脳・血液関門を境にした発熱物質の作用機構

村上 恵・森本昭生・酒井甫浩・和田 實*

Dual mechanisms of far fever induction inside and outside the blood-brain barrier in rabbits Intravenous bacterial endotoxin, or endogenous pyrogen, in high concentration both caused biphasic fever in rabbits. In low concentration they produced only monophasic fever. Human recombinant interleukin 1 also caused the same pattern of febrile response, depending on their doses administered, to those with bacterial endotoxin or endogenous pyrogen.

Subcutaneous indomethacin suppressed the first phase of fever produced by high concentration of intravenous endotoxin or endogenous pyrogen, but not the second phase. Intracerebroventricular injection of indomethacin reduced only the second phase of fever produced by high concentration of intravenous endotoxin or endogenous pyrogen, but not the first phase. Intraventricular injection of endotoxin or endogenous pyrogen caused slow monotonic fever. This was suppressed by intraventricular, but not by subcutaneous, indomethacin.

Hence, it is concluded that the first phase of biphasic fever is caused by pyrogen acting via structures outside the blood-brain barrier and the second phase by pyrogen acting via structures within the blood-brain barrier.

Naotoshi Murakami • Akio Morimoto • Yoshihiro Sakai • Minoru Wada*

*Department of Physiology, Yamaguchi University School of Medicine

key words: endogenous pyrogen, blood-brain barrier, monophasic fever, biphasic fever, indomethacin

体内に侵入した細菌の内毒素によって、血中の貪食性単核細胞が刺激され、内因性発熱物質を合成するようになり、この物質が血中に遊離されてくる。これが脳に流れていって体温調節神経機構に働き、発熱反応が発現するというのが、最近の発熱発現機序に関する仮説である^{1,2)}。

しかし、この内因性発熱物質(endogenous pyrogen, EP)が、脳で脳・血液関門(BBB)を通過して体温調節神経機構を構成している神経細胞に作用することを証明した報告はまったく見当たらない。すなわち、分子量が18,000程度のペプチドであるこのEPは、BBBを通過しえないのである。とすれば、この脳血流と神経機構とを結びつける働きは、なにが行っているのかの疑問が湧いてくる。

このような発熱発現機序についての研究の経過とは別個に、Miltonらは、プロスタグランジンE₁を脳室内に投与すると、きわめて微量ですぐに発熱することを発見し、以来幾多の研究を重ね、1971年にプロスタグランジン(PG)が、脳内での発熱の最終仲介物質であるとする仮説を提唱した³⁾。EPによって起こる発熱は、このPG合成阻害剤をあらかじめ投与しておく、いちじるしく減少ないしは抑制されることがわかり、この仮説は広く

受け入れられている現状である。PG合成阻害剤のなかでインドメサシンは強力な合成阻害作用を示すが、同時にBBBを通過しがたい性質がある。そこで本剤を使用して、EPが発熱発現に至る経過を分析した。

ふるくから内毒素を静脈内に投与すると、二相性発熱が発現するが、EPの静脈内投与では一相性発熱しか起こらないといわれている。しかし、その根拠はまったくないように思える。このような発熱図式の違いは、血液中のEP量の違いによって起こるのではないかと仮定し、これについての検討をまず行った。ついで一相性発熱ならびに二相性発熱発現過程について分析を加えた。

方法

実験には、3.0ないし3.5 kgの健康な雄性家兎22羽を使用し、本実験の少なくとも10日前までに、薬物投与用のカニューレ(外径0.6 mmのステンレス・スチール管)を先端が第3脳室に達するように、麻酔下で植込み手術を行った。このカニューレを介して、発熱物質ならびにインドメサシンを第3脳室に投与した。

本実験は、動物を最低限に拘束し、21°Cの環境下に、0900から1600にかけて行った。実験中家兎の直腸温を銅・コンスタンタン熱電対を使用して、1分毎に測定したが、薬物投与前は少なくとも90分間は観測し、直腸温が安定するのを待った。薬物の静脈内投与は、耳静脈内

* 山口大学医学部第二生理学教室

に行った。脳室内投与は、前述のカニューレを通してポリエチレン管に接続した細針を挿入し、常時全容積が $20\ \mu\text{l}$ になるように調整した溶液を、5分間かけてマイクロシリンジポンプにて投与した。

内因性発熱物質は、家兎の白血球から *in vitro* で作製したが、その詳細はこれまでに何度も報告している⁴⁾ので省略する。使用したプロスタグランジン E_2 は、2%(v/v)のエタノールを含んだ生理食塩水に $0.5\ \text{mg/kg}$ の濃度になるように溶解した。インドメサシン(Sigma社)は、皮下投与の場合にはゴマ油に $20\ \text{mg/ml}$ の濃度に調整し、脳室内投与用にはエタノールに $20\ \text{mg/ml}$ の濃度になるように調整した。IL-1 は、ヒト・リコンビナント IL-1 α (大日本製薬)を生理食塩水に $10\ \mu\text{g/ml}$ の濃度に溶解した。

なお、家兎は内毒素の静脈内投与に当り、発熱耐性が出現しないように、ランダムな順序で実験を行った。

成績

図1は、内因性発熱物質(EP)を静脈内に、少量($0.3\ \text{ml/kg}$)と大量($1.0\ \text{ml/kg}$)を投与したとき、これとは別にさらに脳室内に少量($15\ \mu\text{l}$)あるいは大量($50\ \mu\text{l}$)のEPを投与したときの直腸温の変動分の平均値を示したものである。

すなわち、静脈内投与では、少量で一相性の体温上昇が出現し、その頂は約60分目に認められるが、大量投与では特徴ある二相性の体温上昇が出現し、第一相目の頂は一相性のときと同様に約60分目に認められた。これに対し、第二相目の頂は180分目であった。内毒素投与によっても発熱は出現するが、少量の内毒素(LPS, lipopolysaccharide)を、たとえば、 $0.02\ \mu\text{g/kg}$ を静脈内投与すると、EP少量投与の場合と同じく一相性発熱が出現し、量が多くなると典型的な二相性発熱を呈した(内毒素の成績は図示していない)。

他方、第3脳室内にEPを投与すると、図1下段に示しているように、量の多少に関係なく30ないし40分の潜時の後、ゆっくりと体温上昇が進行し、4時間の経過の間にその頂を認めることはできなかった。かかる異なった体温上昇経過を示したのは、内毒素の汚染によるものでなく、EPそれ自身の持つ発熱作用であることは、加熱失活させたEPでは体温上昇が起こらないことから明らかである。

図2は、ヒト・リコンビナント IL-1 α を少量($0.5\ \mu\text{g/kg}$)もしくは大量($2\ \mu\text{g/kg}$)静脈内投与したときの体温変動を示したものである。少量投与では60分目に頂を持った一相性体温上昇を呈したが、大量に及ぶと二相性体温上昇が出現し、その頂はそれぞれ60分目と180分目に出現しており、まったくEPと同一図式で発熱した。

図3は、EPもしくはLPS静脈内投与時に出現する

図1 内因性発熱物質(EP)を静脈内もしくは脳室内に投与したとき出現する直腸温の変動消長

上段は少量($0.3\ \text{ml/kg}$, 白マル)あるいは大量($1\ \text{ml/kg}$, 黒マル)のEPを、下段は少量($15\ \mu\text{l}$, 白マル)あるいは大量($50\ \mu\text{l}$, 黒マル)のEPを脳室内に投与した群($n=6$)

白四角印は加熱失活させたEPを $50\ \mu\text{l}$ 脳室内投与。各値は平均値±標準誤差である。

図2 ヒト・リコンビナント IL-1 α を少量($0.5\ \mu\text{g/kg}$, 黒マル)もしくは大量($2\ \mu\text{g/kg}$, 白マル)を静脈内に投与したとき出現する直腸温の変動消長

体温変動に、第3脳室もしくは皮下に投与したインドメサシンが、どのように影響するかを検したものであって、いずれも6羽についての平均値を示してある。図3aにおいては、インドメサシン脳室内投与のときの溶媒であるエタノールを同量($20\ \mu\text{l}$)脳室内にあらかじめ投与した後、EPを静脈内に投与して起こる一相性発熱(実線)は、インドメサシン($400\ \mu\text{g}$)を脳室内に投与した後、EPを投与して起こる発熱(破線)とまったくかわらない(図3a)。すなわち、インドメサシン脳室内投与の影響をまったく受けないが、皮下にあらかじめインドメサシン($20\ \text{mg/kg}$)を投与した後、EPを静脈内に投与する(点線)と発熱はまったく起こらなかった。

図3 内因性発熱(EP)あるいは LPS を静脈内に投与したとき出現する体温変動へのインドメサシン投与の影響

- a : 実線はインドメサシン溶液の溶媒 (20 μ l) をあらかじめ脳室内 (i.c.v) に投与した後、EP を投与した群の体温変動。破線はインドメサシン (400 μ g) 溶液を脳室内に投与した後 EP を投与。点線はインドメサシン (20 mg/kg) 溶液を皮下に投与した後 EP を投与
- b : 実線はインドメサシン皮下 (s.c) のときの溶媒のオイルだけをあらかじめ皮下に (s.c) 投与した後、LPS (2 μ g/kg) を投与した群の体温変動。点線はインドメサシン (20 mg/kg) を皮下に投与した後 LPS (2 μ g/kg) を投与した群の体温変動。破線は点線の群に、さらに LPS 投与 1 時間後にもう 1 回 インドメサシン (20 mg/kg) を皮下に投与した群
- c : 実線は 0 時点で EP 投与、その後 1 時間してインドメサシン溶液の溶媒だけを矢印の時期に脳室内に投与 (i.c.v) した群の体温変動。点線は EP 投与後矢印の時期にインドメサシン (400 μ g) 溶液を脳室内に投与した群

図 3b では、LPS (2 μ g/kg) を投与したときの二相性発熱を示すが(実線)、LPS 投与前にインドメサシン (20 mg/kg) をオイルに溶かして皮下に投与しておき、LPS を静脈内に投与すると第一相目の発熱は消失した(点線)。第二相目の発熱はなお残存した。この第二相目の発熱発現直前に再度インドメサシンを、同量皮下に投与しても、なんの影響も認められなかった(破線)(図

図4 家兎の脳室に LPS (0.02 μ g) (a) あるいは内因性発熱物質 (EP, 20 μ l) (b) を投与したとき出現する体温変動に及ぼすインドメサシンの効果

実線は発熱物質投与に先行して脳室にインドメサシンの溶媒のエタノール (20 μ l) を、破線は同じく皮下にインドメサシン (20 mg/kg) を、点線は同じく脳室内にインドメサシン (400 μ g) 溶液を投与した後、矢印の時点で発熱物質を投与する。

3b)。

発熱の第一相目は、このように皮下に投与したインドメサシンの影響を受けるが、脳室内に投与したインドメサシンの影響を受けない。第二相目は図 3c で示したように、異なった性質を呈した。すなわち、大量の EP を静脈内投与すると、実線のような二相性発熱が出現する。このとき第一相目の頂付近で、インドメサシンの溶媒だけを脳室内に投与してもなんらの影響を受けないが、インドメサシン (400 μ g) を脳室内に投与すると(点線)、発熱の第二相目は発現しなくなった。すなわち、EP 静脈内投与による発熱の第一相目は、皮下に投与したインドメサシンにより、第二相目は脳室内に投与したインドメサシンにより消失した。

図 4 は、EP もしくは LPS 脳室内投与による発熱に、インドメサシンがいかなる効果を呈するかを調べた成績である。図 4a は、インドメサシン投与時の溶媒であるエチルアルコール (20 μ l) をあらかじめ脳室内に投与し、その後 LPS (0.02 μ g) を脳室内に投与して起こる発熱は(実線)、あらかじめ皮下にインドメサシン (20 mg/kg) を投与しておいても、まったく変化を示さない(破線)。しかし、あらかじめ脳室内にインドメサシン (400 μ g) を投与しておくと、LPS 脳室内投与によっても体温上昇は起こらなかった(点線)。図 4b は、EP を使用して行ったまったく同様な実験の成績を示している。いずれの場合においても、発熱物質投与と同一ルートにインドメサシンを投与しなければ、解熱効果を期待することはできなかった。

た。

考 察

発熱は、生体に侵入した外因性発熱物質(LPS などが含まれる)が、組織に固定された、もしくは血液中を自由に移動できる貪食性単核細胞に働いて、内因性発熱物質(EP)を合成するようにこれを賦活し、その結果遊離してきた EP が脳に流れて体温調節神経機構に働き、発熱が発現するものと最近では解されている¹⁾。

しかし、静脈内にこれら外因性発熱物質、もしくは内因性発熱物質を投与して発熱を起こした発熱モデルでは、LPS を使ったときには二相性発熱が、EP を使用したときには一相性発熱が出現するものと広く信じられている。しかし、これといった根拠は見当らない。発熱は、いずれにしろ最終的には、体内で EP が合成されなければ発現しないことから、この合成された EP 量の多少によるのではないかと考えて検討してみると、はたして EP 量いかにによって一相性になったり、二相性になったりする発熱が観察された。近年、発熱物質は、特に EP をめぐる研究の進展はいちじるしく、1981年にはこの EP が免疫反応発現の最初の液性情報伝達物質であるインターロイキン 1 (IL-1) と同一物質か、もしくは近縁物質であることが証明された²⁾が、さらに、それには少なくとも α と β の 2 種類が存在し、アミノ酸配列はもとより遺伝子構造までも明らかになってきた³⁾。さらに、これらの物質が純粋に大量にリコンビナントの形で入手できるようになった。

そこで筆者らは、この EP が、まさに IL-1 であるとするならば、これまで述べた EP で得られた発熱図式がそのまま IL-1 投与によっても得られるに違いないと仮定し検討してみると、はたして、図 2 に示すように、まったく同一図式で発熱すること、さらに発熱の頂もまったく同一であることが明白となった。結局、発熱パターンは血中における発熱物質の量いかに依存しているのである。

しかし、これはあくまでも EP を静脈内に投与するときにみられる現象であって、すでに明らかにされているように、発熱が EP の脳への働きによる⁷⁾とするならば、よりその作用部位に近い脳室内に投与した発熱モデルもまた発熱研究に使用できるに違いないとして、脳室内投与実験モデルもしばしば使用されてきた。ところがその発熱発現経過をよくみると、図 1 下段にみられるように静脈内投与の場合とは全然違った発熱発現の経過を呈した。この二つの発現経過を比較するとまったく性質を異にしており、それぞれ違った発熱発現機構の存在を示唆している。このことは Stitt らの成績⁸⁾と一致している。

Milton らは、プロスタグランジン E を脳室内に投与

したとき、短い潜時とともにいちじるしい発熱が発現したことから、血液中に産生された EP が、脳に直接働いて発熱が起こるのではなくて、このプロスタグランジン(PG)が発熱発現に当っては最終のメディエーターとして働いているとする仮説を提唱した⁹⁾。この PG が脳内のどこで遊離されるかについては、未だ不明の点も多々あるが、現在ではこの仮説は広く支持されている。

筆者らは、発熱発現に複数の過程が関与していることを以下に考察するが、いずれの過程も、最終メディエーターとして、PG が関与していることはインドメサシンの投与によって、発熱発現が抑制されることから明らかである。

インドメサシンは、プロスタグランジン合成酵素の働きを抑制する強力な解熱剤であるが¹⁰⁾、その特性の一つに、脳・血液関門の透過性がよくないことが報告されている¹⁰⁾。そこで、EP 静脈内投与による発熱に際して、皮下に投与したインドメサシンは静脈内に入り、その作用を発現する結果、図 3 のように 60 分目ごろ、頂に達する発熱の第一相目を抑制したが、180 分目に頂に達する第二相目の体温上昇にはまったく無効であった。このことは、静脈内にインドメサシンが存在するときには、脳・血液関門(BBB)の血液側に存在する発熱発現機構には作用するが、BBB を通過できないので、その内側に作用しえず、第二相目の発熱発現は、BBB 内側の発現機構が関与していることを示唆している。また、この第二相目は、脳室内にインドメサシンを投与することによって、抑制されてしまうが、このときは第一相目はまったく無効であった。また、脳室内発熱物質投与によって発現した発熱は、皮下に投与したインドメサシンはまったく効果なく、脳室内に投与したインドメサシンでのみ発熱が消失した。

これらの諸成績から総合して考えると、静脈内に発熱物質が少量合成されたとき発現する発熱は、BBB の外側、すなわち血液側に存在する発熱発現機構だけが関与している。これに対して、静脈内に大量の発熱物質が存在する場合には、BBB 内側に存在する発熱発現機構が関与してくることによって、発熱パターンが複雑になってくるものと結論できよう。すなわち、血液中に大量の発熱物質が存在するような状況下で起こる発熱は、BBB 内側にも発熱物質が存在していることを考えざるをえないような発熱パターンになってくる。しかし、これまでの発熱研究の歴史の中で、BBB を発熱物質が通過できるか否かがなん度となく調べられているが、結論は常に否定的であった¹¹⁾。

この間の矛盾はどう解釈できるのであろうか。一部の研究者は、大量の LPS 投与時に脳室内に LPS が存在する¹²⁾といった、あるいは EP が通過するといった¹³⁾肯定的意見を述べているが、一般的に考えて、日常自然に

発現する発熱時にそのようなことを想定することは無理であろう。 *in vitro* の実験ではあるが、ごく最近 IL-1 α や IL-1 β が血管内皮細胞あるいは血管平滑筋細胞に働いて、IL-1 β の induction が起こることを報告しており^{14,15)}、*in vivo*においても同様な反応が行われているのではないかと想像されるのであって、目下検索中である。

本研究に使用したヒト・リコンビナント IL-1 α は、大日本製薬㈱のご好意によって恵与されたものであって、ふかく感謝する。

文 献

- 1) Atkins, E.: Pathogenesis of fever. *Physiol. Rev.* 40: 580-646, 1960.
- 2) Kluger, M.J.: Fever, its biology, evolution and function. Princeton University Press, New Jersey, 1979, p 86-105.
- 3) Milton, A.S., Wendlandt, S.: Effects on body temperature of prostaglandins of the A, E and F series on injection into the third ventricle of unanaesthetized cats and rabbits. *J. Physiol. (Lond)* 218: 325-336, 1971.
- 4) Murakami, N., Ono, T.: Sex-related differences in fever development of rats. *Am. J. Physiol.* 252: R284-R289, 1987.
- 5) Rosenwasser, L.J., Dinarello, C.A.: Ability of human leukocytic pyrogen to enhance phytohemagglutinin induced murine thymocyte proliferation. *Cell Immunol.* 63: 134-142, 1981.
- 6) Lomedico, P.T., Kilian, P.L., Gubler, U., Stern, A.S., Chizzonite, R.: Molecular biology of interleukin-1. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Bio.* LI: 631-639, 1986.
- 7) King, K.M., Wood, B.W.: Studies on the pathogenesis of fever. IV. The site of action of leukocytic and circulating endogenous pyrogen. *J. Exp. Med.* 107: 291-303, 1958.
- 8) Stitt, J.T., Bernheim, H.A.: Differences in endogenous pyrogen fevers induced by IV and ICV routes in rabbits. *J. Appl. Physiol.* 59: 342-347, 1985.
- 9) Vane, J.R.: Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism for aspirin-like drugs. *Nature New Biol.* 231: 232-235, 1971.
- 10) Hucker, H.B., Zacchei, A.G., Cox, S.V., Brodie, D.A., Cantwell, N.H.R.: Studies on the absorption, distribution and excretion of indomethacin in various species. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 153: 237-240, 1966.
- 11) Cooper, K.E.: The neurobiology of fever: Thoughts on recent development. *Ann. Rev. Neurosci.* 10: 297-324, 1987.
- 12) Ogawa, Y., Kanoh, S.: Involvement of central action of lipopolysaccharide in pyrogen fever. *Jpn. J. Pharmacol.* 36: 389-395, 1984.
- 13) Blatties, C.M., Bealer, S.L., Hunter, W.S., Llanos-Q, J., Ahokas, R.A., Mashburn, Jr., T.A.: Suppression of fever after lesions of the anteroventral third ventricle in guinea pigs. *Brain Res. Bull.* 11: 519-526, 1983.
- 14) Dinarello, C.A., Ikejima, T., Warner, S.J.C., Orencole, A.F., Lonnemann, G., Cannon, J.G., Libby, P.: Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits *in vivo* and in human mononuclear cells *in vitro*. *J. Immunol.* 139: 1902-1910, 1987.
- 15) Warner, S.J.C., Auger, K.R., Libby, P.: Interleukin 1 induces interleukin 1. II. Recombinant human interleukin 1 induces interleukin 1 production by adult human vascular endothelial cells. *J. Immunol.* 139: 1911-1917, 1987.