

虚血性脳浮腫と slow reacting substance (SRS)

脳内 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase 活性からみた SRS 放出抑制剤(トランニラスト)の有用性

河野 輝昭・堤 圭介・三宅 仁志・森 和夫

Effect of Tranilast, an Anti-releasing Drug for Slow Reacting Substance, on Ischemic Brain Edema

Teruaki KAWANO, Keisuke TSUTSUMI, Hitoshi MIYAKE and Kazuo MORI

Department of Neurosurgery, Nagasaki University, Nagasaki

Abstract

The effect of tranilast, an anti-releasing drug for slow reacting substance (SRS) on incomplete ischemia produced by a bilateral common carotid artery occlusion/recirculation model in the spontaneous hypertensive rat (SHR-SR) was investigated. $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ adenosinetriphosphatase (ATPase) activity in brain microvessels and brain parenchyma were measured separately. $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase activity in the microvessels was not influenced by tranilast treatment. Brain parenchymal $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase activity decreased progressively after recirculation. At 3 hours after recirculation, parenchymal $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase activity returned to the control level when treated by tranilast, and progressive decrease was observed in SHR-SR without tranilast treatment. Data suggest that the SRS produced in the brain parenchyma during ischemic insult was very important for production of brain edema. Tranilast might be very useful for the treatment of ischemic brain edema.

Key words: ischemic brain edema, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase, slow reacting substance, tranilast

I はじめに

虚血性脳浮腫の発生には多くの内因性活性物質が関与しており、これらに対する阻害物質や合成阻止物質について *in vitro*, *in vivo* 両面での実験がなされている^{1,23)}。近年、特にアラキドン酸カスケードが注目を浴びており、cyclooxygenase 系代謝産物や lipoxygenase 系代謝産物の重要性が指摘されるようになってきた^{19,22)}。Cyclooxygenase 系代謝産物については、indomethacin や aspirin の効果が検討されたが、著明な効果は認められず、しだいに研究の流れは lipoxygenase 系代謝産物へと移ることとなった。ロイコトリエン(LT) C4 · D4 はその主な代謝産物であるが、1979

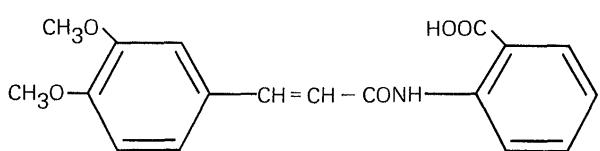
年に構造式が決定される²⁾までは slow reacting substance (SRS) として知られており、アレルギー症状発現や気管支平滑筋収縮作用を有することから、喘息との関連や治療についての研究がなされてきた。

脳血管系への作用については、Tagari ら²⁴⁾が LT C4 · D4 の収縮作用について報告し、さらに強力な血管透過性増強効果を持つことから、脳浮腫に関する可能性も指摘されている²⁵⁾。Tranilast は Fig. 1 に示す構造式を有し、SRS (LT C4 · D4) の放出抑制剤である^{11,12)}。我々はこの作用に注目し、tranilast の虚血性脳浮腫への効果を検討したので報告する。

長崎大学脳神経外科

Address reprint requests to: T. Kawano, M.D., Department of Neurosurgery, Nagasaki University, 7-1 Sakamoto-machi, Nagasaki 852.

受稿 1986年1月7日 受理 1987年2月2日

 $C_{18}H_{17}NO_5 : 327.34$

N-(3,4-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid

Fig. 1 Chemical structure of tranilast.

1) Animals: SHR-SR (12 weeks, 16 weeks)

2) Time course

-0.5	- tranilast 300 mg/kg (intraperitoneally)
0	- ligation both of the common carotid artery
1	
2	
2.5	- tranilast 150 mg/kg (intraperitoneally)
3	- recirculation
	- killed
4	
5	
6	- killed

Fig. 2 Experimental procedures. SHR-SR indicates spontaneous hypertensive rat-stroke resistance.

II 方 法

実験には12週齢および16週齢の自然発症高血圧ラット (spontaneous hypertensive rat-stroke resistance: SHR-SR) を用いた。Fujishima らの方法⁵⁾に準じて、ラットの両側総頸動脈を tourniquet により clipping し、一過性に血流を遮断することで不完全脳虚血モデルを作製し、3時間後に再開通させ、再開通後15分および3時間目に脳を摘出し試料とした(Fig. 2)。脳実質と脳微小血管との分離は、Brendel らの方法³⁾に準じ、まず大脳皮質を 4°C, 0.01 M tris(hydroxymethyl) aminoethane hydrochloride (tris-HCl) buffer (pH 7.4, 0.32 M sucrose を含む) 内で脳軟膜剥離を行ったのち、pore size 153 μm の nylon mesh を用いて微小血管を分離し、同時に採取した filtrate を脳実質成分として $Na^{+}-K^{+}$ adenosinetriphosphatase (ATPase) 活性測定の試料とした(Fig. 3)。

Ouabain sensitive $Na^{+}-K^{+}$ ATPase 活性は、脳実質あるいは微小血管を前述の tris-HCl buffer で homogenize したのち、whole homogenate を酵素標品とし、Proverbio らの方法²⁰⁾により tris-ATP を基質とした反応液中で incubation 後、遊離した無機リン (inorganic phosphorus: Pi) を Nakamura らの方法¹⁸⁾で測定し、ouabain 添加あるいは無

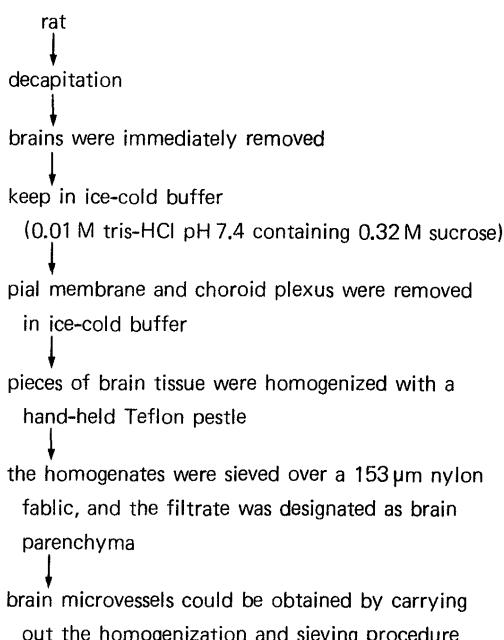
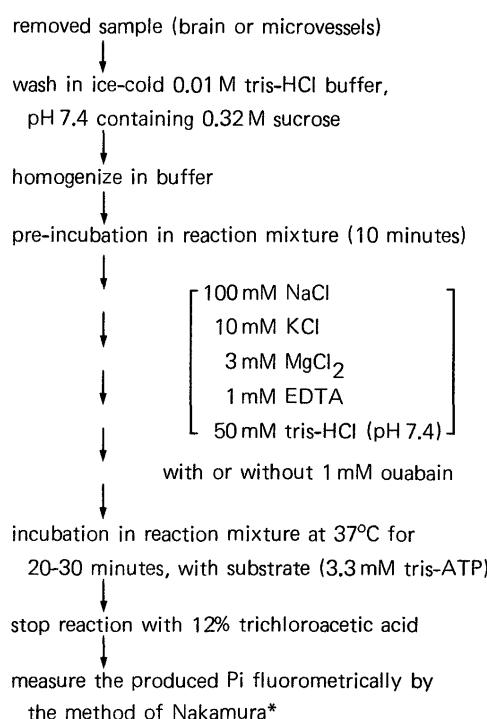


Fig. 3 Method of preparation of brain microvessels and parenchyma. tris-HCl: tris(hydroxymethyl) aminoethane hydrochloride.

Fig. 4 Assay method of $Na^{+}-K^{+}$ adenosinetriphosphatase (ATPase) activity. Pi: inorganic phosphorus.
*Nakamura M and Mori K.¹⁸⁾

添加の差をもって $Na^{+}-K^{+}$ ATPase 活性値とし、 $\mu\text{mol Pi}/\text{mg protein}/\text{hour}$ で示した(Fig. 4)。Tranilast は原末を

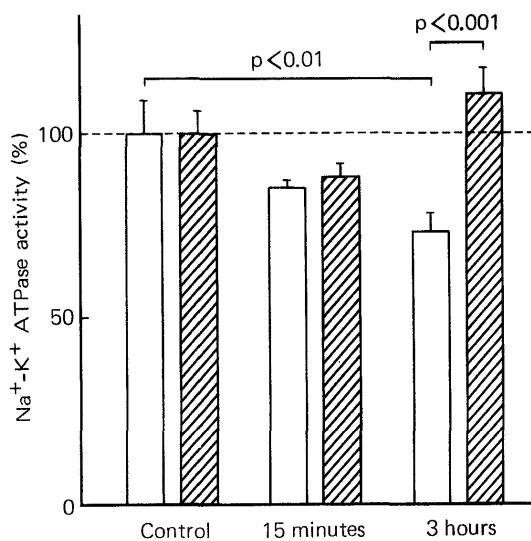


Fig. 5 Effect of tranilast on brain parenchymal $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase activity in the spontaneous hypertensive rat (SHR) (12 weeks) after recirculation. In control rats, $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase activities of treated rats (hatched column), and untreated rats (blank column), were 0.659 ± 0.036 and $0.797 \pm 0.069 \mu\text{mol Pi/mg protein/hr}$, respectively. The vertical lines represent standard deviations.

2% NaHCO_3 水溶液で懸濁液とし、両側総頸動脈血流遮断30分前と再開通30分前にそれぞれ 300 mg/kg , 150 mg/kg を腹腔内に投与した。なお、対照群として、2% NaHCO_3 水溶液のみを同時期に投与したもの用いた。

III 結 果

1. 12週齢 SHR-SR での検討

脳実質での $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase 活性は、虚血前値を100% (対照群)とした場合、再開通後15分では tranilast 処置群・無処置群ともに約80%への低下を示していた(Fig. 5)。これに対して再開通3時間後には、tranilast 無処置群ではさらに75%への低下を示したのに対して、処置群では逆に120%に増加し虚血前値を上回る回復を示していた。次に脳微小血管についてみると、tranilast 無処置群では再開通後15分で若干上昇傾向を示すものの、再開通後3時間でも虚血前に比し有意な変動を示さなかった(Fig. 6)。一方 tranilast 処置群では、再開通後15分、3時間とむしろ上昇傾向を示したが、無処置群との間に有意差は認められなかつた。脳内含水量の変動は、再開通3時間後において、tranilast 無処置群では $72.39 \pm 0.82\%$ であったのに比し、処置群では $70.50 \pm 3.19\%$ と若干減少傾向にあり、脳浮腫発生への抑制効果が示唆された(Table 1)。

2. 16週齢 SHR-SR での検討

16週齢 SHR-SR では平均動脈圧が 200 mmHg 以上あ

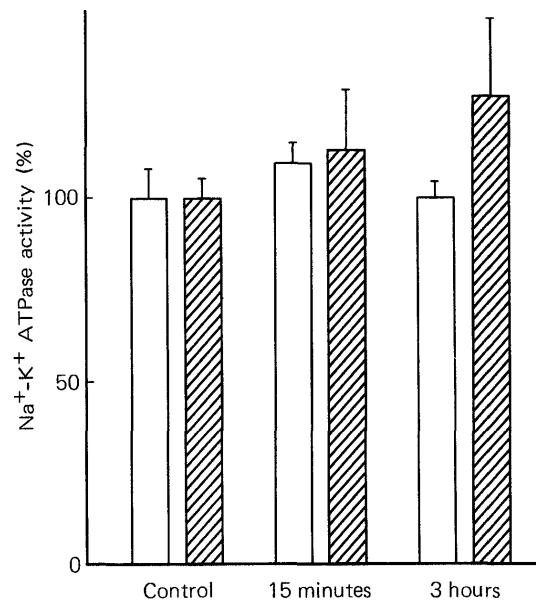


Fig. 6 Effect of tranilast on brain microvessel $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase activity in SHR (12 weeks) after recirculation. In control rats, $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase activities of treated rats (hatched column), and untreated rats (blank column), were 3.88 ± 0.34 and $4.40 \pm 0.34 \mu\text{mol Pi/mg protein/hr}$, respectively. The vertical lines represent standard deviations. There are no statistical differences among these groups.

Table 1 Alteration of cerebral water contents following incomplete ischemia

Experimental group	No. of rat	Water content* (%)
Control Tr (+)	5	62.66 ± 3.84
Control Tr (-)	5	68.75 ± 3.51
Ischemia Tr (+)	10	70.50 ± 3.19
Ischemia Tr (-)	6	72.39 ± 0.82

*Three hours after recirculation. Tr (+): treated with tranilast, Tr (-): not treated with tranilast.

り、両側総頸動脈結紮により12週齢と比べてより高度な脳虚血が起こることはよく知られている。本検討において、tranilast 無処置群では3時間の虚血時間中に全実験動物が死亡したのに対し、処置群ではほとんどが再開通後に死亡しており、両者間には $p < 0.01$ で有意差を認めた(Fig. 7)。また、その際の脳内 $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase 活性は、tranilast 無処置群と処置群との間に有意差がみられ、処置群では活性低下がより緩徐であることが示された(Fig. 8)。

IV 考 察

脳虚血後に起る細胞障害について、近年特にアラキド

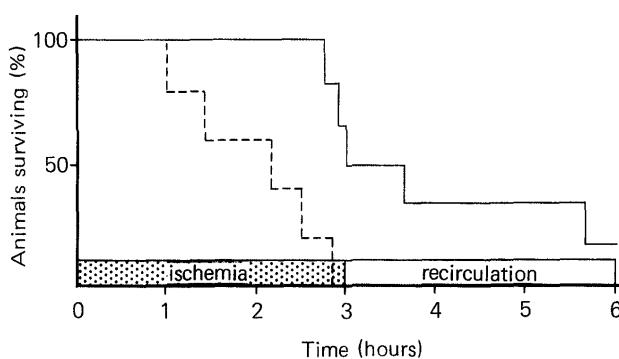


Fig. 7 Survival curves of SHR (16 weeks) after bilateral carotid ligation followed by recirculation. There is a statistical difference between treated (solid line) and untreated (interrupted line) rats ($p < 0.01$).

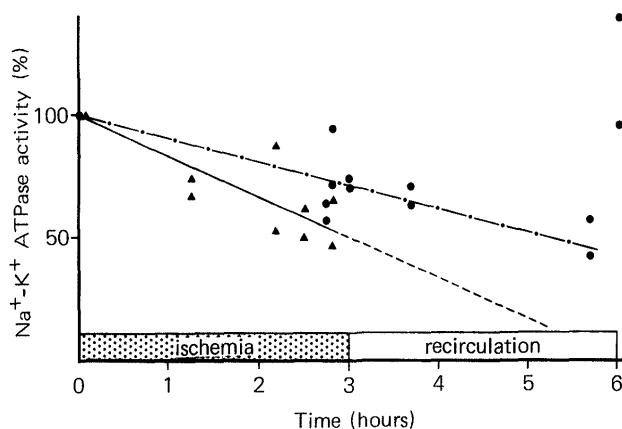


Fig. 8 Time course of brain parenchymal $\text{Na}^{\oplus}\text{-K}^{\oplus}$ ATPase activity after bilateral common carotid ligation followed by recirculation in SHR (16 weeks). In control rats, $\text{Na}^{\oplus}\text{-K}^{\oplus}$ ATPase activities of treated rats (●) and of untreated rats (▲) were 0.432 ± 0.038 and 0.543 ± 0.049 $\mu\text{mol Pi/mg protein/hr}$. There is a statistical difference between these two groups ($p < 0.01$).

ン酸カスケードの役割が注目されている^{1,7)}。このうち、今までの研究の主体は、cyclooxygenase 系代謝産物であるプロスタグランジン類に関するものであった。これは、プロスタグランジン F₂ α (PG F₂ α) や thromboxane A₂ (TX A₂) などが強力な脳血管収縮物質であること、あるいは逆に PG I₂ が血管平滑筋に対して弛緩作用を持つことなどから、脳血管攣縮のみならず脳浮腫発生にも重要な因子となると思われ、これら物質の代謝経路の酵素阻害剤として phospholipase A₂ に対するステロイド療法^{4,8,9)}、cyclooxygenase に対する aspirin や indomethacin^{6,9)}、TX A₂ に対する OKY-1581 などの薬剤について検討されてきた。このうち Iannotti ら⁹⁾は、gerbil を用いた実験において虚血中の

の血流量が $12 \sim 20 \text{ ml}/100 \text{ g}/\text{min}$ の範囲では dexamethasone や indomethacin の脳浮腫発生に対する阻止効果は認められないが、 $5 \sim 7 \text{ ml}/100 \text{ g}/\text{min}$ の虚血巣においては効果があったことを報告し、虚血病態に対する治療の困難さを示している。一方、アラキドン酸カスケードのうち、もう一つの代謝系である lipoxygenase 系に関しては、古くより知られていた SRS-A が LT C₄ · D₄ であることが明らかになり、その構造式が決定されるとともに、強力な血管収縮作用 (PG F₂ α の $100 \sim 1,000$ 倍) および強力な血管透過性作用が注目されることとなった。また、従来脳内においては LT C₄ · D₄ の存在を疑問視する向きもあったが、1984年 Lindgren ら¹⁴⁾が LT C₄ · D₄ · E₄ の抗体を作りラット脳の各部位での局在を明らかにし、特に LT C₄ は視床下部ならびに正中隆起にもっとも濃度の高いことを報告した。1984年に Moskowitz ら¹⁶⁾は、gerbil での不完全脳虚血モデルにおいて、同様の immunoreactive LT C₄ · D₄ が再開通後に脳内で急激な上昇を示すことを報告した。さらに、Kiawak ら¹⁰⁾も gerbil を用いて虚血病態時の LT C₄ · D₄ を検索した結果、これらの産生場所は脳内微小血管ではなく脳実質細胞(ニューロン)であり、これらが虚血性脳浮腫を誘引する最有力物質であると報告した。一方、tranilast の薬理作用としては、抗ヒスタミン遊離作用、Ca²⁺拮抗剤様作用、SRS 放出抑制作用などが挙げられる。一般に、生体内で代謝される物質は酵素的に転換されるだけでなく、多くの非酵素的な代謝経路が知られており、したがって放出抑制剤のほうが単なる酵素阻害剤よりもより優れた作用を有するものと思われる。

$\text{Na}^{\oplus}\text{-K}^{\oplus}$ ATPase は膜結合酵素であり、細胞膜障害の一指標となりうる^{13,15,17,21)}。Fig. 9 に虚血性細胞膜障害の発生様式を模式的に示すが、まず ischemic insult が加わることにより細胞外の Ca²⁺ の細胞内流入が起こる。これが細

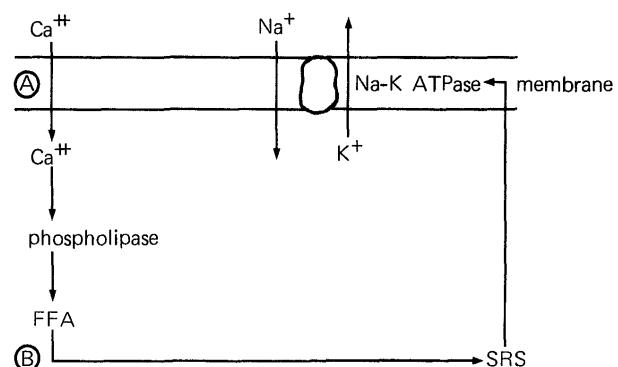


Fig. 9 Hypothesis for membrane damage mechanisms by slow reacting substance (SRS) and acting points of tranilast (Ⓐ, Ⓑ). FFA indicates free fatty acid.

胞内 phospholipase A2 を活性化させ、さらにアラキドン酸を遊離させ、引き続き LT C4・D4 の産生が起こり、これが細胞膜障害を起こすこととなる。この中で、tranilast は Ca^{2+} 拮抗剤としての作用により細胞外 Ca^{2+} の細胞内流入を抑えるとともに、LT C4・D4 の遊離も抑制し、細胞膜障害を軽減させるのではないかと思われる。Tranilast の LT C4・D4 遊離抑制については、障害組織中の LT C4・D4 の直接測定を必要とするが、前述のごとく Kiwak ら¹⁰⁾は再開通時に LT C4・D4 が著明に脳実質細胞(ニューロン)から遊離すると報告しており、今回我々の得た tranilast が脳実質での $\text{Na}^{+}-\text{K}^{+}$ ATPase 活性の低下を防止し、虚血前値にまで速やかに回復させた事実も、LT C4・D4 が虚血性脳浮腫発生に関与する可能性を強く示唆するものと思われる。

V ま と め

1. SHR-SR を用い、両側総頸動脈を 3 時間虚血状態とし、それに続く再開通後の脳内微小血管と脳実質内での $\text{Na}^{+}-\text{K}^{+}$ ATPase 活性を膜障害の指標として測定し、SRS 放出抑制剤である tranilast の効果を検討した。
2. 脳実質内 $\text{Na}^{+}-\text{K}^{+}$ ATPase 活性は再開通後に著減したが、これは tranilast により抑制された。脳微小血管では、処置群・無処置群ともに有意な変動を認めなかった。
3. 3 時間虚血ならびに再開通後に認められる本モデルでの脳障害発生には、脳実質内で産生される SRS が主因を成しており、これに対して SRS 放出抑制剤である tranilast の有用性が示された。

本論文の要旨は、第43回および第44回日本脳神経外科学会総会(1984年10月、千葉、1985年10月、長崎)において発表した。

文 献

- 1) Bhakoo KK, Crockard A, Lascelles PC, Avery SF: Prostaglandin synthesis and edema formation during reperfusion following experimental brain ischemia in the gerbil. *Stroke* 15: 891-895, 1984
- 2) Borgeat P, Samuelsson B: Metabolism of arachidonic acid in polymorphonuclear leukocytes. Structural analysis of novel hydroxylated compounds. *J Biol Chem* 254: 7865-7869, 1979
- 3) Brendel K, Meezan E, Carlson EC: Isolated brain microvessels: A purified, metabolically active preparation from bovine cerebral cortex. *Science* 185: 953-955, 1974
- 4) Flower RJ, Blackwell GJ: Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin. *Nature* 278: 456-459, 1979
- 5) Fujishima M, Ishitsuka T, Nakatomi Y, Tamaki K, Omae T: Changes in local cerebral blood flow following bilateral carotid occlusion in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Stroke* 12: 875-876, 1981
- 6) Furlow TW Jr, Hallenbeck JM: Indometacin prevents impaired perfusion of the dog's brain after global ischemia. *Stroke* 9: 591-594, 1978
- 7) Gaudet RJ, Levine L: Effect of unilateral common carotid artery occlusion on levels of prostaglandins D2, F2 α , and 6-keto-prostaglandin F1 α in gerbil brain. *Stroke* 11: 648-652, 1980
- 8) Hope WE, Waltz AG, Jordan MM, Jacobson RL: Effects of dexamethasone on distribution of water and pertechnate in brains of cats after middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 5: 617-622, 1974
- 9) Iannotti F, Crockard A, Ladds G, Symon L: Are prostaglandins involved in experimental ischemic edema in gerbils? *Stroke* 12: 301-306, 1981
- 10) Kiwak KG, Moskowitz MA, Levine L: Leucotriene production in gerbil brain after ischemic insult, subarachnoid hemorrhage, and concussive injury. *J Neurosurg* 62: 865-869, 1985
- 11) Koda A, Nagai H, Watanabe S, Yanagihara Y, Sakamoto K: Inhibition of hypersensitivity reactions by a new drug, N-(3',4'-dimethoxyinnamoyl)anthranilic acid (N-5'). *J Allergy Clin Immunol* 57: 396-407, 1976
- 12) 小松英忠、氏家新生、内藤 悃：Slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A)の遊離及び平滑筋によよぼす tranilast の影響。日薬理誌 82: 47-55, 1983
- 13) 栗原正紀、河野輝昭、森 和夫、新宮 正、藤田雄三、大島 章：虚血性脳浮腫と細胞膜障害—脳微小血管 $\text{Na}^{+}-\text{K}^{+}$ ATPase 活性変動より。佐野圭司、半田 肇、高倉公朋、小暮久也(監修)。脳虚血とフリーラジカル(1983)。東京、にゅーろん社、1983, pp 200-205
- 14) Lindgren JA, Hokfelt T, Dahlen S-E, Patrono C, Samuelsson B: Leukotrienes in the rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6212-6216, 1984
- 15) MacMillan V: Cerebral $\text{Na}^{+}, \text{K}^{+}$ -ATPase activity during exposure to and recovery from acute ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2: 457-465, 1982
- 16) Moskowitz MA, Kiwak KJ, Hekimian K, Levine L: Synthesis of compounds with properties of leucotrienes C4 and D4 in gerbil brains after ischemia and reperfusion. *Science* 224: 886-889, 1984
- 17) Mrsulja BB, Djericic BM, Cvejic V, Mrsulja BJ, Abe K, Spatz M, Klatzo I: Biochemistry of experimental ischemic brain edema. *Adv Neurol* 28: 217-230, 1980
- 18) Nakamura M, Mori K: Colorimetric determination of inorganic phosphorous in the presence of glucose-1-phosphate and adenosine triphosphate. *Nature* 182: 1441, 1958
- 19) Pickard JD: Role of prostaglandins and arachidonic acid derivatives in the coupling of cerebral blood flow to cerebral metabolism. *J Cereb Blood Flow Metab* 1: 361-384, 1981
- 20) Proverbio F, Condresen-Guidi M, Whitembury G: Ouabain in-sensitive Na^{+} stimulation of an Mg^{2+} -dependent ATPase in kidney tissue. *Biochimica et Biophysica Acta* 394: 281-292, 1975
- 21) Schwartz JP, Mrsulja BB, Passonneau JV, Klatzo I: Alteration of cyclic nucleotide-related enzymes and ATPase during unilateral

- ischemia and recirculation in gerbil cerebral cortex. *J Neurochem* 27: 101-107, 1976
- 22) Shohami E, Rosenthal J, Lavy S: The effect of incomplete cerebral ischemia on prostaglandin levels in rat brain. *Stroke* 13: 494-499, 1982
- 23) Siesjo BK: Cell damage in the brain: A speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1: 155-185, 1981
- 24) Tagari P, DuBoulay GH, Aitken V, Boullin DJ: Leukotriene D₄ and the cerebral vasculature in vivo and in vitro. *Prostaglandins*
- Leukotrienes and Medicine* 11: 281-297, 1983
- 25) von Holst H, Granstrom E, Hammarstrom S, Samuelsson B, Steiner L: Effect of leucotrienes C₄, D₄, prostacyclin and thromboxane A₂ on isolated human cerebral arteries. *Acta Neurochir (Wien)* 62: 177-185, 1982

〔別刷請求先：〒852 長崎市坂本町7-1, 長崎大学脳神経外科,
河野輝昭〕