
原 著

アラキドン酸による脳微小血管内皮細胞傷害

—培養細胞を用いた検討—

新潟大学脳研究所脳神経外科学教室（主任：田中隆一教授）

小 出 章

Cerebral Microvascular Endothelial Cell Damage
Induced by Arachidonic Acid
—In-vitro Studies—

Akira KOIDE

*Department of Neurosurgery, Brain Research Institute,
Niigata University
(Director: Prof. Ryuichi TANAKA)*

The mechanism of the endothelial cell damage caused by free AA (arachidonic acid) was investigated in vitro, using purified cerebral microvascular endothelial cells in culture. The endothelial cells were incubated with various concentrations of free AA, 3, 15, 30, 150, 300 μ M, dissolved in minimal essential medium. The endothelial cell damage was estimated by ^{51}Cr cytotoxicity test and the ability to produce prostacyclin by the endothelial cells after the incubation with free AA. ^{51}Cr release from endothelial cells increased time dependently after the incubation with $\geq 15\mu\text{M}$ of free AA, and reached maximum at the end of 24 hours incubation. Pretreatment with dexamethasone, a phospholipase A_2 inhibitor, partially inhibited ^{51}Cr release. However indomethacin, a cyclooxygenase inhibitor and BW755C, a cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitor, had no effect on it. Prostacyclin production by endothelial cells also decreased time dependently after the incubation with $\geq 30\mu\text{M}$ of free AA. These findings suggested that free AA itself, not the metabolites, induced the endothelial cell damage. Free AA released from cellular membrane after various cerebral insults may play an important

Reprint requests to: Akira KOIDE,
Department of Neurosurgery, Brain
Research Institute, Niigata University,
Asahimachi-dori 1, Niigata City, 951,
JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町757
新潟大学脳研究所脳神経外科学教室
小 出 章

role in occurring the vasogenic cerebral edema.

Key words: cerebral microvascular endothelial cell, arachidonic acid, indomethacin, BW755C, dexamethasone, prostacyclin
脳微小血管内皮細胞, アラキドン酸, インドメサシン, BW755C, デキサメタゾン, プロスタサイクリン

I. はじめに

虚血, 外傷など様々な病的条件下では, 脳を構成する種々の細胞の膜の磷脂質から遊離アラキドン酸が放出され脳組織内に著増することが知られている¹⁾⁻¹⁰⁾. 放出された遊離アラキドン酸は, 再び細胞の膜に組み込まれるか, シクロオキシゲナーゼあるいはリポキシゲナーゼ系の代謝経路で代謝され, 種々の代謝産物が形成される²⁾.

ところで, これらの遊離アラキドン酸やその代謝産物が, 種々の脳傷害の後に出現する vasogenic edema の発生に重要な役割を演ずることが多くの研究によって示唆されてきた¹¹⁾⁻¹⁸⁾. 例えば, 脳内に遊離アラキドン酸を注入すると vasogenic edema の生ずることが報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾. これらの実験結果は, 遊離アラキドン酸またはその代謝産物が脳血管内皮細胞の透過性を亢進させることを示唆している¹⁴⁾¹⁵⁾. このような観点から, 遊離アラキドン酸とその代謝産物のうち内皮細胞の透過性を亢進させる主体は何であるのか, そして脳血管内皮細胞の透過性の亢進は内皮細胞の傷害によって生ずるのかあるいは機能的な変化によって生ずるのかなどについて in vivo で種々の検討が行われ, 多くの知見が得られてきた¹²⁾⁻¹⁸⁾. しかしながらその見解にはいまだ多くの不一致があり, その原因の一つとして in vivo における方法論的な限界があるように思われる.

本研究では, 純粹に培養された脳微小血管内皮細胞を用いて, まず遊離アラキドン酸が脳微小血管内皮細胞を傷害するか否かについて検討を行った. 次いで, 種々のアラキドン酸代謝酵素阻害剤を用いて, 遊離アラキドン酸による脳微小血管内皮細胞傷害が, 遊離アラキドン酸それ自体による作用か, その代謝産物による作用かについて検討した. さらに, 遊離アラキドン酸が脳微小血管内皮細胞のプロスタサイクリン産生に及ぼす影響について検討した.

II. 実験方法

1. 脳微小血管内皮細胞の分離と培養

脳微小血管内皮細胞の分離と培養は Bowman ら¹⁹⁾の方法を一部改変した皆河ら²¹⁾²²⁾の方法で行った. その方法を簡略に記せば, 砂ネズミ10匹を断頭後, 全脳をとりだし, 付着している硬膜を除去し, 生理食塩水でよく洗浄した. これを細切した後, 0.5% dispase を含む 50 mM Hepes buffer 加 minimal essential medium (MEM, Nissui) でよく攪拌し, 37℃で3時間処理した. 処理後, 10% fetal bovine serum (FBS) 加 MEM を加え, 1,000 g で10分間遠心洗浄し, 上清を除去した後, 13% dextran を含む 50 mM Hepes buffer 加 MEM を加え, 5,800 g で10分間遠心した. 得られた沈渣に10% FBS 加 MEM を加えた後よく攪拌し, 孔径 300 μ の nylon mesh を通過させ微小血管を得た. これを 1,000 g で10分間遠心し, 沈渣を 1 mg/ml collagenase/dispase を含む 50 mM Hepes buffer 加 MEM で37℃, 6時間処理した. 処理後, 10% FBS 加 MEM で洗浄し, 得られた沈渣を50% Percoll の連続密度勾配溶液に浮遊させ, 1,000 g で10分間遠心した. 遠心後, 溶液の上層約1/3の部位に主に数個の細胞からなる一層が得られるのでとりだし, 10% FBS 加 MEM で洗浄した. 得られた細胞を1% gelatin (Merck) 加 PBS で coating した数個の組織培養用瓶に移し, CO₂ incubator にて37℃, 5% CO₂ の条件下で培養した. 培養後3~4週で多数のコロニーが形成させるが, この中から細胞が単層敷石状に配列した一つのコロニーのみを機械的に剝離し, 得られた細胞を新しい培養瓶に移し confluent に達するまで培養した. 培養細胞は0.01% EDTA 加0.02% trypsin で処理し, 1:2 の割合で継代した.

培養細胞は多角形で, 単層性に増殖し, いわゆる敷石状配列を示し, 長期に継代してもその性格は失われなかった²¹⁾²²⁾ (Fig. 1). またコラーゲンゲル内に培養した場合, 毛細血管様の管腔の形成が見られた²²⁾. 酵素抗体法による第Ⅷ因子の染色では全ての培養細胞が陽性であり, 長期に継代してもその染色性が保たれた²¹⁾²²⁾ (Fig. 2). Radioimmuno-assay (RIA) 法では, 培養細胞によるプロスタサイクリン産生が確認され, 長期継代細胞でもその性格が維持された²²⁾. これらの所見から, 培

養細胞は純粹に培養された脳微小血管内皮細胞であると考えられた。

2. 遊離アラキドン酸による脳微小血管内皮細胞傷害の検討

遊離アラキドン酸が脳微小血管内皮細胞を傷害するかどうかを知るため、以下の実験を行った。内皮細胞傷害の判定には、Harlan ら²³⁾による⁵¹Cr cytotoxicity testを用いた。

すなわち、gelatin で coating した 24 well の組織培養用皿 (CORNING 25820 GEL, 岩城硝子社製) の各 well に、一定量の培養細胞を均一に浮遊させた20% FBS 加 MEM 1 ml を加え、confluent に達するまで培養した。培養液を除去した後、各 well に Na₂⁵¹CrO₂ (New England Nuclear) を 2 μ Ci/ml の濃度で溶解した20% FBS 加 MEM 1 ml を加え、さらに18時間培養し細胞を label した。培養後、各 well の細胞を MEM 1 ml で5回洗浄して unbound label を含む培養液を除去した後、遊離アラキドン酸 (ナトリウム塩, Sigma) を種々の濃度で含む培養液あるいは control 用培養液 2 ml を加え、種々の時間培養を行った。遊離アラキドン酸を含む培養液は、まず遊離アラキドン酸粉末を PBS で溶解して必要濃度の 100 倍の溶液とし、次いで MEM で 100 倍に希釈することにより作製した。培養液中の遊離アラキドン酸濃度は、3 μ M, 15 μ M, 30 μ M, 150 μ M, 300 μ M とし、培養時間は、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間とした。各濃度の遊離アラキドン酸を含む培養液、control 用培養液の pH, 浸透圧に有意な差はなかった。培養終了後、500 g で10分間遠心した後、上清 200 μ l を採取し、上清中の⁵¹Cr 量をガンマシンチレーションカウンター (Aloka 社製 ARC-300) で測定して実験解離を得た。最大解離は 1% Triton X-100 (ナカライテスク社) で測定し、自然解離は培養液のみ (1% PBS 加 MEM) の条件で測定した。

⁵¹Cr の percent release は、下記の式から算出した。

$$\frac{\text{実験解離 (cpm)} - \text{自然解離 (cpm)}}{\text{最大解離 (cpm)} - \text{自然解離 (cpm)}} \times 100 (\%)$$

(cpm: counts per minute)

3. 遊離アラキドン酸による脳微小血管内皮細胞傷害に及ぼすアラキドン酸代謝酵素阻害剤の影響

次に、遊離アラキドン酸による脳微小血管内皮細胞傷害が、遊離アラキドン酸それ自体の作用により生ずるのか、その代謝産物の作用により生ずるのかを知る目的で、

アラキドン酸代謝酵素阻害剤を用いた検討を行った。

使用した阻害剤とその作用を以下に記す。インドメサシンはシクロオキシゲナーゼの阻害剤であり、プロスタグランジンとフリーラジカルの産生を抑制する²⁴⁾。BW 755C は、シクロオキシゲナーゼとリポキシゲナーゼ両者の阻害剤であり、シクロオキシゲナーゼ系代謝産物以外にロイコトリエンの産生も抑制する²⁵⁾。デキサメタゾンとはスホリパーゼ A₂ の阻害剤であり、細胞の膜の磷脂質から遊離アラキドン酸が放出されるのを抑制する²⁶⁾²⁷⁾。いずれの阻害剤も、in vitro で最大酵素阻害の得られる濃度を、遊離アラキドン酸負荷に先立って投与し、遊離アラキドン酸負荷後にもその作用を持続させた。

すなわち、実験 2 と同様の方法で⁵¹Cr で脳微小血管内皮細胞を label し、unbound label を洗浄除去した後、各 well に、10 μ M のインドメサシン (和光純薬)、100 μ M の BW755C (Wellcome Research Laboratories)、1 μ M のデキサメタゾン (萬有製薬) のいずれか一つの阻害剤を含む培養液あるいは control 用培養液 1 ml を加え培養した。培養時間はインドメサシンおよび BW 755C で30分、デキサメタゾンで1時間とした。各阻害剤を含む培養液は、それらの粉末をまず 100% ethanol で溶解して必要濃度の 10,000 倍の溶液とし、次いで PBS で 100 倍に希釈し、これを MEM でさらに 100 倍に希釈することによって作製した。各阻害剤を含む培養液、control 用培養液の pH, 浸透圧に有意な差はなかった。上記の時間培養を行って細胞を前処置した後、各 well にさらに種々の濃度の遊離アラキドン酸を含む培養液あるいは control 用培養液 1 ml を加え、種々の時間培養を行った。培養液中の遊離アラキドン酸の最終濃度、培養時間は実験 2 と同様とした。培養終了後、実験 2 と同様の手順で⁵¹Cr の percent release を算出したが、この場合自然解離は、阻害剤非処置群では培養液のみ (0.005% ethanol・1% PBS 加 MEM) の条件で測定し、阻害剤処置群では阻害剤を含む培養液のみの条件で測定した。

4. 遊離アラキドン酸が脳微小血管内皮細胞のプロスタサイクリン産生に及ぼす影響

さらに、遊離アラキドン酸が脳微小血管内皮細胞のプロスタサイクリン産生に及ぼす影響について検討した。

すなわち、Gelatin で coating した 24 well の組織培養用皿の各 well に、一定量の培養細胞を均一に浮遊させた20% FBS 加 MEM 1 ml を加え、confluent に達するまで培養した。培養後、各 well を37℃の MEM 1 ml で3回静かに洗浄して培養液を除去した。次いで

各 well に遊離アラキドン酸を種々の濃度で含む培養液あるいは control 用培養液 2 ml を加え、種々の時間培養を行った。培養液中の遊離アラキドン酸の濃度は実験2と同様とし、培養時間は3時間、6時間、12時間とした。培養終了後、500 g で10分間遠心し、上清 200 μ l を採取し、これを -80°C で冷凍保存した。後日市販の RIA kit (New England Nuclear) で、上清中に含まれる 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ を測定し、産生されたプロスタサイクリン量を定量した。

他方、遊離アラキドン酸負荷後における脳微血管内皮細胞のプロスタサイクリン産生量について検討を行った。

すなわち、上記と同様の遊離アラキドン酸濃度、培養時間で内皮細胞の培養を行った後、培養液を除去し、各

well の細胞を再び 37°C の MEM 1 ml で3回静かに洗浄して培養液を除去した。次いで各 well に基質として低濃度 (30 μM) の遊離アラキドン酸を含む培養液 2 ml を加え、3時間培養した。培養終了後、上記と同様の方法で産生されたプロスタサイクリン量を定量した。

III. 結 果

1. 遊離アラキドン酸による脳微血管内皮細胞傷害

300 μM および 150 μM の遊離アラキドン酸では培養3時間後から、30 μM および 15 μM の遊離アラキドン酸では培養6時間後から、濃度依存性、時間依存性に有意な脳微血管内皮細胞傷害が認められた。すなわち遊離アラキドン酸は、15 μM 以上の濃度で、濃度依

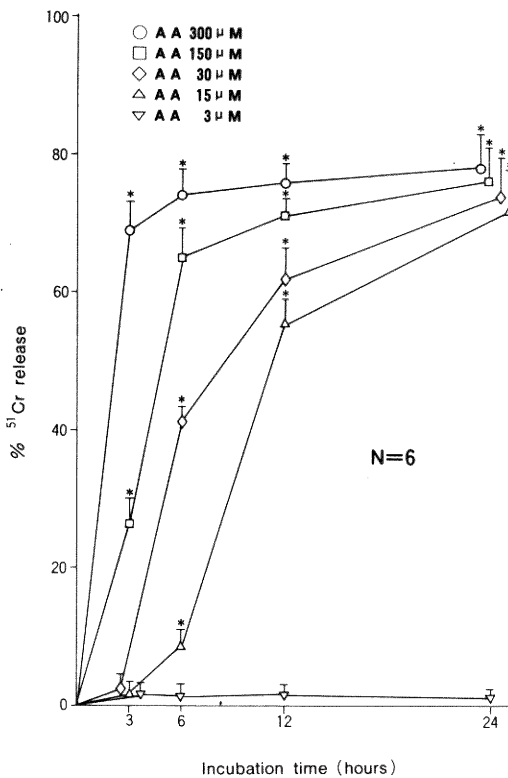


Fig. 3 Effect of free AA on ^{51}Cr release by cerebral microvascular endothelial cells. Results are expressed as percentage of specific increase of ^{51}Cr release over the values obtained in control medium. * $p < 0.001$ different from control by Student's t test.

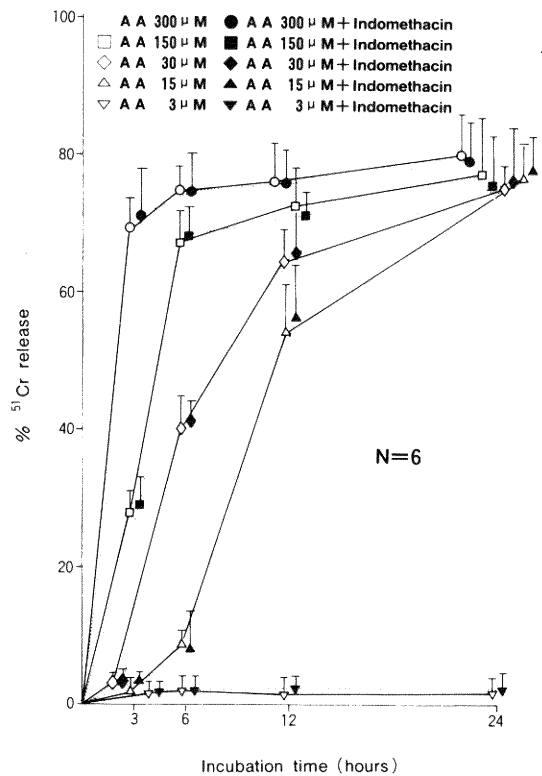


Fig. 4 Effect of pretreatment with indomethacin on ^{51}Cr release by cerebral microvascular endothelial cells induced by free AA. There is no significant difference in ^{51}Cr release between indomethacin-pretreated and untreated cells.

存性、時間依存性に脳微小血管内皮細胞を傷害した。これらの内皮細胞傷害は培養24時間後にほぼ極大に達した。

3 μM の遊離アラキドン酸では、いずれの培養時間においても内皮細胞傷害は認められなかった (Fig. 3)。

2. 遊離アラキドン酸による脳微小血管内皮細胞傷害に及ぼすアラキドン酸代謝酵素阻害剤の影響

インドメサシン処置群、BW755C 処置群のいずれも、それぞれの非処置群に比較して遊離アラキドン酸による脳微小血管内皮細胞傷害に有意な差は認められず、遊離アラキドン酸それ自身が脳微小血管内皮細胞を傷害しうることが示唆された (Fig. 4, 5)。

他方、デキサメタゾン処置群では、非処置群に比較して、不完全ではあるが遊離アラキドン酸による脳微小

管内皮細胞傷害に有意な抑制が認められた。すなわち、デキサメタゾン前処置によって、300 μM および 150 μM の遊離アラキドン酸では培養3時間後に、30 μM の遊離アラキドン酸では培養6時間後に、15 μM の遊離アラキドン酸では培養6時間後および12時間後に、脳微小血管内皮細胞傷害の有意な抑制が認められた (Fig. 6)。

3. 遊離アラキドン酸が脳微小血管内皮細胞のプロスタサイクリン産生に及ぼす影響

遊離アラキドン酸は、3 μM 以上の濃度では、濃度依存性、時間依存性に脳微小血管内皮細胞のプロスタサイクリン産生量を増加させた (Fig. 7)。

他方、遊離アラキドン酸負荷後に細胞を洗浄し、基質として低濃度の遊離アラキドン酸を加え一定時間培養を

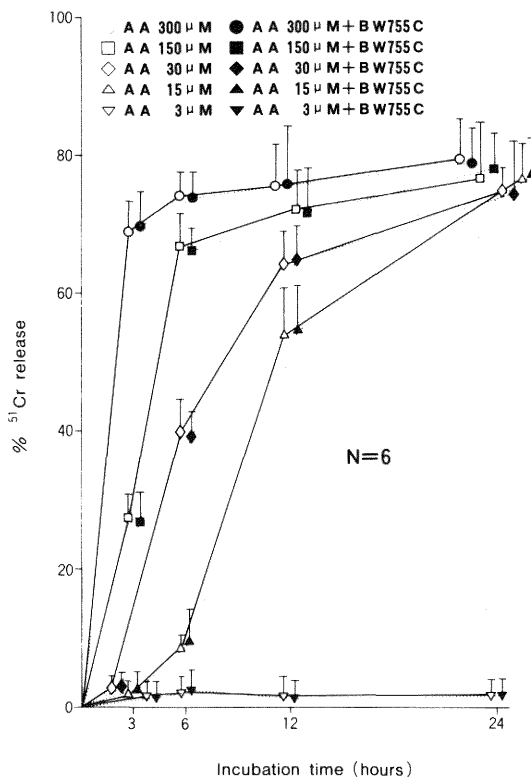


Fig. 5 Effect of pretreatment with BW755C on ^{51}Cr release by cerebral microvascular endothelial cells induced by free AA. There is no significant difference in ^{51}Cr release between BW755C-pretreated and unpretreated cells.

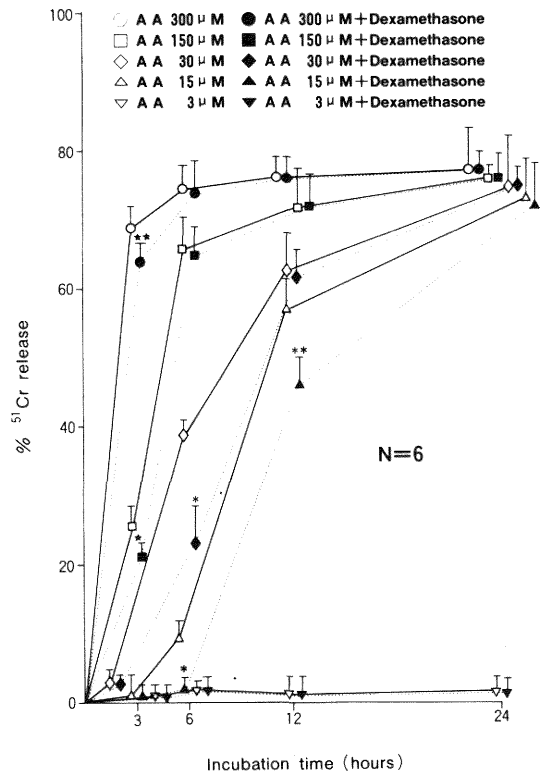


Fig. 6 Effect of pretreatment with dexamethasone on ^{51}Cr release by cerebral microvascular endothelial cells induced by free AA. * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.02$, ** $p < 0.05$ different from unpretreated cells of the corresponding incubation time by Student's t test.

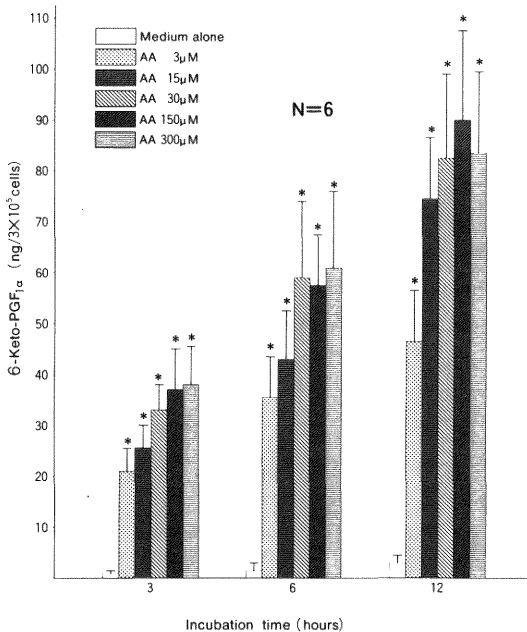


Fig. 7 Concentration and time dependent effect of free AA on 6-keto-PGF_{1α} production by cerebral microvascular endothelial cell. *p<0.001 different from control (medium alone) of the corresponding incubation time by Student's t test.

行くと、30 μM 以上の濃度では、濃度依存性、時間依存性にプロスタサイクリン産生量の減少が認められ、遊離アラキドン酸負荷後にプロスタサイクリン産生能の低下することが示唆された (Fig. 8)。

IV. 考 察

アラキドン酸は、脳組織における細胞膜の磷脂質の主要な構成成分であるが、遊離アラキドン酸、すなわち非結合型のアラキドン酸は、正常な脳組織内にはきわめて微量にしか存在しない¹⁰⁾。しかし虚血、外傷など様々な病的条件下では、ホスホリパーゼ A₂ とホスホリパーゼ C の活性化が起こり¹⁾²⁾、遊離アラキドン酸が、細胞膜の豊富な構成成分であるホスファチジルイノシトールとホスファチジルコリンから放出され、脳組織中に著増することが知られている¹⁾³⁾⁻¹⁰⁾。放出された遊離アラキドン酸は、再び細胞膜に組み込まれるか、シクロオキシゲナーゼあるいはリポキシゲナーゼ系のいずれかの代謝経路で代謝され、前者ではプロスタグランジンとフリー

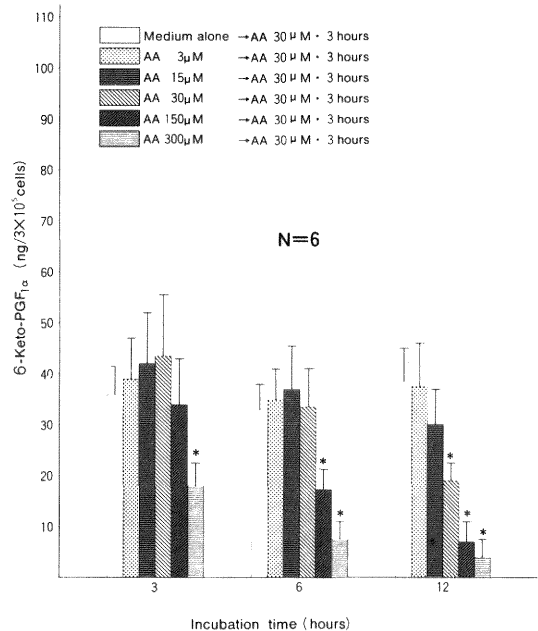


Fig. 8 Six-keto-PGF_{1α} production by cerebral microvascular endothelial cells incubated with 30 μM free AA for 3 hours after incubations with various concentrations of free AA at various incubation time. *p<0.001 different from control (medium alone) of the corresponding incubation time by Student's t test.

ラジカルが、後者ではロイコトリエンが産生される²⁾。

ところで虚血、外傷など様々な脳傷害の後に出現する vasogenic edema の形成に、これら遊離アラキドン酸やその代謝産物が重要な役割を演ずることが、多くの in vivo の研究によって示唆されてきた¹¹⁾⁻¹⁸⁾。Chan¹⁴⁾ は、脳内に遊離アラキドン酸を注入すると、血液脳関門の巨大分子に対する透過性が亢進するとともに、組織中の水分とナトリウム含量が増加し、vasogenic edema が形成されることを観察した。彼らは、病的条件下に生じた遊離アラキドン酸やその代謝産物が脳血管内皮細胞に作用しその透過性を亢進させることによって vasogenic edema が出現することを示唆した¹⁴⁾¹⁵⁾。

このような観点から、遊離アラキドン酸やその代謝産物のうち脳血管内皮細胞の透過性の亢進を引き起こす主体は何であるのか、そして脳血管内皮細胞の透過性の亢進は内皮細胞の傷害によって生ずるのかあるいは機能的な変化によって生ずるのかなどについて in vivo で種々

の検討が行われてきた^{12)13)16)~18)}。Kontos ら¹²⁾および Wei ら¹⁷⁾は、遊離アラキドン酸を脳表に作用させるとこの部の細動脈の内皮細胞膜に破壊の起こることを電顕的に観察したが、この傷害がインドメサシンやフリーラジカルスカベンジャーであるマニトールの投与により軽減したとの彼らの実験結果をふまえ、内皮細胞傷害の原因として遊離アラキドン酸それ自体ではなくフリーラジカルの作用を強調している。Wakai ら¹³⁾は、遊離アラキドン酸を脳内に注入することによって vasogenic edema を作成し、浮腫部の微細構造を電顕的に検索した。彼らは、浮腫中心部の毛細血管内皮細胞の管腔側細胞膜の outer leaflet は選択的に破壊されているがその tight junction は正常に保たれていることを観察し、このような毛細血管内皮細胞の傷害によって血管内成分に対する毛細血管内皮細胞の透過性の変化が生じ vasogenic edema が生ずるものと推論した。しかしながら彼らは、遊離アラキドン酸それ自体が内皮細胞を傷害しうるか否かについてはその可能性を示唆するにとどめ、むしろフリーラジカルの関与を示唆している。Black ら¹⁶⁾は、遊離アラキドン酸の脳内注入による vasogenic edema の形成が、インドメサシン前処置群では抑制されないが BW755C 前処置群ではほぼ完全に抑制されると報告し、遊離アラキドン酸それ自体やシクロオキシゲナーゼ系代謝産物ではなく、ロイコトリエンこそが血液脳関門の透過性を亢進させる主体であると結論した。彼らは、血管内皮細胞の傷害については検討していない。Unterberg ら¹⁸⁾は、脳表に遊離アラキドン酸を作用させるとこの部の細静脈と細動脈に血管透過性の亢進がおり、高分化物質 (fluorescein isothiocyanate dextran) の血管外漏出が起こることを蛍光顕微鏡で観察した。彼らは BW755C 前処置によってこれらの透過性の亢進が全く抑制されないことから、遊離アラキドン酸それ自体が血管透過性の亢進を引き起こすと結論した。彼らは同時に透過性の亢進した血管を電顕的に検索し、細静脈の内皮細胞の細胞質に著明な菲薄化など高度な変化を認めたが、endothelial junction は正常であったと報告している。

このように in vivo において種々の検討が行われ多くの知見が得られてきたが、いまだその見解には多くの不一致がある。その原因として以下のことが考えられる。第一に各実験間で遊離アラキドン酸の投与量や投与方法が様々であり、脳血管内皮細胞に到達する遊離アラキドン酸やその代謝産物の量にも違いを生ずる可能性のあることである。第二はアラキドン酸代謝酵素阻害剤の脳組織中の濃度の問題であるが、血液脳関門の存在のため阻

害剤の投与量や投与方法の違いによって脳組織中の濃度もかなり異なることが予想される。第三に in vivo では脳血管内皮細胞以外に脳を構成する種々の細胞が存在し、遊離アラキドン酸の投与によって同時に変化するこれらの細胞の影響が加わらざるをえず、遊離アラキドン酸やその代謝産物が内皮細胞に及ぼす影響を直接的に検討することが困難になることなどが考えられよう。

脳微小血管内皮細胞は血液脳関門の主要な構成要素である²⁰⁾が、近年脳微小血管内皮細胞を純粹に培養することが可能になり^{19)~22)}、血液脳関門に関する in vitro での新しい研究方法が試みられつつある¹⁹⁾²⁰⁾。

本研究では、純粹に培養した脳微小血管内皮細胞を用いて、遊離アラキドン酸それ自体が脳微小血管内皮細胞を傷害しうるか否かについて検討を行った。内皮細胞傷害の判定には ⁵¹Cr cytotoxicity test を用いたが、本方法は現在のところ内皮細胞傷害の判定に最も有効かつ鋭敏な方法とされる²³⁾²⁸⁾。実験の結果、遊離アラキドン酸それ自体が濃度依存性、時間依存性に脳微小血管内皮細胞を傷害しうることが示された。インドメサシンと BW755C はいずれも最大酵素阻害の得られる濃度を遊離アラキドン酸負荷前から直接に内皮細胞に作用させ、遊離アラキドン酸負荷後もその作用を持続させたので、内皮細胞中のシクロオキシゲナーゼとリポキシゲナーゼは十分な阻害をうけたと考えられる。脳血管内皮細胞にリポキシゲナーゼ活性が存在するか否かは明らかにされていない²⁹⁾が、実験の目的上本酵素の阻害も行った。また使用した遊離アラキドン酸の濃度も適当であったと考えられる。すなわち、病的条件下で実際に脳組織中に放出され蓄積されうる遊離アラキドン酸の濃度がどの程度かという問題であるが、Maier-Hauff ら¹⁰⁾は、外傷によって vasogenic edema を生じさせた脳の組織間液を直接に採取して測定した結果から、200 μ M の値を報告している。また Yoshida ら³⁰⁾³¹⁾や Bhakoo ら⁹⁾の虚血脳における測定結果からは、脳組織中に蓄積しうる遊離アラキドン酸の濃度として 10~100 μ M の値が推定される¹⁸⁾。本研究では、これらの測定結果をふまえ、使用する遊離アラキドン酸の濃度を 300 μ M 以下とした。脳微小血管内皮細胞を傷害する遊離アラキドン酸濃度の閾値として 15 μ M の結果が得られたが、この濃度は、遊離アラキドン酸が病的条件下の脳組織中で実際に到達しうる濃度と思われ、このことは病的条件下で脳組織中に放出され蓄積される遊離アラキドン酸それ自体が脳微小血管内皮細胞を傷害する可能性を示唆するものと思われる。さらに本研究で得られた実験結果は、これま

での *in vivo* での報告によく一致した。すなわち、内皮細胞を傷害する遊離アラキドン酸濃度の閾値が $15 \mu\text{M}$ であるという実験結果は、脳表に遊離アラキドン酸を作させた場合この部の細血管から Na^+ -fluorescein の血管外漏出を引き起こす濃度の閾値が $30 \mu\text{M}$ であるという *in vivo* での報告¹⁸⁾ によく一致した。In vivo で濃度の閾値が高いのは、脳表へ投与した遊離アラキドン酸がこの部の髄液によって希釈されることと、遊離アラキドン酸の内皮細胞への到達が血管壁など脳の他の構成要素によって妨げられることなどが影響した結果と思われる。また遊離アラキドン酸による脳微小血管内皮細胞傷害が濃度依存性、時間依存性に進行し、培養後24時間ではほぼ極大に達するという実験結果は、脳内への遊離アラキドン酸の注入によって生ずる vasogenic edema が濃度依存性に生じ24時間後に極大に達するという *in vivo* での報告¹⁴⁾ によく一致した。これらのことは、病的条件下で脳組織中に放出され蓄積させる遊離アラキドン酸それ自体が、脳微小血管内皮細胞の傷害を通して、vasogenic edema の形成に関わる可能性を示唆するものと思われる。

遊離アラキドン酸それ自体が内皮細胞を傷害する機序として、以下のことが考えられる。すなわち遊離アラキドン酸は親水性と疎水性の両者の性質を持つため細胞膜に容易に進入し、細胞膜を構成する脂質の配列状態を変化させることが知られている³²⁾³³⁾。遊離アラキドン酸の増加は、本物質の細胞膜への過剰な進入を引き起こし、これにより細胞膜の物理的、化学的性状の変化が生じ、ついには細胞傷害が生ずると考えられる¹⁴⁾¹⁸⁾。さらに遊離アラキドン酸が、酸化的燐酸化や重要な酵素である Na^+/K^+ -ATPase の活性を阻害することが報告されており³⁴⁾³⁵⁾、これらも細胞傷害に深く関与するものと思われる。

デキサメタゾン前処置により、不完全ではあるが遊離アラキドン酸による脳微小血管内皮細胞傷害に有意な抑制が認められた。この実験結果は、脳内への遊離アラキドン酸の注入によって形成される vasogenic edema がデキサメタゾン投与によって軽度ながら抑制されるという *in vivo* での報告¹⁴⁾ によく一致した。前述した遊離アラキドン酸による内皮細胞傷害の機序を考慮すると、デキサメタゾンが遊離アラキドン酸による内皮細胞傷害を抑制する機序として、その非特異的な、いわゆる膜の安定化作用が推察される¹⁴⁾³⁶⁾。他方、デキサメタゾンの特異的な作用は、ホスホリパーゼ A_2 を阻害することによって細胞膜の磷脂質からの遊離アラキドン酸放出

を抑制することである²⁶⁾²⁷⁾。これはデキサメタゾンがホスホリパーゼ A_2 を阻害する蛋白質であるリボモジュリンの生合成を促進するためとされる³⁷⁾。リボモジュリンの合成には1時間を要するとされ、実験でも1時間の前処置を行った。デキサメタゾンによって細胞膜の磷脂質からの遊離アラキドン酸放出が抑制されれば、遊離アラキドン酸の過剰な進入による細胞膜の物理的、化学的性状の変化はますます促進され、内皮細胞傷害はかえって増強されることが予想される。したがってデキサメタゾンの内皮細胞傷害の抑制機序として、特異的な作用は考え難いと思われる。遊離アラキドン酸による脳微小血管内皮細胞傷害がデキサメタゾンによって抑制されることは、デキサメタゾンの抗浮腫作用とも関連して興味深い。その抑制機序に関しては遊離アラキドン酸による内皮細胞傷害の機序とともに今後の検討が必要と思われる。

次に本研究では遊離アラキドン酸による脳微小血管内皮細胞傷害をプロスタサイクリン産生の面からも検討した。第一の検討では遊離アラキドン酸が、濃度依存性、時間依存性にプロスタサイクリン産生量を増加させることが示された。この結果は、遊離アラキドン酸が脳微小血管内皮細胞を傷害することに矛盾するものではない。

第一の理由として、遊離アラキドン酸はプロスタサイクリン生合成の基質であるから、基質の増加と培養時間の延長に伴ってプロスタサイクリン産生量の増加したことが考えられる。第二の理由は、血管内皮細胞の傷害によってそのプロスタサイクリン産生量は減少せず、むしろ増加するという報告のあることである³⁸⁾。例えばエンドトキシンによって大動脈由来の培養血管内皮細胞が傷害された場合、そのプロスタサイクリン産生量が増加することが報告されている³⁹⁾。第三の理由は実験方法に関係する。すなわち遊離アラキドン酸による内皮細胞傷害により、内皮細胞中に産生されたプロスタサイクリンが培養液中に溶出し、上清中に含まれるプロスタサイクリン産生量の増加となって表われたと考えられる。事実、第二の検討として、遊離アラキドン酸負荷後に内皮細胞を洗浄し、これに基質として低濃度の遊離アラキドン酸を含む培養液を加えて培養を行うと、 $30 \mu\text{M}$ 以上の濃度では濃度依存性、時間依存性にプロスタサイクリン産生量の減少が認められ、プロスタサイクリン産生の面からも遊離アラキドン酸による濃度依存性、時間依存性の内皮細胞傷害が示唆された。遊離アラキドン酸負荷後にプロスタサイクリン産生能の低下する事実、vasogenic edema に伴う脳微小循環障害の発生との関連が示唆さ

れて興味深い、この問題に関しては今後のより詳細な検討が必要であろう。

以上、培養脳微小血管内皮細胞を用いて、遊離アラキドン酸による脳微小血管内皮細胞傷害を、 ^{51}Cr cytotoxicity test と RIA 法によるプロスタサイクリン産生量の定量の二つの方法で検討した。いずれの実験結果も、遊離アラキドン酸が脳微小血管内皮細胞を傷害することを示し、 ^{51}Cr cytotoxicity test とアラキドン酸代謝酵素阻害剤を併用した検討では、遊離アラキドン酸それ自体が脳微小血管内皮細胞を傷害しうることが示唆された。これらの実験結果は、これまでの *in vivo* におけるいくつかの報告によく一致し、遊離アラキドン酸それ自体が、脳微小血管内皮細胞の傷害を通して、血液脳関門の透過性の亢進に関わる可能性を強く示唆した。しかしながら、これによって脳微小血管内皮細胞傷害に関わる遊離アラキドン酸代謝産物の役割が否定されるものではないことに注意する必要がある。すなわち本研究では内皮細胞中のアラキドン酸代謝酵素のみを阻害したのであり、*in vivo* においては内皮細胞以外の細胞で産生されるアラキドン酸代謝産物が直接に内皮細胞を傷害する可能性が残されている。例えば、脳内でのロイコトリエンの産生部位については不明な点が多く²⁹⁾、内皮細胞傷害に及ぼすその影響についても否定的な意見が多い。¹⁵⁾¹⁸⁾ が、その産生部位として脳皮質をあげる報告もある⁴⁰⁾⁴¹⁾。ロイコトリエンの関与を否定するためには、病的条件下の脳組織中で実際に産生されうる濃度のロイコトリエンを直接に内皮細胞に作用させ細胞傷害の生じないことを確認するなど、今後の検討が必要と思われる。フリーラジカルに関しても同様の検討が必要であろう。

以上培養細胞を用いて遊離アラキドン酸が脳微小血管内皮細胞に及ぼす影響について検討した。本研究で用いた培養細胞は、前述したように長期に継代しても内皮細胞としての性格をよく持続していたが、一般に培養細胞を用いるにあたっては継代に伴いその性格が徐々に変化することを常に念頭に置かねばならない。この点に留意すれば、培養脳微小血管内皮細胞は、*in vivo* で血液脳関門に関連して起きる様々な現象を理解するための有用な手段になるうと考えられた。

V. ま と め

1. 脳微小血管内皮細胞に及ぼす遊離アラキドン酸の影響を、培養細胞を用いて検討した。

2. 遊離アラキドン酸は、 $15\text{ }\mu\text{M}$ 以上の濃度で、濃度依存性、時間依存性に脳微小血管内皮細胞を傷害し、

内皮細胞傷害は培養後24時間でほぼ極大に達した。 $3\text{ }\mu\text{M}$ の濃度では、いずれの培養時間においても内皮細胞傷害は認められなかった。

3. インドメサシン、BW755C のいずれも遊離アラキドン酸による脳微小血管内皮細胞傷害を抑制せず、この結果から遊離アラキドン酸それ自体が脳微小血管内皮細胞を傷害しうることが示唆された。

4. デキサメタゾン、不完全ではあるが遊離アラキドン酸による脳微小血管内皮細胞の傷害を抑制した。

5. 遊離アラキドン酸は、 $3\text{ }\mu\text{M}$ 以上の濃度で、濃度依存性、時間依存性に脳微小血管内皮細胞のプロスタサイクリン産生量を増加させた。遊離アラキドン酸負荷後に細胞を洗浄し、低濃度の遊離アラキドン酸を基質として加えて培養を行うと、 $30\text{ }\mu\text{M}$ 以上の濃度では、濃度依存性、時間依存性にプロスタサイクリン産生量の減少が認められ、プロスタサイクリン産生の面からも遊離アラキドン酸による濃度依存性、時間依存性の内皮細胞傷害が示唆された。

6. 培養脳微小血管内皮細胞は、*in vivo* で血液脳関門に関連して起きる様々な現象を理解するための有用な手段であると考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました田中隆一教授に深甚なる謝意を表わすとともに、直接御指導頂きました皆河崇志先生、佐々木修先生、小池哲雄講師、竹内茂和助手に深謝申し上げます。さらに、本研究を進めるにあたり絶えず協力して頂きました脳神経外科教室の先生方、関川和代嬢に心から感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Siesjö, B.K.: Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **1**: 155~185, 1981.
- 2) Wolfe, L.S.: Eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes, and other derivatives of carbon-20 unsaturated fatty acids. *J. Neurochem.*, **38**: 1~14, 1982.
- 3) Sato, K., Yamaguchi, M., Mullan, S., Evans, J.P. and Ishii, S.: Brain edema: a study of biochemical and structural alterations. *Arch. Neurol.*, **21**: 413~424, 1969.
- 4) Bazan, N.G.: Changes in free fatty acids of brain by drug-induced convulsions, electroshock, and

- anesthesia. *J. Neurochem.*, **18**: 1379~1385, 1971.
- 5) **Agardh, C.D., Westerberg, E. and Siesjö, B.K.:** Severe hypoglycemia leads to accumulation of arachidonic acid in brain tissue. *Acta Physiol. Scand.*, **190**: 115~116, 1980.
 - 6) **Gardiner, M., Nilsson, B., Rehnström, S. and Siesjö, B.K.:** Free fatty acids in the rat brain in moderate and severe hypoxia. *J. Neurochem.*, **36**: 1500~1505, 1981.
 - 7) **Rehnström, S., Westerberg, E., Akesson, B. and Siesjö, B.K.:** Brain cortical fatty acids and phospholipids during and following complete and severe incomplete ischemia. *J. Neurochem.*, **38**: 84~93, 1982.
 - 8) **Siesjö, B.K., Ingvar, M. and Westerberg, E.:** The influence of bicuculline-induced seizures on free fatty acid concentrations in cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum. *J. Neurochem.*, **39**: 796~802, 1982.
 - 9) **Bhakoo, K.K., Crockard, H.A. and Lascelles, P.T.:** Regional studies of changes in brain fatty acids following experimental ischemia and reperfusion in the gerbil. *J. Neurochem.*, **43**: 1025~1031, 1984.
 - 10) **Maier-Hauff, K., Lange, M., Schurer, L., Guggenbichler, C., Vogt, W., Jacob, K. and Baethmann, A.:** Glutamate and free fatty acid concentrations in extracellular vasogenic edema fluid. In: Go, K.G., Baethmann, A. (eds): *Recent progress in the study and therapy of brain edema*. Plenum Press, New York, p. 183~192, 1984.
 - 11) **Bazan, N.G. and Rodriguez de Turco, E.B.:** Membrane lipids in the pathogenesis of brain edema. Phospholipids and arachidonic acid, the earliest membrane components changed at the onset of ischemia. *Adv. Neurol.*, **28**: 197~205, 1980.
 - 12) **Kontos, H.A., Wei, E.P., Povlishock, J.T., Dietrich, W.D., Magiera, C.J. and Ellis, E.F.:** Cerebral arteriolar damage by arachidonic acid and prostaglandin G_2 . *Science*, **209**: 1242~1245, 1980.
 - 13) **Wakai, S., Aritake, K., Asano, T. and Takakura, K.:** Selective destruction of the outer leaflet of the capillary endothelial membrane after intracerebral injection of arachidonic acid in the rat. *Acta Neuropathol (Berl.)*, **58**: 303~306, 1982.
 - 14) **Chan, P.H., Fishman, R.A., Caronna, J., Schmidley, J.W., Prioleau, G. and Lee, J.:** Induction of brain edema following intracerebral injection of arachidonic acid. *Ann. Neurol.*, **13**: 625~632, 1983.
 - 15) **Chan, P.H. and Fishman, R.A.:** The role of arachidonic acid in vasogenic brain edema. *Fed. Proc.*, **43**: 210~213, 1984.
 - 16) **Black, K.L., and Hoff, J.T.:** Leukotrienes increase blood-brain barrier permeability following intraparenchymal injections in rats. *Ann. Neurol.*, **18**: 349~351, 1985.
 - 17) **Wei, E.P., Ellison, M.D., Kontos, H.A. and Povlishock, J.T.:** O_2 -radicals in arachidonate-induced increased blood-brain barrier permeability to proteins. *Am. J. Physiol.*, **251**: 693~699, 1986.
 - 18) **Unterberg, A., Wahl, M., Hammersen, F. and Baethmann, A.:** Permeability and vasomotor response of cerebral vessels during exposure to arachidonic acid. *Acta Neuropathol (Berl.)*, **73**: 209~219, 1987.
 - 19) **Bowman, P.D., Ennis, S.R., Rarey, K.E., Betz, A.L. and Goldstein, G.W.:** Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: A model for study of blood-brain barrier permeability. *Ann. Neurol.*, **14**: 396~402, 1983.
 - 20) **Goldstein, G.W., Betz, A.L. and Bowman, P.D.:** Use of isolated brain capillaries and cultured endothelial cells to study the blood-brain barrier. *Fed. Proc.*, **43**: 191~195, 1984.
 - 21) **皆河崇志, 田中隆一, 佐々木修, 小池哲雄, 石井鏖二:** 砂ネズミ脳微血管内皮細胞の継代培養, 培養細胞の膜酵素の染色性に関する検討. *脳卒中*, **11**: 89~95, 1989.
 - 22) **Minakawa, T.:** Long-term culture of microvascular endothelial cells derived from mongolian gerbil brain. *Stroke*, **20**: 947~951, 1989.
 - 23) **Harlan, J.M., Killen, P.D., Harker, L.A.,**

- Striker, G.E. and Wright, D.G.: Neutrophil-mediated endothelial injury in vitro: mechanisms of cell detachment. *J. Clin. Invest.*, **68**: 1394~1403, 1981.
- 24) Abdel-Halim, M.S., Sjoquist, B. and Anggard, E.: Inhibition of prostaglandin synthesis in the rat brain. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh.)*, **43**: 266~272, 1978.
- 25) Higgs, G.A. and Vane, J.R.: Inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase. *Br. Med. Bull.*, **39**: 265~270, 1983.
- 26) Flower, R.: Steroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of phospholipase A2. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.*, **3**: 105~112, 1978.
- 27) Hong, S.C. and Levine, L.: Inhibition of arachidonic acid release from cells as the biochemical action of anti-inflammatory corticosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 1730~1734, 1976.
- 28) 森田育男: 動脈硬化における内皮細胞障害の抑制, 血管内皮細胞の新しい培養法と動脈硬化治療への応用. その実際, 技術情報協会 (編), 技術情報協会, 東京, p. 14~15, 1988.
- 29) 裏出良博: 脳内の PG, LT 合成酵素・分解酵素とその局在. 講座プロスタグランジン 5, 脳と神経, 早石 修・室田誠逸・山本尚三 (編), 東京化学同人, 東京, p. 67~78, 1988.
- 30) Yoshida, S., Abe, K., Busto, R., Watson, B.D., Kogure, K. and Ginsberg, M.D.: Influence of transient ischemia on lipidsoluble antioxidants, free fatty acids and energy metabolites in rat brain. *Brain Res.*, **245**: 307~316, 1982.
- 31) Yoshida, S., Inoh, S., Asano, T., Sano, K., Shimasaki, H. and Ueta, N.: Brain free fatty acids, edema and mortality in gerbils subjected to transient bilateral ischemia and effect of barbiturate anaesthesia. *J. Neurochem.*, **40**: 1278~1286, 1983.
- 32) Solomonson, L.P., Leipkals, V.A. and Spector, A.A.: Changes in Na/K-ATPase activity of Ehrlich ascites tumor cells produced by alteration of membrane fatty acid composition. *Biochemistry*, **15**: 892~897, 1976.
- 33) Klausner, R.D., Kleinfeld, A.M., Hoover, R.L. and Karnovsky, M.J.: Lipid domains in membranes: evidence derived from structural perturbations induced by free fatty acids and lifetime heterogeneity analysis. *J. Biol. Chem.*, **255**: 1286~1295, 1980.
- 34) Kuwashima, J., Fujitani, B., Nakamura, K., Kadokawa, T., Yosida, K. and Shimizu, M.: Biochemical changes in unilateral brain injury in the rat: a possible role of free fatty acid accumulation. *Brain Res.*, **110**: 547~557, 1976.
- 35) Chan, P.H., Kerlan, R. and Fishman, R.A.: Reductions of GABA and glutamate uptake and Na/K-ATPase activity in brain slices and synaptosomes by arachidonic acid. *J. Neurochem.*, **40**: 309~316, 1983.
- 36) Domopoulos, H.B., Milvy, P., Kakari, S. and Ransohoff, J.: Molecular aspects of membrane structure in cerebral edema. In Reuren, H. J., Schurmann, K. (eds): *Steroids and Brain edema*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, p. 29~39, 1972.
- 37) Hirata, F.: The regulation of lipomodulin, a phospholipase inhibitory protein, in rabbit neutrophils by phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **256**: 7730~7733, 1981.
- 38) Goldsmith, J.C.: Contribution of the subendothelium to prostacyclin release after vascular injury. *J. Lab. Clin. Med.*, **100**: 574~584, 1982.
- 39) Nawroth, P.P., Stern, D.M., Kaplan, K.L. and Nessel, H.L.: Prostacyclin production by perturbed bovine aortic endothelial cells in culture. *Blood*, **64**: 801~806, 1984.
- 40) Moskowitz, M.A., Kiwak, K.J., and Hakimian, K.: Synthesis of compounds with properties of leukotrienes C₄ and D₄ in gerbil brains after ischemia and reperfusion. *Science*, **224**: 886~887, 1984.
- 41) Kiwak, K.J., Moskowitz, M.A. and Levine, L.: Leukotrienes production in gerbil brain after ischemic insult, subarachnoid hemorrhage, and concussive injury. *J. Neurosurg.*, **62**: 865~869, 1985.

小出論文付図

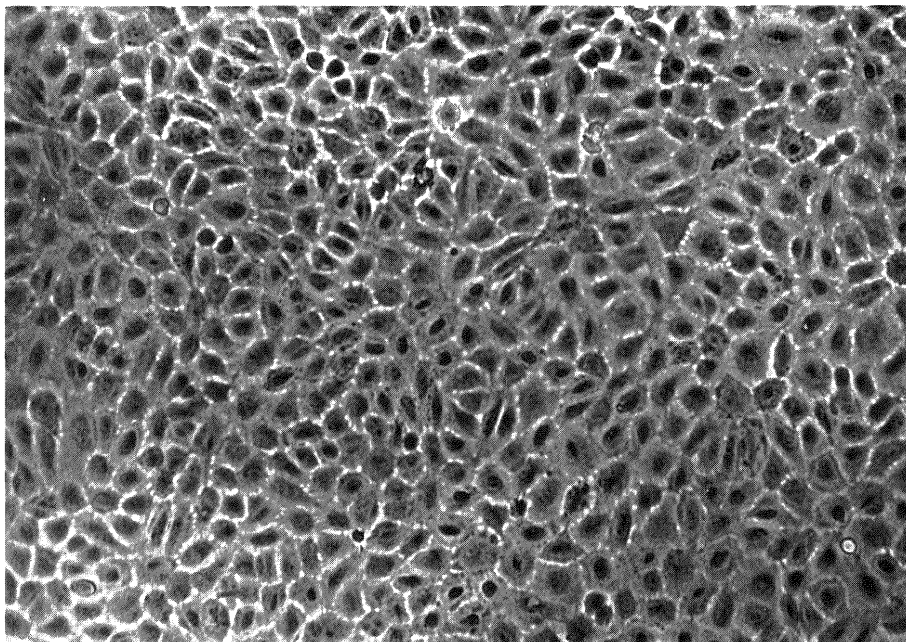


Fig. 1 Cultured cerebral microvascular endothelial cells viewed by phase-contrast microscopy (Passage 48). Original magnification, $\times 300$.

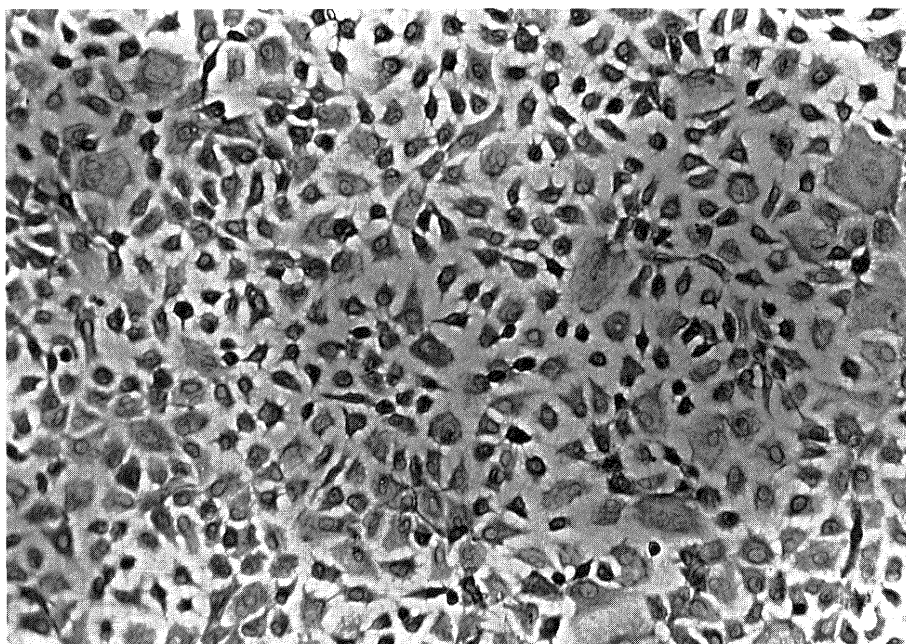


Fig. 2 Immunoperoxidase staining for factor VIII related antigen in cultured cerebral microvascular endothelial cells (Passage 16). Original magnification, $\times 300$.