



## Neutrophil elastase inhibition reduces cerebral ischemic damage in the middle cerebral artery occlusion

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 島倉, 啓 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1633">http://hdl.handle.net/10271/1633</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 356号	学位授与年月日	平成14年 2月22日
氏 名	島 倉 啓		
論文題目	<p>Neutrophil elastase inhibition reduces cerebral ischemic damage in the middle cerebral artery occlusion  (中大脳動脈閉塞モデルにおける好中球エラスターゼの阻害は脳虚血障害を減弱する)</p>		

博士(医学) 島 倉 啓

## 論文題目

Neutrophil elastase inhibition reduces cerebral ischemic damage in the middle cerebral artery occlusion

(中大脳動脈閉塞モデルにおける好中球エラスターゼの阻害は脳虚血障害を減弱する)

## 論文の内容の要旨

### 〔はじめに〕

脳虚血後の梗塞部位および脳梗塞周辺部位においては白血球が集積しており、それが梗塞の進展に影響を及ぼしていることが知られている。その白血球が活性化されることにより、なかでも好中球からエラスターゼというタンパク分解酵素が産生され、血管内皮あるいは組織そのものへの障害に関与していると考えられている。

そこで、エラスターゼの虚血巣における役割を明らかにする目的で、光増感反応を用いたラット中大脳動脈閉塞モデルにおいてエラスターゼインヒビターの作用を検討した。

### 〔材料ならびに方法〕

#### 1. 光増感反応を用いた脳梗塞モデルの作製

体重250g前後のWistar系雄性ラットをハロセン麻酔下に、手術用ドリルで頭蓋底に直径約4mmの窓を作成し、左中大脳動脈を露出させた。光ファイバーケーブルにて中大脳動脈に緑色光を照射すると同時に大腿静脈よりローズベンガルを注入し、血栓にて中大脳動脈を閉塞した。

#### 2. 脳梗塞面積の測定

脳梗塞作成24時間後に大脳を取り出し、横断面で1mmのスライスを6枚作成した。1% TTCにて染色し、脳梗塞の面積を測定した。すなわち、そのスライスをボラロイドカメラで撮影し、イメージアナライザーでそれぞれのスライスの脳の総横断面積に対する梗塞の割合を計算した。

また、脳梗塞作成24時間後の神経症状の観察および水分含量についても検討した。

#### 3. 好中球数の測定

脳切片を免疫染色にてミエロペルオキシダーゼを染色し、光学顕微鏡下で好中球数をカウントした。

エラスターゼインヒビター(ONO-5046)は、3~30mg/kg/hrで静脈内持続投与した。抗好中球抗体(Anti-PMN)は脳梗塞作製3時間前に腹腔内投与した。

### 〔結果〕

脳虚血直後からONO-5046を、10, 30mg/kg/hrで24時間静脈内持続投与することにより、24時間後の脳梗塞の進展抑制、水分含量の減少が認められた。神経症状は用量依存的に軽減された。また、脳虚血3時間後から21時間、30mg/kg/hrの静脈内持続投与においても直後からの投与と同程度の脳梗塞の進展抑制が認められた。Anti-PMN投与群では、末梢血の好中球数は90%減少し、脳梗塞の進展も抑制された。ミエロペルオキシダーゼで染色した好中球数は梗塞部位においてONO-5046投与群と対称群との間に差は認められなかった。

### 〔結論〕

今回の結果から、光増感反応を用いたラット中大脳動脈閉塞モデルにおいて、脳梗塞の進展に好中球

が深く関与しており、なかでもエラスターゼが重要な役割をしていると考えられた。エラスターゼインヒビターを虚血3時間後から投与した場合にも脳梗塞の進展が抑制されたことから、エラスターゼは虚血3時間後までの超急性期より、それ以降に関与していることが示唆された。また、エラスターゼインヒビターは、好中球の集積には影響を与えずエラスターゼ活性を抑制したことで障害を縮小したと思われる。

## 論文審査の結果の要旨

脳虚血後の梗塞部位および脳梗塞周辺部位に白血球が集積し、梗塞の進展と何らかの関係があることが知られている。とくに活性化された好中球からタンパク分解酵素であるエラスターゼが産生され、血管内皮あるいは組織そのものへの障害に関与しているのではないかと考えられている。しかし、エラスターゼの脳梗塞形成への関与はこれまで証明されていない。そこで、申請者はエラスターゼ活性が脳虚血後の梗塞巣の形成過程に関与することを明らかにする目的で、光増感反応を用いたラット中大脳動脈閉塞モデルにおいてエラスターゼインヒビターの作用を検討した。

体重240-260gのWistar系雄ラットを2%ハロセン麻酔下に、手術用ドリルで頭蓋底に直径約4 mmの窓を作成し、左中大脳動脈を露出させた。大腿静脈よりローズベンガル(20 mg/kg)を注入すると同時に、光ファイバーケーブルにて中大脳動脈に緑色光(540 nm半値幅80nm)を10分間照射し、光増感反応により血栓を形成させて中大脳動脈を閉塞した(photochemically-induced thrombosis、PITモデル)。エラスターゼインヒビター(ONO-5046)は、3、10、30 mg/kg/hrで静脈内持続投与した。抗好中球抗体(Anti-PMN)は脳梗塞作製3時間前に腹腔内投与した(1mg)。

脳梗塞作成24時間後に脳を取り出し、横断面で1 mmの脳切片を6枚作成した。1% TTC (triphenyltetrazolium chloride)にて染色し、イメージアナライザーでそれぞれの脳切片の梗塞の面積を測定し、脳の総横断面積に対する梗塞の割合を計算した。また、脳梗塞作成24時間後の神経症状(後肢の麻痺、姿勢の異常)および脳浮腫(水分含量)についても検討した。さらに脳切片を抗ミエロペルオキシダーゼ抗体を用いて免疫染色し、光学顕微鏡下で好中球数をカウントした。

脳虚血直後からONO-5046を、10、30 mg/kg/hrで24時間静脈内持続投与することにより、24時間後の脳梗塞面積の減少、水分含量の減少が認められた。神経症状も用量依存的に軽減された。また、脳虚血3時間後からONO-5046の投与を開始し、30mg/kg/hrの静脈内持続投与を21時間行った場合においても、虚血直後からの投与の場合と同程度の脳梗塞面積の減少が認められた。抗好中球抗体投与群では、末梢血の好中球数は90%減少し、脳梗塞の進展も抑制された。しかし、ONO-5046投与群と対称群との間に梗塞部位における好中球数に有意差は認められなかった。

以上から、エラスターゼインヒビターは、好中球の集積には影響を与えずエラスターゼ活性を抑制することで脳梗塞を縮小することが明らかになった。このように、申請者は光増感反応を用いたラット中大脳動脈閉塞モデルにおいて、脳梗塞の進展に好中球が深く関与しており、そのエラスターゼが重要な役割をしていることを明らかにした。特に、エラスターゼインヒビターを虚血3時間後から投与した場合にも脳梗塞の進展が抑制されたことから、エラスターゼはごく急性期の細胞障害よりむしろ、それ以降の組織障害による梗塞進展に関与していることが示唆され、エラスターゼ抑制剤の臨床応用への発展も期待できる点を評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) 虚血後3時間以上経過後でONO-5046を投与した場合の効果はどのように考えられるか
- 2) エラスターゼ活性は血管内皮障害、extravasationに直接関与しないのか
- 3) 好中球はエラスターゼを血中に分泌するのか、組織で分泌するのか
- 4) 好中球のカウント数は梗塞面積で補正すべきではなかったか
- 5) エラスターゼはラジカル発生あるいはラジカルによる障害とどう関係があるのか
- 6) 脳虚血による細胞障害や梗塞の進展にエラスターゼはどの様に関わっているのか
- 7) TTCは何を染色するものなのか、なぜ梗塞巣が判るのか
- 8) PITモデルでONO-5046同様の脳保護効果のあった他の薬剤とエラスターゼの関係は
- 9) PITモデルは一過性局所脳虚血の病態に近いモデルと考えられるか
- 10) ONO-5046の臨床応用はどの程度すすんでいるのか
- 11) ONO-5046は脳血流量に直接影響を与えないのか
- 12) 虚血で好中球が活性化され、エラスターゼが分泌されるのはどういうメカニズムか
- 13) ONO-5046は、血液脳関門を透過するか
- 14) ONO-5046の血中半減期はどれくらいか、効果は可逆的か
- 15) 脳浮腫に対する効果は直接効果ではなく、梗塞が減少した結果ではないのか
- 16) ONO-5046の副作用、特に感染に関してはどうか
- 17) 浮腫発生とエラスターゼインヒビターが虚血による脳浮腫を減弱するメカニズム

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	福田 敦 夫	
	副査	佐藤 康 二	副査 山 本 清 二