虚血における BK および脳浮腫、脳エネルギー代謝諸量の経時的变化の検討

i. 脳虚血の作成と BK、脳含水量、脳エネルギー代謝諸量の測定準備

2% halothane を含有する酸素吸入による麻酔下にて、SHR の頸部正面を正中切開し両側総頸動脈、外頸静脈を剝離露出させ、杉田式動脈瘤クリップにより 3 時間にわたり両側総頸動脈を閉塞 (bilateral common carotid artery occlusion; BLCO) して脳虚血を作成、クリップを解除することにより血行を再開した。

血中 BK の検討は、sham control, BLCO 後 3 時間および再開通後 30、60 分の各々の時期にて行った。BK の測定は polyethylene 試験管を用い外頸静脈より採取した血液 (2 ml) にて行った。

脳組織 BK の検討は、血中 BK の測定と同様に sham control, BLCO 後 3 時間および再開通後 30、60 分の各々の時期にてラット頭部に酵素活性を瞬時に停止するためマイクロウェーブアプリアレーター (東芝製) を用いてマイクロウェーブを照射 (出力 5 kW, 照射時間 1.5 秒) した後に直ちに断頭し、脳を摘出した。摘出脳の半球を前頭部と後頭部に二分割した後、前頭部で脳含水量を後頭部にて脳組織 BK の測定を行った。脳代謝諸量 (ATP, lactate, pyruvate) の測定は、BK の測定と同様な方法および時期にて頭部にマイクロウェーブを同様な条件にて照射した後に、脳の後頭部にて測定した。

ii. bradykinin (BK) の測定

血中 BK の測定は、採取した血液を直ちに kallikrein inhibitors として Trasylol® 6,000 units, SBTI 0.5 mg を、kininase inhibitors として EDTA (ethylenediamine tetraacetate) 20 mg, protamine 5 mg

を混入後、3,000 rpm、4℃、5分間遠心し、血漿を分離して行った。分離血漿はBKの測定まで凍結保存した。一方、脳組織BKの測定は、採取した脳に0.1 M 酢酸 4 ml でポッター型ホモジナイザーにより氷冷下にてホモジナイズし、その後0.1 M 酢酸で10 ml とし塩化ナトリウム 3.5 g を加え転倒混和し、水中静置した後3,000 rpm、4℃、10分間遠心分離した上清に血中BKの測定と同様にTrasyolol®, SBTI および EDTA, protamine を加えてBKの測定まで凍結保存した。これらの試料を用い、isopropyl alcohol で除蛋白を、petroleum ether で脱脂を行った後、窒素ガス下で濃縮し、B-F 分離に polyethylene glycol を使用し、Takanashi らの RIA 法²²⁾にてBKの測定を行った。測定値は血中BKは pg/ml、脳組織BKは pg/g brain として表した。

iii. 脳含水量の測定

摘出した脳の湿潤重量を測定した後に直ちに脳を凍結し、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。脳の乾燥重量を測定し、湿潤重量と乾燥重量から脳組織水分含量を算出し、湿潤重量に対する脳組織水分含量の比率を%で表し、この比率を脳浮腫の指標とした。

iv. 脳エネルギー代謝諸量の測定

マイクロウェーブ照射し酵素を不活化した脳組織は直ちに6%トリクロル酢酸 5 ml を加えてホモジナイズした後に3,000 rpm で20分間遠心し、その上清を分離して測定試料とした。ATPはluciferin-luciferaseを用いたbioluminescence法²³⁾により、またlactateおよびpyruvateはLDHを用いたultra-violet法²⁴⁾にてそれぞれ測定した。

3) 脳虚血における kallikrein enzyme inhibitor (aprotinin および SBTI) の脳浮腫および脳エネルギー代謝に及ぼす影響の検討

kallikrein enzyme inhibitor である aprotinin および SBTI を投与し、BK の産生を抑制することにより、BK の脳虚血に果たす役割につき脳含水量および脳エネルギー代謝諸量を測定し検討した。aprotinin は、大腿静脈に挿入したカテーテルにより、BLCO 直後より投与した。aprotinin は 10,000 U/ml を含有する生理食塩溶解液を 111 U/min の速度で3時間かけて注入、計 66,000 U/kg を投与した。BLCO 3時間後にてクリップを解放し、血行再建を行い、再開通 30 分にて脳含水量および脳エネルギー代謝諸量の測定を行った。またもう一つの kallikrein enzyme inhibitor である

SBTI も同様の方法にて、3.0 mg/ml の生理食塩溶解液を 3.3×10^{-2} mg/min の速度にて計 20 mg/kg の投与を行い同様の検討を行った。また対照群として同様の方法にて BLCO 施行後、生理食塩水を同様の速度で同量注入した。

統計学的有意差はすべて Student's t-test により計算した。

結 果

1. BK 注入モデルにおける検討

脳含水量は、BK 注入側では $79.47 \pm 0.62\%$ (n=7) であり、対照群の生理食塩水注入側の $78.20 \pm 0.19\%$ (n=10) に比べて統計学的に有意の増加を示した。一方、BK 非注入側では、脳含水量は $77.95 \pm 0.36\%$ (n=7) であり、対照群の非注入側の $78.30 \pm 0.37\%$ (n=10) との間に有意な差異は認めなかった (Fig. 1)。また、透過型電子顕微鏡 (transmission electron microscope; TEM) による注入側中大脳動脈領域の皮質における毛細血管周囲微細構造の観察では、生理食塩水注入の対照群において4例とも血管内腔がよく灌流され、血管壁はほぼ均一で、周囲の浮腫はない状態に保たれていることが確認された。また、mitochondria,

Fig. 1 Difference of brain water content between the administration of bradykinin and saline. Brain water content were indicated as %. $p < 0.001$, N.S. = No significance, n = numbers

Fig. 2 Transmission electron micrographs of the capillary in the cortex of MCA area. ($\times 5,000$)

Saline infused group (control) : Note smooth surface and no pinocytotic vesicles of HRP in the capillary endothelium.

Lu=Lumen

Fig. 3 Transmission electron micrographs of the capillary in the cortex of MCA area. ($\times 5,000$)

BK infused group : Note a lot of pinocytotic vesicles in the capillary endothelium, marked swelling of astrocytic foot process (Acf), and increase of microvillies (arrow-head).

tight junction 等の微細構造もよく保たれていた (Fig. 2). 一方, BK 注入群では 4 匹中 3 匹において, 血管内腔には内皮細胞表面より多数の microvilli の産生や内皮細胞内への HRP 顆粒の取り込みのほか, astrocytic foot process が浮腫を生じて膨化している所見が認められた (Fig. 3). 高倍率所見では, 血管内皮細胞内に HRP 顆粒を多量に取り込んだ pinocytotic vesicle が認められた (Fig. 4a, large arrow). さらに, HRP 顆粒が血管内皮細胞内のみならず血管周囲の astrocytic foot process 内へ侵入している所見も認められた (Fig. 4a, small arrow). また mitochondria の crista の開離も観察された (Fig. 4b). 一方, このような HRP の漏出所見にもかかわらず, Fig. 4c で示されるごとく tight junction は保たれていた.

2. 脳虚血における BK および脳浮腫, 脳エネルギー代謝諸量の経時的変化の検討

(1) 脳含水量の経時的測定

脳含水量は, 対照群が $78.01 \pm 0.20\%$ ($n=6$) であり, 3 時間虚血群が $79.20 \pm 0.49\%$ ($n=6$) となり統計学的に有意な増加 ($p < 0.001$) を示した. 再開通 30 分では $80.69 \pm 0.75\%$ ($n=6$) とさらに上昇し, 3 時間虚血群に対しても統計学的に有意な増加 ($p < 0.01$) を示した. 再開通 60 分では, 再開通 30 分に比べ, 統計学的に有意に低下 ($p < 0.05$) し, $78.95 \pm 1.10\%$ ($n=5$) となり, 対照群に対しては統計学的に有意ではないが高値の傾向を示した (Fig. 5, Table 1).

(2) 脳エネルギー代謝諸量の経時的測定

ATP は, 対照群が $2.64 \pm 0.11 \mu\text{mol/g brain}$ ($n=6$) であり, 3 時間虚血群が $0.14 \pm 0.08 \mu\text{mol/g brain}$

Fig. 4 TEM observations in high magnification. ($\times 20,000$)
BK infused group: Note a lot of pinocytotic vesicles in the capillary endothelium (large arrow), extravasation of HRP (small arrows) (a), marked swelling of mitochondrias (b), and an intact endothelial tight junctions (Tj) (c).
Mc=Mitochondria

Fig. 5 Changes of brain water content after BLCO and recirculation.
Brain water content were indicated as %.
* $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.05$

($n = 6$) となり統計学的に有意の低下 ($p < 0.001$) を示した。再開通 30 分では $0.18 \pm 0.09 \mu\text{mol/g brain}$ ($n = 6$) とやや増加するが、対照群とは統計学的に有意の低下 ($p < 0.001$) を示した。再開通 60 分では、再開通 30 分 に比べ有意に増加 ($p < 0.05$) し、 $0.75 \pm 0.48 \mu\text{mol/g brain}$ ($n = 5$) となるが、対照群に対しては統計学的に有意の低下を示した (Fig. 6)。

一方、lactate は、対照群が $1.38 \pm 0.28 \mu\text{mol/g brain}$ ($n = 6$) であり、3 時間虚血群が $32.38 \pm 7.16 \mu\text{mol/g brain}$ ($n = 6$) となり統計学的に有意の増加 ($p < 0.001$) を示した。再開通 30 分では $39.39 \pm 7.99 \mu\text{mol/g brain}$ ($n = 6$) とさらに上昇し、対照群に対しても統計学的に有意な増加 ($p < 0.001$) を示した。再開通 60 分では再開通 30 分 に比べ、有意に低下 ($p < 0.001$) し、 $11.01 \pm 7.38 \mu\text{mol/g brain}$ ($n = 5$) となっ

Table 1 Changes of water content, plasma and tissue bradykinin levels

Ischemia	n	Water content	Plasma bradykinin	Tissue bradykinin
Sham operation	6	78.01±0.20	74.0±14.9	4.45±1.66
3 h BLCO	6	79.20±0.49*	169.8±30.6	4.66±0.61
3 h BLCO+30 min recirculation	6	80.69±0.75*	486.7±136.1	13.67±3.95*
3 h BLCO+60 min recirculation	5	78.95±1.10	166.0±31.9	5.19±1.82

Each values are mean±S.D. Water content were indicated as %. The levels of bradykinin in plasma and tissue were indicated as pg/ml and ng/g brain.

*p<0.001, n=numbers

Fig. 6 Changes of brain metabolites after BLCO and recirculation.

Concentrations of ATP, lactate and pyruvate were indicated as $\mu\text{mol/g brain}$.

*p<0.001, **p<0.05, N.S. = No significance

Fig. 7 Changes of plasma bradykinin levels after BLCO and recirculation.

Plasma bradykinin levels were indicated as pg/ml.

*p<0.001

たが、対照群に対してはなお高値を維持していた(p<0.05) (Fig. 6).

また、pyruvate は、対照群が $0.18 \pm 0.06 \mu\text{mol/g brain}$ (n=6) であり、3 時間虚血群が $0.12 \pm 0.07 \mu\text{mol/g brain}$ (n=6) と低下し、再開通後 30 分で $0.18 \pm 0.02 \mu\text{mol/g brain}$ (n=6), 60 分で $0.26 \pm 0.21 \mu\text{mol/g brain}$ (n=5) と高値を示したが、統計学的に有意な差異は認めなかった (Fig. 6).

(3) 血中 BK の経時的測定

血中 BK は、対照群が $74.0 \pm 14.9 \text{ pg/ml}$ (n=6) であり、脳含水量と同様に 3 時間虚血群が $169.8 \pm 30.6 \text{ pg/ml}$ (n=6) となり統計学的に有意の増加(p<0.001)を示した。再開通 30 分では、 $486.7 \pm 136.1 \text{ pg/ml}$ (n=6) とさらに上昇し、3 時間虚血群に対しても統計学的に有意な増加 (p<0.001) を示した。再開通 60 分では、再開通 30 分に比べ、統計学的に有意に低下 (p<0.001) し、 $166.0 \pm 31.9 \text{ pg/ml}$ (n=5) となるが、対照群に対してなお高値 (p<0.001) を示した (Fig. 7, Table 1).

Fig. 8 Changes of tissue bradykinin levels after BLCO and recirculation.
Tissue bradykinin levels were indicated as ng/g brain.
* $p < 0.001$, N.S. = No significance

Fig. 9 The relation between plasma bradykinin levels and brain water content.
There was significant relation between plasma bradykinin and brain water content ($p < 0.005$, $r = 0.80$, $n = 23$).

(4) 脳組織 BK の経時的測定

脳組織 BK は、対照群が 4.45 ± 1.66 ng/g brain ($n = 6$) であり、3 時間虚血群が 4.66 ± 0.61 ng/g brain となり上昇傾向を示し、再開通 30 分では急激に上昇し、 13.67 ± 3.95 ng/g brain となった。この増加は、対照群、3 時間虚血群と比較して統計学的に有意 ($p < 0.001$) であった。再開通 60 分では再開通 30 分に比べ、統計学的に有意に低下 ($p < 0.001$) し、 5.19 ± 1.82 ng/g brain となり、対照群に対しては上昇傾向を示したが統計学的に差異は認めなかった (Fig. 8, Table 1)。

(5) 脳含水量と血中 BK との関連性

同一ラットにて測定された血漿 BK と脳含水量と

の関連性について、対照群、3 時間虚血群、3 時間虚血 30 分再開通群、3 時間虚血 60 分再開通群において検討を試みた。

血中 BK と脳含水量とは Fig. 9 で示されたように有意の正の相関がみられ ($p < 0.005$, $r = 0.80$, $n = 23$)、血中 BK の高値の脳では脳含水量も高値を示した。

3. 脳虚血における kallikrein enzyme inhibitor (aprotinin および SBTI) の脳浮腫および脳エネルギー代謝に及ぼす影響の検討

3 時間虚血後に 30 分の再開通を行ったラットにおける脳含水量の検討では、生理食塩水を注入した対照群の脳含水量は $80.34 \pm 0.94\%$ ($n = 7$) であるのに対して、aprotinin 投与群では $77.79 \pm 0.21\%$ ($n = 7$)、SBTI 投与群では $79.21 \pm 0.83\%$ ($n = 7$) となり、ともに統計学的に有意に脳含水量の増加が抑制された ($p < 0.001$, $p < 0.05$) (Fig. 10, Table 2)。

脳エネルギー代謝諸量の検討では、ATP は対照群で 0.41 ± 0.14 μ mol/g brain ($n = 7$) であり、aprotinin 投与群では 2.38 ± 1.60 μ mol/g brain ($n = 7$)、SBTI 投与群では 0.91 ± 0.36 μ mol/g brain ($n = 7$) となり、ともに統計学的に有意な増加を示した ($p < 0.01$, $p < 0.01$) (Table 2)。一方、lactate は対照群で 24.47 ± 5.68 μ mol/g brain ($n = 7$) であり、aprotinin 投与群では 2.69 ± 0.81 μ mol/g brain ($n = 7$) と統計学的に有意な低下を示した ($p < 0.001$) が、SBTI 投与群では 16.04 ± 8.73 μ mol/g brain ($n = 7$) と低下傾向を認め

Table 2 Effect of aprotinin and SBTI on brain water content and metabolites

Group	n	Water content	Metabolites		
			ATP	Lactate	Pyruvate
Saline	7	80.34±0.94	0.41±0.14	24.47±5.68	0.29±0.10
Aprotinin	7	77.79±0.21***	2.38±1.60**	2.69±0.81 N.S.	0.28±0.06 N.S.
SBTI	7	79.22±0.83	0.91±0.36	16.04±8.73	0.34±0.20

Each values are mean±S.D. Concentrations of ATP, lactate and pyruvate were indicated as $\mu\text{mol/g}$ brain. Water content were indicated as %.

* $p<0.001$, ** $p<0.01$, *** $p<0.05$, N.S.=No significance, n=numbers

Fig. 10 Effect of aprotinin and SBTI on brain water content.

Significant decrease of brain water content were demonstrated in the treated groups.

たが有意な差異は認めなかった (Table 2). また, pyruvate は, 対照群で $0.29 \pm 0.10 \mu\text{mol/g}$ brain ($n=7$) であり, aprotinin 投与群では $0.28 \pm 0.06 \mu\text{mol/g}$ brain ($n=7$), SBTI 投与群では $0.34 \pm 0.20 \mu\text{mol/g}$ brain ($n=7$) であり, とともに統計学的に有意な差異は認めなかった (Table 2).

考 察

BK は, 1949 年 Rocha e Silva ら²⁵⁾によって発見され, 1960 年 Elliott ら²⁶⁾によって同定された kallikrein-kinin system (K-K system)の活性 peptide

であり, kallikrein が kininogen に働くことにより生成され, アミノ酸 9 個からなり, H-Arg-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH の構造式で示される. BK は炎症局所における重要な chemical mediator²⁷⁾であり, 末梢血管拡張, 血管透過性亢進や平滑筋収縮^{28,29)}および弛緩^{29,30)}, 血圧上昇作用³¹⁻³³⁾など多彩な生物学的反応に関与するとされ, 末梢の炎症部位では, BK は postcapillary venules で主に内皮細胞の血管透過性を亢進し, その結果, 血漿が血管内スペースより間質へ漏出し, 損傷組織での局所浮腫の形成において重要な役割を担っていると報告^{34,35)}されている. 一方, 末梢組織での浮腫発現に重要な役割を持つといわれている K-K system が脳浮腫の発現においても関与を示唆する報告¹⁸⁻²⁰⁾も散見する. そこで著者は, まず SHR を使用して外因性の BK を内頸動脈に注入することにより, BK の脳浮腫発現への関与を透過型電子顕微鏡 (TEM) による中大脳動脈の皮質における毛細血管周囲微細構造の観察も加えて検討した. 脳浮腫の指標となる脳含水量の検討では, BK 注入側大脳半球にて生理食塩水注入側大脳半球 (対照群) に比して脳含水量の著明な増加が認められ, 脳浮腫の発生が示された (Fig. 1). また中大脳動脈領域の皮質の毛細血管周囲構造の観察では, 血管周囲性浮腫を示す astrocytic foot process の膨化, vesicular transport の亢進を示唆する pinocytotic vesicles の増加および脳血管外への HRP の漏出, 脳内エネルギー代謝障害を想起させる mitochondria の内膜の解離が認められ, これらは浮腫の発現と血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) の蛋白透過性の亢進を示唆すると考えられた. また tight junction の解離 (dissociation) は認められなかったので HRP の移動は pinocytosis の亢進により行わ

れていることが示唆された。すなわち、外因性の BK の注入により、主として pinocytosis の亢進による BBB の障害が発生し、その結果脳浮腫が発生したものと考えられた。

次に、内因性の BK の変動が虚血性脳浮腫の発現および進展にいかに関与するかについての検討を行った。虚血性脳浮腫モデルとして SHR を用いた両側総頸動脈閉塞後の再開通モデルを使用し、血中および脳組織 BK レベルの変動と脳浮腫および脳エネルギー代謝諸量との関連につき検討を行った。このモデルは、細胞性脳浮腫 (cytotoxic edema) のほかに、血管内皮の細胞膜透過性の亢進や血液脳関門の障害による血管性脳浮腫 (vasogenic edema) を伴う³⁶⁾。脳含水量の検討では、脳含水量は虚血 3 時間において増加し、BLCO 後の血流再開通 30 分ではさらに増加してピークを示し、再開通 60 分では低下した (Fig. 5)。この脳含水量の経時的変化は Westergaard ら³⁷⁾の mongolian gerbil を用いた脳虚血の報告とほぼ一致している。また、脳エネルギー代謝諸量の検討において、脳のエネルギー状態を反映する ATP は虚血により著しく低下し、血流再開後 30 分ではやや増加し、60 分ではさらに増加を認めるがなお低値を示していた (Fig. 6)。脳の嫌気性代謝産物である lactate は ATP の経時の変化とあたかも鏡像を示すごとく虚血 3 時間では著しく増加し、血流再開 30 分ではさらに増加し、60 分では急激に低下した (Fig. 6)。一方、pyruvate は虚血により著しい変化を示さなかった (Fig. 6)。このように、虚血による脳エネルギー代謝障害と脳浮腫の進展、消退がともに密接な関連をもっていることが示されている。他方、同一ラットにおいて脳含水量と血中の BK の変化を検討した。BK は、循環血中において半減期は 30 秒といわれ³⁸⁾、BK を分解し、不活化させる kininase が肺の血管内皮細胞内には膜結合性酵素として多量に存在しており、動脈血ではその 90% 以上が肺において分解され不活化されるため³⁹⁾、BK の測定は脳のできごとをより反映し不活化されない外頸静脈血より行った。血中 BK レベルは虚血 3 時間で有意に増加し、BLCO 後の血流再開通 30 分ではさらに増加してピークを示し、再開通 60 分では低下した (Fig. 7)。この血中 BK の経時的変化は Fig. 5 で示された脳含水量の経時的変化と類似した経過をとることが示された。さらに、同一ラットにおける血中 BK と脳含水量とは極めて高い正の相関を示した (Fig. 9)。また、脳組織 BK も、虚血 3 時間で増加傾向を示し血流再開

30 分後に急激な、かつ有意な増加を示したが、再開通 60 分では対照値域まで低下した (Fig. 8)。このように脳組織 BK の変動は血中 BK の変動に類似していた。脳虚血中での脳浮腫の発現は、血流遮断により ATP の減少、lactate の蓄積によって示されるように好氣的エネルギー代謝の障害を主として生じたものと考えられる。すなわち、ATP の枯渇により ATP dependent な Na pump は障害され、細胞内に Na および水の貯留をきたす。さらに、lactate の蓄積により細胞内浸透圧の上昇をきたし、浮腫は一層助長されることになる。この時期において、血漿および脳組織 BK は血流再開 30 分の時期に比べて軽度であったが増加を認めた。これは BLCO 3 時間ではすでに BK の活性上昇により血管の透過性亢進が惹起されていることが推測される。一方、血流再開後においては、著明な脳含水量の増加および血漿や脳組織 BK の増加が認められた。これらの結果より、血流再開による脳浮腫の増強のメカニズムの一つとして BK の増加が示唆される。今回の結果より、血流再開により K-K system が活性化され、BK の著しい増加が生ずることが示されたが、血漿 BK の増加は虚血による BBB 障害とあいまって BBB の透過性をさらに亢進させ、血漿成分の脳組織間隙への流出をさらにもたらしたと考えられる。この血漿の脳組織への漏出は、血漿中に含有される BK や kallikrein の流出をもたらし、脳組織での BK 産生を亢進させ、脳組織での BK レベルを増加させると考えられる。脳組織での BK の増加は、上記のごとく血漿成分の漏出により影響を受けているほか、脳組織自体においても血中と同様に K-K system の活性化が生じていることも考えられる。こうして BK の増加した脳組織においては、末梢局所でみられる BK の増加による浮腫形成のごとく、虚血障害部位にても同様の浮腫が作成されるものと考えられる。このような K-K system の活性化により、血流再開後に浮腫は進展、助長されるものと考えられる。一方、再開通 60 分では血中および脳組織 BK はともに低下したが、血中 BK の再開通後の減少変化と比較すると、脳組織 BK は血流再開後増加してから極めて速やかに減少しているといえる。これは脳組織 BK が速やかに髄液中や血中にクリアランスされること⁴⁰⁾、また BK を分解する kininase が脳内や髄液中に豊富に存在することなどによると推測される。

一方、kallikrein enzyme inhibitor を用いての BK と脳浮腫との関連の検討では、aprotinin, SBTI とも

脳含水量を有意に減少させ、脳エネルギー代謝の面でも aprotinin は脳エネルギー代謝障害を有意に改善し、SBTI も改善傾向を示した (Fig. 10, Table 2). これは aprotinin と SBTI により kininogen から BK への合成が阻害され、BK 産生を抑制することにより脳浮腫を抑制したと考えられる。この両者の脳浮腫の抑制の程度の違いは、kallikrein inhibitor としての作用の差によるためと推測できる。すなわち、aprotinin は血漿性 kallikrein, 組織性 kallikrein とも抑制するのに対し、SBTI は血漿性 kallikrein のみを抑制するので SBTI のほうが脳浮腫の抑制が弱かったと推測できる³⁷⁾。そして aprotinin, SBTI による脳浮腫の発生の抑制が脳循環障害を軽減し、脳エネルギー代謝障害を改善したと考えられた。またこの両者の脳浮腫の抑制の程度の差違は分子量の差 (aprotinin-6,512, SBTI-20,100) や投与量の問題も一因と考えられる。

近年, prostaglandin (PG) 生合成系⁴¹⁻⁴³⁾および 5-lipoxygenase 産物⁴⁴⁾と脳浮腫の関連がいわれているが、K-K system は PG 生合成系および 5-lipoxygenase 産物とも密接に関連しており^{12,14,15)}, kinin が細胞膜上の receptor に結合すると phospholipase A₂ が活性化され^{12,13)}, 細胞膜のリン脂質に蓄えられている arachidonic acid が遊離され, cyclooxygenase に触媒される系と lipoxygenase により触媒される系により種々の強力な血管作動性をもつ PG, leukotriene (LT) が合成される。そのうち PGE₁, E₂ は BK と相乗作用をもって末梢性の浮腫を増強するとされている^{45,46)}。今回の結果は、血流再開時において血中および脳組織の BK が著明に上昇し、その BK は phospholipase A₂ を活性化させ、PG, LT を増加し、脳浮腫が増強されたものと考えられる。Gaudet⁴³⁾ の血流再開後の PG の増加や Minamisawa⁴⁴⁾ の血流再開後の LT の増加も今回の BK の結果とよく一致しており、BK の PG や LT との関連性も示唆された。

以上、BK は脳虚血、特に脳浮腫発現に重要な要因の一つであると考えられた。

結 論

SHR を用いて BK の内頸動脈注入を行い、BK の脳浮腫発生に及ぼす影響について脳含水量および透過型電子顕微鏡による病理組織学的検討を行った。また、3 時間の両側総頸動脈閉塞後に血流再開通を行った脳虚血モデルで、血中、脳組織の BK および脳含水量、

脳エネルギー代謝諸量を測定し、さらに kallikrein enzyme inhibitor による BK の効果につき脳浮腫および脳エネルギー代謝の面より検討し、以下の結論を得た。

1) BK 注入モデルでは、脳含水量は BK 注入側で対照群に比して有意に増加を示した。BK 非注入側では対照群に比して有意な変化は認めなかった。

2) 電子顕微鏡的観察では、血管周囲性浮腫を示す astrocytic foot process の膨化, vesicular transport の亢進を示唆する pinocytotic vesicles の増加および脳血管外への HRP の漏出を認めた。

3) 血中 BK は、虚血 3 時間および血流再開 30 分でもいずれも有意に高値を示した。脳組織 BK は、血流再開 30 分で有意の高値を示した。また、脳含水量は、虚血 3 時間および血流再開 30 分で有意の増加を示し、3 者の経時的変化に相似性がみられた。

4) 脳含水量と血中 BK は有意の正相関を示した。

5) 脳エネルギー代謝では、ATP は脳虚血 3 時間で著しい低値を示し、血流再開により回復を示した。lactate は脳虚血 3 時間では著しい高値を示し、血流再開 30 分ではさらに高値を示したが、血流再開 60 分では低下した。pyruvate は虚血 3 時間では低値を示し、血流再開後では増加傾向を示した。

6) aprotinin および SBTI とも脳含水量を有意に抑制した。aprotinin は脳エネルギー代謝障害を有意に改善し、SBTI も改善傾向を示した。

以上の成績より、BK は脳虚血性脳浮腫発現に重要な役割を果たしていると考えられた。

稿を終えるに際し、本研究を行うにあたり種々の御鞭撻、御助言をいただきました日本医科大学第 2 内科学教室脳浮腫研究班の片山泰朗博士をはじめとする各位、ならびに付属第一病院生理研究室村松浩美技術員に深甚なる謝意を表します。

なお本論文の要旨は、第 28, 29, 30 回日本神経学会総会 (1987, 1988, 1989 年 5 月), Brain Edema Symposium '87 (Baltimore, USA, October, 1987) および XIV International Symposium on Cerebral Blood Flow and Metabolism (Bologna, Italy, May, 1989) において発表した。

文 献

- 1) Unterberg, A., Wahl, M. and Baethmann, A.: Effects of bradykinin on blood-brain barrier function and pial microcirculation. *Adv. Neurosurg.*, 11, 355~358, 1983.
- 2) Dacey, R.G., Jr., Bassett, J.E. and Takayasu, M.: Vasomotor responses of rat intracerebral arterioles to vasoactive intestinal peptide, substance P, neuropeptide Y, and bradykinin. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 8,

- 254~261, 1988.
- 3) Kamitani, T., Little, M.H. and Ellis, E.F.: Evidence for a possible role of the brain kallikrein-kinin system in the modulation of the cerebral circulation. *Circ. Res.*, 57, 545~552, 1985.
- 4) Wahl, M., Young, A.R., Edvinsson, L. and Wagner, F.: Effects of bradykinin on pial arteries and arterioles in vitro and in site. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 3, 231~237, 1983.
- 5) Marceau, F., Knap, M. and Regoli, D.: Pharmacological characterization of the vascular permeability-enhancing effects of kinins in the rabbit skin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 59, 921~926, 1981.
- 6) Regoli, D.: Neurohumoral regulation of precapillary vessels; The kallikrein-kinin system. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 6(Suppl. 2), S401~S412, 1984.
- 7) Gawlowski, D.M., Ritter, A.B. and Duran, W.N.: Reproducibility of microvascular permeability responses to successive topical applications of bradykinin in the hamster cheek pouch. *Microvasc. Res.*, 24, 354~363, 1982.
- 8) Unterberg, A., Wahl, M. and Baethmann, A.: Effects of bradykinin on permeability and diameter of pial vessels in vivo. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 4, 574~585, 1984.
- 9) 加藤久雄: 血液凝固とキニン系および線溶系の関係. *医用酵素*, 3, 312~326, 1979.
- 10) Kobayashi, M., Suzuki, S. and Hashiba, K.: Role of renal kallikrein in control of renin release in conscious rats. *Am. J. Physiol.*, 244, E262~E265, 1983.
- 11) Mersey, J.H., Williams, G.H., Hollenberg, N.K. and Dluhy, R.G.: Relationship between aldosterone and bradykinin. *Circ. Res.*, 40, 84~88, 1977.
- 12) Nasjletti, A. and Malik, K.U.: Relationships between the kallikrein-kinin and prostaglandin systems. *Life Sci.*, 25, 99~110, 1979.
- 13) Bareis, D.L., Manganiello, V.C., Hirata, F., Vaughan, M. and Axelrod, J.: Bradykinin stimulates phospholipid methylation, calcium influx, prostaglandin formation, and c-AMP accumulation in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2514~2518, 1983.
- 14) Kariya, K., Yamauchi, A. and Chatani, Y.: Relationship between central actions of bradykinin and prostaglandins in the conscious rat. *Neuropharmacology*, 21, 267~272, 1982.
- 15) McGiff, J.C.: Interaction of prostaglandins with the kallikrein-kinin and renin-angiotensin systems. *Clin. Sci.*, 59(Suppl. 6), 105s~116s, 1980.
- 16) Donaldson, V.H. and Evans, R.R.: A biochemical abnormality in hereditary angioneurotic edema. *Am. J. Med.*, 35, 37~44, 1963.
- 17) Cochrane, C.G., Revak, S.D. and Wuepper, K.D.: Activation of hageman factor in solid and fluid phase; A critical role of kallikrein. *J. Exp. Med.*, 138, 1564~1583, 1973.
- 18) Unterberg, A. and Baethmann, A.: The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. Part 1. Cerebral exposure to bradykinin and plasma. *J. Neurosurg.*, 61, 87~96, 1984.
- 19) Maiser-Hauff, K., Baethmann, A., Lange, M., Schürer, L. and Unterberg, A.: The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. Part 2. Studies on kinin formation in focal and perifocal brain tissue. *J. Neurosurg.*, 61, 97~106, 1984.
- 20) Unterberg, A., Dautermann, C., Baethmann, A. and Müller-Esterl, W.: The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. Part 3. Inhibition of the kallikrein-kinin system in traumatic brain swelling. *J. Neurosurg.*, 64, 269~276, 1986.
- 21) Graham, R.C., Jr. and Karnovsky, M.J.: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney; Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 14, 291~302, 1966.
- 22) Takanashi, N., Ohno, Y., Aoyama, M., Maruyama, I., Okada, A., Shinmyozu, K. and Igata, A.: Plasma kinins measurement by sensitive kinin radioimmunoassay and its clinical application. *Thromb. Haemost.*, 50, 230, 1983.
- 23) 片山泰朗: 実験的脳出血による脳浮腫の成因に関する研究; 脳組織のエネルギー代謝の面よりの検討. *日医大誌*, 49, 204~214, 1982.
- 24) Holl, F.: *Methods of Enzymatic Analysis*. p. 1475~1479, Verlag Chemie Weinheim and Academic Press, New York, 1974.
- 25) Rocha e Silva, M., Beraldo, W.T. and Rosenfeld, G.: Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am. J. Physiol.*, 156, 261~273, 1949.
- 26) Elliott, D.F., Lewis, G.P. and Horton, E.W.: The structure of bradykinin; A plasma kinin from ox blood. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 3, 87~91, 1960.
- 27) Rocha e Silva, M.: Chemical mediators of the acute inflammatory reaction. *Ann. NY Acad. Sci.*, 116, 899~911, 1964.
- 28) Regoli, D., Barabe, J. and Park, W.K.: Receptors for bradykinin in rabbit aortae. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 55, 855~867, 1977.
- 29) Regoli, D. and Barade, J.: Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.*, 32, 1~46, 1980.
- 30) Gaudreau, P., Barabe, J., St-Pierre, S. and Regoli, D.: Pharmacological studies of kinins on venous smooth muscles. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 59, 371~379, 1981.
- 31) Correa, F.M.A. and Graeff, F.G.: Central site of the hypertensive action of BK. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 192, 670~676, 1975.
- 32) Hoffmann, W.E. and Schmid, P.G.: Separation of pressor and antidiuretic effects of intraventricular BK. *Neuropharmacology*, 17, 999~1002, 1978.
- 33) Kondo, K., Okuno, T., Konishi, K., Saruta, T. and Kato, E.: Central and peripheral effects of bradykinin and prostaglandin E₂ on blood pressure in conscious rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 308, 111~115, 1979.
- 34) Williams, T.J.: Potentiation of bradykinin-induced exudation following intradermal injection of particulate or colloidal materials in the rabbit; Evidence for prostaglandin release and action in inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, 60, 291P~292P, 1977.
- 35) Williams, T.J. and Morley, J.: Prostaglandins as potentiators of increased vascular permeability in

- inflammation. *Nature*, 246, 215~217, 1973.
- 36) 島健, 山本光生, 岡田芳和, 魚住徹, 石原博文, 宮崎正毅 : SHR 両側頸動脈結紮による脳虚血, 脳と神, 31, 1235~1243, 1979.
 - 37) Westergaard, E., Go, G., Klatzo, I. and Spatz, M. : Increased permeability of cerebral vessels to horseradish peroxidase induced by ischemia in mongolian gerbils. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 35, 307~325, 1976.
 - 38) Saameli, K. and Eskes, T.K.A.B. : Bradykinin and cardiovascular system; Estimation of half-life. *Am. J. Physiol.*, 203, 261~265, 1962.
 - 39) Kizuki, K. and Moriya, H. : Biochemical aspects of the kallikrein-kinin system; Progress and recent topics. *Jpn. J. Inf.*, 6, 221~232, 1986.
 - 40) Kariya, K., Yamauchi, A., Hattori, S. and Okada, Y. : The disappearance rate of intraventricular bradykinin in the brain of the conscious rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 107, 1461~1466, 1982.
 - 41) Gaudet, R.J. and Levine, L. : Transient cerebral ischemia and brain prostaglandins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 86, 893~901, 1979.
 - 42) Gaudet, R.J. and Levine, L. : Effect of unilateral common carotid artery occlusion on levels of prostaglandin D_2 , $F_2\alpha$ and 6-keto prostaglandin $F_{1\alpha}$ in gerbil brain. *Stroke*, 11, 648~652, 1980.
 - 43) Gaudet, R.J., Alam, I. and Levine, L. : Accumulation of cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism in gerbil brain during reperfusion after bilateral common carotid artery occlusion. *J. Neurochem.*, 35, 653~658, 1980.
 - 44) 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 C_4 as a possible cause of cerebral edema. *Stroke*, 19, 372~377, 1988.
 - 45) Thomas, G. and West, G.B. : Prostaglandins as regulators of bradykinin responses. *J. Pharm. Pharmacol.*, 25, 747~748, 1973.
 - 46) Moncada, S., Ferreira, S.H. and Vane, J.R. : Prostaglandins, aspirin-like drugs and the oedema of inflammation. *Nature*, 246, 217~219, 1973.

(受付: 1989年10月11日)