ラット心筋梗塞巣拡大における LTB₄ の役割

佐々木幸二^{*1)}, 鹿取 信・上野晃憲^{*2)}, 重広世紀子・木川田隆一^{*1)}

A role of leukotriene B₄ in exacerbation of myocardial infarction of the rat Myocardial infarction was induced in rats by ligation of left coronary descending artery and ischemic injury was followed up to 48 hr. After the ligation, blood flow resumed into ischemic area from surrounding normal tissue, as known by intensely staining of the marginal zone of the ischemic area with pontamine sky blue, which was injected intravenously one hour before cardiac arrest at each time. Infarct size, evaluated by unstained area of triphenyltetrazolium chloride, reached a plateau at 12 hr. Neutrophils were also accumulated from 3 hr and then increased extensively from 12 to 24 hr. The LTB₄ content in the cardiac tissue was also increased 4 times at 3 hr, compared with that in sham operated controls. Single oral administration of a 5-lipoxygenase inhibitor (AA-861) (80 mg/kg) one hr before ligation decreased the LTB₄ content to the control and the neutrophil count at 3 hr by 40%. Furthermore, the infarct size at 48 hr was also suppressed by AA-861 by 34%. Single oral administration of the inhibitor at 2, 8 or 24 hr after ligation also suppressed the infarct size by 18, 19 or 19% respectively. These results clearly indicate that LTB₄ was generated in the ischemic cardiac tissue, attracted neutrophils and indirectly enhanced the exacerbation of the infarct size.

Koji Sasaki^{*1)}, Makoto Katori・Akinori Ueno^{*2)}, Sekiko Shigehiro・Ryuichi Kikawada^{*1)}

Departments of ^{*1)} Internal Medicine and ^{*2)} Pharmacology, Kitasato University
School of Medicine

key words: myocardial infarction, LTB₄, neutrophils

心筋梗塞の発生は、冠動脈硬化、血栓形成、冠動脈攣縮などによる冠動脈の閉塞に起因するといわれているが、いったん閉塞が起こると、その冠動脈の灌流域は心筋細胞の壊死に進展する。薬物の投与により壊死巣の拡大を最小限にとどめることができれば、心機能障害の増悪を軽減することになり、新しい心筋梗塞の治療法を確立できる。

心筋梗塞巣に多核白血球が浸潤することは早くから報告された¹⁾が、その後の研究は主としてアイソトープ標識細胞を用いて24時間以後の細胞浸潤の検索がなされていた²⁾。

最近、cyclooxygenase と lipoxygenase の両活性を阻害する BW 755 C を用いると、イヌの左冠動脈結紮により生ずる梗塞巣を縮小することが報告され³⁻⁵⁾、この抑制効果は浸潤した多核白血球浸潤抑制に基づくものであると主張された^{3,5)}。しかし、心筋を *in vitro* で ¹⁴C-アラキドン酸とインキュベートして生じた代謝物は 12-HETE⁵⁾ で多核白血球浸潤を説明するには困難であった。

本論文はラットを用い左冠動脈を結紮して心筋梗塞を発生させ、選択的 5-lipoxygenase 阻害薬 (AA-861) が48時間の梗塞部の大きさを有意に縮小させるとともに、心筋内の leukotriene (LT) B₄ 量の減少および心筋内浸潤多核白血球数も同時に減少させることを報告する。

方 法

(1) 冠動脈結紮 (冠結紮)

Sprague-Dawley 系 雄性 ラット (8 週齢 220~270 g SPF) を軽度エーテル麻酔下に背仰位固定し、Selye らの方法⁶⁾に従い、胸骨左縁に沿って約 1.5 cm の縦切開を加え開胸し、心膜を破り、心臓を露出させ、左主冠動脈を起始部から 1~2 mm のところで黒ブレードシルク縫合糸 (浜医科工業、4-0) にて結紮した後、心臓をもとの位置にもどし、すみやかに閉胸した (閉胸時間は約 30~40 秒)。この間、人工呼吸は行わなかった。両側胸部を圧迫し、胸腔内に入った空気を排出すると、呼吸運動はもとの状態にもどった。手術後、心電計 (日本光電 ECG 6611) で II 誘導の ST 上昇を確認した。約10分後までに心室性不整脈が頻発するが、20分を過ぎるころにはほぼ消失した。恒温恒湿室 (25±0.5°C, 60±1%) 内で水、餌を自由にとらせ48時間まで飼育した。全手術時間は約

*1) 北里大学医学部内科学教室

*2) 同 薬理学教室

図1 冠動脈結紮48時間後の心筋断面の虚血部および梗塞部の広がりを示す。
a : 5% pontamine sky blue (PSB) 静注後1時間の心筋横断輪状切片C部心基部断面
b : 心筋輪状切片C部心基部断面のTTC染色

5分、手術による死亡率は約30%であった。

(2) 虚血部面積比の測定

血漿蛋白質と結合する5% pontamine sky blue (PSB) (100 mg/kg) (東京化成) を屠殺前に大腿静脈より注射し、1時間後に1 M KCl を再び大腿静脈より注射して心停止させ、心臓を摘出した。心臓は2~2.5 mm 間隔の四つの横断輪状切片とし、心基部側よりA,B,C,D部と名づけた。B,C,Dの心基部側断面の左心のみについて、染色部、非染色部を光学顕微鏡(日本光学、接眼レンズ10倍、対物レンズ1.2倍)に装着した描画装置(日本光学)を用いて、紙上にトレースした。ミニコンピュータ(HP 1000, 9874 digitizer, Hewlett Packard)を用いて各部分の面積を求め、三つの切片の各部分の面積の総和を、左室断面の面積の総和に対する百分率であらわし全左室に対する百分率(%LV)とした。

(3) 梗塞部面積比の測定

上記と別な動物を用いて同様に1 M KCl 静注で心停止させ、取り出した心臓を2 mm 間隔の横断輪状切片とし、0.09 M phosphate buffer (pH 8.5~8.6)にて1% triphenyl tetrazolium chloride (TTC) (和光純薬)溶液をつくり、遮光下に37°C 20分間インキュベートした。dehydrogenase 活性の存在する正常心筋は深紅色に、活性の消失した壊死部は白色(非染色部)となる⁷⁾。この非染色部を梗塞部とし、虚血部と同様に%LVであらわした。

(4) 心筋組織浸潤多核白血球数の算定

1 M KCl にて心停止させ、取り出した心臓を2 mmの横断輪状切片とし、C部の切片を10% formal saline で約4時間固定し、0.05 M の phosphate buffered saline 中に4°Cで一晩放置し、パラフィン包埋後、切片の心基部側をミクロトーム(大和光機)で4 μmの厚さとし、プレパラート標本を作成した。浸潤多核白血球の chloroacetate esterase 活性を以下の方法で染色した⁸⁾。反応液Aは、4% new fuchsin 2 N HCl 1滴と4%亜硝酸ソーダ1滴を混和し、麦色になったら30 ml の1/15 M phosphate buffer (pH 7.6)を加え作成し、反応液Bは10 mg naphthol AS-D chloroacetate を1 ml の N,N-dimethyl formamide で溶解して作成した。A液とB液を混和し、ワットマン No. 2 で濾過した後、この濾液に脱パラフィンした標本を入れ30~60分間インキュベートし、さらに hematoxylin にて細胞の核を染色したのち、グリセリンゼリーで封入した。

光学顕微鏡(BA-A, Olympus 光学)(対物レンズ100倍油浸、接眼レンズ10倍)にて観察すると胞体が赤色顆粒状、核が青色に染まった多核白血球は、他の細胞と容易に識別できた。この標本内のすべての多核白血球数を算定した。同一標本の多核白血球数の4回の算定は、4676, 4557, 4563, 4793で、平均±標準誤差は4647±56と、この算定に信頼性があることが確認された。

(5) LTB₄の測定

冠動脈結紮3時間後のラット心臓を1 M KCl で心停止させた後、心臓を取りだし、冷生理的食塩水で血液を洗い流し、10秒以内に液体窒素に入れた。10分間放置後凍結した心臓を液体窒素で冷却したステンレス性シリンダー中にて内筒を金槌で十分たたき粉碎し⁹⁾、ただちに80%の冷エタノール(関東化学、超特級)5 ml に入れホモゲナイズした。1時間後2,000 g, 4°C 15分で遠心し、上清を減圧下で蒸発乾固し、5 ml の蒸留水で溶解してpHを3.5に合わせた後、Sep-Pak C 18 (Waters Associates, Milford, MA)にロードし、20 ml の水、20 ml の石油エーテル(和光、特級)で洗浄後20 ml メタノール(関東化学、超特級)で溶出した。蒸発乾固してから0.1%ゲラチン含有50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6) 5 ml に溶解して、LTB₄をRIAキット(Amersham, U.K.)にて測定した¹⁰⁾。この抗体の交叉反応性はLTC₄, LTD₄に対して0.03%であった。対照ラットは、開胸のみ行った後、1~3時間後に同様に処置して測定した。

(6) 薬物の投与

選択的5-lipoxygenase (LOX) 阻害薬 AA-861 (武田薬品) (80 mg/kg) を5%アラビアゴム懸濁液として経口投与した。血中濃度は、有効代謝産物のAA-1777を含めると24時間まで持続する(武田薬品生物研究所、牧良孝博士、私信)。

図2 虚血部および梗塞部の経時的变化
たて軸は左心室に対する百分率(%LV)、横軸
は冠結紮後の時間

(7) 統計学的処理

すべて Student's t-test 法により、危険率5%以下を有意差ありと判定した。

結果

(1) 虚血部面積比の経時変化

屠殺1時間前に5% pontamine sky blue (PSB) を静注すると、色素はすべて血漿蛋白質と結合するので、血流のある正常冠灌流域は淡青色に染まり、血流の途絶した領域は染色されず、両者を区別しえた。冠結紮直後では、この両者のみ認められるが、時間経過とともに両者の間に濃青色に染まる部分が出現した。図1aは、48時間後の輪状切片C部の心基部剖面を示してあり、結紮冠動脈灌流域内のPSBでまったく染色されない虚血部(PSB非染色部)の外側にPSBで濃染された部分(PSB濃染部)があることがわかる。これは、結紮冠動脈灌流域内への血液の再流入を示すものである。

図2は、その時間経過を示したものである。左冠動脈結紮により虚血となった部位の大きさは約56~58%と48時間までほとんど変化しないが、その内側のPSB濃染部は、1時間より明らかとなり以後経時的に流入が増大したことを示していた。このため、真の虚血部であるPSB非染色部の大きさは50.1%(1時間後)よりさらに減少し48時間では27.1%となった。

(2) 梗塞部面積比の経時変化

図1bは、冠結紮48時間後の心臓切片剖面のTTC染色所見を示す。赤く染色された正常部位に比し、壊死に陥った梗塞部はまったく染色されなかった。図2はその時間経過を示したものである。梗塞部は3時間後より明らかとなり、12時間後にはほぼプラトー(約40%)になった。しかし、梗塞部の染色性は、48時間ではまったく染色されないのに比し、12時間ではやや淡い色調を呈していた。非染色部の左室面積は12時間をすぎると、PSB非染色部(真の虚血部)の面積を上まわり血流流入にもかかわらず、壊死が進行することを示していた。

表1 心筋組織浸潤白血球数

	3 hr	6 hr	12 hr	24 hr	48 hr
counts/C切片 心基部剖面	1,096 ±208 (n=4)	1,898 ±463 (n=3)	1,928 ±340 (n=3)	5,588 ±429 (n=5)	5,094 ±208 (n=4)

(平均±標準誤差)

表2 48時間後の梗塞サイズに対するAA-861各時間1回経口投与の抑制効果

	48時間後心筋梗塞 サイズ(%LV)	抑制率	有意水準
A 対 照	37.5±1.5 (n=7)		
B 1時間前	24.6±1.6 (n=9)	34.4%	P<0.001
C 2時間後	30.8±2.1 (n=9)	17.9%	P<0.001
D 8時間後	30.2±1.5 (n=10)	19.5%	P<0.001
E 24時間後	30.5±2.4 (n=7)	18.7%	P<0.001

(平均±標準誤差)

表3 心筋組織より測定した冠結紮3時間後LTB₄値

	LTB ₄ 測定値 (ng/心臓)	
冠 非 結 紮	1.27±0.28 (n=5)	P<0.001
冠 結 紮	3.81±0.25 (n=5)	
冠結紮+ AA-861 投与	1.43±0.27 (n=5)	P<0.001

(平均±標準誤差)

(3) 心筋内浸潤多核白血球数

心筋内浸潤多核白血球数は、対照心筋内では一割面あたり7、10でにすぎないが、結紮後は表1のごとく3時間後でいちじるしく増加し、6~12時間で一度プラトーとなった後24時間後までに急速に増え、以後はほぼ第2のプラトーとなった。

(4) 選択5-lipoxygenase阻害薬の抑制効果

選択的5-lipoxygenase阻害薬AA-861(80mg/kg)を冠結紮1時間前に1回経口投与し、48時間後の梗塞部の大きさを調べると、表2に示すごとく34.4%有意に縮小した(P<0.001)。同様に冠結紮2時間後に1回投与すると、17.9%の有意の抑制を示した。冠結紮8あるいは24時間後の1回経口投与でも、それぞれ19.5、18.7%と同様に有意な抑制がみられた。しかし、AA-861を早期に投与したほうがより有効であるから、冠結紮後の早い時期に5-LOX産物が関与する可能性が示唆された。また、結紮1時間前にAA-861を1回経口投与すると、24時間後の心筋内浸潤多核白血球数は、5588±428から3286±414と41.2%減少した(P<0.005)。このことから

梗塞部拡大に多核白血球が5-LOX産物を介して関与する可能性が示唆された。

(5) 心筋内 LTB_4 量

心筋内 LTB_4 を測定すると、表3のごとく、正常対照ラットの心筋内では、 1.27 ± 0.28 ng/心臓の LTB_4 が認められるが、冠結紮3時間後のラット心筋内では 3.81 ± 0.25 /心臓と有意 ($P < 0.001$) に増加していた。しかし、AA-861を冠結紮1時間前に投与したラットの結紮3時間後の心筋内 LTB_4 は 1.43 ± 0.27 ng/心臓と正常ラット心筋内 LTB_4 量に抑制された。

考 察

ラットを含む実験小動物を用いての心筋梗塞実験は、早くから研究¹¹⁾され、Selyeらによって方法⁶⁾が確立されたといえる。その後、このモデルの種々の変法¹²⁾が考案されるとともに、その梗塞部の形態学的経時変化¹³⁾や酵素活性の経時変化¹⁴⁾も報告された。特に、興味のあることは、心筋梗塞巣周辺に早くから多核白血球の浸潤および単核球が出現し、単核球が瘢痕形成に関係するとの報告もある¹⁵⁾。ある種の非ステロイド性抗炎症薬^{16,17)}や、hydrocortisone, cobra venom factor¹⁸⁾によって、梗塞部サイズが縮小することは炎症反応が梗塞巣拡大に密接に関係することを示している。しかし、これらの詳細な生化学的解析は、いままで知られていなかった。

本実験のラット左冠動脈結紮後の経過は、いままでの報告とはほぼ類似していた。冠動脈結紮後の各時間にPSBを静注し、血漿蛋白質の動態を調べると、結紮冠動脈灌流域は結紮直後にはまったく血流が途絶していたが、1時間後にはすでに虚血部の周辺部が濃青色に染まっており(図2)、虚血部周囲から血流が流入していることは明らかであった。しかも、血液の再流入領域は時間とともに拡大し、真の虚血部はしだいに縮小し、48時間後には左心室の27.1%に減少した。

一方、TTC染色で調べた非染色部すなわち dehydrogenase 消失部あるいは壊死部は3時間より明らかとなり、12時間でほぼ一定となった。これは酸化酵素活性消失の時間経過が9時間で一定となるという報告¹⁴⁾とはほぼ一致する。真の虚血部(PSB非染色部)面積と壊死部(TTC非染色部)面積とは、12時間を少し過ぎたところで約40%とはほぼ一致し、以後血流が入っているにも拘らず、壊死に陥っていることは、12時間虚血となった部位は、後に血流が再開しても再び壊死から回復しないことを示している。

こうした虚血部の変化に加えて、壊死巣周辺部に多核白血球の浸潤が加わり、炎症反応の色彩が濃厚になる。多核白血球は通常の hematoxylin-eosin 染色では心筋組織の諸細胞と区別しがたい。そこで本研究では、浸潤した多核白血球の顆粒の chloroacetate esterase 活性を

染色することにより、他の細胞と容易に識別可能となった。同一標本の4回の多核白血球算定結果はばらつきが少なく、信頼性があることがわかった。この方法で算定した結果は、表1のごとく6～12時間で1度プラトーとなった後24時間まで急速に増加し、以後5,000～5,500と一定となった。心筋内多核白血球数を正確に算定した報告はなく、半定量的な評定で、ラットの冠結紮後1日で mild¹³⁾、2日で moderate～severe¹³⁾、イヌの左冠動脈回旋枝結紮、再灌流6時間後に moderate～severe との報告¹⁹⁾があり、本実験の方法は信頼に足るものと思われた。

多核白血球浸潤は、微小循環レベルでは流血中の多核白血球の流速の減少、細静脈内壁への転がり、粘着そして血管外遊走という経過を経て組織間隙に出現²⁰⁾するが、アラキドン酸の lipooxygenase 代謝物の leukotriene (LT) B_4 は *in vivo* で他の lipooxygenase 代謝物である 5-HETE の100倍、12-HETE の1,000倍 chemokinetic 作用が強²¹⁾、ハムスター頬袋を LTB_4 で灌流すると、低濃度で用量依存的に明らかに白血球の細静脈内壁粘着が起こる²⁰⁾。本実験において、選択的 5-lipoxygenase 阻害薬 AA-861 の冠結紮1時間前1回経口投与において、結紮24時間後の多核白血球数を40%減少させたことは LTB_4 の関与を示唆する。

AA-861 はモルモット腹腔好中球から調整した 5-lipoxygenase を選択的かつ可逆的に阻害し、その IC_{50} は $0.8 \mu M$ と低いが、cyclooxygenase や 12-lipoxygenase は $10 \mu M$ でも抑制しない²²⁾。また、AA-861 の有効代謝産物 AA-1777 は、IgG-抗原複合体のラット胸腔内注射により起こしたアレルギー性胸膜炎の滲出液中の LTB_4 を消失させるとともに、3時間の滲出液の多核白血球および単核球数を半減させる²³⁾ことから *in vivo* でも有効であることは明らかである。

本実験において、結紮1時間前に AA-861 を1回経口投与すると、梗塞部面積比を34%減少させ、さらに結紮2時間後に投与したとき、また8,24時間後の単独投与においても、それぞれ有意に抑制した。AA-861 (80 mg/kg) 経口投与後、有効代謝物の AA-1777 の血中濃度は、少なくとも24時間保たれる(牧良孝博士、私信)こと、および結紮前の投与がより有効なことから、結紮後早期に産生された lipooxygenase 生成物ことに、 LTB_4 が多核白血球浸潤を促すとともに、それにより48時間後の梗塞巣拡大に作用している可能性がきわめて高い。事実、結紮3時間後の心筋内 LTB_4 が、対照正常ラット心筋の3倍産生されていることは、この推測を裏づけるものである。アラキドン酸代謝物は、細胞膜の刺激によって容易に人工的に産生されることは明らかであるので、本実験においては、ラット心筋を摘出後10秒以内に液体窒素中に入れ、凍結するとともに、液体窒素で冷し

たステンレス性シリンダー中で内筒をたたいて粉碎し、ただちに80%冷エタノール中でホモゲナイズした。この方法は、心筋内 ATP、クレアチン磷酸測定の方法⁹⁾の変法であり、酵素失活は確実であると考え、LTB₄測定は、市販の RIA キットによったが、pH 3.5 として Sep-Pak C18 を通すことにより、RIA の妨害物質を除去しえた¹⁰⁾。LTB₄ 1 ng/ml で *in vitro* の chemokinetic activity は最大となること²¹⁾を考えると、心筋内の 3 ng/心臓という量は、多核白血球血管外遊走を起こすには十分の量である。さらに、AA-861 の冠結紮1時間前1回投与により、正常対照ラットのレベルまで抑制されたことは、LTB₄ が多核白血球遊走の一部に関与していたという結論を支持する。

本実験の結果は、cyclooxygenase と lipoyxygenase 両阻害作用をもつ BW 775 C のイヌ心筋梗塞巣縮小が、その lipoyxygenase 阻害作用に基づくという報告³⁻⁵⁾を支持するが、12-HETE が多核白血球遊走を起こしたという結論⁵⁾を支持しない。その論文では、イヌ心筋梗塞部を *in vitro* で ¹⁴C-アラキドン酸とインキュベートしたものであり、本実験の *in vivo* での結論とはいちじるしく異なるとともに、活性からいっても 12-HETE を遊走因子とするには無理がある。

本実験において、初期の LTB₄ が心筋組織のどの細胞に由来するかは明らかでないが、虚血部の周囲組織の流血中の白血球、あるいは心筋組織内に常在するマクロファージである可能性がある。また、マクロファージが zymosan の貪食刺激で LTB₄ を産生するとの報告²⁴⁾もあるので、心筋壊死細胞を貪食して LTB₄ を産生する可能性がある。さらに、冠結紮後8および24時間に1回投与した AA-861 によって、48時間後の梗塞部が約19%縮小することは、心筋内の多核白血球数が24時間でプラトーになることを考え合わせると、LTB₄ 以外の 5-lipoxygenase 生成物、たとえば LTC₄、LTD₄ がその血管収縮作用²⁵⁾あるいは血漿滲出作用²⁶⁾により梗塞部拡大に働いている可能性がある。

心筋梗塞を起こしたウサギ摘出心臓灌流標本に FMLP を加えると、LTD₄ 様物質が生成されるという報告²⁷⁾もあるが、LTD₄ 量は正常ウサギと差がないとの報告²⁸⁾もあり、一定しない。しかし筆者らの予備実験においては、冠結紮24時間後に immunoreactive LTC₄ が少量検出されているので、これらのペプチド LT が梗塞拡大に作用する可能性もある。抗好中球ウサギ血清¹⁹⁾あるいは hydroxyurea⁵⁾により、流血中の多核白血球を減少させておくと、梗塞巣拡大が予防されることは、浸潤多核白血球と梗塞部拡大に因果関係が存在することを示している。

結論として、ラット冠動脈結紮により早期に産生された LTB₄ が、多核白血球浸潤の一部に寄与し、5-lipoxy-

genase 阻害薬の早期投与が心筋梗塞巣拡大阻止に有効であることは、この疾患に新しい治療法を加えることになると思われる。

多核白血球染色法をご教示賜った北里大学医学部解剖山科正平教授、勝又修技術員に深い感謝を捧げる。また、AA-861 を供与された牧良孝博士(武田薬品)に心から感謝をする。この研究の一部は、文部省科学研究費補助金、一般(B)(5848031)および奨励研究A(58770179)、病態代謝研究会、上原財団助成金により助成された。

文 献

- 1) Mallory, G.K., White, R.D., Sacedo-salgar, J.: The speed of healing of myocardial infarction. *Am. heart J.* 18: 647-671, 1939.
- 2) Thakur, M.L., Gattshalk, A., Zaret, B.L.: Imaging experimental myocardial infarction with indium-III-labelled autologous leukocytes; effects of infarct age and residual myocardial blood flow. *Circulation* 60: 297-305, 1979.
- 3) Mullane, K.M., Moncada, S.: The salvage of ischemic myocardium by BW 755 C in anesthetized dogs. *Prostaglandins* 24: 255-266, 1982.
- 4) Jolly, S.R., Lucchsi, B.R.: Effect of BW 755 C in an occlusion-reperfusion model of ischemic myocardial injury. *Am. Heart J.* 106: 8-13, 1983.
- 5) Mullane, K.M., Pead, N., Salmon, J.A., Moncada, S.: Role of leukocyte in acute myocardial infarction in anesthetized dogs; relationship to myocardial salvage by anti-inflammatory drugs. *J. Pharm. Exp. Ther.* 228: 510-522, 1984.
- 6) Selye, H., Bausz, E., Grasso, S., Mendell, P.: Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology* 2: 398-407, 1960.
- 7) Marvin, M.N., Theodor, K.S.: Macroscopic identification of early myocardial infarcts by alterations in dehydrogenase activity. *Am. J. Pathol.* 42: 379-405, 1963.
- 8) Leder, L.-D.: the chloroacetate esterase reaction. *Am. J. Dermatopathol.* 1: 39-42, 1979.
- 9) Imai, S., Piley, A.L., Berne, P.M.: Effect of ischemia on adenosine nucleotides in cardiac muscle and skeletal muscle. *Circulation Res.* 15: 443-450, 1964.
- 10) Ueno, A., Harada, Y., Katori, M.: A clean-up method for radioimmunoassay of leukotrienes from inflammatory exudate. *Jpn. J. Pharmacol.* 40 (suppl.): 88, 1986.
- 11) Johns, T.N., Olson, B.J.: Experimental myocardial infarction I. Amethod of coronary occlusion in small animals. *Ann. Surgery* 140: 675-682, 1954.
- 12) Gusky, H., Kunde, D., Fuhrmann, I.: Die Fadenumwicklung an den koronararterien der ratte, eine methode zur erzeugung einer experi-

- mentellen koronarstenose. *Acta Biol. Med. Germ.* 34: 573-577, 1975.
- 13) Fishbein, M.C., Maclean, D., Maroko, R.: Experimental myocardial infarction in the rat. *Am. J. Pathol.* 90: 57-70, 1978.
 - 14) Fishbein, M.C., Hare, C.A., Gissen, S.A., Spadaro, J., Maclean, D., Maroko, P.R.: Identification and quantification of histochemical border zones during the evaluation of myocardial infarction in the rat. *Cardiovasc. Res.* 14: 41-49, 1980.
 - 15) Robert, C.S., Maclean, D., Maroko, P., Kloner, R.A.: Relation of early mononuclear and polymorphonuclear cell infiltration to late scar thickness after experimentally induced myocardial infarction in the rat. *Basic. Res. Cardiol.* 80: 202-209, 1985.
 - 16) Evans, R.G., Val-mejias, J.E., Kulevich, J., Fisher, V.W., Mueller, S.H.: Evaluation of a rat model for assessing interventions to salvage ischemic myocardium; effect of ibuprofen and verapamil. *Cardiovasc. Res.* 19: 132-138, 1985.
 - 17) Fiedler, V.B.: Reduction of myocardial infarction and dysrhythmic activity by nafazatrom in the conscious rat. *Eur. J. Pharmacol.* 88: 263-267, 1983.
 - 18) Maclean, D., Fishbein, M.C., Braunwald, E., Maroko, P.R.: Long-term preservation of ischemic myocardium after experimental coronary artery occlusion. *J. Clin. Invest.* 61: 541-551, 1978.
 - 19) Romson, J.L., Hook, B., Kunke, S., Abrams, G., Lucchesi, B.R.: Reduction in myocardial infarct size by neutrophil depletion in the dog. *Circulation* 66 (Suppl.): II-85, 1982.
 - 20) Björk, J., Hedqvist, P., Arfors, K.E.: Leukotriene B₄ cause leukocyte emigration from post capillary venules in the hamster cheek pouch. *Inflammation* 6: 189-200, 1982.
 - 21) Palmer, F.M.J., Stephney, P.J., Higgs, G.A. and Eakins, K.E.: Chemokinetic activity of arachidonic acid lipoxygenase products in leukocytes of different species. *Prostaglandins* 20: 411-418, 1980.
 - 22) Yoshimoto, T., Yokoyama, C., Ochi, K., Yamamoto, S., Maki, Y., Ashida, Y., Terao, S., Shiraishi, M.: 2,3,5-Trimethyl-6-(12-hydroxy-5,10-dodecadiynyl)-1,4-benzoquinone(AA-861), a selective inhibitor of the 5-lipoxygenase reaction and the biosynthesis of slow-reacting substance of anaphylaxis. *Biochim. Biophys. Acta* 713: 470-473, 1982.
 - 23) Tanaka, K., Ueno, A., Katori, M.: Roles of leukotrienes in two rat allergic inflammatory models, IgE-mediated and IgG-antigen complex-induced pleurisies. *Prostaglandins* 31: 1099-1116, 1986.
 - 24) Bray, M.A., Ford-Hutchinson, A.W., Smith, M.J.H.: SRS-A and leukotrienes (ed. Piper, P.J.), Wiley Chichister, 1981, p 253-270.
 - 25) Terashita, Z., Fukui, H., Hirata, M., Terao, S., Ohkawa, A., Nishikawa, K., Kikuchi, S.: Coronary vasoconstriction and PGI₂ release by leukotrienes in isolated pig hearts. *Eur. J. Pharmacol.* 73: 357-361, 1981.
 - 26) Ueno, A., Tanaka, K., Katori, M., Hayashi, M., Arai, Y.: Species difference in increased vascular permeability by synthetic leukotriene C₄ and D₄. *Prostaglandins* 21: 637-648, 1981.
 - 27) Barst, S., Mullane, K.: The release of a leukotriene D₄-like substance following myocardial infarction in rabbits. *Eur. J. Pharmacol.* 114: 383-387, 1985.
 - 28) Evers, A.S., Murphree, S., Saffiz, J.E., Jakschik, B.A., Needleman, P.: Effects of endogenously produced leukotrienes, thromboxane and prostaglandins on coronary vascular resistance in rabbit myocardial infarction. *J. Clin. Invest.* 75: 992-999, 1985.