

学 位 論 文 題 名

脳再灌流状態における ICAM-1 とサイトカイン動態の検討

学位論文内容の要旨

緒言：虚血による細胞死という不可逆的な変化を免れ機能障害にとどまった脳組織は、脳血流の再開により回復すると考えられるが、実際には血流の再開に関わらず、その領域に新たな脳浮腫や脳出血等の組織障害が生じることがしばしば経験される。この再灌流に伴う組織障害(再灌流障害)は心臓、肺や腸管など全身の臓器においてすでに認められており、白血球と血管内皮細胞との相互作用により活性化した白血球が組織内に進入し、組織を傷害するという炎症反応と同様な機序によるものであると考えられている。最近、脳における再灌流障害に関する報告も認められ、その細胞間相互作用について関心が集められてきている。著者はその再灌流障害の急性期におけるメカニズムを検討する目的で、4-vessels occlusion modelにより得られる再灌流状態において以下の項目を調べた。1) intracellular adhesion molecule (ICAM)-1とleukocyte function-associated antigen (LFA)-1出現の時間的、空間的特徴、2) ICAM-1を含めた各サイトカインのmRNAの誘導の経時的変化、3) macrophage migration inhibitory factor (MIF)のmRNA及び蛋白レベルの動態と、臨床的に4) 脳虚血性疾患における血清中のsoluble ICAM-1を測定し、虚血性疾患におけるICAM-1の動態、等を検討した。

対象及び方法：250g前後のウィスターラットを用い、Pulsinelliらの方法に従い、Pentobarbital腹腔内投与後、両側の椎骨動脈を凝固切断し、24時間後、isoflurane麻酔下に両側の総頸動脈を30分間遮断した。その後15、30分、1、6、24時間と遮断解除し、再度isofluraneにて麻酔後断頭し、前脳を摘出し即、液体窒素にて凍結、-80℃にて保存した。これらの脳はコントロール及び虚血負荷のみのグループを含め、再灌流時間により7つのグループに分類した。まず、凍結した前脳の前頭極約8mmの部位の7 μ mの冠状断を作成し、monoclonal anti-rat ICAM-1抗体、monoclonal anti-rat LFA-1 α 、 β 抗体を使用し、各グループにおけるICAM-1、LFA-1の出現を免疫組織学的手法により比較検討した。次に各グループの凍結脳約300mgをTrizol reagentとと

もにホモジナイズしRNAを抽出し、各々のRNA10 μ gについてRT-PCRを行った。均一な β actinを基準としてICAM-1、interleukin(IL)-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6、tumor necrosis factor (TNF)- α 、interferon(IFN)- γ 、monocyte chemoattractant protein(MCP)-1のmRNAの経時的な動態を半定量的に検討し、またMCID Image Analyzerにより定量化した。MIFについてはRT-PCRによるmRNAの動態の検討の他にWestern blottingによる蛋白の出現、及びその分布について免疫組織学的検討を行った。Western blottingはコントロール(group1)と24時間再灌流(group7)のサンプルを用い、polyclonal anti-rat MIF抗体とperoxidase-conjugated anti-rabbit IgGに反応させた。バンドの強度はMCID Image Analyzerにて定量化した。MIFの免疫染色はgroup1とgroup7の凍結切片を用い、同時にMIFの局在を検討する目的でpolyclonal rabbit anti-glia fibrillary acidic protein、polyclonal rabbit anti-neuron specific enolase、monoclonal mouse anti-microtubule-associated protein、monoclonal mouse anti-synaptophysin、monoclonal mouse anti-human CD68、等の染色も行った。また臨床的には脳虚血性疾患を発症した急性期の患者28名の血清中のsICAM-1を測定し、虚血性疾患におけるICAM-1の動態を検討した。対象患者28名は脳梗塞24名と一過性脳虚血発作(TIA)4名であり、すべての症例は発症より24時間以内に採血が行われ、血清に分離後、ICAM-1 test kitを使用しELISA法により定量化し、健常成人(23名)の血清中sICAM-1と比較検討した。

結果及び考察：ICAM-1は皮質下及び基底核領域の微小血管に再灌流1時間後より強くその染色が認められ、またLFA-1陽性の白血球は再灌流6時間後より微小血管周囲に認められた。RT-PCRによるmRNAの動態の検討では、ICAM-1、IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α やMCP-1等のmRNAは再灌流1時間後にその増加が認められたが、IL-6やMIFのmRNAの誘導は再灌流後24時間まで徐々に増加するものであった。以上より再灌流状態では、ICAM-1やサイトカインが早期に誘導され、細胞間反応がその急性期より出現すると考えられた。また、MIFは免疫学的検討では再灌流24時間後にneuropilと思われる部位にその出現が増強しており、Western blottingによっても同様にその蛋白の増加が認められた。これよりMIFは再灌流状態における細胞間反応に関与している事が示唆された。臨床的検討ではには虚血性疾患、特にTIAでsICAM-1はコントロールに比較し高く認められた。

結論：ラットの4-vessels occlusion modelによる再灌流状態では早期にICAM-1の増強が脳微小血管上に認められ、またICAM-1やサイトカイン等のmRNAも再灌流後早期に誘導された。これ

らより再灌流状態の急性期に白血球を中心とした細胞間相互作用が関与することが示唆された。また、その過程にMIFの関与も考えられた。臨床的には脳虚血疾患、特にTIAの急性期の病態に再灌流状態と同様なメカニズムの関与が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 阿 部 弘

副 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

学 位 論 文 題 名

脳再灌流状態における ICAM-1 とサイトカイン動態の検討

再灌流に伴う組織障害(再灌流障害)は心臓、肺や腸管など全身の臓器で認められており、炎症反応と同様に白血球と血管内皮細胞との相互作用を中心として進行するとされている。脳において再灌流障害は急性期の脳梗塞の治療を行う上で大きな問題点であり、その急性期のメカニズムを検討する目的を目的とした。本研究ではラットの 4-vessel occlusion model を用い 15 分より 24 時間にいたる各種の再灌流状態を作成し、免疫組織学的に ICAM-1 と LFA-1 出現の時間的、空間的特徴と RT-PCR を用いて ICAM-1、サイトカインケモカインの mRNA の誘導の経時的変化を検討し、また臨床的に脳虚血性疾患における血清中の soluble ICAM-1 を測定し、虚血性疾患における ICAM-1 の動態を検討した。ICAM-1 は皮質下及び基底核領域の微小血管に再灌流 1 時間後より強くその染色が認められ、また LFA-1 陽性の白血球は再灌流 6 時間後より微小血管周囲に認められた。また ICAM-1、IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α や MCP-1 等の mRNA は再灌流 1 時間後にその増加が認められたが、IL-6 や MIF の mRNA の誘導は再灌流後 24 時間まで徐々に増加するものであった。以上より再灌流状態では、1 時間という急性期より ICAM-1 やサイトカインが誘導されることにより、次々に細胞間反応が出現すると考えられた。

臨床的には虚血性疾患、特に TIA で sICAM-1 は高く認められ、虚血性疾患の急性期の病態に ICAM-1 を含めた細胞間相互作用の関与が考えられた。

以上の結果より、再灌流状態の急性期より ICAM-1 やサイトカインなどの誘導が起こり白血球を中心とした血管内皮細胞や組織との相互作用が働き、早期より再灌流障害が誘導されることが示唆された。また、虚血性疾患、特に TIA においても、その病態に微小レベルではあるが同メカニズムの関与が示唆された。

公開発表において、上出利光教授より ICAM-1 の出現について他の臓器の血管と比較した脳血管の特異性、再灌流障害に陥りやすい部位の実験動物とヒトとの差について質問があった。ついで長嶋和郎教授より再灌流障害を起こす虚血の critical point について、その障害を担う細胞について、sICAM-1 の働きについての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自らの研究に基づく経験や過去の論文の結果を引用し、豊富な知識に基づいて明解に回答した。

本研究により、再灌流障害における白血球を中心とした細胞間相互作用の働きが関与することが明らかとなり、脳梗塞急性期の治療における再灌流障害の予防として期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。