

博士論文

脳梗塞後に生じる血管原性浮腫の形成
および進行におけるミクログリアの役割

A role of microglia in the formation and progression of
vasogenic edema after ischemic stroke

田中 美樹

Miki TANAKA

広島大学大学院 統合生命科学研究科

統合生命科学専攻 生命医科学プログラム

2022年3月

査読

石原 康宏 准教授 (主査)

広島大学 大学院統合生命科学研究科
生体機能化学研究室

古武 弥一郎 教授

広島大学 大学院医系科学研究科
生体機能分子動態学研究室

森岡 徳光 教授

広島大学 大学院医系科学研究科
薬効解析科学研究室

山崎 岳 教授

広島大学 大学院統合生命科学研究科
分子脳科学研究室

※ 五十音順

目次

第 1 章 序論	7
1.1 脳卒中および脳梗塞の概説	7
1.1.1 脳卒中の概況と分類	7
1.1.2 脳梗塞の病型分類	9
1.1.3 脳梗塞の重症度評価と治療法	10
1.2 脳浮腫の概説	16
1.2.1 脳梗塞後の二次障害	16
1.2.2 脳浮腫の発症率と転帰	16
1.2.3 虚血性脳浮腫の分類	18
1.3 虚血性脳浮腫の治療戦略	19
1.3.1 水輸送の制御	19
1.3.2 神経炎症の制御	21
第 2 章 永久虚血下において生じる脳浮腫の形成過程の解析	24
2.1 緒言	24
2.2 材料と方法	25
2.2.1 実験動物と飼育環境	25
2.2.2 中大脳動脈永久閉塞術 (pMCAO).....	25
2.2.3 核磁気共鳴画像 (MRI) の撮像	28
2.2.4 乾湿重量測定法	29
2.2.5 TTC 染色	29
2.2.6 神経機能障害度の評価	30
2.3 実験結果	33
2.3.1 中大脳動脈永久閉塞術 (pMCAO) に用いるナイロンフィラメントの作製.....	33
2.3.2 pMCAO 後の局所脳血流量 (rCBF) の測定	33
2.3.3 pMCAO 後の虚血領域の同定.....	35
2.3.4 pMCAO 後の梗塞巣の形成および進展過程の観察.....	36
2.3.5 脳虚血後の神経機能障害度の評価	38
2.3.6 乾湿重量測定による脳水分量の算出	39
2.3.7 DWI の撮像による細胞障害性浮腫の評価.....	39
2.3.8 T2WI の撮像による血管原性浮腫の評価	42
2.3.9 血管原性浮腫の新規評価法の確立	44

2.4 考察	47
2.4.1 虚血中心部における細胞障害メカニズム	47
2.4.2 浮腫液の供給源	48
2.4.3 脳領域特異的な虚血障害の影響	49
2.4.4 虚血マウス脳における脳水分量変化の意義	53
第3章 血管原性浮腫の形成におけるミクログリアの役割の解明	54
3.1 緒言	54
3.2 材料と方法	54
3.2.1 実験動物と飼育環境	54
3.2.2 ミノサイクリンの投与	54
3.2.3 免疫染色用凍結組織切片の作製	54
3.2.4 Iba1/CD68 免疫蛍光染色画像を用いたミクログリア活性化状態の定量化	55
3.2.5 マウス組織からの total RNA の抽出	56
3.2.6 Rea-time PCR を用いた遺伝子発現解析	57
3.2.7 マウス脳微小血管内皮細胞 bEnd.3 の立ち上げと培養	58
3.2.8 bEnd.3 の細胞数カウント	58
3.2.9 統計解析	58
3.3 実験結果	59
3.3.1 虚血中心部および虚血辺縁部におけるミクログリア活性状態の観察	59
3.3.2 Iba1/CD68 染色画像をもとにしたミクログリア活性状態の定量解析	61
3.3.3 ミクログリア活性と血管原性浮腫の形成および進行過程との関連	63
3.3.4 虚血辺縁部における神経炎症状態の解析	63
3.3.5 マウス脳微小血管内皮細胞株 bEnd.3 の培養条件の確立	64
3.3.6 TNF- α および IL-6 処置による bEnd.3 への影響	66
3.3.7 ミノサイクリン投与によるミクログリア活性状態への影響	66
3.3.8 ミノサイクリン投与後の脳水分量の変化	68
3.3.9 ミノサイクリン投与による血管原性浮腫の形成および進行過程への影響	69
3.3.10 ミノサイクリン投与後の神経機能評価	72
3.4 考察	73
3.4.1 虚血辺縁部へのミクログリア活性化の伝搬	73
3.4.2 血管原性浮腫の形成における貪食機能の関与	74
3.4.3 ミノサイクリンの薬物動態と脳への送達	75

第4章 AHR 阻害による保護効果の検証と炎症発現機構の解明	76
4.1 緒言	76
4.2 材料と方法	78
4.2.1 実験動物と飼育環境	78
4.2.2 AhR アンタゴニストの投与	78
4.2.3 ヒト単球系白血病細胞株 (THP-1) の培養と分化	78
4.2.4 Rea-time PCR を用いた遺伝子発現解析	78
4.2.5 イムノブロッティング	79
4.2.6 NOX 活性の測定	79
4.2.7 プロモーター解析	80
4.2.8 クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイ	80
4.2.9 過酸化脂質レベルの測定	81
4.2.10 マウス初代ミクログリアの単離と培養	81
4.2.11 統計解析	82
4.3 実験結果	83
4.3.1 虚血後マウス脳における AhR 発現と活性化	83
4.3.2 AhR 誘導性の炎症関連因子の発現	84
4.3.3 虚血後の脳浮腫および梗塞巣形成における AhR の関与	86
4.3.4 神経炎症における NOX-2 の役割	88
4.3.5 p47phox のプロモーター領域における AhR 結合能の評価	90
4.3.6 NOX 由来の酸化ストレスにおける AhR の関与	91
4.3.7 炎症下のミクログリアにおける p47phox 発現	92
4.3.8 虚血後マウス脳における p47phox 発現と酸化ストレス惹起	93
4.3.9 虚血下における内因性 AhR アゴニスト	95
4.4 考察	96
4.4.1 AhR 遺伝子型とリガンド感受性	96
4.4.2 脳虚血下における AhR リガンド	97
4.4.3 内因性 AhR リガンドの産生細胞	100
4.4.4 外因性 AhR リガンドによる脳梗塞予後への影響	101
総括および結論	103
研究業績一覧	106
発表論文	106
学会発表	106
その他参考となるもの	108

略語一覽.....	110
参考文献.....	113
謝辭.....	129

第1章 序論

1.1 脳卒中および脳梗塞の概説

1.1.1 脳卒中の概況と分類

脳卒中(脳血管障害)は脳血管がつまる、もしくは破裂することにより脳の血液循環が障害され、様々な症状をもたらす疾患である。25歳以降の推定生涯リスク(lifetime risk)は世界全体で24.9%であり、4人に1人が発症するほどの高い罹患率を有する(GBD 2016 Lifetime Risk of Stroke Collaborators *et al.*, 2018)。全世界においては毎年1,200万人以上、すなわち3秒に1人が発症しており(Fig. 1)(Feigin *et al.*, 2022)、高齢化社会の加速により2005年から2050年までに患者数が68%増加することが危惧されている(Foerch *et al.*, 2008)、脳卒中は世界の死亡原因として第2位であり(Feigin *et al.*, 2022)、一命を取り留めたとしても身体障害や言語障害などの重篤な後遺症を残し、生涯にわたり患者の生活の質(quality of life; QOL)を著しく損なう疾患であるとして問題視されている。加えて、脳卒中は医療経済的な負担も極めて大きく、脳卒中による世界的なコストは8,910億ドル(世界GDPの1.12%)以上にのぼると推定されており(Owolabi *et al.*, 2022)、脳卒中患者のQOL向上は世界全体において喫緊の課題である。

我が国においては、脳卒中の総患者数は111万5,000(政策統括官付参事官付保健統計室, 2019a)、脳卒中を原因とした年間死亡数は10万2,956人であり、この結果は悪性腫瘍、心疾患、老衰に次いで第4位である(政策統括官付参事官付人口動態・保健社会統計室, 2021)。脳卒中は直接の死因としては減少しつつあるが、要介護になる原因疾患としては認知症に次いで第2位であり、寝たきり状態となる要介護4および5の原因疾患としては認知症以上の割合を占め第1位であることが『2019年国民生活基礎調査の概況』にて報告されている(政策統括官付参事官付世帯統計室, 2020)。さらに、脳卒中の年間医療費は1兆8,085億円にもものぼる(政策統括官付参事官付保健統計室, 2019b)。

脳卒中は、その発生原因により2つに大別される(Fig. 2)。血管破裂に起因するものは出血性脳卒中(脳出血)、血管閉塞に起因するものは虚血性脳卒中(脳梗塞)である。脳卒中のうち約85%は脳梗塞、脳出血は約15%である(Feigin *et al.*, 2014)。1999年から2018年までに日本脳卒中データバンク(japan stroke data bank; JSDB)に登録された約17万の臨床データに

よると、急性期の脳卒中患者 169,991 例中、脳梗塞は 74.0%、脳出血は 19.5%、くも膜下出血は 6.5%を占める (国循脳卒中データバンク 2021 編集委員会, 2021).

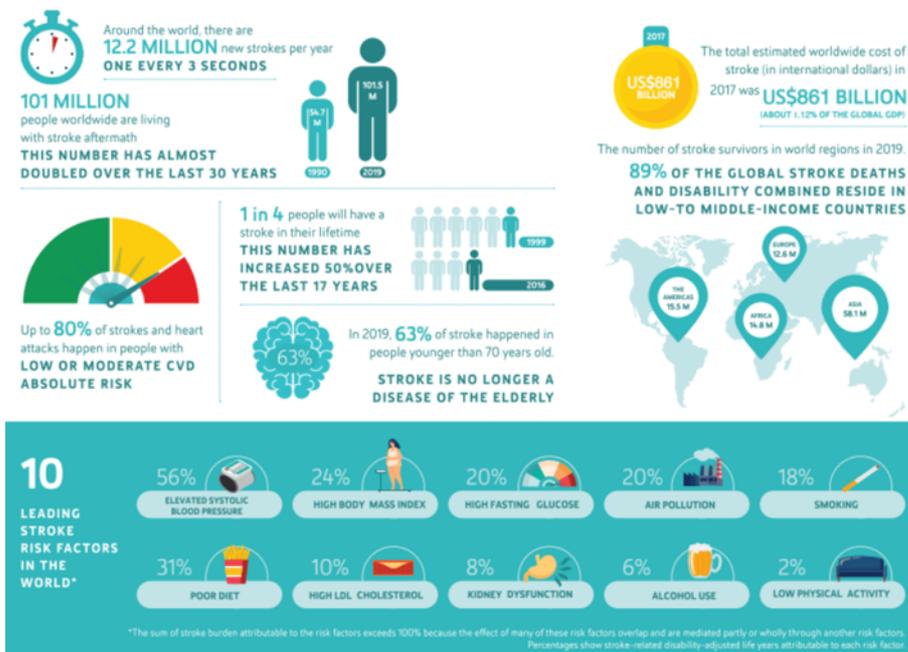


Fig. 1 Stroke infographic

引用元：(Feigin *et al.*, 2022).

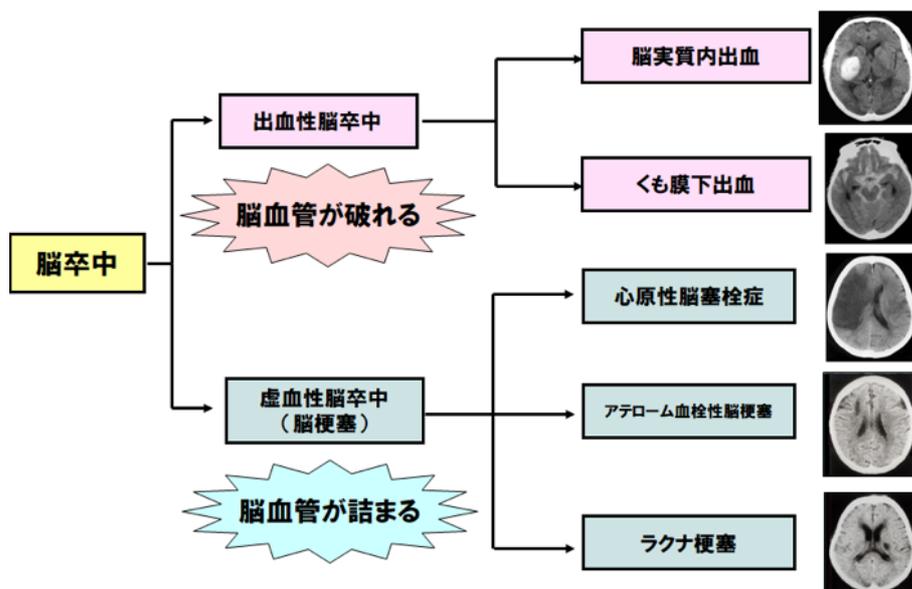


Fig. 2 脳卒中の病型分類

引用元：一般社団法人 日本脳卒中学会「脳卒中とは」, 2021年10月13日

<https://www.jsts.gr.jp/common/overview.html>

1.1.2 脳梗塞の病型分類

脳梗塞はその発症原因により、①ラクナ梗塞、アテローム血栓性脳梗塞、③心原性脳塞栓症、④その他の脳梗塞、の4亜病型に分類される。この分類はNIHの国立神経疾患・脳卒中研究所 (national institute of neurological disorders and stroke; NINDS) が作成した『Classification of Cerebrovascular Diseases III (CVD III)』に基づいたものである (National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS), 1990).

① **ラクナ梗塞**：大脳深部に血液を供給する直径1 mm以下の細い動脈(穿通動脈)が、脂肪硝子変性や血管壊死により閉塞することにより生じる。ラクナとは、ラテン語で“小さくぼみ”を表す言葉である。1本の穿通動脈が閉塞した場合、壊死に至る範囲は最大1.5 cm以下であり、Computed tomography (CT) や核磁気共鳴画像法 (magnetic resonance imaging; MRI) で15 mm以下の梗塞巣(死細胞群)が検出される。脳梗塞患者の28.2%を占め(国循環脳卒中データバンク2021編集委員会, 2021)、高血圧や糖尿病が危険因子となる。意識障害や失語症や半側空間無視などの皮質症状を伴わず、運動麻痺や感覚障害が主体となり生じる。

② **アテローム血栓性脳梗塞**：脳を灌流する頭蓋内外の直径5~8 mm程度の太い動脈(主幹動脈)のアテローム硬化を原因とする。閉塞部位は内頸動脈起支部、中大脳動脈水平部、椎骨動脈起支部および遠位部、脳底動脈中間部に好発する。脳梗塞患者の31.5%を占め(国循環脳卒中データバンク2021編集委員会, 2021)、高血圧、糖尿病、脂質異常症、喫煙などが危険因子となる。アテローム血栓性脳梗塞では動脈硬化が徐々に進行するため、発症当初は軽麻痺などの軽症例が多い。しかし進行するにつれて病態が増悪し、意識障害、失語症、半側空間無視などの皮質性症状を伴い、重症化する例も見られる。

③ **心原性脳塞栓症**：心臓内に形成された栓子や心臓を経由する栓子により主幹動脈が閉塞することで生じる。原因となる心疾患としては心房細動が最も多く、その他には発症1ヶ月以内の心筋梗塞、心筋症、洞不全症候群、心内膜炎、心臓粘液種、僧帽弁逸脱、奇形性塞栓症、人工弁、心臓ペースメーカーなどがある。心原性塞栓症では主幹動脈が突然閉塞されるため、生じる梗塞巣が大きく予後不良となる症例が多い。脳梗塞患者の28.8%を占める(国循環脳卒中データバンク2021編集委員会, 2021)。内頸動脈が好発部位であり、この場合は致死率が高い。皮質を含む大半球梗塞 (large hemispheric infarction; LHI) となる症例が多く、出血性梗塞へと進行する頻度も高い。神経機能障害は突如として生じ、意識障害、失語症、半側空間無視などの皮質症状を伴い、重症化する症例が多い。

④ **その他の脳梗塞**：動脈または静脈の奇形，感染症，自己免疫性疾患，凝固因子異常，外傷を起因とするものであり，脳梗塞患者の11.6%を占める(国循脳卒中データバンク2021編集委員会, 2021).

これらの4亜病型のうち目立って重症となるのは心原性脳塞栓症である。JSDBに登録された約17万の臨床データによると，脳梗塞患者の来院時NIHSSについて，ラクナ梗塞は中央値3点，アテローム血栓性脳梗塞は中央値4点，心原性脳塞栓症は中央値10点，その他の脳梗塞は中央値4点であることが報告されている(国循脳卒中データバンク2021編集委員会, 2021).

1.1.3 脳梗塞の重症度評価と治療法

脳梗塞中の鑑別診断には神経学的検査が必須であり，客観的な重症度評価のために有用な評価スケールがいくつか存在する。NIH Stroke Scale (NIHSS) は，アメリカ国立衛生研究所(national institutes of health; NIH)により確立された神経機能評価スケールであり，1989年にBrottらにより有効性が報告された(Brott *et al.*, 1989)。2022年現在において国際的に最も標準化された評価指標であり，臨床において頻用される。NIHSSでは意識，視野，麻痺，四肢筋力，感覚，言語などの15種類の評価項目について42点満点でスコアリングを行い，点数が高いほど重症であると評価される。他の評価尺度としてmodified Rankin Scale (mRS)も頻用される。mRSは，患者の運動機能制限レベルについて，grade 0(まったく症候がない)からgrade 6(死亡)の7段階で評価するものである(van Swieten *et al.*, 1988)。簡便性に優れており，多くの臨床研究の主要評価項目としての使用実績がある。加えて本邦では，日本脳卒中学会が開発した世界初の重みづけ評価であるJapan Stroke Scale (JSS)も併用される(Stroke Scale委員会委員長 後藤文男, 1997)。これは，意識，言語，無視，視野欠損または半盲，眼球運動障害，瞳孔異常，顔面麻痺，足底反射，感覚系，運動系の10つの項目について14.71点で評価するものである。

脳梗塞の治療は発症からの経過時間や重症度を考慮して最適な方法が選択される。急性期には血管再開通や合併症軽減を，慢性期には再発防止や後遺症軽減を目的とした治療が行われる。これらの治療は日本脳卒中学会が定める『脳卒中治療ガイドライン2021』に基づいており，実験動物での研究結果や臨床データをもとにA・B・C・D・Eの5つの治療推奨度と，高・中・低の3つのエビデンスレベルに分類されている(Table. 1, Table. 2)

血流再開のための治療法としては、遺伝子組換え組織プラスミノゲン活性化因子 (recombinant tissue-type plasminogen activator; rt-PA) の静脈内投与による「静注血栓溶解 (rt-PA) 療法」がある。これは、血中のプラスミノゲンをプラスミンへと活性化させ、血栓の構成要素であるフィブリンやその前駆体フィブリノゲンを分解するという作用機序による (Fig. 3)。この治療法は有効性が高く治療推奨グレード A (エビデンスレベル高) と定められている (脳卒中ガイドライン委員会, 2021)。

しかし、既往歴や臨床所見による投与制限が極めて厳しいため (Table. 3)、患者の9割以上は治療適応外 (禁忌) となる。事実、JSDB の解析結果によると、本邦における rt-PA 施行率はわずか 8.8% に留まる (Fig. 4)。他の血流再開法として、血管内にカテーテルを挿入することで血栓を溶解または回収する「血管内治療法」も開発されており、推奨度 A に設定されている (脳卒中ガイドライン委員会, 2021)。しかし、治療実施に不可欠な設備、機器、人材などの整備は乏しく、全国での施行率はわずか 5.5% に留まる (Fig. 5)。このように脳梗塞急性期の治療法は年々進歩を遂げつつあるが、未だ多くの臨床課題が存在するのが現状である。血流再開が見込めない9割以上の患者においては、合併症などの二次障害の軽減を目的とした治療が行われる。

Table. 1 脳卒中治療ガイドライン 2021 における治療推奨どの分類

引用元：(脳卒中ガイドライン委員会, 2021)

推奨度	定義	治療の推奨度
A	強い推奨	行うよう勧められる 行うべきである
B	中程度の推奨	行うことは妥当である
C	弱い推奨	考慮しても良い 有効性が確立していない
D	利益がない	勧められない 有効ではない
E	有害	行わないように勧められる 行うべきではない

Table. 2 脳卒中治療ガイドライン 2021 における推奨文のエビデンスレベルに関する分類

引用元：(脳卒中ガイドライン委員会, 2021)

エビデンスレベル	定義
高	良質な複数ランダム化比較試験 (randomized controlled trial; RCT) による一貫したエビデンス, もしくは観察研究などによる圧倒的なエビデンスがある. 今後の研究により評価が変わることはまずない.
中	重要な limitation のある (結果に一貫性がない, 方法論に欠陥, 非直接的である, 不精確である) 複数 RCT によるエビデンス, もしくは観察研究などによる非常に強いエビデンスがある. もしさらなる研究が実施された場合, 評価が変わる可能性が高い.
低	観察研究, 体系化されていない臨床経験, もしくは重大な欠陥をもつ複数 RCT によるエビデンス. あらゆる効果の推定値は不確実である.

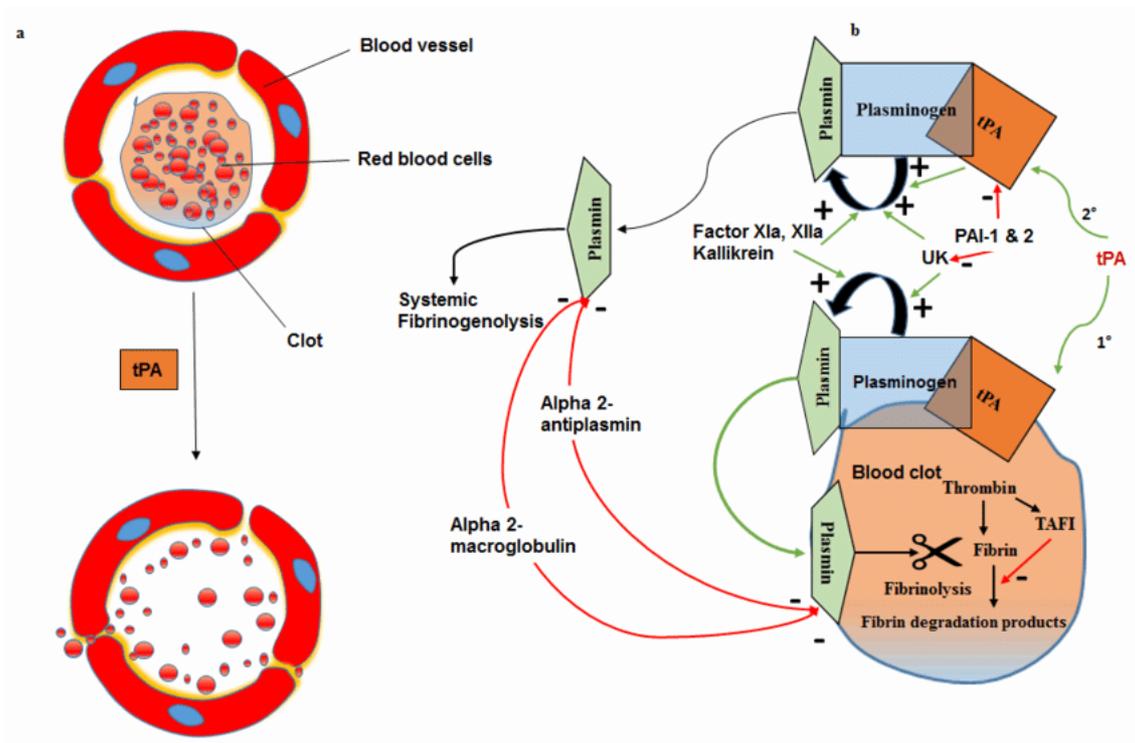


Fig. 3 rt-PA による線維素溶解メカニズム

引用元：(Bhaskar *et al.*, 2018)

(a) t-PA による血栓の分解. (b) 詳細な線溶メカニズム. 緑色の矢印は活性化または刺激, 赤色の矢印は抑制を示す. UK; urokinase, PAI; plasminogen activator inhibitor.

Table.3 rt-PA 静注療法の適応チェックリスト

引用元：(脳卒中ガイドライン委員会, 2021)

適応外 (禁忌)		あり	なし
発症ないし発見から治療開始までの時間経過			
発症 (時刻確定) または発見から 4.5 時間超	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
発見から 4.5 時間以内で DWI/FLAIR ミスマッチなし、または未評価	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
既往歴			
非外傷性頭蓋内出血	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1 ヶ月以内の脳梗塞 (症状が短時間に消失している場合を含まない)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3 ヶ月以内の重篤な頭部脊髄の外傷あるいは手術	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
21 日以内の消化管あるいは尿路出血	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
14 日以内の大手術あるいは頭部以外の重篤な外傷	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
治療薬の過敏症	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
臨床所見			
くも膜下出血(疑)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
急性大動脈解離の合併	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
出血の合併 (頭蓋内, 消化管, 尿路, 後腹膜, 咯血)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
収縮期血圧 (降圧療法後も 185mmHg 以上)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
拡張期血圧 (降圧療法後も 110mmHg 以上)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
重篤な肝障害	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
急性膵炎	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
感染性心内膜炎 (診断が確定した患者)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
血液所見 (治療開始前に必ず血糖、血小板数を測定する)			
血糖異常 (血糖補正後も <50mg/dl, または >400mg/dl)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
血小板数 100,000/mm ³ 以下 (肝硬変、血液疾患の病歴がある患者)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
※肝硬変、血液疾患の病歴がない患者では、血液検査結果の確認前に治療開始可能だが、100,000/mm ³ 以下が判明した場合にすみやかに中止する			
血液所見：抗凝固療法中ないし凝固異常症において			
PT-INR >1.7	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
aPTT の延長 (前値の 1.5 倍[目安として約 40 秒) を超える)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
直接作用型経口抗凝固薬の最終服用後 4 時間以内	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
※ダビガトランの服用患者にイダルズマブを用いて後に本療法を検討する場合は、上記所見は適応外項目とならない			
CT/MR 所見			
広汎な早期虚血性変化	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
圧排所見 (正中構造偏位)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
慎重投与 (適応の可否を慎重に検討する)		あり	なし
年齢 81 歳以上	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
最終健常確認から 4.5 時間超かつ発見から 4.5 時間以内に治療開始可能で DWI/FLAIR ミスマッチあり	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
既往歴			
10 日以内の生検・外傷	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10 日以内の分娩・流産	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1 ヶ月以上経過した脳梗塞 (とくに糖尿病合併例)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
蛋白製剤アレルギー	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
神経症候			
NIHSS 値 26 以上	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
軽症	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
症候の急速な軽症化	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
痙攣 (既往歴などからてんかんの可能性が高ければ適応外)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
臨床所見			
脳動脈瘤・頭蓋内腫瘍・脳動脈静脈奇形・もやもや病	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
胸部大動脈瘤	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
消化管潰瘍・憩室炎, 大腸炎	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
活動性結核	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
糖尿病性出血性網膜症・出血性眼症	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
血栓溶解薬, 抗血栓薬投与中 (とくに経口抗凝固薬投与中)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
月経期間中	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
重篤な腎障害	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
コントロール不良の糖尿病	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

<注意事項> 一項目でも「適応外」に該当すれば実施しない。

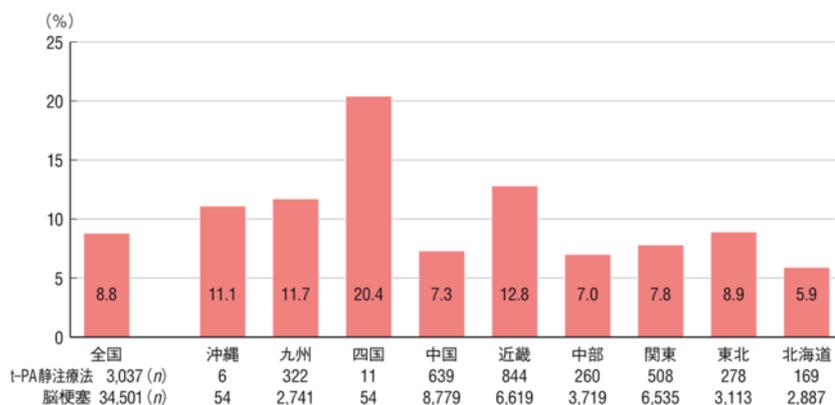


Fig. 4 全国および地域別の rt-PA 静注療法の施行率

引用元：(国循脳卒中データバンク 2021 編集委員会, 2021)

2012年9月～2018年12月(rt-PA静注療法の発症4.5時間後までの保険適用が可能となった時期)に日本脳卒中データバンク(JSDB)へ登録された、発症(最終未発症確認)後7日以内の臨床病型を問わない脳梗塞のうち、院内発症例を除いた34,546例を母集団とした。同条件下での救急対応を解析するため、rt-PA静注療法の適正治療指針第二版の適応基準に拠った時期の症例のみを対象として解析した。

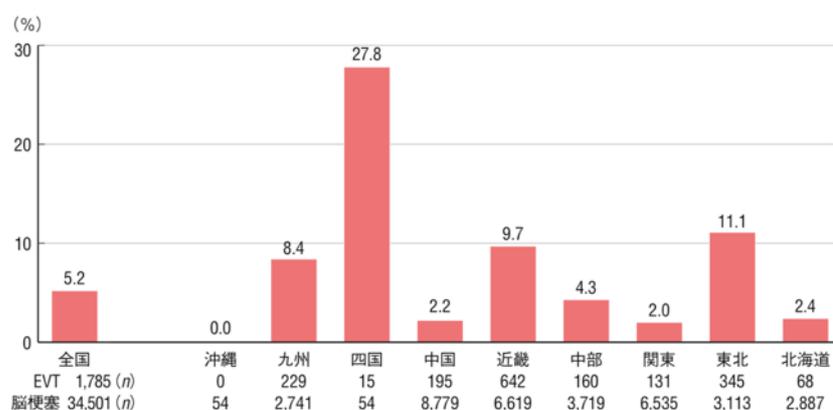


Fig. 5 全国および地域別の急性期脳血管内治療(EVT)の施行率

引用元：(国循脳卒中データバンク 2021 編集委員会, 2021)

2012年9月～2018年12月(rt-PA静注療法の発症4.5時間後までの保険適用が可能となった時期)に日本脳卒中データバンク(JSDB)へ登録された、発症(最終未発症確認)後7日以内の臨床病型を問わない脳梗塞のうち、院内発症例を除いた34,546例を母集団とした。EVTの適応基準は、最新のEVT指針(適正使用指針第四版)に至るまでの変遷があるが、解析には2012年9月以降の症例を等しく扱った。

1.2 脳浮腫の概説

1.2.1 脳梗塞後の二次障害

脳梗塞発症後には感染症、けいれん発作、脳浮腫などの二次障害が頻発する。脳卒中患者 279 症例のうち 95% の患者は少なくとも 1 つの二次的なイベントを経験し、神経学的機能や死亡率が悪化することが報告されている (Johnston *et al.*, 1998)。なかでも脳浮腫は、脳梗塞発症から数日以内の死因として最も一般的であると言われるほど患者の転帰を著しく増悪させる (Steiner, Ringleb and Hacke, 2001)。

1.2.2 脳浮腫の発症率と転帰

脳浮腫は、脳卒中、脳腫瘍、頭部外傷、脳外科手術などに起因する、いわゆる脳のむくみのような病態である。脳細胞間隙 (細胞外腔) の含水量が異常に増加し、脳実質の水分量増加とそれに伴う脳体積増加を引き起こす (Stokum, Gerzanich and Simard, 2016)。重度の脳浮腫は頭蓋内圧を亢進させ、頭蓋内障壁の間隙から脳組織の一部が突出する脳ヘルニア (Fig. 6) を引き起こすことで患者を死に至らしめる (Halstead and Geocadin, 2019)。脳梗塞発症後に生じる浮腫は虚血性脳浮腫といい、中大脳動脈などの主幹動脈が閉塞される大半球梗塞 (large hemispheric infarction; LHI) にて頻発する (Liebeskind *et al.*, 2019)。LHI を発症した患者の 50% 以上が発症 2~3 日後以内に脳浮腫を発生し急速に神経学的機能が低下するほか (Qureshi *et al.*, 2003; Wartenberg, 2012)、脳ヘルニアにより死亡率が 80% まで達する (Hacke *et al.*, 1996; Pm *et al.*, 1997; Berrouschot *et al.*, 1998) など、虚血性脳浮腫の転帰は極めて不良である。



Fig. 6 脳梗塞患者において生じた脳ヘルニア

引用元：(Stiver, 2009)

(上) 頭蓋骨切除術後の脳ヘルニア (矢印) を示す非造影 CT 画像. (下) 別の患者の剖検により得られた標本写真.

1.2.3 虚血性脳浮腫の分類

1987年にKlatzoは、脳浮腫をその発生原因により2つに大別した(Klatzo, 1987a, 1987b). いわゆる細胞障害性浮腫(cytotoxic edema)と血管原性浮腫(vasogenic edema)である. 細胞障害性浮腫は、 Na^+ と Cl^- のイオンが細胞外腔から細胞内へと流入することで、細胞が異常に膨張する病態である(Stokum, Kurland, *et al.*, 2015). 細胞障害性浮腫はそれ自体では脳体積増加を引き起こすことはなく、単に細胞外腔の水が細胞内へと移動するだけである. また、細胞障害性浮腫の形成は中枢神経系の全ての細胞種で報告されているが、アストロサイトが最も感受性が高いと考えられている(Stokum, Kurland, *et al.*, 2015). 一方で血管原性浮腫は、血液脳関門(blood-brain barrier; BBB)の透過性亢進により細胞外腔に水が蓄積する病態である. BBB内皮細胞のタイトジャンクション(tight junction proteins; TJPs)が破壊されることでアルブミンや他の血漿タンパク質に対する透過性が高まり、脳組織への水の流入量が増加するために、脳体積が増大する(Yang *et al.*, 2019). しかし、細胞障害性浮腫と血管原性浮腫は臨床において明確に区別できる事象ではなく、時間的に連続している可能性があることに注意する必要がある.

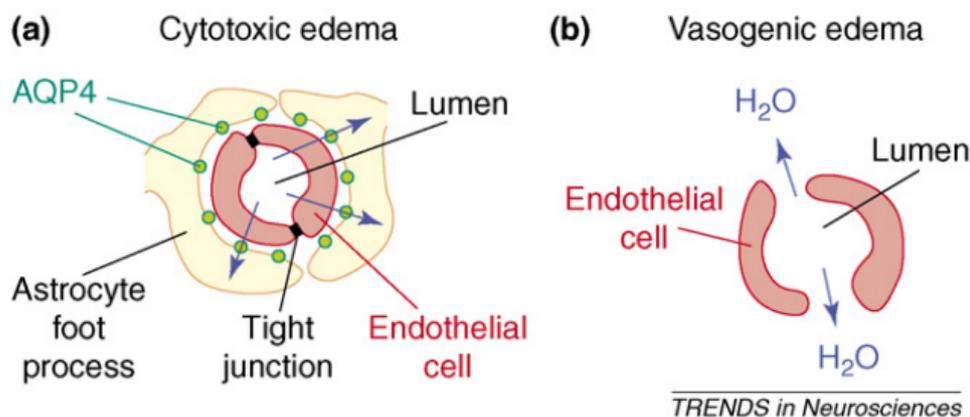


Fig. 7 脳実質への水の流入経路

引用元：(Tait *et al.*, 2008)

(a) 細胞障害性浮腫では、内皮細胞またはアストロサイトのエンドフィートに発現するAQP4を介して脳実質へと水が移動する。(b) 血管原性浮腫では、血管透過性が亢進した血液脳関門を介して脳実質へと水が移動する.

1.3 虚血性脳浮腫の治療戦略

1.3.1 水輸送の制御

現行の脳浮腫治療法は、高張液の静脈内投与や開頭外減圧術などの対症療法に限るが、これらは科学的根拠に乏しいうえ、患者の予後を十分に改善するものではない (Halstead and Geocadin, 2019; 脳卒中ガイドライン委員会, 2021)。この非標的療法は100年以上前に導入されたものであるが、その後の進展がないのが現状である (Weed and McKibben, 1919)。この状況を打開するため、病態形成に重要だと考えられる種々の因子を標的とした研究が進められている。

アクアポリン (aquaporin; AQP) は、膜貫通型の水選択制チャネルタンパク質であり、脳や脊髄を含む哺乳類の組織に恒常的に分布している (Oshio *et al.*, 2004; Nesic *et al.*, 2006)。AQPファミリーにはAQP0からAQP12までの13種類のサブタイプが確認されて脳神経系にはAQP1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 12が存在しており、このうち主にAQP4が脳内の水輸送に関与すると考えられている (Venero *et al.*, 2001; Stokum, Kurland, *et al.*, 2015)。AQP4は、脳の構成要素の中では主にアストロサイトに発現しており、そのほとんどが血管周囲のアストロサイトエンドフィートに集中している (Fig. 8)。これまで、虚血脳におけるAQP4の発現と機能について多くの研究が進められてきた。たとえば、永久虚血マウスの脳内においては、AQP4のmRNAおよびタンパク量ともに虚血1から24時間後まで経時的に発現上昇する (Yang *et al.*, 2009)。また、AQP4ノックアウトマウスに永久虚血を誘導すると、野生型マウスと比較して脳浮腫が35%減少し、神経学的機能が改善する (Manley *et al.*, 2000)。このような結果をもとにAQP4は虚血性脳浮腫における水の流入経路であると考えられるようになり、現在では、新たに開発されたAQP4特異的阻害剤AER-271 (Farr *et al.*, 2019)による臨床試験が進行中である (NCT03804476)。

しかし、AQP4阻害による治療には多くの障壁が存在する。上述の通りAQP4は水の流入経路として考えられているが、AQP4ノックアウトマウスに脳浮腫を誘導すると頭蓋内圧および脳水分量が上昇し神経学的機能が増悪するとの結果も存在し (Papadopoulos *et al.*, 2004)、AQP4は水の排出経路としても機能すると考えられる。さらに、浮腫の水輸送にはSUR1-TRPM4、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体 ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ transporter; NKCC)、 Na^+/H^+ 交換輸送体 (Na^+/H^+ exchanger; NHE) など他の多くのイオンチャネルやトランスポーターも関与する (Solenov *et al.*, 2004; Simard *et al.*, 2009; Michinaga and Koyama, 2015; Stokum, Kurland, *et al.*,

2015; Stokum, Gerzanich and Simard, 2016). 加えて, AQPには多くの相同性のあるアイソフォームが存在し組織内での分布や機能が多岐にわたり (Badaut *et al.*, 2014), 中枢神経系や末梢神経系への望ましくない作用が予測されること, 血液脳関門への高い透過性が必要であることなど, 薬剤開発の面からも課題は多い. 以上の理由より, 浸透圧調節のみに焦点を当てた治療法では十分な治療効果が見込めない可能性がある.

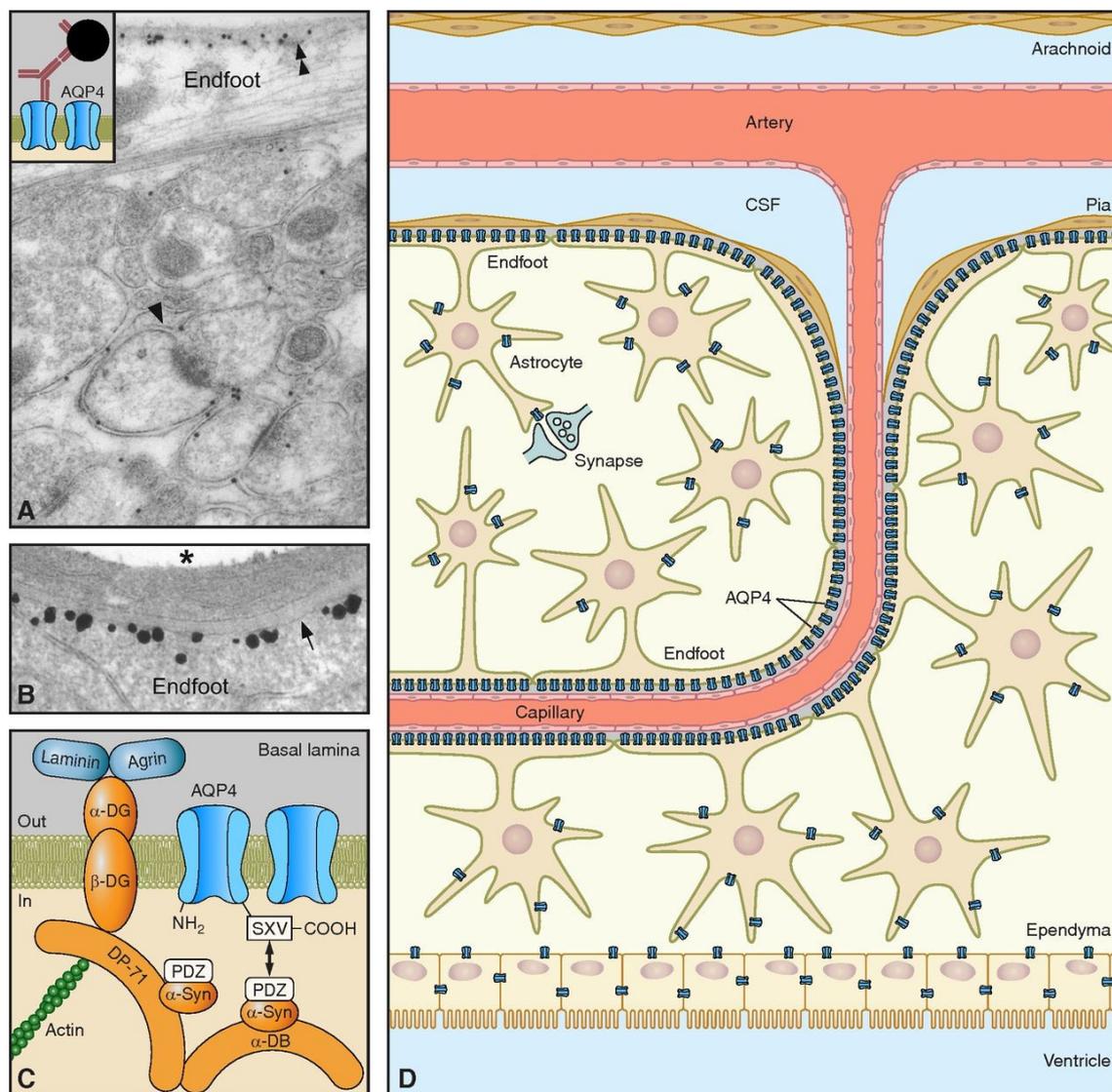


Fig. 8 脳内における AQP4 の分布

引用元 : (Nagelhus and Ottersen, 2013)

(A) 小脳皮質における AQP4 分布を示す電子顕微鏡写真. AQP4 を示す粒子はグリア膜上, 特に軟膜下のエンドフィート上に高密度に存在する (二重矢印). シナプスを包むグリア膜 (矢頭) にも AQP4 が存在するが少量である. 左上の挿入図は免疫電子顕微鏡法の原理

を示したものである。(B) 血液と脳の境界面の高倍率顕微鏡写真。AQP4 がグリアに限局する偏った分布をもつことが確認された。AQP4 は血管周囲のグリアエンドフィートに沿って発現している (矢印)。アスタリスクは血管内腔を示す。(C) AQP4 は、 α -シントロフィン (α -Syn), α -ジストロブレビン (α -DB)、ジストロフィンの 71kDa アイソフォーム (DP71), β -ジストログリカン (β -DG), α -ジストログリカン (α DG) からなるジストロフィン関連タンパク質複合体 (dystrophin-associated protein complex; DAPC) によって血管周囲の基底膜に固定される。AQP4 の COOH-末端 SXV 配列は、 α -シントロフィンの PDZ ドメインと直接的または間接的に相互作用する。 α -ジストログリカンは、ラミニンとの直接結合とアグリンを介して基底膜に付着している。 α -ジストログリカンの O-グリコシル化は細胞外マトリックスリガンドとの結合に必要である。(D) 脳における AQP4 発現の模式図。AQP4 (青色) はアストロサイトと上衣細胞に発現している。

1.3.2 神経炎症の制御

水輸送の制御に代わる治療法として神経炎症の制御が着目されている。虚血性脳浮腫の病態形成には BBB 透過性の亢進が重要であることから、TNF- α (King, Alleyne and Dhandapani, 2013; Rochfort *et al.*, 2014; Abdullah *et al.*, 2015), IL-6 (Desai *et al.*, 2002; Cohen *et al.*, 2013), Superoxide (Armstead *et al.*, 1992; Armstead, 2001; Kim *et al.*, 2001), MMP-9 (Asahi *et al.*, 2001; Rosenberg and Yang, 2007; Yang *et al.*, 2007; McColl, Rothwell and Allan, 2008; Liu *et al.*, 2009) などのさまざまな BBB 透過性亢進因子を標的とした治療法が提案された。これらの阻害は脳梗塞モデル動物において良好な結果をもたらすため有望な治療標的として期待されていたが、臨床試験では顕著な結果を得られないことが多く、BBB 透過性亢進因子を標的とした治療薬は未だ存在しない。その理由として、虚血後の炎症反応の発現および増悪においては複数の因子が相互作用することが挙げられる。よって、顕著な治療効果を得るには単一の BBB 透過性亢進因子ではなく、それらの産生細胞を標的とすることが合理的だと考えられる。

ミクログリアは中枢神経系 (central nervous system; CNS) のグリア細胞の一種であり、脳常在性マクロファージとも呼ばれる免疫細胞である (Kettenmann *et al.*, 2011)。アストロサイト、オリゴデンドロサイト、上衣細胞といった外胚葉由来のグリア細胞とは異なり、ミクログリアは胎生期卵黄嚢を起源とする中胚葉由来の細胞である (Ginhoux *et al.*, 2013)。生

理的条件下においてミクログリアは、細胞体から細長い多数の突起を伸ばした静止型ミクログリア (resting microglia, ramified microglia) として点在するが、病態時には細胞体を膨大化させ突起を退縮させた活性化型ミクログリア (activated microglia, amoeboid microglia) へと変化する (Fig. 9) (Wolf, Boddeke and Kettenmann, 2017). このような形態変化の他に、活性化型ミクログリアは遊走能や貪食能の亢進、サイトカインやケモカインなどの種々の液性因子の産生と放出を行う (Hanisch, 2002).

脳虚血後に最初に反応する免疫細胞はミクログリアである。その後、虚血半球で最初に発見される白血球系の細胞は好中球であり、時間経過により T細胞や B細胞が浸潤する (Jin, Yang and Li, 2010; Chamorro *et al.*, 2012; Grønberg *et al.*, 2013). これらの細胞は炎症促進性サイトカインやケモカインなどの液性因子を放出することで脳虚血後の病態形成に寄与する (Gelderblom *et al.*, 2009; Liesz *et al.*, 2011). しかし、虚血半球への浸潤細胞の増加は虚血-再灌流において認められる現象であり、永久虚血においてはほとんど認められないことが報告されている。末梢からの免疫細胞の浸潤阻害による治療は、永久虚血モデルにおいては治療効果が乏しい (Zhang *et al.*, 1995; Garcia, Liu and Bree, 1996; Prestigiacomo *et al.*, 1999). さらに、Zrzavy らが脳梗塞患者 16 名と対照者 18 名の脳組織標本を用いて病変組織における炎症細胞数を定量解析したところ、浸潤 T細胞の多くは CD8 陽性細胞であるうえ、わずかに存在する CD4 陽性細胞も増殖マーカーを発現していなかった。一方で、ミクログリアは顕著な活性化が認められた (Zrzavy *et al.*, 2018). 上記知見より、ミクログリアを標的とした治療が妥当であると考えられる。

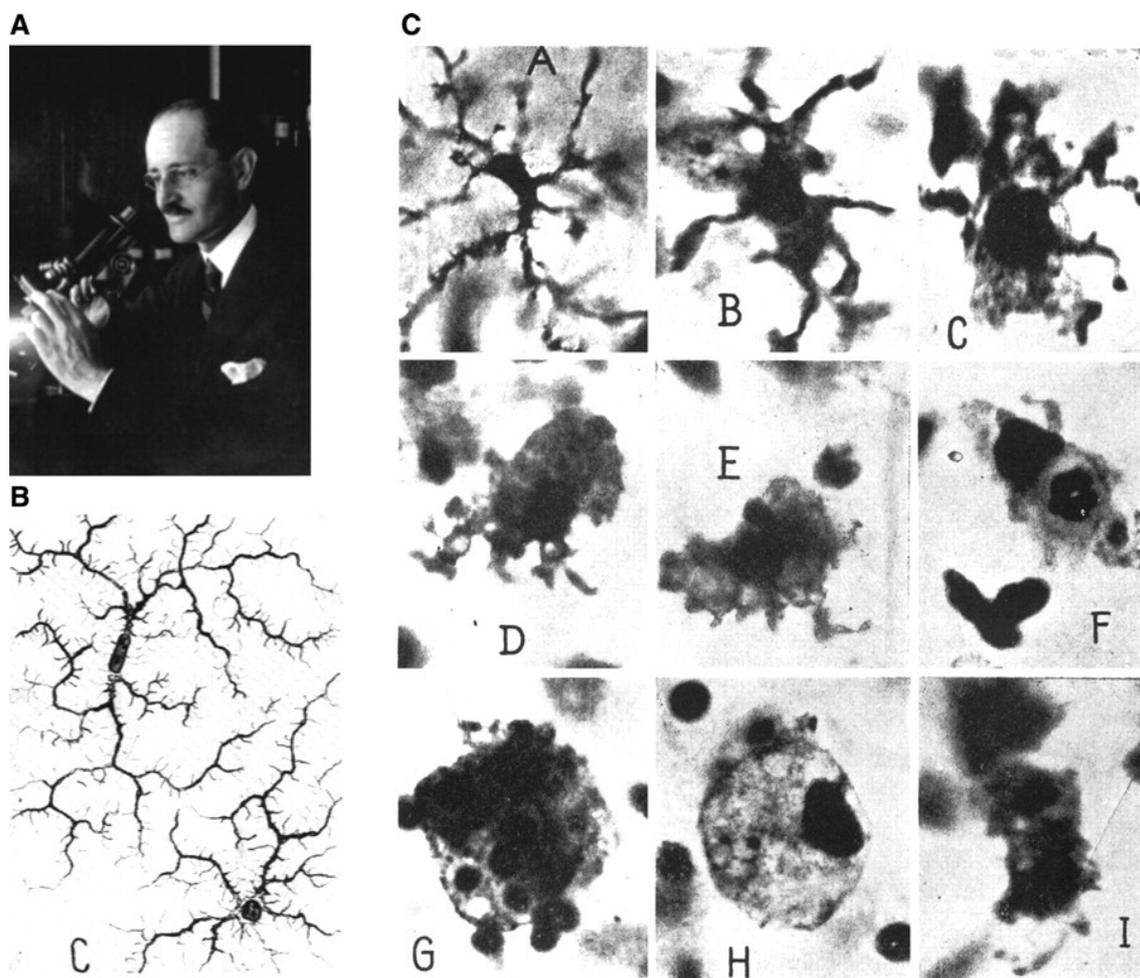


Fig. 9 Pio del Rio-Hortega が発見したミクログリア細胞

引用元：(Kettenmann *et al.*, 2011)

(A) Pio del Rio-Hortega (1882-1945). (B) Hortega が描いた ramified microglial cell の画像.
 (C) 貪食中のミクログリアの形態変化.

第2章 永久虚血下において生じる脳浮腫の形成過程の解析

2.1 緒言

永久虚血下における脳浮腫の形成および進行過程を調べるため、まずは、安定的に脳虚血と脳浮腫を誘導できる実験系の確立を目指した。

脳虚血の病態は、血流低下する脳範囲、または血流低下の程度により分類される。血流が低下する範囲によっては全脳虚血 (global ischemia) と局所脳虚血 (focal ischemia) とに、血流低下の程度によっては完全虚血 (complete ischemia) と不完全虚血 (incomplete ischemia) とに分けられる。このような病態に対してこれまで種々の実験動物モデルが発案されてきた。全脳虚血モデルでは、心停止などの発生により小脳・脳幹を含めた脳全体が虚血に陥る。このモデルでは虚血の程度が強く、虚血状態の持続により動物は早期に死亡するため、血流再開が必須となる。局所脳虚血モデルでは、主幹動脈の閉塞によりその支配領域が虚血に陥る。最終的には神経細胞、グリア細胞、血管内皮細胞などの脳組織を構成する全要素が壊死し、死細胞群 (梗塞巣) となる。虚血の程度は部位によって異なり、虚血中心部は完全虚血に近いが、辺縁部ではわずかに血流が残存した不完全虚血となる。局所脳虚血モデルでは、虚血中心部において血管障害が認められ、血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) の機能低下による血清中タンパク質の血管外漏出が生じ、その結果として血管原性浮腫が発生する。臨床においては、動脈硬化性の変化により主幹動脈が狭窄もしくは閉塞するアテローム血栓性脳梗塞と、不整脈などを主因とする心臓由来の血栓が主幹動脈を閉塞する心原性脳梗塞が主として生じ、どちらも中大脳動脈 (middle cerebral artery; MCA) に好発する。よって、臨床病態に最も類似した MCA 閉塞モデルが局所脳虚血モデルとして頻用される。MCA の閉塞方法としては、クリップや電気凝固によって血管外から直接 MCA を閉塞する手法と、ナイロン糸などを頸動脈から挿入することにより血管内から MCA を閉塞する手法とに大別され、細かい手法の違いにより種々の実験モデルが存在する。本研究は、永久虚血下において生じる血管原性浮腫を対象としているため、(1) 自然な血流再開、(2) 頭開による頭蓋内圧や BBB への影響が生じうるモデルは不適である。よって、両者の懸念がない血管内系上げモデル (intraluminal thread model) により中大脳動脈永久閉塞術 (permanent middle cerebral artery occlusion; pMCAO) を行なった。

2.2 材料と方法

2.2.1 実験動物と飼育環境

本研究では、雄性 ICR マウスを CLEA Japan Inc (Shizuoka, Japan) または Japan SLC, Inc (Tokyo, Japan) から購入し、実験に供した。全てのマウスは、室温: 23±3°C, 湿度: 50±10%, 明暗周期: 12 時間 (明期 8:00-20:00, 暗期 20:00-8:00) に維持された広島大学 東広島キャンパス 総合科学部附属 動物実験施設 (O-101) にて飼育し、水および固形飼料 (CE-2; CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan) は自由摂取とした。虚血手術前は、ケージ (W220×L320×H135 mm, KN-600-T; Natsume Seisakusho Co., Ltd, Tokyo, Japan) に 3-5 匹、虚血手術後はケージ (W140×D320×H140 mm, KN-60105-T; Natsume Seisakusho Co., Ltd, Tokyo, Japan) に 1 匹の条件で飼育した。屠殺の際には、イソフルランを用いた吸入麻酔下での頸椎脱臼または断首により安楽死させた。

本研究の遂行にあたっては『広島大学動物実験等規則』（『動物の愛護及び管理に関する法律』、『実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準』、『動物の殺処分方法に関する指針』、『研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針』）に準拠を遵守した。『広島大学動物実験等規則』では動物実験会計画書の提出を義務づけ、倫理面を含めた実験内容について広島実験動物委員会にて審査し、国や大学により定められた法律、基準、指針等に準拠した研究であることを確認したのちに動物実験を許可している (承認番号: No.C18-16-4)。

2.2.2 中大脳動脈永久閉塞術 (pMCAO)

手術開始前、解剖用具と縫合糸を 5%ヒビテン液 (Dainippon Pharma Co., Ltd, Osaka, Japan, Catalog No. 662610007) に浸漬滅菌した。雄性 ICR マウス (8-12 週齢) をイソフルラン (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) で吸入麻酔し (導入 3%, 維持 2%, とともに 200 mL/min), 腹臥位にした。ヘアカッターで頭頂部の毛を剃り 70% EtOH 脱脂綿で滅菌した。表皮を切開して頭蓋骨を露出し綿棒を用いて頭蓋膜を剥離した。pMCAO による虚血誘導時には、フィラメントの先端径の太さやマウスの血管走行における個体差の問題などにより、血流が十分に阻害されない場合が存在する。そのため、pMCAO 手術前後に Laser

doppler 血流計を用いて局所脳血流量 (regional cerebral blood flow; rCBF) を測定し、脳血流量が 20 mL/100 g/min まで低下した個体のみを実験に使用した。

血流測定後、マウスを仰臥位にして手術用まくら (Fig. 10) を配置し、バリカンで前喉部の毛を剃り 70% EtOH 脱脂綿で滅菌した。正中線に沿って喉部を約 2 cm 切開した。左の総頸動脈 (common carotid artery; CCA) を露出させ、1号の絹糸 (C-23-561; Natsume Seisakusho Co., Ltd, Tokyo, Japan) を通したのち、微小血管クリップで一時的に血流を止めた (Fig.11-①)。血管周囲の迷走神経を傷つけないよう慎重に外総頸動脈 (external carotid artery; ECA) と内総頸動脈 (internal carotid artery; ICA) を剥離した。7-0号の絹糸 (Natsume Seisakusho Co., Ltd, Tokyo, Japan) により、ECA と ICA の分岐から遠位部 (Fig.11-②)、および近位部 (Fig.11-③) に1つずつ輪を作り、遠位部をきつく結紮した。CCAに通した絹糸で血管を結紮して血流を一時的に遮断したのち (Fig.11-④)、微小血管クリップをICAにつけかえた (Fig.11-⑤)。ECAの2つの結び目の間に超精密はさみ (室町機械株式会社, 15000-08) で切り込みを入れ、フィラメントを挿入した。ECAを可能な限り遠位部で切断し、フィラメントをICAへと挿入した。ICAのクリップを外し中大脳動脈 (middle cerebral artery; MCA) へとフィラメントを押し進め、ECAとICAの分岐から約8-10 mmまで挿入した。フィラメントを固定して留置し、表皮を縫合してマウスをケージに戻し、任意の時間虚血させた。Sham operation 群ではECAを結紮、および切断までは同様の操作を行い、フィラメントは挿入せずにCCAの結紮を解いたのち、表皮を縫合した。

なお、pMCAOの際には自作のナイロンフィラメントを用いた。6-0号の透明ナイロン糸 (C-23-N1; Natsume Seisakusho Co., Ltd, Tokyo, Japan) をピンセットでつまみ、熱したはんだごてに対して垂直になるようにゆっくりと近付けた。ナイロン糸の先端から約1 mmの部分が太くなったらはんだごてから離し、フィラメントの全長が11 mmになるようナイロン糸をカットした。実体顕微鏡とマイクロメーターを用いて先端部を確認し、先端径 200-250 μm 、先端長 1.5-2.0 mm になったフィラメントのみを実験に使用した (Fig. 12)。



Fig. 10 マウス手術用まくら

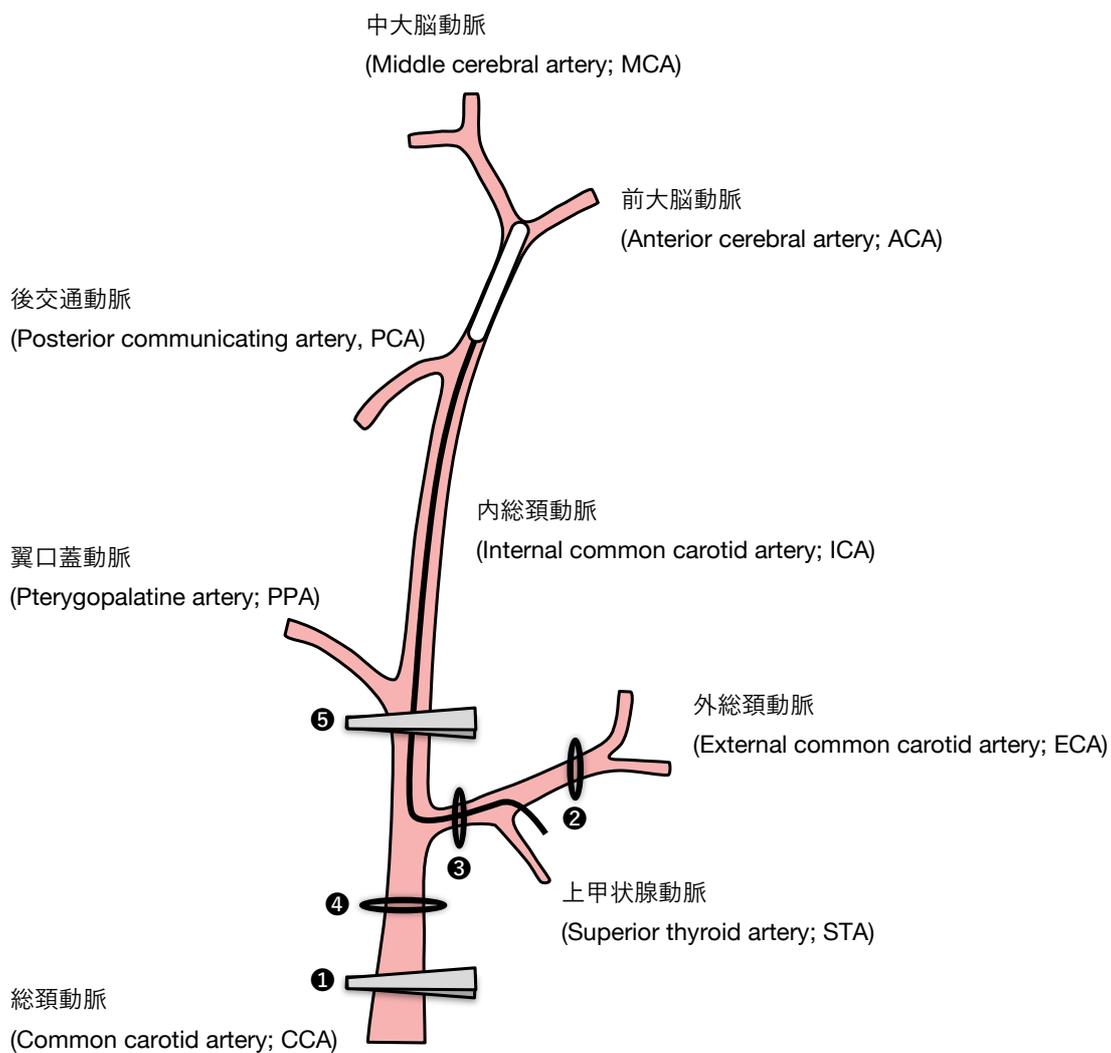


Fig. 11 マウス脳血管構造と pMCAO の手順

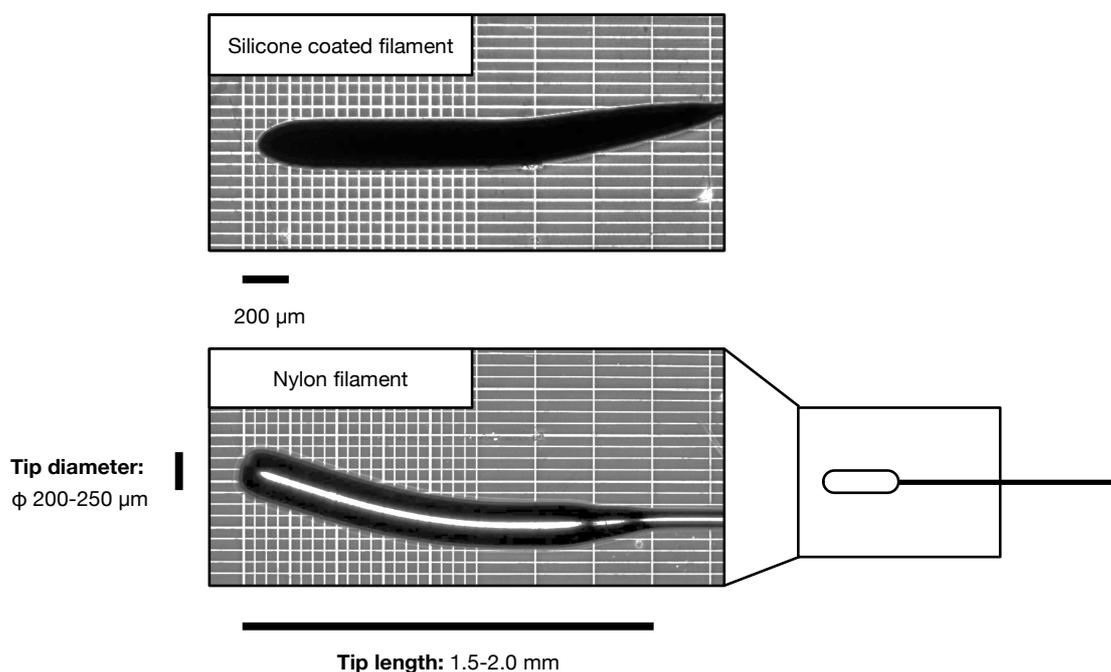


Fig. 12 Doccol 社のシリコンコートフィラメントと自作のナイロンフィラメント

Doccol 社のシリコンコートフィラメント (702212PK5Re; Doccol Corp., Massachusetts, USA) の大きさを参考にしてナイロンフィラメントを作製した。6-0 号の透明ナイロン色 (C-23-N1; Natsume Seisakusho Co., Ltd. Tokyo, Japan) をはんだごてで熱して先端を確認し、先端径 200-250 μm, 先端長 1.5-2.0 mm になったナイロンフィラメントのみを使用した。

2. 2. 3 核磁気共鳴画像 (MRI) の撮像

pMCAO 後の虚血領域の同定および脳浮腫の評価のために核磁気共鳴画像 (magnetic resonance imaging; MRI) を撮像した。Sham operation および pMCAO 後の任意の時間にマウスをイソフルラン (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) で吸入麻酔し (導入, 維持ともに 1.5-1.8 %, 160 mL/min), 直腸プローブ (Unique Medical Co., Ltd., Tokyo, Japan) で体温をモニタリングしながら, Warm-water blanket を用いて体温を $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$ に維持した。MRI データは 1.5 T の永久磁石, 小型コンピュータ制御のコンソール, および内径 30 mm のソレノイド型 MRI コイルからなる MRmini-SA (DS Pharma Biomedical Co., Ltd, Osaka, Japan) を用いて取得した。2次元スピネコーmulti-slice 法により, T1 強調画像 (T1 weighted image; T1WI), T2 強調画像 (T2 weighted image; T2WI), 拡散強調画像 (diffusion

weighted image; DWI) を撮像した。冠状方向に 1 mm 厚で脳を画像化し、1 回の測定につき 11 枚の画像を得た。各種 MRI 画像のシグナル強度測定には、INTAGE Realia Professional software program (Cybernet Systems Co. Ltd., Tokyo, Japan) と ImageJ (National Institutes of Health, Maryland, USA) (no date; Abramoff, 2007; Schindelin *et al.*, 2012; Schneider, Rasband and Eliceiri, 2012) を用いた。

2.2.4 乾湿重量測定法

秤量瓶と蓋を乾熱滅菌機中で 24 時間乾燥させた (100°C)。常温に戻して蓋を取り付け、秤量瓶の質量を計測した。pMCAO 後にマウス脳を摘出して虚血半球と非虚血半球に分け、線条体と大脳皮質に分画した後にそれぞれを秤量瓶中に入れた。湿重量 [W1] を測定後、乾熱滅菌機で 24 時間乾燥させた (100°C)。秤量瓶が常温に戻り次第、乾燥重量 [W2] を測定し、下記の計算式により脳水分量 (%) を算出した。

$$\text{脳水分量 (\%)} = \{ ([W1] - [W2]) / [W1] \} \times 100$$

2.2.5 TTC 染色

マウス脳を摘出し、Brain Slicer (Roboz Surgical Instrument, AL-1175) とカミソリを用いて Bregma を基準として冠状方向に 1 mm 厚でスライスした。PBS を用いて 1% TTC (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride, NACALAI TESQUE, INC., Kyoto, Japan) を調製し、37°C で 10 分間インキュベートした。各脳切片を嗅球側より並べて iPhone (Apple Inc., California, USA) により撮影した。ImageJ を用いて、非虚血半球の全領域 [a]、梗塞巣領域 [b]、虚血半球の全領域 [c] の面積を ROI で数値化し、下記の計算式により梗塞巣体積を算出した (Fig. 13)。

$$\text{梗塞巣体積 (mm}^3\text{)} = (\text{非虚血半球の全領域 [a]} \times \text{梗塞巣領域 [b]}) / \text{虚血半球の全領域 [c]}$$

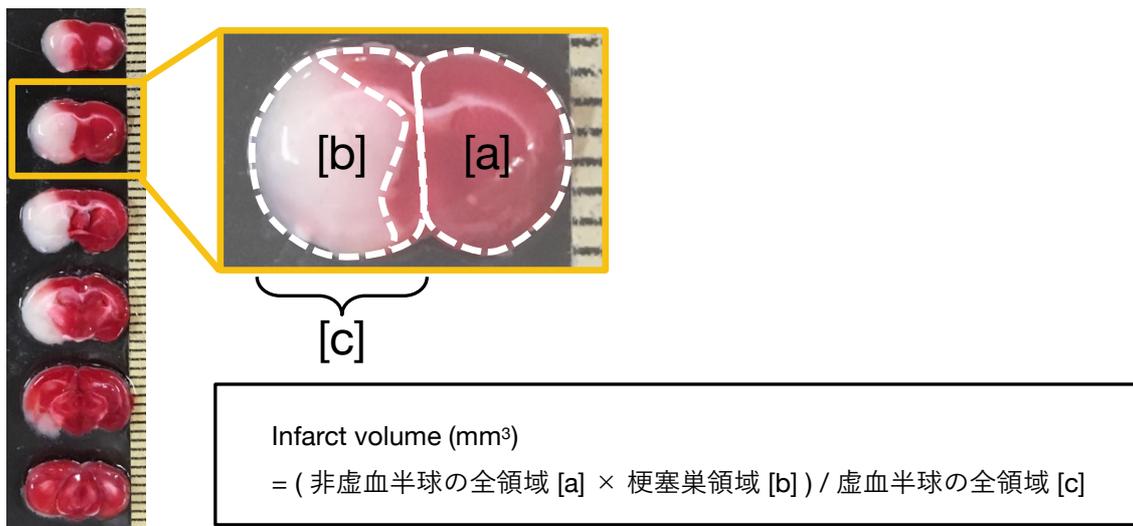


Fig. 13 TTC 染色による梗塞巣体積の算出

2.2.6 神経機能障害度の評価

マウスの神経機能評価には Modified neurological severity score (mNSS) を用いた(Chen *et al.*, 2001). マウスに pMCAO を施し, 任意の時間において Table. 4 と Table. 5 に従ってスコアリングした. 点数が大きいほど神経機能が低下していることを示し, 最少値は 0, 最大値は 18 である.

Table. 4 mNSS のスコアリング

1. 運動機能の評価	最高得点	6
1-1. 吊下姿勢の観察		
バランスよく姿勢を保つ		0
マヒ側の前肢を屈曲させる		1
マヒ側の後肢を屈曲させる		2
30秒以内に垂直軸から10度以上頭を動かしたままの状態になる		3
1-2. 歩行運動の観察		
まっすぐに歩く		0
まっすぐに歩けない		1
マヒ側へ回転運動を行う		2
マヒ側へ倒れる		3
2. 感覚機能の評価	最高得点	2
2-1. 視覚性・触覚性置き直し試験		
マヒ側の頬髭を刺激すると前肢を机に置きなおす		0
マヒ側の頬髭を刺激をしても前肢を置き直さない		1
2-2. 固有感覚性置き直し試験		
梗塞巣側から横押しをすると前肢を抵抗させる		0
梗塞巣側から横押しをしても前肢を抵抗させない		1
3. バランス機能の評価	最高得点	6
3-1. ビームバランス試験		
安定した姿勢で60秒以上バランスをとる		0
角材の側面をつかむ		1
角材を抱え込むが四肢のうち1つが角材から落ちている		2
角材を抱え込むが四肢のうち2つが角材から落ちている, または回転する		3
角材の上でバランスをとろうとするが, 40-59秒で落下する		4
角材の上でバランスをとろうとするが, 20-39秒で落下する		5
バランスをとろうしない, または角材をつかむが20秒未満で落下する		6
4. 反射・行動異常の観察	最高得点	4
4-1. 耳介反射		
耳介反射があり, 頭を振る		0
耳介反射がない		1
4-2. 角膜反射		
角膜反射があり, 目を閉じる		0
角膜反射がない		1
4-3. プライエル驚愕反射		
驚愕反射があり, とびあがる		0
驚愕反射がない		1
4-4. 運動異常や行動異常		
異常がない		0
けいれん, 筋クローヌス, 筋ジストニアが認められる		1
Total	最高得点	18

Table. 5 mNSS の各試験における評価項目

試験名	評価項目
吊下姿勢観察	マウスの尾を持って吊り下げた状態の四肢および頭部の状態により評価した。
歩行運動観察	机の上にマウスを置き、歩行運動の様子を観察することにより評価した。
視覚性置き直し試験	マウスの尾を持って吊り下げた状態から机の端に近づけ、髭など身体の一部が接触する前に頭部をもちあげて前肢を伸展する姿勢が発現するかにより評価した。
触覚性置き直し試験	下垂させた前肢端を机の端に接触させたとき、前肢を伸展させ置き直す反応が生じるかにより評価した。
固有感覚性置き直し試験	足を机の端へ押しやり、手足の筋肉を刺激したとき、手足を置き直す反応が生じるかにより評価した。
ビームバランス試験	自作の角材 (900×5×20 mm に 900×6×6 mm を貼り合わせたもの) を床から 1 m の位置に設置してマウスを乗せ、1 分間観察したときの状態により評価した。
耳介反射	耳介内側の外耳道に薬さじを接触させたとき、耳介を動かす反射が生じるかにより評価した。
角膜反射	角膜に薬さじを軽く接触させたとき、眼瞼を閉鎖 (瞬目) する反射が生じるかにより評価した。
驚愕反射	手を鳴らし音刺激に対して過敏な反応 (跳躍, 過剰な前後肢の伸展等) が生じるかにより評価した。
痙攣・ミオクローヌス・筋張力障害の評価	マウスの様子を観察し、痙攣 (身体または一部の骨格筋に不随意的な発作性の収縮), ミオクローヌス (筋肉や筋肉群に起きる素早い収縮), および緊張力障害が起きているかにより評価した。

2.3 実験結果

2.3.1 中大脳動脈永久閉塞術 (pMCAO) に用いるナイロンフィラメントの作製

血管内系上げモデル (intraluminal thread model) は、1986年に小泉らにより開発された (Koizumi et al. 1986). 小泉の原法では、ナイロン糸の先端を熱して球状にし、シリコンで覆うことで先端を円柱状にしたシリコンコートフィラメントを用いている. その後、Zea Longa らがナイロン糸の先端を熱して球状に加工したナイロンフィラメントを開発した (Longa et al. 1989). 本研究では、フィラメントの形状の再現性がより高いナイロンフィラメントを採用した. マウスの Intraluminal thread model においては、先端径が 0.20-0.25 mm のフィラメントが多用される (Chiang et al. 2011). したがって、これに近い直径をもつ黒色ナイロン糸 (5-0号: 0.10-0.149 mm または 6-0号: 0.070-0.099 mm) を熱してナイロンフィラメントを作製し、pMCAOを行なった. どちらの号数のナイロンフィラメントも MCA まで到達したが、虚血 24 時間後にマウスを屠殺して脳を摘出したところ、脳出血が頻発した (8/16 匹). よって、ナイロンフィラメントの形状の改良を試みた.

脳出血が生じる原因は、ナイロン糸周囲の黒色塗料であると考えた. ナイロン糸を熱した際に、糸周囲に付着している黒色塗料が溶け出すことにより先端が鋭利な形状になり、血管を傷つけ穿孔することで出血が生じるとの仮説を立てた. よって、塗料が付着していない透明ナイロン糸 (5-0号または 6-0号) を熱してナイロンフィラメントを作製した (Fig. 12). 5-0号の透明ナイロン糸を熱すると先端は綺麗な球形となったが、先端径が 0.30-0.35 mm になり、pMCAOの際にナイロンフィラメントが MCA まで到達しなかった. 6-0号の透明ナイロン糸を熱すると、先端が綺麗な球形かつ先端径は 0.20-0.25 mm となり、MCA への挿入が可能になった. さらに、虚血 24 時間後にマウスを屠殺して脳を摘出したところ、脳出血が生じないことを確認した (0/16 匹). よって、以後全ての実験において 6-0号の透明ナイロン糸を熱してナイロンフィラメントを作製した.

2.3.2 pMCAO 後の局所脳血流量 (rCBF) の測定

自作したナイロンフィラメントを MCA へと挿入した際に、MCA 支配下領域の血流が低下するかを確認した. pMCAO 施術中に、Laser doppler 血流計を用いて左 MCA の局所脳血流量 (rCBF) を測定した (Fig. 14A). 施術前の rCBF は約 60 mL/100 g/min であったが、MCA

へのナイロンフィラメント挿入後は約 20 mL/100 g/min まで低下しており、MCA の閉塞が認められた。虚血 24 時間後においても、左 MCA の rCBF は約 20 mL/100 g/min のまま低下しており、虚血状態が維持されていた (Fig. 14B)。さらに、Sham operation 施術中において左 MCA の rCBF を測定し、血流が低下しないことを確認した (Fig. 14C)。

既報によると、局所永久虚血モデルにおいて脳浮腫が発生する rCBF は、スナネズミでは 20 mL/100 g/min (Crockard *et al.*, 1980)、サルでは 15-20 mL/100 g/min (Symon, Branston and Chikovani, 1979)、ネコでは 10-15 mL/100 g/min (Hossmann, Hossmann and Takagi, 1980; Strong *et al.*, 1983) である。したがって、本手法は脳浮腫を発生させるモデルとして適切であると判断し、以後は rCBF が約 20 mL/100 g/min に低下した個体のみを実験に使用した。

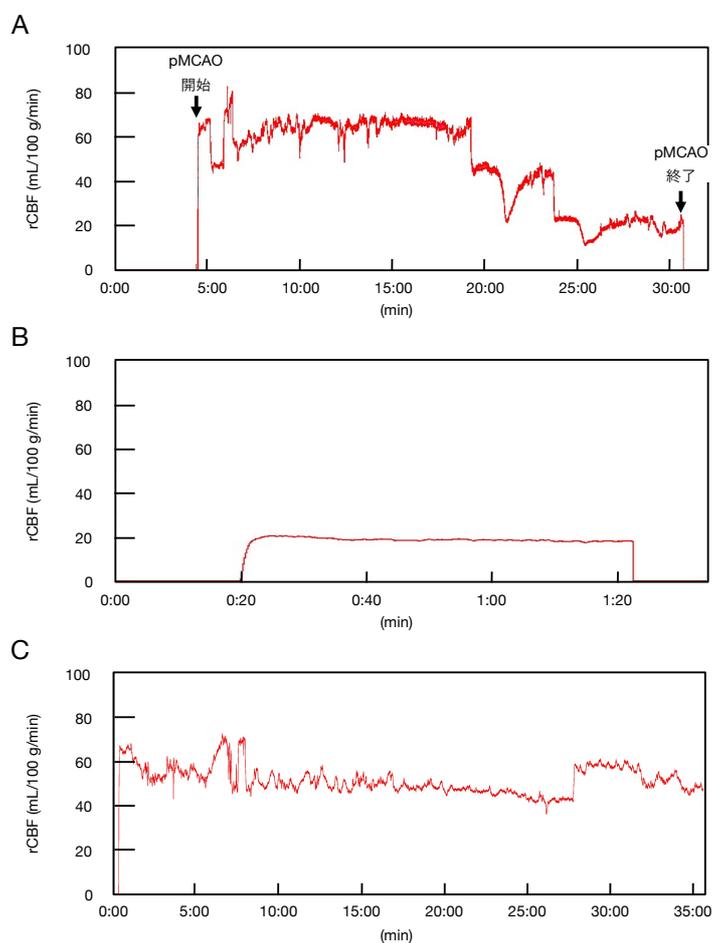


Fig. 14 pMCAO または Sham operation 中における局所脳血流量 (rCBF) の推移

pMCAO または Sham operation 施術中に Laser doppler 血流計を用いて左 MCA の rCBF を測定した。(A) pMCAO 施術中の rCBF, (B) pMCAO 24 時間後の rCBF, (C) Sham operation 施術中の rCBF。

2.3.3 pMCAO 後の虚血領域の同定

局所脳虚血モデルでは虚血の程度は部位によって異なり、完全虚血に近い虚血中心部とわずかに血流が残存し不完全虚血となる虚血辺縁部とに分類される。これらの領域を同定するため、造影剤を用いたMRIの撮像により、pMCAO 前後の脳灌流領域を調べた。3-hydroxymethyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl (3-hydroxymethyl-proxyl; 3HMP) は血液脳関門透過性の造影剤であるため、血流豊富な脳領域に分布して当該領域の画像コントラストを強調する効果をもつ (Fujii et al. 2013)。またMRIの一種であるT1WIは解剖学的構造を捉えることに適した撮像法である。したがって、3HMP投与後にT1WIを取得することで灌流領域を表す画像が得られる。

マウスへ10 mg/kg 3HMPを静脈内投与し、T1WIを撮像した (Fig. 15)。pMCAO 施術前は、灌流領域を示す青いシグナルが脳全体で認められた。一方でpMCAO 後には、MCA支配下領域である線条体や大脳皮質を中心として青いシグナルが消失した。したがって、本手法においては線条体と大脳皮質の側頭部が虚血中心部となり、大脳皮質の頭頂部が虚血辺縁部となることが判明した。

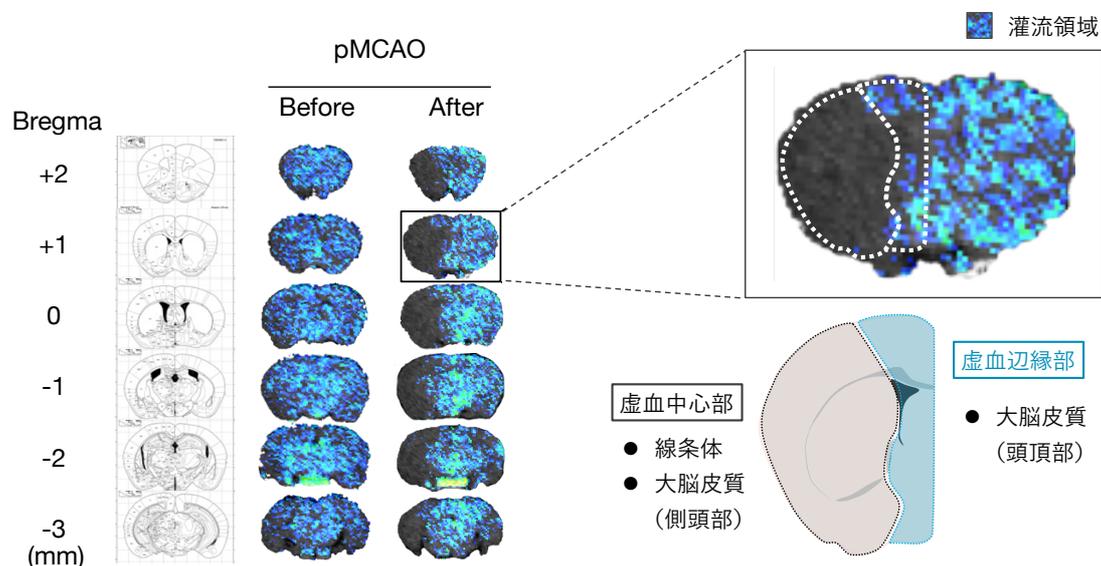


Fig. 15 MRI 造影剤 3HMP の投与による pMCAO 施術前後の脳灌流領域の同定

MRI 造影剤である 3HMP を 10 mg/kg の濃度で静脈内投与し、再度 T1WI を撮像した。3HMP は血液脳関門透過性の造影剤であるため、血流が豊富な脳領域に分布し、当該領域の画像コントラストを強調する効果をもつ。よって、3HMP の投与後に T1WI を撮像することで脳灌流領域を表す画像が得られる。

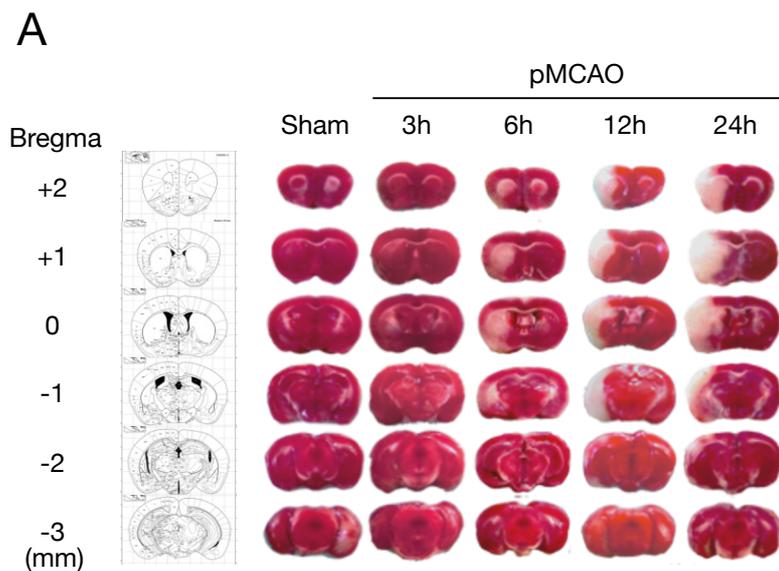
2.3.4 pMCAO 後の梗塞巣の形成および進展過程の観察

局所脳虚血モデルでは、主幹動脈の閉塞によりその支配下領域が虚血に陥り、最終的には神経細胞、グリア細胞、血管内皮細胞などの脳組織を構成する全要素が壊死し、死細胞群 (梗塞巣) となる。pMCAO 後の梗塞巣の形成および進行過程を調べるため、TTC 染色を行なった。

トリフェニルテトラゾリウムクロライド (2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride; TTC) は白色結晶であるが、水素によりトリフェニルホルマザン (1,3,5-triphenylformazan; TPF) へと還元されることで赤色を呈する。ミトコンドリアには電子伝達系を中心に大量の還元酵素が存在するため、ミトコンドリアが機能している細胞では TTC から TPF への還元が生じ、赤く染色される。しかし、生理活性がなく梗塞巣化した脳領域では染色が生じず、脳本来の薄桃色の領域として残存する。以上の原理より、TTC 染色は梗塞巣の検出法として頻用される (Chiang et al. 2011)。また、梗塞巣体積の算出法としては脳腫脹を考慮した計算式を採用した。臨床において、脳梗塞発生後には脳腫脹による脳体積の増大がしばしば認められる。同様に、脳虚血モデル動物においても虚血半球の腫脹は頻繁に生じ、この腫脹は梗塞巣体積を定量する際に誤った値を算出する原因となる。そのため、脳虚血の研究においては脳腫脹を考慮した脳梗塞体積の算出法が用いられる (Boyko et al. 2010)。

Sham operation または pMCAO を施し、TTC 染色により虚血 3, 6, 12, 24, 48 時間後の梗塞巣を調べた (

Fig. 16). 梗塞巣は、虚血 6 時間後に線条体領域においてのみ生じた。12 時間後には大脳皮質の側頭領域においても梗塞巣が認められ、24 時間後には梗塞巣がさらに拡大した。梗塞巣体積を算出することにより梗塞巣の経時変化を定量したところ、梗塞巣の体積は虚血後から増加し、虚血 24 時間後にプラトーに達した。よって以後は、虚血 24 時間後において予後を評価した。



B

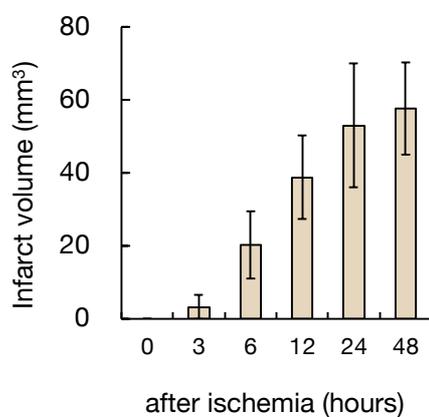


Fig. 16 pMCAO 後の梗塞巣の進行過程と梗塞巣体積の算出

マウスに pMCAO を施し、虚血後の任意の時間において脳を摘出して Bregma ± 0 mm を基準に 1 mm 厚の冠状連続切片を作製した。脳切片を 1% TTC 溶液中に浸漬し、10 分間、37°C でインキュベートして嗅球側より並べて撮影した。ImageJ により各切片の梗塞巣体積を算出したのちに合算し脳全体の梗塞巣体積とした。なお、梗塞巣体積の計算には脳腫脹の影響を除外する計算式を用いた。(A) pMCAO 後の代表的な TTC 染色画像。(B) TTC 染色画像をもとにした脳全体の梗塞巣体積の定量結果。The values represent the mean S.E. n=3-6.

2.3.5 脳虚血後の神経機能障害度の評価

脳虚血後の神経機能の評価するため、modified neurological severity score (mNSS) を行なった。mNSS とは、運動機能、感覚機能、バランス機能、反射機能に関する試験を含む神経機能評価スコアである (Chen *et al.*, 2001)。統合的な神経機能の測定が可能であり、正常状態は 0 点、神経機能欠損が最大の状態は 18 点で表される。この mNSS は、臨床において患者の神経学的機能評価に用いられる NIH Stroke Scale (NIHSS) や Japan Stroke Scale (JSS) を実験動物に応用したスコアリング法であり、脳虚血研究において頻用される。

マウスへ Sham operation または pMCAO を施し、mNSS により虚血 24 時間後の神経機能の評価した (Fig. 17)。Sham operation 群において神経機能障害は認められなかったが、pMCAO 群においては運動機能、感覚機能、バランス機能、および反射機能において重篤な障害が生じた。

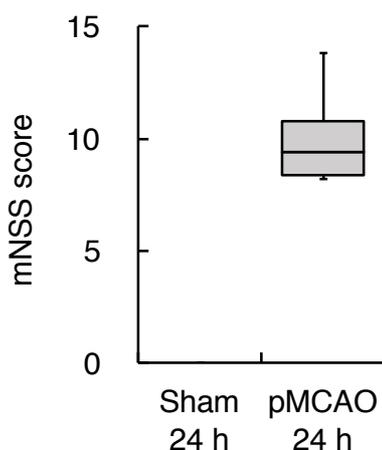


Fig. 17 pMCAO 24 時間後における神経機能の評価

マウスに pMCAO または Sham operation を施し、24 時間後に mNSS により神経機能の評価した。mNSS の最大スコアは 18 点であり、得点が高いほど神経機能障害が重篤であることを示す。The values represent the mean S.E. n=5.

2.3.6 乾湿重量測定による脳水分量の算出

脳の乾湿重量測定により脳水分量を算出し、pMCAO後の脳浮腫の有無を評価した。虚血後は、脳浮腫領域以外に死細胞群でも水分量が増加するため、乾湿重量測定は脳浮腫を正確には評価できないが、簡便な脳浮腫評価法として一般的に使用される。

虚血24時間後に脳を摘出し、虚血半球と非虚血半球それぞれの線条体と大脳皮質を採取して湿重量と乾燥重量を測定することで、各部位の脳水分量を算出した (Fig. 18)。線条体では、非虚血半球と比べて虚血半球の水分量が有意に増加した。大脳皮質では、虚血半球の水分量に増加傾向が認められたが、有意な差は認められなかった。

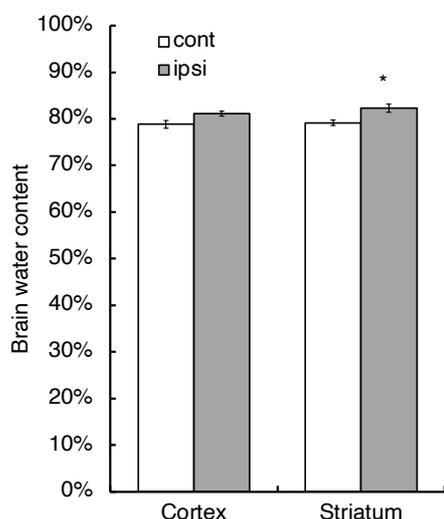


Fig. 18 pMCAO 24 時間後における脳水分量の測定

マウスに pMCAO を施し、24 時間後に脳を摘出して虚血半球と非虚血半球に分画した。それぞれの線条体領域と大脳皮質領域を採取し、湿重量の測定後に乾熱滅菌機中で乾燥させた。乾燥重量を測定後に乾湿重量の比較により脳水分量を算出した。The values represent the mean S.E. n=4. The data were analyzed using Student's t-test. *P < 0.05 vs. contralateral values

2.3.7 DWI の撮像による細胞障害性浮腫の評価

詳細に脳浮腫を評価するため、核磁気共鳴画像法 (magnetic resonance imaging; MRI) のシーケンスの一種である拡散強調画像 (diffusion-weighted image; DWI) と T2 強調画像 (T2-weighted image; T2WI) を撮像し、虚血後の脳浮腫形成過程を時空間的に精査した。

MRIは、磁気と電磁波を用いて体内に存在する水素原子の情報を取得するイメージング法であり、空間分解能が高い断層画像を非侵襲的に取得できるため、生きている動物の深部情報を得ることができる。MRIの画像コントラストは、組織における水分子の水素原子核(プロトン)の密度(量)や緩和時間(周辺環境)などの性質の違いにより生じる。目的に合わせて撮像パラメーターを変更したさまざまなシーケンスが開発されており、臨床での脳梗塞の病態診断においては主にDWIとT2WIが撮像されている。

DWIはプロトンのブラウン運動(気体や液体中に浮遊する微粒子が不規則に運動する現象)の程度の差によりコントラストを生み出す撮像法であり、運動性が低下した領域を高信号のシグナルとして描出する。細胞障害性浮腫が生じると細胞内に水が流入し、細胞は膨大化して細胞間隙は狭小化するため、プロトンの運動性が低下する。よって、細胞障害性浮腫が生じた領域は、DWIでは白い高信号領域として現れる。マウスへpMCAOを施し、虚血から3、6、12、24時間後にDWIを撮像した(Fig. 19)。虚血3時間後、虚血中心部である線条体や大脳皮質の側頭領域において高信号の白いシグナルが生じた。時間経過とともに高信号領域は拡大し、信号強度は増大した。24時間後には虚血中心部である線条体や大脳皮質の側頭領域において顕著な白いシグナルが現れており、著明な細胞障害性浮腫が生じていることが明らかになった。

2.3.8 T2WIの撮像による血管原性浮腫の評価

T2WIはプロトンが多く局在する領域を高信号シグナルとして描出する。そのため脳実質の水分量が著しく増大する血管原性浮腫の領域は、T2WIでは白い高信号領域として現れる。マウスへpMCAOを施し、虚血から3、6、12、24時間後にT2WIを撮像した(Fig. 20)。6時間後、虚血中心部である線条体において高信号の白いシグナルが生じた。時間経過とともに高信号領域は拡大し信号強度は増大した。24時間後には線条体や大脳皮質の側頭領域において顕著な白いシグナルが出現し、著明な血管原性浮腫が生じていることが明らかになった。

さらに、T2WIのシグナル強度を定量解析した。定量化する脳断面としては、虚血中心部である線条体と大脳皮質の側頭領域が広範に存在し、顕著な変化が見られるBregma±0.0 mmのスライスを用いた。なお、定量化した領域はFig. 21に示した通りである。ImageJを用いて、虚血半球および非虚血半球の線条体と大脳皮質をROIで囲むことでシグナル強度を数値化し、非虚血半球の各部位の数値を1.0として、虚血半球におけるシグナルの相対比を算出した(Fig. 21)。線条体では虚血12時間後から顕著に高信号となり、24時間後にはさらにシグナルが上昇した(Sham operation: 0.94 ± 0.02 , pMCAO 3 h: 1.23 ± 0.06 , 6 h: 1.29 ± 0.14 , 12 h: 1.47 ± 0.12 , 24 h: 1.81 ± 0.06)。大脳皮質では、虚血12時間後間ではわずかにシグナルが上昇したのみであったが、24時間後には顕著に高信号となった(Sham operation: 0.95 ± 0.01 , pMCAO 3 h: 1.20 ± 0.05 , 6 h: 1.21 ± 0.14 , 12 h: 1.20 ± 0.10 , 24 h: 1.49 ± 0.11)。

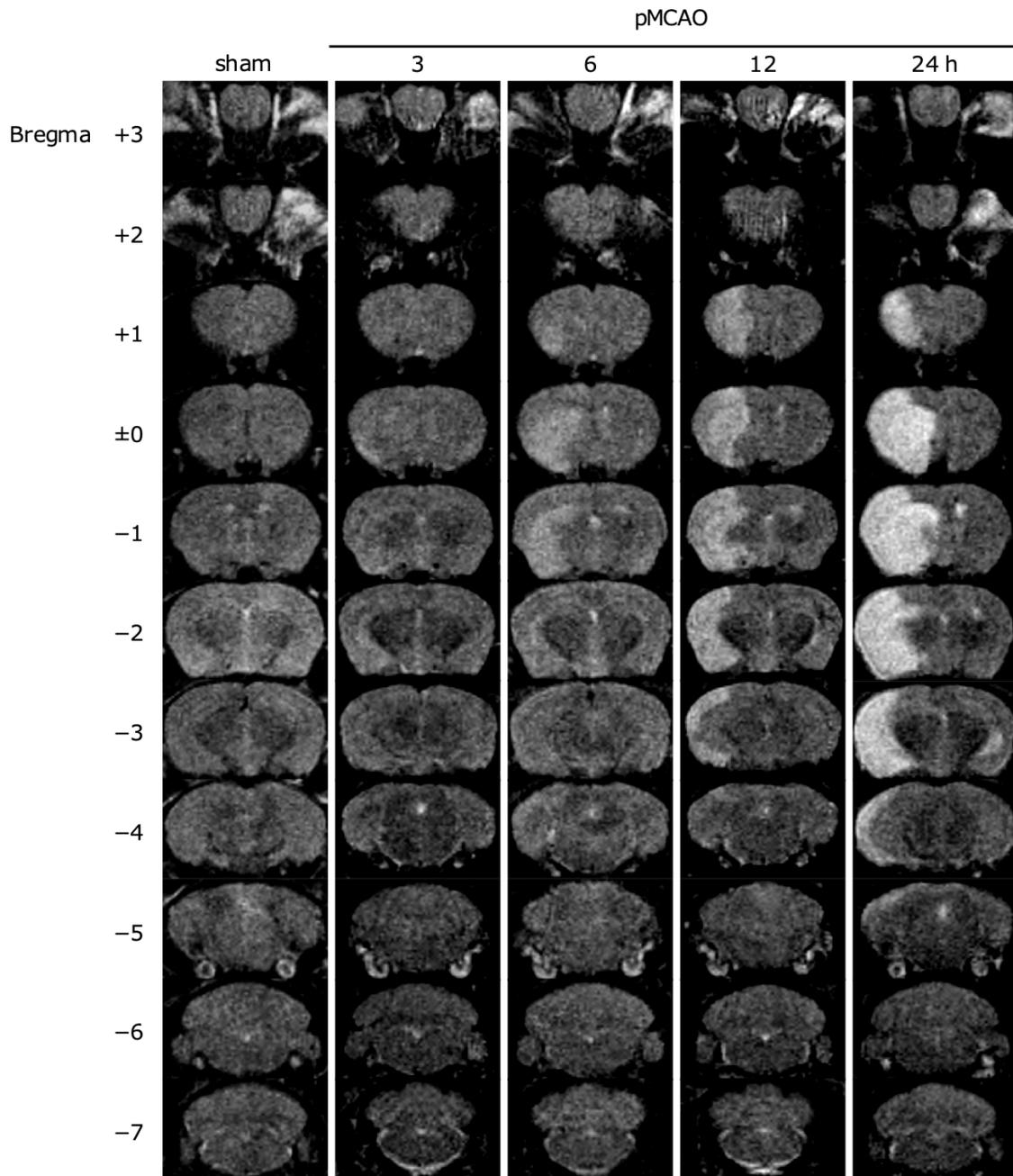


Fig. 20 T2強調画像 (T2WI) の撮像による血管原性浮腫および梗塞巣形成過程の観察

マウスに pMCAO または Sham operation を施し, 3, 6, 12, 24 時間後に T2WI を撮像した (冠状方向, 1 mm 間隔).

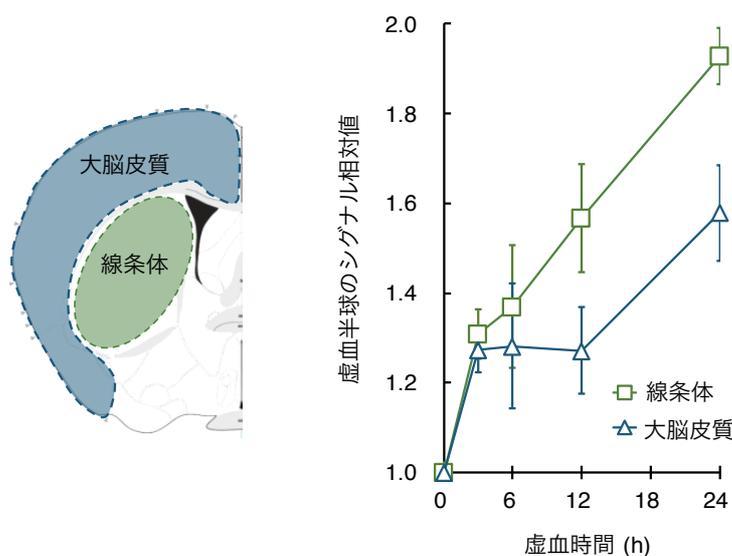


Fig. 21 pMCAO 後のマウス脳における T2WI シグナル強度の推移

マウスに Sham operation または pMCAO を施し、3、6、12、24 時間後に T1WI、T2WI、DWI のイメージングを行った。Bregma ± 0 mm の断面の画像を用いて ImageJ により線条体と大脳皮質のシグナル強度を数値化した。非虚血半球の数値を 1.0 として、虚血半球の各領域のシグナルを算出した。(A) シグナル強度を定量した脳領域。(B) T1WI のシグナル定量結果。(C) T2WI のシグナル定量結果。(D) DWI のシグナル定量結果。The values represent the mean S.E. n=3-4.

2.3.9 血管原性浮腫の新規評価法の確立

T2WI 撮像により水分量の多い脳領域を特定し血管原性浮腫を評価するという手法は、脳浮腫研究において一般的に用いられてきた。しかし実際は、血管原性浮腫の領域のみならず虚血壊死した領域にもプロトンは多く存在するため、T2WI は血管原性浮腫と梗塞巣の両方を描出する。したがって、従来の方法では正確な血管原性浮腫領域を特定できない。そこで本研究では、T2WI 撮像と TTC 染色とを併用する新規手法を提案し、血管原性浮腫のみの領域を可視化した (Fig. 22)。T2WI の高信号領域には血管原性浮腫と梗塞巣が含まれる。また、TTC 染色を行うと生細胞のみが赤く染色されるため死細胞塊である梗塞巣領域が特定できる。そのため、T2WI 撮像直後に TTC 染色を行い同一個体の T2WI と TTC 染色画像を重ね合わせ、T2WI の高信号領域と TTC 画像の未染色領域とを差し引くことで、血管原性浮腫のみの領域を特定した。

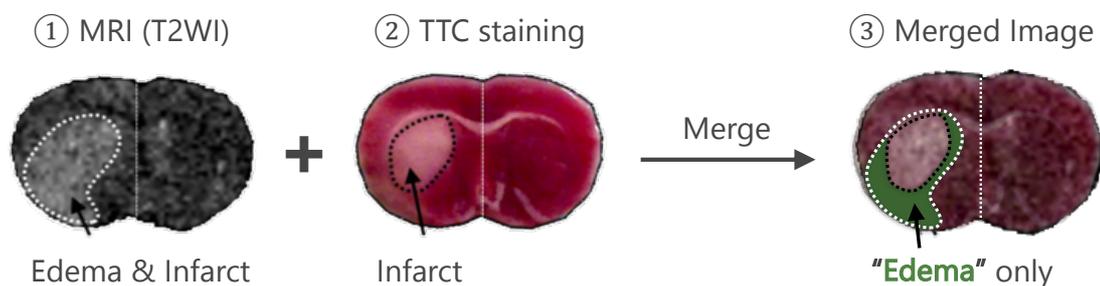


Fig. 22 新たに開発した血管原性浮腫領域の評価法

マウスに Sham operation または pMCAO を施し、3、6、12、24 時間後に T2WI を撮像した、直後に脳を摘出して TTC 染色を行った。同一個体の T2WI と TTC 染色画像を重ね合わせることで、血管原性浮腫のみの領域を同定した。

マウスへ pMCAO を施し、虚血 3、6、12、24 時間後に T2WI を撮像した。T2WI 撮像直後に TTC 染色を行い、同一個体の T2WI と TTC 染色画像を重ね合わせるにより、血管原性浮腫のみの領域を特定した (Fig. 23)。重ね合わせ画像を見ると、血管原性浮腫は虚血 6 時間後から虚血中心部において生じ、12 時間後には虚血中心部内を移動した。興味深いことに 24 時間後になると、浮腫領域は虚血中心部には留まらず虚血辺縁部へと進行していた。以上より、血管原性浮腫は虚血中心部において形成され、24 時間後には虚血辺縁部へと進行することが明らかになった。

さらに ImageJ により、① T2WI の高信号領域 (血管原性浮腫と梗塞巣)、② TTC 画像の未染色領域 (梗塞巣)、③ 重ね合わせ画像により特定した領域 (血管原性浮腫)、を ROI で囲み面積を定量した (Fig. 23)。① 血管原性浮腫と梗塞巣、② 梗塞巣の領域は経時的に面積が増大した。しかし、③ 血管原性浮腫の面積については、統計学的な有意差は認められなかった。

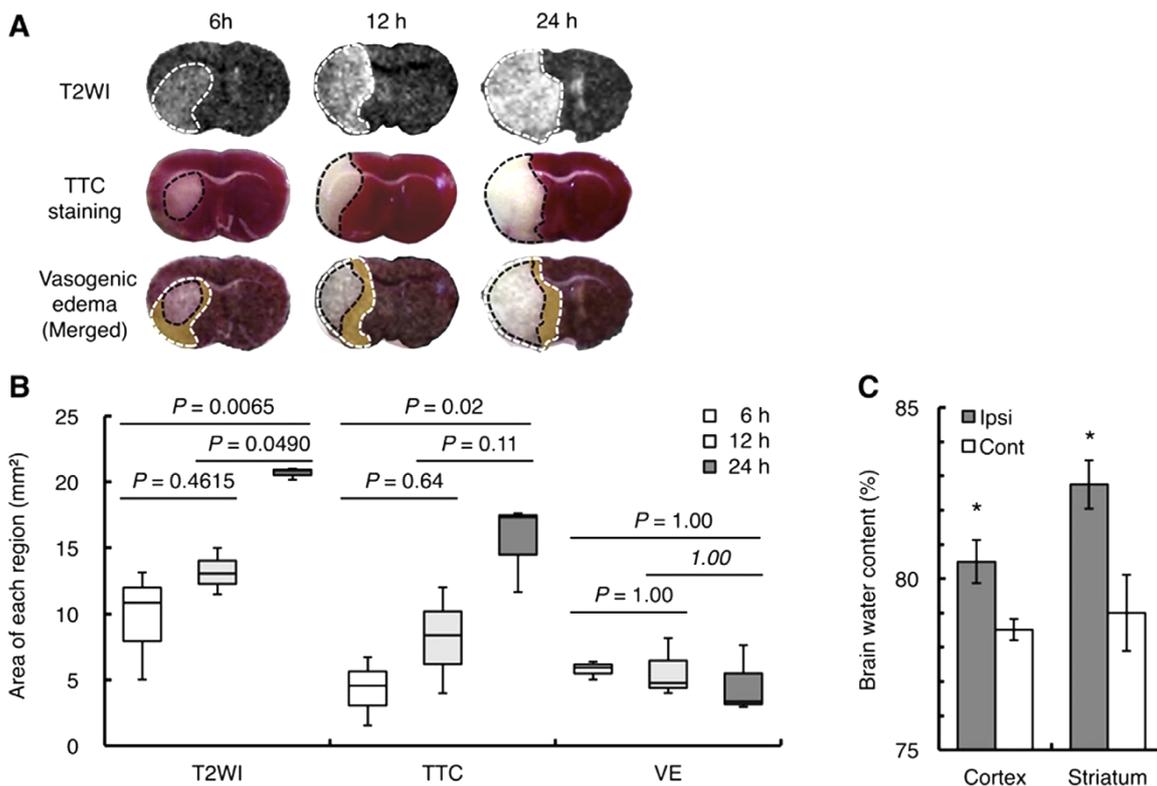


Fig. 23 pMCAO 後の血管原性浮腫の進行過程と各面積および脳水分量の算出

(A) pMCAO 後の血管原性浮腫の進行過程. (B) 重ね合わせ画像における各領域面積の定量結果. (C) 虚血 24 時間後の脳水分量. The values represent the mean S.E. $n=3$. The statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by the Bonferroni test.

2.4 考察

2.4.1 虚血中心部における細胞障害メカニズム

第2章では、脳虚血手術に用いる精密なナイロンフィラメントの作製と手術前後の脳血流量の測定により、安定的に虚血を誘導できる実験系を構築した。3HMPとMRIを用いてpMCAO前後の脳灌流領域を調べると、虚血を施した脳半球は、顕著に血流が低下する虚血中心部と血流低下が認められない虚血辺縁部とに分類された。さらに、従来法を改良した新規の血管原性浮腫評価法を確立したことにより、浮腫は中心部から生じ、時間経過とともに辺縁部へと進行することが示された。虚血持続下での細胞障害メカニズムに言及することは、本研究における知見の価値を理解するために重要である。ここでは、本研究成果を正しく解釈するための基盤となる既知の知見をもとに、その意義について概説する。

虚血中心部は顕著な血流低下が生じる領域であり、中大脳動脈(MCA)支配領域である線条体と大脳皮質の側頭部を含む。虚血中心部においては虚血3時間後から細胞障害性浮腫が生じ、6時間以後は梗塞巣(死細胞塊)が形成された。虚血24時間後の梗塞巣領域は虚血中心部とほぼ同一であり、その後は拡大が認められなかったことより、虚血中心部における細胞死は主に血流低下に端を発する現象であると推察される。

血流低下による細胞障害機序は以下の通りである。酸素とグルコースの欠乏によりATP産生量が低下し、 Na^+/K^+ -ATPaseが機能停止することでニューロンにおいて虚血性脱分極が生じる。この脱分極の発生は脳血流量に依存すると考えられており、 $\text{rCBF} < 10 \text{ mL}/100 \text{ g}/\text{min}$ の領域において直ちに脱分極が生じることがSymonらにより実証された(Symon, Branston and Chikovani, 1979)。細胞内への Na^+ 蓄積により Cl^- に対する電氣的勾配と H_2O に対する浸透圧勾配が生じ、 Na^+ が細胞内へと流入する(Young *et al.*, 1987)。 Na^+ の流入機構は他にもいくつか存在し、虚血性脱分極によりニューロンから放出されたグルタミン酸をアストロサイトが取り込むことで、アストロサイト内に水が流入する(Stokum, Kurland, *et al.*, 2015)、アストロサイトのエンドフィートに発現するAQP4チャネルの近傍に位置するKチャネルKir4.1が水の流入を促進する(Luo *et al.*, 2020)など種々の可能性が示唆されている。これらのいずれがアストロサイトへの Na^+ 蓄積の主要な機序であるかは不明だが、種々の経路を介して虚血から数分後以内に細胞障害性浮腫が形成されると考えられる。

2.4.2 浮腫液の供給源

脳浮腫液の供給源は病態形成に関する重要なファクターであるが、その流入経路については未だ不明点が多い。本項では、近年活発に議論されている経路である①血管系、②リンパティック系について考察する。

1つ目の仮説は、脳に灌流する血液を供給源とするものである。Starlingの原理 (Starling, 1896) にもとづき、脳実質内の動脈、静脈、毛細血管から水が流入するという考えが長らく支持されてきた (Simard *et al.*, 2007)。しかし近年、浮腫液の供給源は脳脊髄液 (cerebrospinal fluid; CSF) であるとし、脳室内とくも膜下腔に存在するリンパティック系 (glymphatic system) を介して浮腫液が脳実質に流入するという新規の仮説が提唱された。リンパティック系とは、末梢器官において老廃物排出や組織液吸収を行うリンパ系に相当する脳内の循環システムであり、2012年に二光子顕微鏡を用いたIliffらの研究により発見された (Iliff *et al.*, 2012, 2013)。“リンパティック”という言葉はリンパ系 (lymphatic system) とグリア細胞 (glial cell) とを組み合わせた造語であり、グリア細胞が血管周囲に形成したパイプ状構造を介して、動脈周囲腔から静脈周囲腔へCSFを循環させるという特徴に由来する (Fig. 24)。この仮説における浮腫液の供給源はCSFである。CSFは頭蓋内液の約10%を占めており、 Na^+ 濃度が高いという特徴を有する (Thrane, Rangroo Thrane and Nedergaard, 2014)。これまでCSFは浮腫液の供給源としては認識されていなかったが (Stokum, Gerzanich and Simard, 2016)、Mestreらは血管周囲空間 (perivascular space; PVS) がCSF流入経路になるという考えをもとに永久脳虚血モデルマウスを用いて脳浮腫液の供給源を検討した (Mestre *et al.*, 2020)。Mestreらは、永久虚血の15分前に静脈内または耳介内へ $^{22}\text{Na}^+$ を投与し、虚血半球の放射線量を測定することで $^{22}\text{Na}^+$ 蓄積量を算出した。この時、静脈内注射された $^{22}\text{Na}^+$ は血液からの流出を、耳介内投与された $^{22}\text{Na}^+$ はCSFからの流出を表している。非常に興味深いことに、静脈内投与時は $^{22}\text{Na}^+$ 蓄積量に変化がなかった一方で、耳介内投与時には虚血半球の $^{22}\text{Na}^+$ 蓄積量が有意に上昇しており、脳梗塞後の浮腫液はCSFが主な供給源である可能性が示された。

上記のうち、脳に灌流する血液を供給源とする仮説は脳出血または虚血-再灌流などの血流が保たれている状態下では妥当であり、主要な水源となる可能性がある。本研究においては、血流量が顕著に低下した線条体や大脳皮質側頭部といった虚血中心部において顕著に水分量が上昇した。上記知見を考慮すると、永久虚血下における脳浮腫液の供給源としてはリンパティック系を介したCSFの寄与が大きいと推察される。

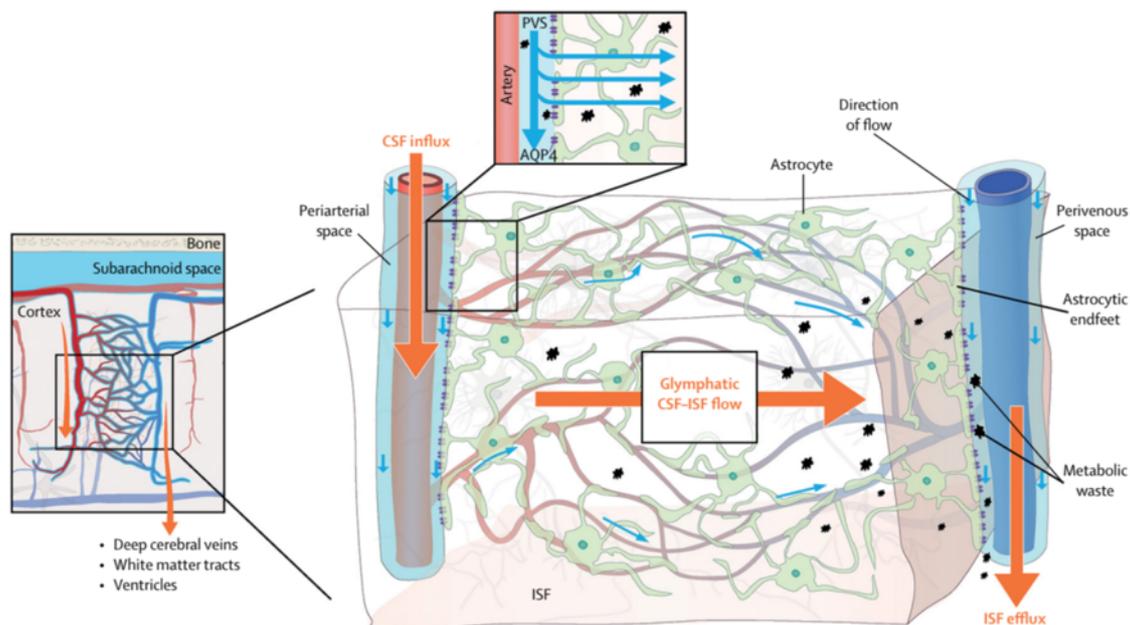


Fig. 24 グリンパティック経路

引用元：(Rasmussen, Mestre and Nedergaard, 2018)

グリンパティック経路は、動脈周囲腔，静脈周囲腔，およびその間の脳実質の3つの異なる解剖学的領域から構成される。AQP 4; aquaporin 4, CSF; cerebrospinal fluid, ISF; interstitial space fluid, PVS; perivascular space.

2. 4. 3 脳領域特異的な虚血障害の影響

本研究では、マウスへのpMCAO処置により永久虚血を誘導後にMRI撮像により浮腫を評価すると、虚血中心部である線条体と大脳皮質側頭部において顕著なシグナル上昇が認められた。この浮腫は、特に線条体において早期に生じた (Fig. 20)。また、乾湿重量測定法による脳水分量の算出、TTC染色による梗塞巣評価についても、線条体は大脳皮質よりも虚血障害度が大きい傾向が認められた。

このような脳領域ごとの虚血障害の差は、灰白質に対し白質の方がより浮腫に脆弱であることに起因すると考えられる。白質は繊維がより平行に配置されていること、白質では繊維状アストロサイトが存在するのに対し灰白質では原形質アストロサイトが多く存在すること (Sensenbrenner, Lucas and Deloulme, 1997) などの理由により、白質は灰白質と比べて液体の輸送能力が高いため浮腫に敏感である (Fenske *et al.*, 1973; Cserr *et al.*, 1981)。さら

に、浮腫形成に必要な役割を果たす水チャネル AQP4 の発現が白質と灰白質で異なることも影響しうる (Badaut *et al.*, 2014; Stokum, Mehta, *et al.*, 2015). Stokum らがラット脳梗塞モデル動物を用いて白質アストロサイトと灰白質である皮質のアストロサイトにおける AQP4 の発現と局在を解析したところ、白質アストロサイトでは血管周囲の AQP4 が増加し、AQP4 アイソフォームの存在量も 2.2-6.2 倍に上昇した。よって、白質は灰白質に対して AQP4 を介した水流入が生じやすいことが示唆される。線条体は、大脳基底核の構成する主要要素のうち最大の要素である。ヒトとサルでは、線条体は尾状核 (caudate nucleus) と被殻 (putamen) の2つの部分からなり、ヒトでは内包 (大脳新皮質や視床からの軸索線維の束であり白質) により尾状核と被殻が隔てられている。しかし、齧歯類では尾状核と被殻は区別なく存在し、線条体を貫通して大脳皮質と皮質下構造を結ぶ有髄線維は内包を形成することなく線条体全体に分布しており、線条体は白質を含む構造となっている。一方で大脳皮質は灰白質である。以上のことより、灰白質である大脳皮質よりも白質を含む線条体の方が浮腫に脆弱であるために、障害の程度が強いことが考えられる。

脳領域ごとの虚血障害の差を説明しうるほかの理由として、pMCAO により閉塞された血管の支配領域の差がある。マウスの脳血管支配領域を解析した Xiong らの研究によると、線条体への血液供給血管は ACA および MCA であり、大脳皮質への血液供給血管は ACA, MCA, PCA などである (Fig. 25)。本研究において用いた脳虚血モデルでは、MCA へのナイロンフィラメントの留置により血流を遮断した。マウス脳血管構造を見ると MCA の下流には ACA が存在しているため (Fig. 26)、MCA 閉塞により MCA と ACA の両支配下領域が虚血に陥る。一方で PCA の血流は保たれており、その結果、大脳皮質における虚血障害はより軽微であったと推察される。

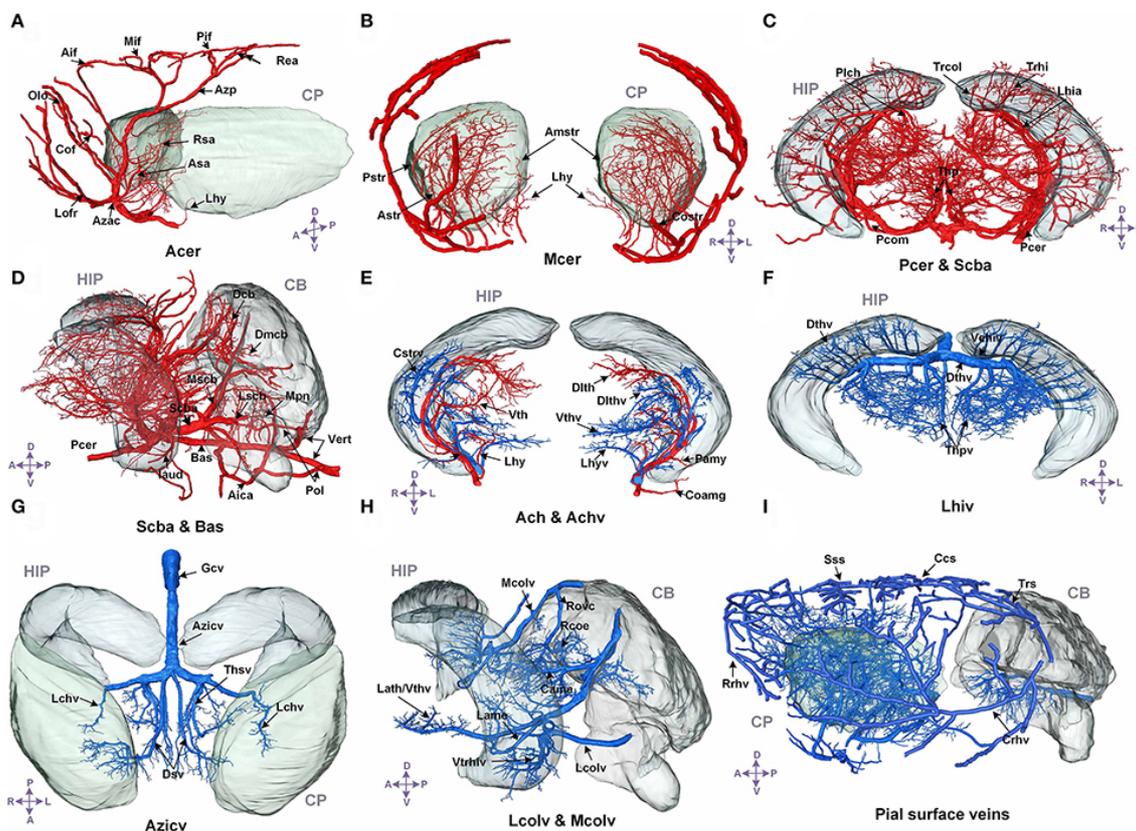


Fig. 25 マウス脳動脈および脳静脈の構造と分布

引用元：(Xiong et al., 2017)

動脈(赤)と静脈(青)の全脳血管系の構造と分布の3D画像。血管の名称はすべて黒、脳領域の名称は灰色で表示されている。

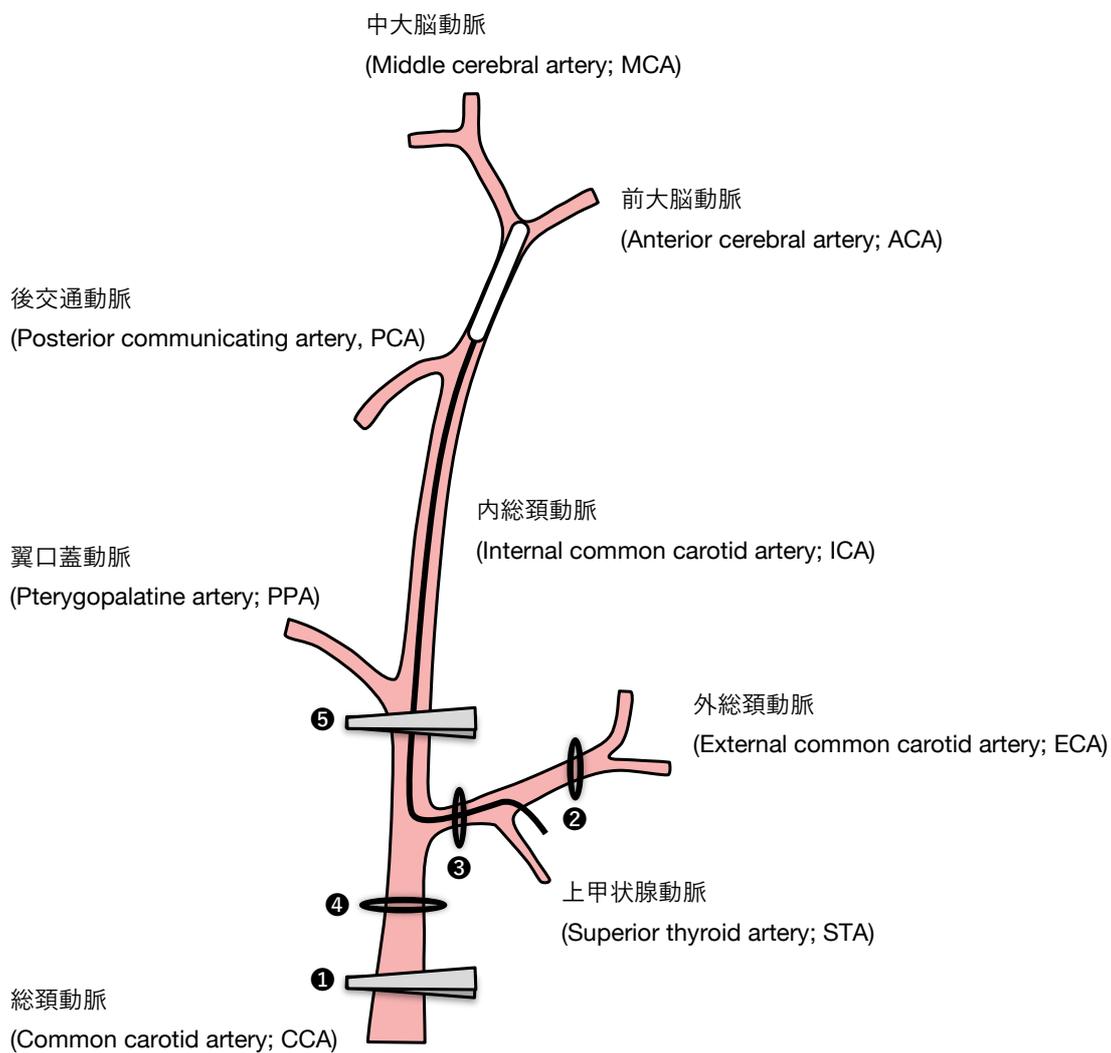


Fig. 26 マウス脳血管構造と pMCAO の手順

2.4.4 虚血マウス脳における脳水分量変化の意義

本研究において虚血 24 時間後のマウス線条体における脳水分量を測定した結果、非虚血半球では $79 \pm 0.6\%$ 、虚血半球では 82 ± 0.4 となり、約 3% の水分上昇が認められた。先行研究によると、生理的条件下でのマウス脳水分量は約 78.5%、脳虚血や外傷性能障害などの病態下では約 82.0% へと 3-4% 増加することが報告されており、本研究の結果と一致する。研究室間でのばらつきは約 $\pm 0.5\%$ である (Gröger *et al.*, 2005; Vakili, Kataoka and Plesnila, 2005; Keep, Hua and Xi, 2012)。これらの水分量の上昇は数値としてはわずかである。しかし、細部の膨らみは脳水分量とともに指数関数的に増加するものであり、脳水分量が 4% 増加すると脳体積が 25% 増加する (Fig. 27)。よって、わずかに脳水分量を減少させるだけでも、頭蓋内圧、正中線の移動、ひいては予後改善に非常に大きな影響を及ぼすと考えられる。

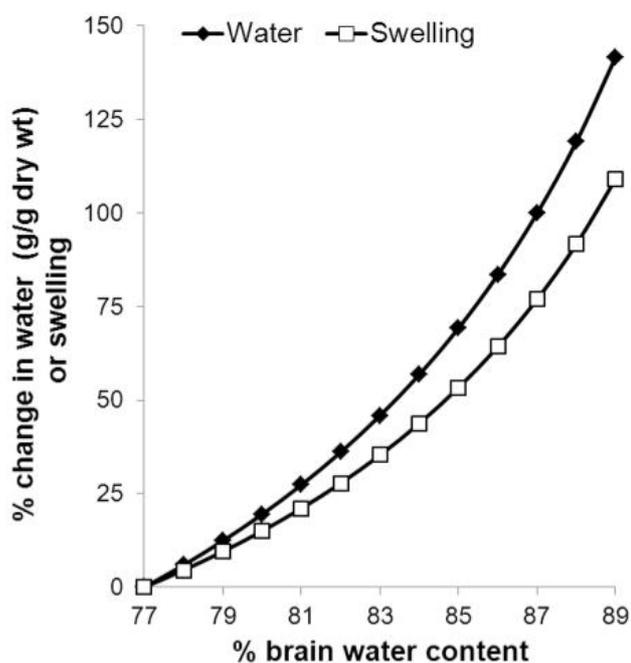


Fig. 27 脳水分量と脳体積の相関

引用元：(Keep, Hua and Xi, 2012)

第3章 血管原性浮腫の形成におけるミクログリアの役割の解明

3.1 緒言

第2章では、脳虚血手術に用いる精密なナイロンフィラメントの作製、および脳血流量の測定により、安定して虚血と脳浮腫を誘導できる実験系を確立した。また、新規の脳浮腫評価法により、浮腫形成過程を詳細に評価し、血管原性浮腫が虚血中心部から辺縁部へと進行することを明らかにした。第3章では、血管原性浮腫の形成におけるミクログリアの関与を調べるため、まず Iba1 と CD68 の二重免疫蛍光染色を行い、浮腫形成前後の各タイムポイントにおけるミクログリア活性状態を調べた。さらに、ミクログリア抑制剤ミノサイクリン (minocycline; MINO) の投与により、ミクログリア抑制による脳浮腫への影響を検討した。

3.2 材料と方法

3.2.1 実験動物と飼育環境

第2章と同一の方法により実施した。

3.2.2 ミノサイクリンの投与

ミノサイクリン塩酸塩 (minocycline; MINO) は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) より購入した。MINO を 5 mg/mL の濃度となるように生理食塩液に溶解し、1M NaOH により pH 7.0 に調製した。100 mg/kg MINO をマウスへ腹腔内投与し、1時間後に pMCAO に供した。

3.2.3 免疫染色用凍結組織切片の作製

摘出した脳組織を冷 PBS で洗浄し、4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (pH7.4; Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) で一晩浸漬固定した (4°C)。固定後の試料

を30%スクロース/PBSに48時間浸漬し、粉末状にドライアイスより凍結したのち Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて凍結包埋した。

クリオスタットで50 µm厚の凍結切片を作製し(庫内温度 -20°C, 試料台温度 -20°C), PBSを入れた48 well plate上に浮かべた。4% PFA (30min, RT)で処置した後, PBSで3回洗浄した。その後, 湿箱に入れて Blocking solution (10% Normal Goat Serum; Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, Missouri), 0.3% Triton-X in PBS)を加えて室温で1時間インキュベートした。抗体希釈液(1% BSA, 0.3% Triton-X in PBS)で Anti-Iba1 抗体(Rabbit pAb, 和光純薬), Anti-CD68 (rat mAb, Serotec/Bio-Rad) 抗体をそれぞれ400倍, 200倍に希釈し, 4°Cで一晩処理した。PBSで3回洗浄した後, 抗体希釈液でそれぞれ200倍に希釈した Anti-rabbit igG Alexa568 (Molecular Probes) Anti-Rat igG Alexa488 (Molecular Probes)で室温, 1時間処理した。PBSで洗浄した後, 切片をスライドガラスに貼り付け, カバーガラスを重ね, DAPI Fluoromout-Gで封入し, -20°Cで保存した。

3.2.4 Iba1/CD68 免疫蛍光染色画像を用いたミクログリア活性化状態の定量化

脳切片における Iba1/CD68 の発現様式をもとにミクログリア活性化状態を定量評価した。Zen Black (Zeiss) と ImageJ を用いて Table. 6 に示した3つの指標をもとに定量した。

Table. 6 ミクログリア活性状態の定量解析に用いた3つの指標

指標	解析方法
細胞数 (cells/mm ³)	Iba1 で染色された細胞体と DAPI で染色された核が重なる細胞数を計数し, 撮像した脳切片の厚み (20 µm) をかけて 1 mm ³ あたりの細胞数を算出した。
形態変化率 (%)	細胞体を ROI で囲み, [a] 細胞体だけの面積を数値化した。さらに [b] 染色画像中の Iba1 発現面積を取得した。[a] を [b] で割ることにより細胞体の割合を算出し, 形態変化率とした。
貪食活性率 (%)	[a] Iba1 と CD68 の共染色領域を ROI で囲み面積を定量した。さらに, [b] 染色画像中の Iba1 発現面積を取得した。[a] を [b] で割ることにより CD68 の割合を算出し, 貪食活性率とした。

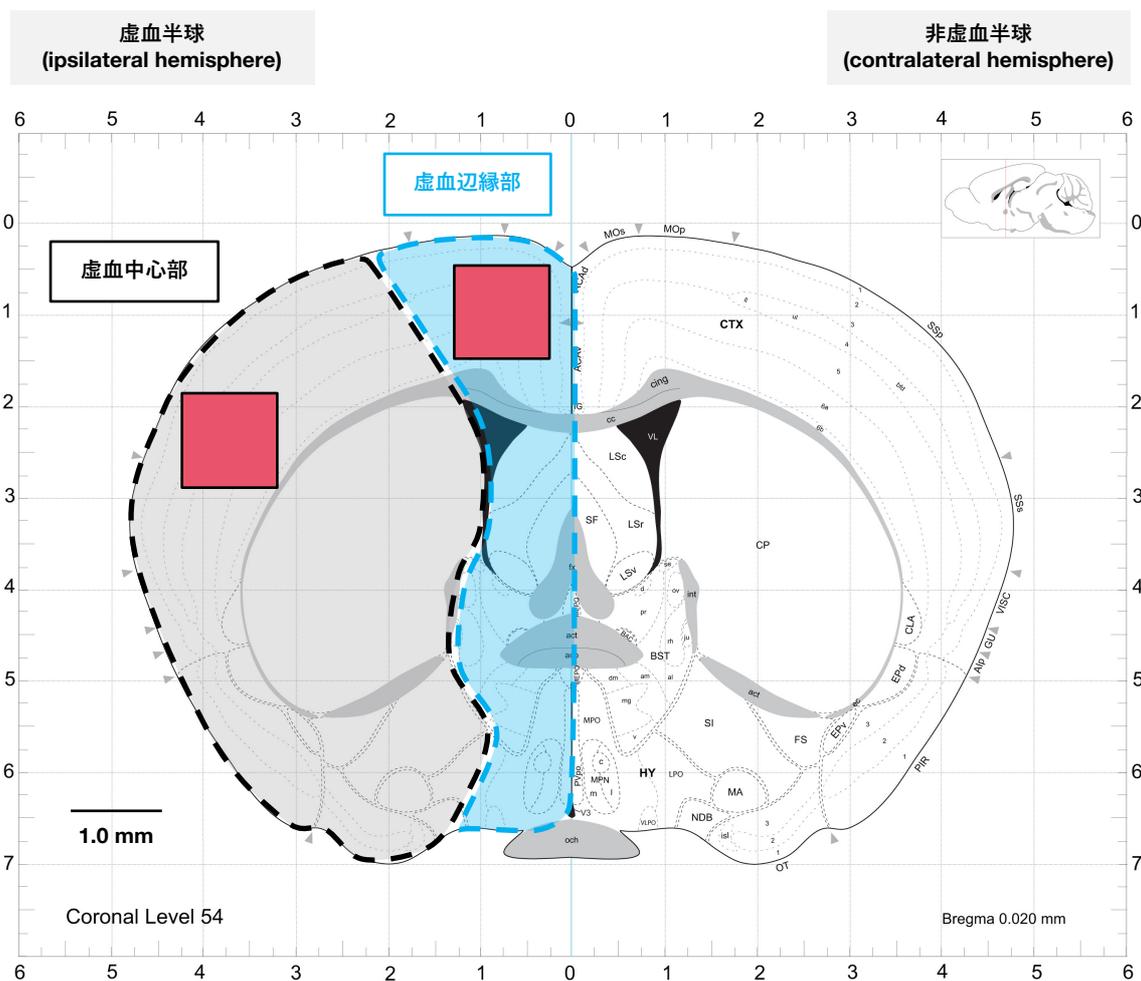


Fig. 28 Iba1/CD68 の二重免疫蛍光染色によるミクログリア活性状態の解析箇所

虚血 3, 6, 12, 24 時間後に脳を摘出し、クリオスタットを用いて 50 μm 厚の凍結脳切片を作製した。Iba1/CD68 の二重免疫蛍光染色を行い、Bregma ± 0.0 mm の切片にてミクログリアの活性状態を評価した (赤色の四角は解析箇所)。

3.2.5 マウス組織からの total RNA の抽出

マウス脳を摘出し、虚血半球と非虚血半球に分画した。各半球の線条体領域と大脳皮質領域を採取し、液体窒素で凍結させた。ダウンスホモジナイザーと High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて total RNA を抽出した。得られた total RNA 溶液の濃度は、NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) により測定した。また、1% アガロースゲル電気泳動により、28S および 18S

ribosomal RNA のバンドを可視化し、total RNA の純度を確認した。抽出された total RNA は定量的遺伝子発現解析に用いた。

3.2.6 Real-time PCR を用いた遺伝子発現解析

ReverTra Ace protocol (TOYOBO CO., LTD., Osaka, Japan) に従い、Random Primer (9-mer; Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて total RNA (1 μ g) から cDNA を合成した。SYBR Green Real-time PCR master mix (TOYOBO CO., LTD., Osaka, Japan) と CFX Conect Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) を使用して、Real-time PCR 法により対象遺伝子の発現量を評価した。各遺伝子の発現量はハウスキーピング遺伝子である β -actin を内在性コントロールとし、 Δ Ct法を用いて算出した。Real-time PCR に用いたプライマーは Table. 7 に示す。

Table. 7 Real-time PCR に使用したプライマー

Target	Forword primer	Reverse primer
Mouse β -actin	AGCCATGTACGTAGCCATCC	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA
Mouse TNF- α	ATGGCCTCCCTCTCATCAGT	CTTGGTGGTTTGCTACGACG
Mouse IL-1 β	AGCTTCCTTGTGCAAGTGTCT	GCAGCCCTTCATCTTTTGGG
Mouse IL-6	TCTCTGCAAGAGACTTCCATCC	TTGTGAAGTAGGGAAGGCCG
Mouse COX-2	AGCCAGGCAGCAAATCCTT	CAGTCCGGGTACAGTCACAC
Mouse Claudin5	GTTAAGGCACGGGTAGCACT	TACTTCTGTGACACCGGCAC
Mouse Occludin	TTGAACTGTGGATTGGCAGC	CAAGATAAGCGAACCTTGGCG
Mouse Tjpl	CCTTACTCACCACAAGCGCA	AGATGAGGCTTCTGCTTTCTGT
Mouse Cadherin-5	CCTGAGGCAATCAACTGTGC	GGAGGAGCTGATCTTGTCCG

3.2.7 マウス脳微小血管内皮細胞 bEnd.3 の立ち上げと培養

マウス脳微小血管内皮細胞株 bEnd.3 (ATCC, CRL-2299) は福岡大学 片岡泰文先生より分与いただいた。立ち上げにあたり、DMEM を 37°C に温めて 50 mL Falcon チューブ中に分取した。凍結保存されていた bEnd.3 細胞を 37°C の湯煎にかけてとかし、溶解した bEnd.3 細胞溶液を DMEM 培地中に混合した。900 rpm で 3 分間遠心分離し、アスピレーターで上清を除いた。新たに DMEM 培地を 10 mL 加え、ピペットマンで静かに懸濁した。10 cm Dish に播種しインキュベーター (37°C, 5% CO₂/95% air) で培養した。培地交換は 3 日ごとに行った。

継代培養の際には、DMEM 培地、1×PBS、Trypsin-EDTA 溶液を 37°C に温めた。アスピレーターで 10 cm Dish 中の培地を除き、5 mL 1×PBS を加えて洗浄した。2 mL Trypsin-EDTA を処置し、インキュベーターに 1 分間静置したのち、細胞が Dish から剥がれていることを顕微鏡で確認した。8 mL の培地を加え、Dish 全体を満遍なくピペッティングしたのち、溶液を 50 mL Falcon チューブに回収した。900 rpm で 3 分間遠心分離し、アスピレーターで上清を除いた。チューブに培地を加えてピペッティングし、Dish に再び播種してインキュベーターで培養した。

3.2.8 bEnd.3 の細胞数カウント

bEnd.3 細胞を 1×10^5 cells/well で 12 well plate に播種した。播種後の各タイムポイントにおいて 5 µg/mL Hoechst 33342 を処置し、蛍光顕微鏡 (Keyence, BZ-9000) により生細胞を計数した。

3.2.9 統計解析

データは全て平均値 ± 標準誤差 (S.E.) で示した。統計学的解析のために、Windows 版 Excel 統計 (Social Survey Research Information, Tokyo, Japan) を用いた。統計学的有意差は、P 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判定した。

3.3 実験結果

3.3.1 虚血中心部および虚血辺縁部におけるミクログリア活性状態の観察

第2章では、安定して虚血を誘導できる pMCAO 法を確立した。pMCAO により生じる梗塞巣や脳浮腫を評価し、血管原性浮腫が虚血中心部から辺縁部へと進行することを明らかにした。第3章では、血管原性浮腫の形成におけるミクログリアの関与を調べるため、まず Iba1 と CD68 の二重免疫蛍光染色を行い、浮腫形成前後の各タイムポイントにおけるミクログリア活性状態を調べた。

ミクログリアは静止 (非活性) 状態と活性状態があり、顕著に形態が異なる)。Iba1 はミクログリアに発現するタンパク質であり、静止および活性状態のどちらにおいても発現が認められるため、ミクログリアの形態観察に用いられる。非活性状態のミクログリアは突起をもつラミファイド型として存在し、活性化状態に近づくにつれ徐々に突起を退縮させ、細胞体を肥大化させたアメーバ型となる。CD68 は貪食に関わるスカベンジャー受容体であり、非活性状態ではほとんど発現しないが活性状態で高発現する (Kettenmann et al. 2011)。以上より、Iba1 の染色はミクログリアの形態、CD68 の染色は貪食能力の指標として活性状態を評価した。Iba1/CD68 共染色画像の撮像箇所は Fig. 28 に示した通りである。

① 虚血中心部、② 虚血辺縁部 の各領域において Iba1/CD68 染色画像を取得した (Fig. 29)。虚血中心部においてミクログリアは、虚血3時間後に細胞体を肥大化、および CD68 を高発現させており、顕著な活性化を呈した。6時間以降は細胞体の崩壊が認められ、細胞死が生じていることが示唆された。虚血辺縁部においては、6時間後まではラミファイド型の形態を示すとともに CD68 の発現は認められず、活性化は認められなかった。12時間以降は、細胞体の肥大化や突起の退縮が認められ、CD68 が発現上昇した。よって、虚血中心部においては虚血3時間後から、虚血辺縁部においては12時間後からミクログリアの活性化が引き起こされることが示唆された。

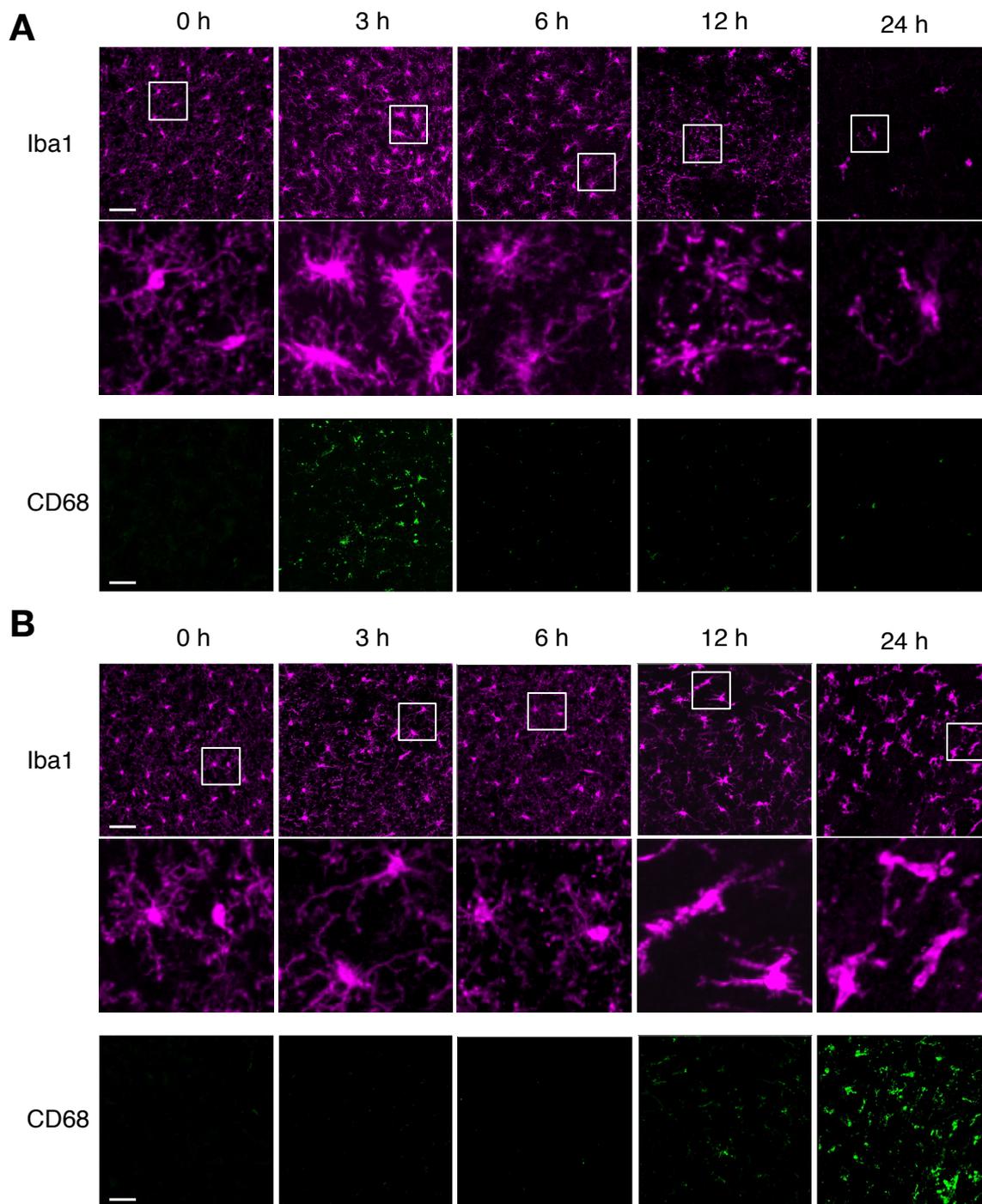


Fig. 29 Iba1/CD68 蛍光染色による虚血領域／周辺領域のミクログリア活性状態の観察

マウスに Sham operation または pMCAO を施し、3、6、12、24 時間後に屠殺した。脳を摘出してクリオスタットにて 50 μ m 厚さの脳スライスを作製し、Iba1/CD68 の免疫蛍光染色により虚血領域と周辺領域それぞれのミクログリア活性状態を観察した。(A) 虚血領域における代表的な染色画像と、(B) 周辺領域における代表的な染色画像。Bar=50 μ m.

3.3.2 Iba1/CD68 染色画像をもとにしたミクログリア活性状態の定量解析

顕著なミクログリア活性化が認められた虚血3, 24時間後の活性状態を ImageJ により定量化した (Fig. 30). 定量解析にあたっては Table. 6 に示した3つの指標を用いた.

ミクログリア細胞数は24時間後に虚血中心部のみで有意に減少した (虚血中心部-0h: $18,571 \pm 2,457 \text{ mm}^3$, 虚血中心部-3h: $20,000 \pm 13,878 \text{ mm}^3$, 虚血中心部-24h: $3,401 \pm 1,381 \text{ mm}^3$, 虚血辺縁部-0h: $18,639 \pm 2,984 \text{ mm}^3$, 虚血辺縁部-3h: $13,878 \pm 623 \text{ mm}^3$, 虚血辺縁部-24h: $14,338 \pm 1,427 \text{ mm}^3$). このときの Iba1 染色画像を見ると, ミクログリアは細胞体を崩壊させた異常な形態を示していることから, 死細胞へと変化したことにより細胞数が減少したと考えられる. 形態変化率は3時間後に虚血中心部で, 24時間後に虚血辺縁部で値が上昇した (虚血中心部-0h: $15.6 \pm 1.1 \%$, 虚血中心部-3h: $26.2 \pm 2.5 \%$, 虚血中心部-24h: $17.0 \pm 1.7 \%$, 虚血辺縁部-0h: $17.4 \pm 1.6 \%$, 虚血辺縁部-3h: $17.6 \pm 1.5 \%$, 虚血辺縁部-24h: $31.4 \pm 2.5 \%$). また, 貪食活性率についても同様の結果が得られた (虚血中心部-0h: $7.1 \pm 1.3 \%$, 虚血中心部-3h: $12.7 \pm 0.8 \%$, 虚血中心部-24h: $4.3 \pm 3.0 \%$, 虚血辺縁部-0h: $9.2 \pm 1.5 \%$, 虚血辺縁部-3h: $7.9 \pm 0.6 \%$, 虚血辺縁部-24h: $16.6 \pm 1.7 \%$). よって, Iba1/CD68 染色画像の観察結果と同様に定量解析によっても, 虚血中心部においては3時間後, 虚血辺縁部においては24時間後にミクログリアは活性化していることが示された.

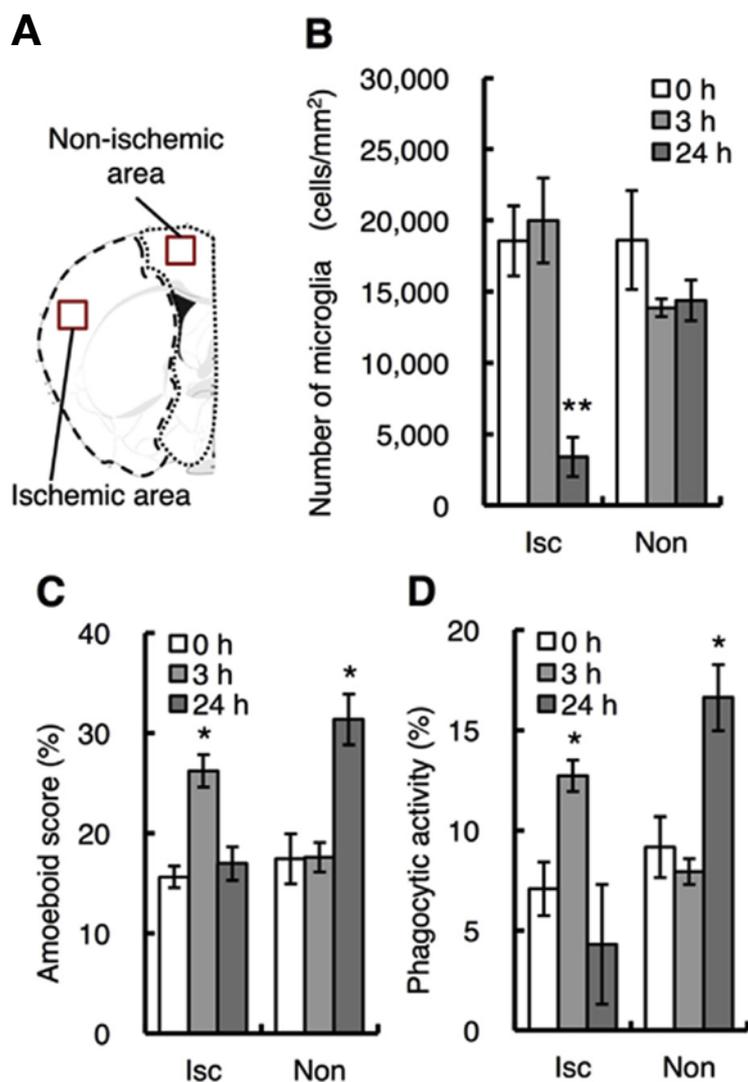


Fig. 30 Iba1/CD68 画像をもとにしたミクログリア活性状態の定量化

虚血中心部および虚血辺縁部における Iba1/CD68 の免疫蛍光染色画像をもとに、ImageJ を用いてミクログリア活性状態を定量解析した。(A) 解析箇所, (B) 細胞数, (C) 形態変化率, (D) 貪食活性率. The values represent the mean S.E. (n=4). The statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by the Bonferroni test *P < 0.05, **P < 0.01 vs. contralateral values.

3.3.3 ミクログリア活性と血管原性浮腫の形成および進行過程との関連

浮腫形成過程におけるミクログリアの関与を検討するため、T2WIとTTC染色画像の重ね合わせにより明らかにした血管原性浮腫の形成過程と、Iba1/CD68により調べたミクログリア活性状態の変化とを併せて検討した。

まず、ミクログリア活性状態について時空間的に考察する。pMCAO3時間後、虚血中心部のミクログリアが活性化状態となり、6時間後には虚血中心部のミクログリアが死細胞へと変化しはじめた。12時間後になると、それまで変化が認められなかった虚血辺縁部においてミクログリアが活性化の様相を呈し、24時間後には顕著に活性化している様子が認められた。以上の結果より、ミクログリアは虚血中心部に端を発して活性化をはじめ、時間経過とともに辺縁部へと活性化が広がると考えられる。

次に、血管原性浮腫の形成過程について考察する。浮腫は6時間後から虚血中心部において生じ、12時間後も虚血中心部内にとどまっていた。しかし24時間後になると浮腫は虚血辺縁部へと進行した。これらの結果を統合して考察すると、活性化ミクログリアが認められた領域では、数時間後に血管原性浮腫が生じており、ミクログリアの活性化の広がりによって引き続いて血管原性浮腫も虚血辺縁部へと広がるという経過が明らかになった。

3.3.4 虚血辺縁部における神経炎症状態の解析

虚血部位でのミクログリア活性化は、一般的に虚血により障害を受けた細胞によるダメージ関連分子パターン (damage-associated molecular patterns; DAMPs) の作用と説明できる。活性化したミクログリアは、TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカインを放出する。これら炎症性サイトカインは、細胞間のタイトジャンクションを構成するタンパク質であるクローデインやオクルーデイン、ZO-1 の発現を低下させることが知られている。血管内皮細胞でタイトジャンクションの機能が低下する結果、血液脳関門がルーズとなり血漿が脳実質に流出する。一方、本研究では虚血辺縁部でもミクログリア活性化と血管原性浮腫が生じていることが明らかとなった。そこで、虚血辺縁部におけるサイトカイン量について評価し、脳浮腫の原因を考察した。

マウスへ pMCAO を施し、6 時間後に虚血辺縁部-大脳皮質を採取し、Total RNA を抽出した。なお、採取した領域は Fig. 22 に示した。Real-time PCR によりハウスキーピング遺伝子である β -actin を基準として炎症関連因子の発現を解析したところ、血管原性浮腫が生

じる前に虚血辺縁部では、炎症性サイトカインである TNF- α とプロスタグランジンの代謝酵素である COX-2 の発現が有意に上昇した (Fig. 31).

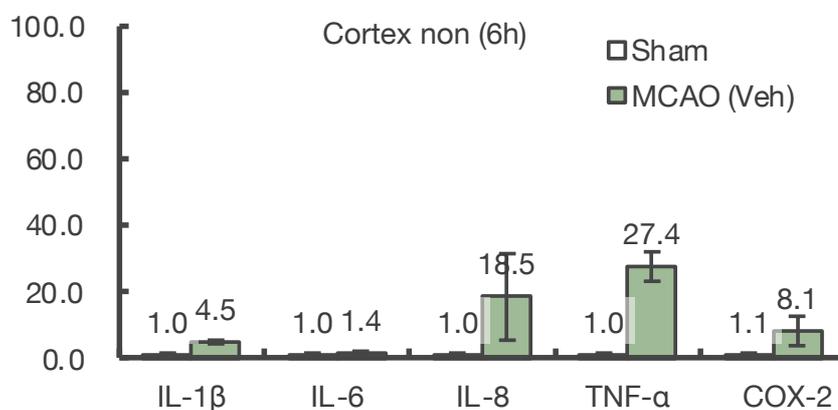


Fig. 31 虚血辺縁部における炎症関連因子の発現量

マウスに Sham operation または pMCAO を施し、3、6 時間後に屠殺した。脳を摘出して虚血辺縁部-大脳皮質を採取し、total RNA 抽出後に cDNA を合成した。Real-time PCR によりハウスキーピング遺伝子である β -actin を基準として炎症関連因子の発現を解析した。

3.3.5 マウス脳微小血管内皮細胞株 bEnd.3 の培養条件の確立

血液脳関門を形成する脳血管内皮細胞のモデルとしてマウス脳微小血管内皮細胞株 bEnd.3 を使用した。まずはタイトジャンクションタンパク質を発現する培養条件を検討した。bEnd.3 を 1×10^5 cells/well の濃度で 12 well plate に播種し、1、2、3、5、7、9、13 日後に明視野顕微鏡により細胞の形態を観察した (Fig. 32)。播種直後から 3 日後までは bEnd.3 は球状に近い形態を呈したが、5 日後から細胞が扁平状に進展した。

さらに、bEnd.3 播種後の TJPs および AJPs 発現量の推移を調べた。上述した培養法と同一の条件で bEnd.3 を播種し、1、3、5、7 日後に TJPs (Claudin-5, Occludin, ZO-1) と AJPs (Cadherin-5) の発現を解析した (Fig. 33)。TJPs、AJPs とともに播種 5 日以降に安定して発現していた。よって以後は、播種 5 日以降の bEnd.3 を実験に用いた。

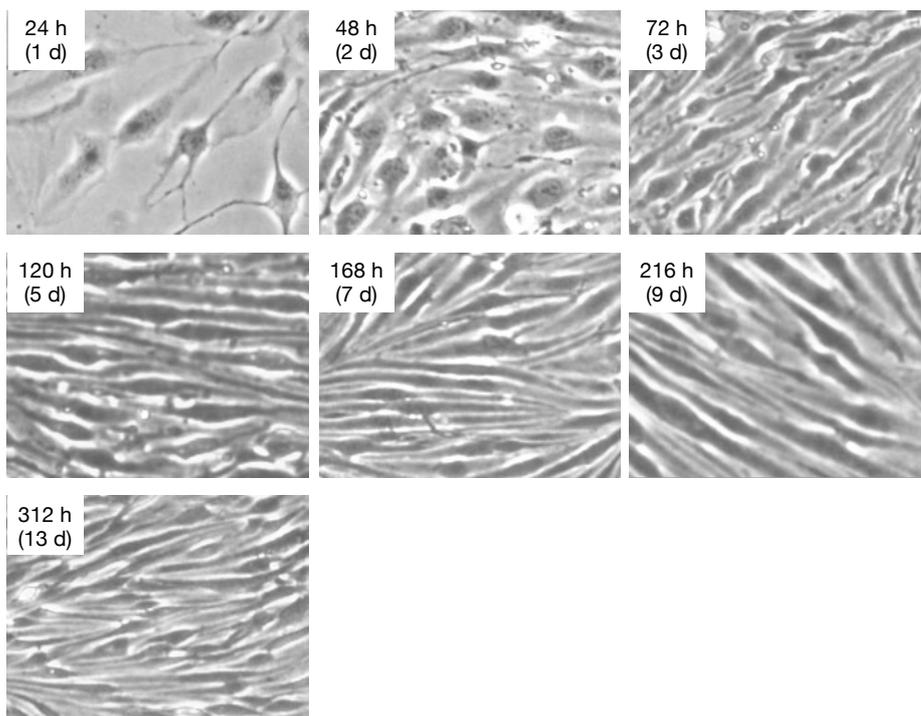


Fig. 32 bEnd.3 播種後の形態変化の観察

マウス脳微小血管内皮細胞株 bEnd.3 を 1×10^5 cells/well の濃度で 12 well plate に播種した。播種 1, 2, 3, 5, 7, 9, 13 日後に明視野顕微鏡 (Nikon, TS100) により細胞の形態を観察した。

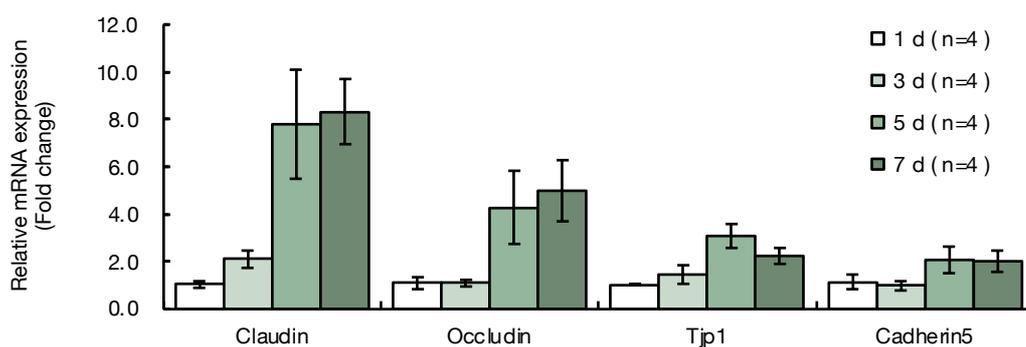


Fig. 33 bEnd.3 播種後の TJPs の mRNA 発現解析

マウス脳微小血管内皮細胞株 bEnd.3 を 1×10^5 cells/well の濃度で 12 well plate に播種した。播種 1, 3, 5, 7 日後に High Pure RNA Isolation Kit (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland, Catalog No. 11828665001) により total RNA を抽出した。ハウスキーピング遺伝子である β -actin の発現量を基準として、対象遺伝子の発現量を解析した。

3.3.6 TNF- α および IL-6 処置による bEnd.3 への影響

TNF- α および IL-6 処置により炎症性サイトカインが bEnd.3 へ与える影響を調べた。上述した培養法と同一の条件で bEnd.3 を播種し、bEnd.3 を 10 ng/mL および 100 ng/mL IL-6 と TNF- α で処置した。処置 6, 24 時間後に TJPs (Claudin-5, Occludin, ZO-1) の免疫蛍光染色により TJPs の発現状況を調べた (Fig. 34)。TNF- α 処置により Claudin-5 と ZO-1 の発現が消失しており、bEnd.3 のバリア機能が破綻している可能性が示唆された。一方で、IL-6 処置はタイトジャンクションタンパク質の発現に影響しなかった。

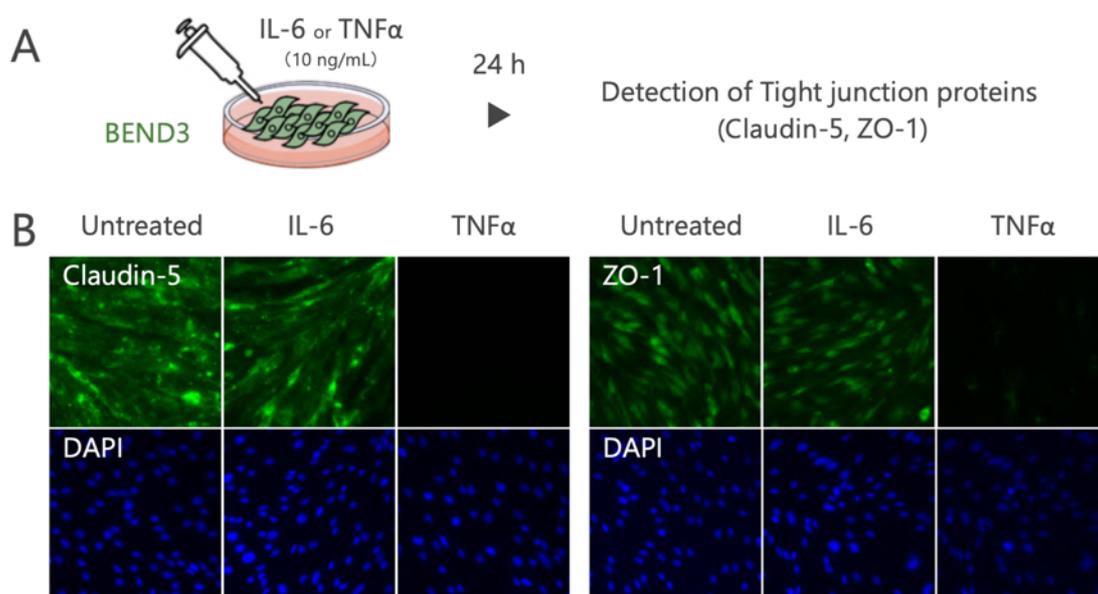


Fig. 34 TNF- α および IL-6 処置による内皮細胞 TJPs への影響

(A) マウス脳微小血管内皮細胞株 bEnd.3 を 1×10^5 cells/well の濃度で 12 well plate に播種し、播種 5 日後に IL-6 と TNF- α を 100 ng/mL の濃度で処置した。(B) 処置 6, 24 時間後に TJPs (Claudin-5, ZO-1) の免疫蛍光染色を行い、TJPs の発現状況を調べた。

3.3.7 ミノサイクリン投与によるミクログリア活性状態への影響

これまでの結果より虚血辺縁部においては、活性化ミクログリアが産生する TNF- α により内皮細胞のバリア機能が破綻することで血管原性浮腫が生じることが示唆された。そこ

で、ミクログリア活性化抑制剤ミノサイクリン投与により神経炎症を抑制し、浮腫が軽減されるかを検証した。

ミノサイクリン (MINO) 1972年に合成されたテトラサイクリン系の抗生物質であり、ニキビ治療や感染症への適用が認められている薬剤である。その作用機序は、30Sリボソームサブユニットに結合してタンパク質合成を阻害することである。テトラサイクリン系抗菌薬は、細胞外膜の親水性孔からの受動的拡散と、細胞質内膜からのエネルギー依存的な能動的輸送という二段階のプロセスを経て、最近のリボソームに到達する。細胞内に入ると、テトラサイクリンは、30Sリボソームサブユニットに結合し、aminoacyl t-RNAがm-RNA/リボソーム複合体のアクセプターサイトに結合するのを妨げ、蛋白合成を阻止することにより抗菌作用を発揮する (Klein and Cunha, 1995)。

このような抗生物質であるMINOのミクログリア活性化抑制メカニズムに関しては不明な点が多い。初代培養ミクログリアへN-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) を処置すると、ミクログリア活性化マーカーCD11b/cの陽性細胞数や炎症性サイトカインIL-1 β 産生量が増加するなど、顕著なミクログリア活性化が認められるが、MINO処置によりこれらの増加は抑制される (T.M. Tikka et al. 2001)。また、外傷性脳障害の誘導によりミクログリアを活性化させたマウスにMINOを処置すると、ミクログリア活性化マーカーIba1陽性細胞数が減少する。加えて、エンドカンナビノイド受容体であるCB1RやCB2Rのアンタゴニスト投与により、このMINOによるミクログリアの活性抑制効果は失われる (A.B. Lopez-Rodriguez et al. 2015)。以上のように、MINOのミクログリアへの作用機序に関しては議論があるが、顕著なミクログリア活性化抑制作用をもつためMINOはミクログリア活性化抑制剤として頻用されている。

マウスへ100 mg/kg MINOを腹腔内投与し、1時間後にpMCAOを施した。虚血から3および24時間後にIba1/CD68免疫蛍光染色を行った (Fig. 35)。ミクログリア活性化の解析は、顕著なミクログリア活性化が認められた、①3時間後の虚血中心部と②24時間後の虚血辺縁部において行った。①3時間後の虚血中心部において、Vehicle投与群 (Veh) のミクログリアは細胞体を膨大させ突起を退縮させたアメーバ様の形態を呈し、CD68を高発現させていることから活性化状態であることがわかる。MINO投与群のミクログリアも同様の形態を示し、CD68を高発現させていた。よって、虚血中心部のミクログリア活性化はMINO投与によっては抑制されなかった。②24時間後の虚血辺縁部において、Veh投与群のミクログリアはアメーバ型の形態を示し、CD68を発現させた活性化状態であった。

しかし、MINO 投与群のミクログリアはラミファイド型の形態を呈し、CD68 の発現もほとんど認められなかった。よって、虚血辺縁部のミクログリア活性化は MINO 投与により抑制されることが明らかになった。

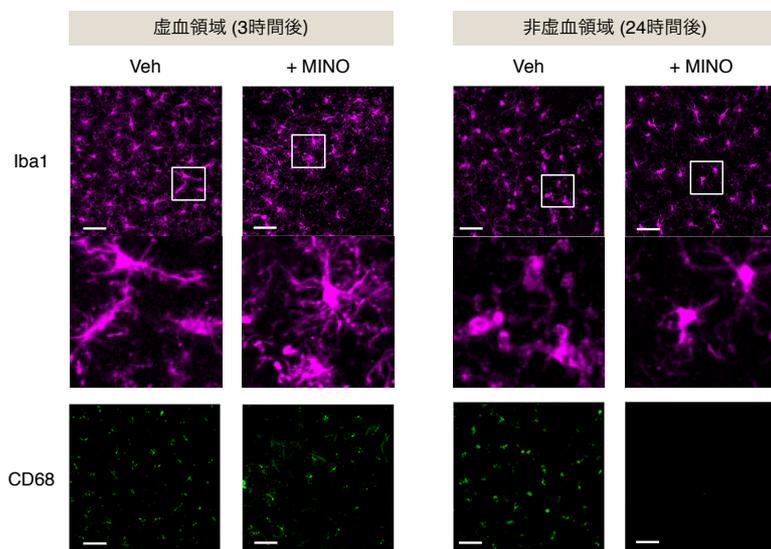


Fig. 35 ミノサイクリン投与マウスにおけるミクログリア活性状態の観察

マウスに 100 mg/kg ミノサイクリン (MINO) を腹腔内投与し、1 時間後に pMCAO を施した。虚血 3、24 時間後に屠殺して脳を摘出し、クリオスタットにて 50 μ m 厚さの脳スライスを作製した。Iba1/CD68 の免疫蛍光染色により虚血領域と周辺領域それぞれのミクログリア活性状態を観察した。Bar=50 μ m.

3.3.8 ミノサイクリン投与後の脳水分量の変化

MINO 投与により、虚血 24 時間後の虚血辺縁部におけるミクログリア活性化が抑制された。次に、MINO 投与によるミクログリア活性化抑制が脳水分量へ影響を与えるかを検討した。マウスへ 100 mg/kg MINO を腹腔内投与し、1 時間後に pMCAO を施した。虚血 24 時間後に脳を摘出して虚血半球と非虚血半球に分画し、脳の乾湿重量測定により、虚血半球側の線条体と大脳皮質の水分量を測定した (Fig. 36)。線条体に注目すると、Veh 群および MINO 投与群ともに非虚血側での脳水分量に変化はなかった。虚血半球の線条体では Veh 群で顕著な脳水分量の増加が認められたが、MINO 群では虚血後の脳水分量増加が有

意に抑制された。大脳皮質に着目すると、Veh群およびMINO投与群ともに非虚血側での脳水分量に変化はなかった。虚血半球の大脳皮質ではVeh群においてわずかに脳水分量の増加が認められたが、MINO投与によりこの増加は抑制されなかった。

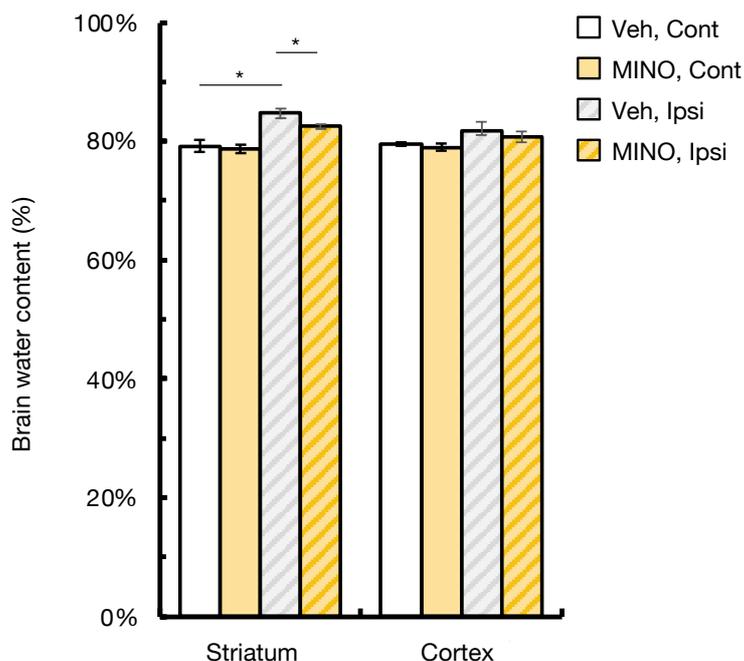


Fig. 36 ミノサイクリン投与マウスにおける pMCAO 24 時間後の脳水分量の測定

マウスに 100 mg/kg ミノサイクリン (MINO) を腹腔内投与し、1 時間後に pMCAO を施した。虚血 24 時間後に屠殺して脳を摘出し、脳を摘出して虚血半球と非虚血半球に分画した。それぞれの線条体領域と大脳皮質領域を採取し、乾湿重量の比較により脳水分量を算出した。The values represent the mean S.E. (n=3-6). The data were analyzed using Student's t-test.

*P < .05 vs. Veh 非虚血側 values, #P < .05 vs. Veh 虚血側 values.

3.3.9 ミノサイクリン投与による血管原性浮腫の形成および進行過程への影響

MINO 投与による血管原性浮腫の形成または進行への影響を調べた。マウスへ 100 mg/kg MINO を腹腔内投与し、1 時間後に pMCAO を施した。虚血 24 時間後に T2WI の撮像および TTC 染色を行い、これらの画像を重ね合わせて血管原性浮腫の領域を同定した。重ね合

わせ画像をみると、Veh 投与群と同様に MINO 投与群でも血管原性浮腫が生じていた (Fig. 37-A)。しかし注目すべきことに、MINO 群の浮腫は虚血中心部内に留まり、辺縁部への進行が抑制されていた。

さらに、ImageJ を用いて T2WI 高信号領域、梗塞巣領域、血管原性浮腫領域の各面積を ROI で囲むことで定量化した (Fig. 37-B)。T2WI 高信号領域と梗塞巣領域は MINO 投与により有意に減少したが、血管原性浮腫領域は変化がなかった (T2WI Veh 群： $20.7 \pm 0.3 \text{ mm}^2$ ，T2WI MINO 群： $12.6 \pm 0.6 \text{ mm}^2$ ，TTC Veh 群： $15.5 \pm 1.9 \text{ mm}^2$ ，TTC MINO 群： $9.3 \pm 1.2 \text{ mm}^2$ ，重ね合わせ Veh 群： $4.6 \pm 1.5 \text{ mm}^2$ ，重ね合わせ MINO 群： $3.3 \pm 0.5 \text{ mm}^2$)。

以上の結果より、MINO を投与しても虚血領域におけるミクログリアの活性化は抑制されず浮腫が発生するが、非虚血領域におけるミクログリア活性化は顕著に抑制され、虚血領域から非虚血領域への浮腫の広がりが抑制されることが明らかになった。

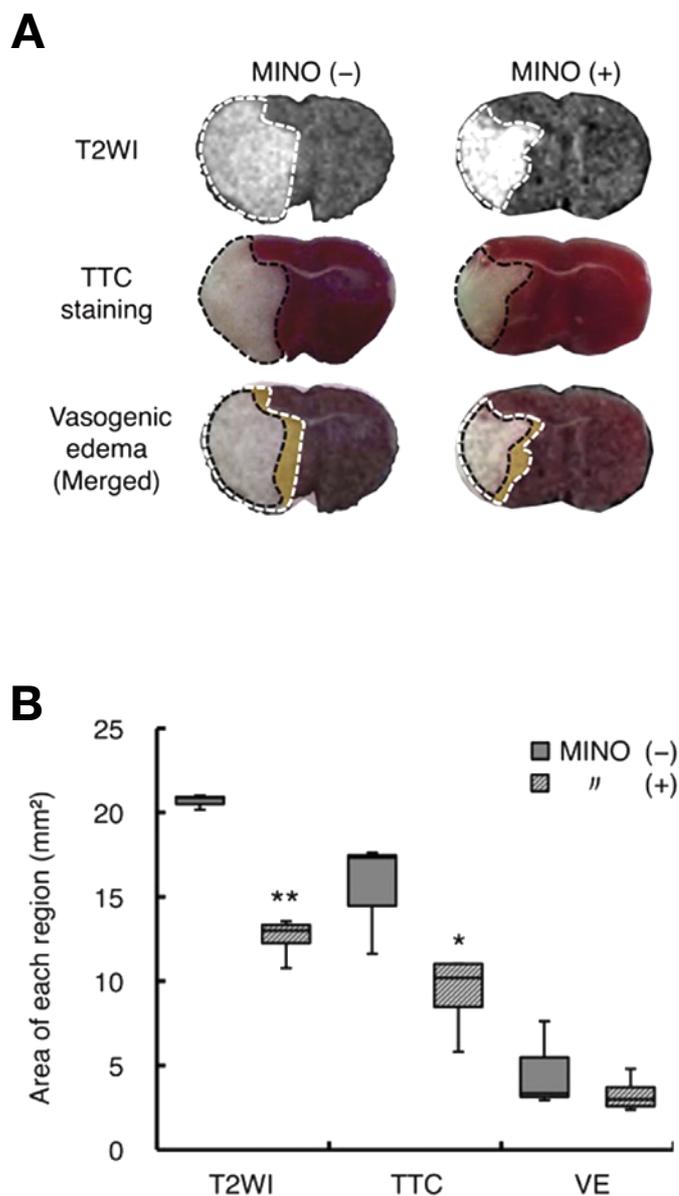


Fig. 37 ミノサイクリン投与マウスにおける血管原性浮腫の進行への影響

マウスに 100 mg/kg ミノサイクリン (MIN) を腹腔内投与し、1 時間後に pMCAO を施した。虚血 24 時間後に T2WI を撮像した (冠状方向, 1 mm 間隔)。撮像直後に屠殺して脳を摘出し、TTC 染色を行った。同一個体の T2WI と TTC 染色画像を重ね合わせることで、血管原性浮腫のみの領域を同定した。(A) Veh 投与群と MINO 投与群における血管原性浮腫の比較。(B) T2WI と TTC 染色画像の重ね合わせ画像における各面積の定量結果。The values represent the mean S.E. (n=3-4). The data were analyzed using Student's t-test. *P < .05 vs. Veh values.

3.3.10 ミノサイクリン投与後の神経機能評価

MINO 投与により血管原性浮腫の進行が抑制されることが明らかになったため、虚血後の神経機能障害が改善されるかを mNSS により評価した。マウスへ 100 mg/kg MINO を腹腔内投与し、1 時間後に pMCAO を施した。虚血 24 時間後に mNSS を測定し、運動機能、感覚機能、バランス機能、反射機能について統合的に評価した (Fig. 38)。MINO 投与群では、Veh 群で認められた重度の神経障害が有意に改善された (Veh 投与群: 10.7 ± 1.0 点, MINO 投与群: 6.6 ± 1.1 点)。以上より、ミクログリアによる神経炎症を抑制することで、虚血辺縁部への血管原性浮腫の進行が抑制され、脳梗塞予後が改善することが示された。

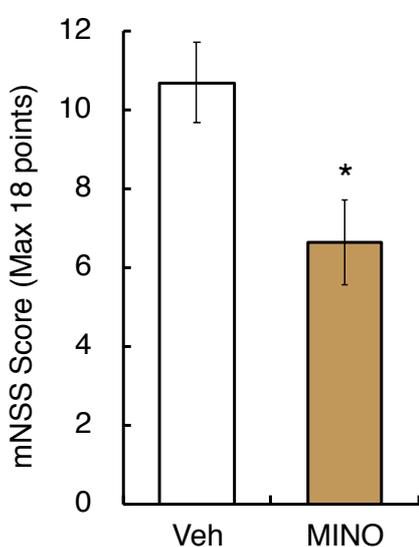


Fig. 38 ミノサイクリン投与マウスにおける神経機能の評価

マウスに 100 mg/kg ミノサイクリン (MIN) を腹腔内投与し、1 時間後に pMCAO を施した。虚血 24 時間後に mNSS により神経機能の評価した。Veh 投与群は重篤な神経機能障害が生じたが、MINO 投与群では神経機能が有意に改善することが示された。The values represent the mean S.E. (n=5). The data were analyzed using Student's t-test. *P < .05 vs. Veh value.

3.4 考察

3.4.1 虚血辺縁部へのミクログリア活性化の伝搬

第3章では、ミクログリア活性化状態について時空間的に詳細に検討すると、虚血3時間後には中心部において活性化ミクログリアが認められ、12時間以後は辺縁部においてミクログリアは徐々に活性化の様相を呈した。

虚血早期に中心部において認められたミクログリア活性化は、障害を受けたニューロン由来の DAMPs (damage-associated molecular patterns) の作用により説明される。すなわち、障害を受けたニューロンは核酸、ATP、タンパク質などの DAMPs を細胞外に放出する。ミクログリアに発現する Toll-like receptors (TLRs) はこれらのニューロン由来分子を感知する。例えば、TLR3 は RNA を TLR9 は DNA を感知してシグナルを下流に伝えることができる。TLR の下流では MyD88 や TRIP といったアダプター分子の作用を介して転写因子 NF- κ B, AP-1, IRF-3 が活性化される。これらの転写因子により炎症促進性サイトカインなどの炎症性因子が誘導される (Jin, Yang and Li, 2010)。

一方、辺縁部においては、ミクログリアは12時間からわずかに活性化を初め、24時間に明瞭な活性化を呈するという遅発性の緩徐な活性化様式を示した。虚血辺縁部では細胞死は生じなかったことより、死細胞由来の DAMPs によりミクログリアが活性化しているとは考え難い。この緩徐なミクログリア活性化について本研究では、虚血中心部から生じたミクログリア活性化が時間経過とともに遠方へと伝播するという“Microglial wave”仮説を提唱する。Microglial wave においてミクログリア同士の活性化を媒介するメカニズム (細胞間相互作用を媒介するメカニズム) としては、炎症性因子のパラクリンまたはオートクリン作用を想定している。虚血領域で活性化したミクログリアは様々な液性因子を放出する。特に炎症性サイトカインは比較的近傍に位置するミクログリアの活性化を促す。この過程が繰り返されることで、虚血領域で活性化したミクログリアが遠く離れた非虚血領域のミクログリアを活性化することが考えられる。これらの活性化したミクログリアが近傍のミクログリアを活性化し、活性化の波として脳の遠位部へと伝わると考える。

3.4.2 血管原性浮腫の形成における貪食機能の関与

本研究では、虚血中心部から辺縁部へとミクログリアへの活性化が伝搬し、辺縁部の炎症性サイトカイン量 (TNF- α) が増大することで血管透過性が亢進して血管原性浮腫が生じるという Microglial wave 仮説を提唱する。虚血 24 時間後の虚血辺縁部において Iba1/CD68 の二重免疫蛍光染色を行うと、アメーバ型への顕著な形態変化とともに、CD68 の発現上昇が認められた。この CD68 (別名 macrosialin) は、ミクログリアやマクロファージ、単球の細胞膜、リソソーム膜、エンドソーム膜に局在する膜貫通型のタンパク質である (Holness and Simmons, 1993; Kurushima *et al.*, 2000; Fadini *et al.*, 2013)。CD68 は炎症時に発現上昇し、貪食機能に関与するタンパク質であることから、虚血辺縁部ではミクログリアにの貪食機能が亢進していると考えられる。

活性化ミクログリアはサイトカインやケモカインなどの液性因子の放出を行うほかに、貪食作用を発揮する (Kettenmann *et al.*, 2011)。この phagocytosis と呼ばれる作用は、アポトーシスやネクロシス後の細胞死に伴って生じるものであり、死んだ細胞や死ぬ運命にある細胞のみを除去すると考えられてきた。しかし、発達期や病態時など種々の場面においては、細胞ストレスにより負荷が生じた生細胞をミクログリアが貪食することがある。この生細胞に対する貪食作用は、2012 年に Brown らによって“phagoptosis”として提唱された (Brown and Neher, 2012)。Phagoptosis は、たとえば脳発達期において過剰に作成されるシナプス前駆体を貪食し、神経回路網の正常な構築に寄与する点や、ガン細胞などの正常機能を失った細胞や病原体を除去できる点においては有用である。しかし、炎症下において生じる過剰な phagoptosis が結果的に細胞障害的に働くことが示されつつあり、BBB の血管透過性亢進に寄与することを示唆する報告が複数存在する。たとえば、LPS 腹腔内投与による全身炎症下において、ミクログリアはアストロサイトエンドフィートを貪食している様子が二光子顕微鏡顕微鏡を用いた脳内のライブイメージングにより確認された (Haruwaka *et al.*, 2019)。また Jolivel らは、脳虚血時に血管内から漏出したフィブリノゲンやアルブミンによりミクログリアが血管内皮細胞の近傍へとリクルートされ、内皮細胞を貪食する様子を二光子顕微鏡で捉えた (Jolivel *et al.*, 2015)。よって、炎症下においてはミクログリアはアストロサイトや内皮細胞などの BBB 構成要素を積極的に貪食することで血管透過性を亢進させうる。よって、本研究で確認された虚血辺縁部での血管原性浮腫形成について、ミクログリアは液性因子による TJPs 発現低下以外にも、BBB 構成要素の貪食によって直接的に BBB 透過性を亢進させている可能性がある。

3.4.3 ミノサイクリンの薬物動態と脳への送達

本研究では、ミクログリア活性化抑制剤としてミノサイクリン (minocycline; MINO) を用いた。MINO は 1966 年に初めて合成されたテトラサイクリン系の抗生物質であり (Redin, 1966), 抗菌薬ミノマイシンとして、ニキビ治療や感染症などに対して処方される。その作用機序は、真正細菌と古細菌細菌が有する 30S リボソームサブユニットへの結合によるタンパク質合成の停止である (Chopra and Roberts, 2001)。テトラサイクリン系抗菌薬は、細胞外膜の親水性孔からの受動的拡散と細胞質内膜からのエネルギー依存的な能動的輸送という二段階のプロセスを経てリボソームに到達する。30S リボソームサブユニットへと結合し、aminoacyl t-RNA が m-RNA/リボソーム複合体のアクセプターサイトに結合するのを妨げてタンパク合成を停止することにより抗菌作用を発揮する (Klein and Cunha, 1995)。

MINO やドキシサイクリンなどの第二世代テトラサイクリンは脂溶性が高いという特徴を有する (Aronson, 1980)。そのため、投与後の吸収効率、体内分布、さらには抗炎症効果の向上が期待されている。事実、テトラサイクリンやオキシテトラサイクリンと比較して、MINO は高い脳移行性を有することがイヌを用いた薬物動態試験により示されている (Barza *et al.*, 1975)。さらに MINO は IL-1 β , IL-6, TNF- α , MMP-9 などの多くの炎症関連因子について顕著な抑制効果を発揮する (Möller *et al.*, 2016)。また、その IC₅₀ は 1.21 \pm 0.71 μ M であることが報告されている (Zhao *et al.*, 2021)。

MINO の脳移行性については、ラット (Colovic and Caccia, 2003), イヌ (Barza *et al.*, 1975) などのさまざまな動物種において証明されている。MINO 経口投与から 4 時間後のラット脳を解析した Colovic らの結果によると、25 mg/kg MINO 投与時には約 1.5 μ g/g, 100 mg/kg MINO 投与時には約 3.5 μ g/g の濃度で MINO が検出される (Colovic and Caccia, 2003)。マウスにおける半減期は 3.0 時間, EC₅₀ は 11.75 nM であり (Sharma *et al.*, 2016), 100mg/kg MINO 腹腔内投与から 1 時間後のマウス血清濃度は約 30 mg/L (Zhou *et al.*, 2017), 血清中の約 30-40%が脳内へ移行すること (Colovic and Caccia, 2003) を併せて考えると、本研究における 100 mg/kg MINO の腹腔内投与は、MINO が脳実質へ到達するには十分な濃度であると言える。

第4章 AhR 阻害による保護効果の検証と炎症発現機構の解明

4.1 緒言

これまでの結果より、以下3点が明らかになった。① 虚血中心部でミクログリアが活性化し、その後、血管原性浮腫が生じる。② 時間経過により周辺領域でもミクログリアが活性化をはじめ、それに引き続いて血管原性浮腫が生じる。③ ミクログリア活性化抑制剤ミノサイクリン (minocycline; MINO) の投与により、虚血24時間後の非虚血領域へのミクログリア活性化領域の拡大は抑制され、非虚血領域における血管原性浮腫の進行が顕著に抑制される。以上より、虚血後の活性化ミクログリアが血管原性浮腫を引き起こす主因となることが示された。MINOによりミクログリア活性化が抑制され、神経障害度が有意に改善したことから、MINOは血管原性浮腫の新規治療薬となりうる。しかし、MINOはテトラサイクリン系の抗菌剤でありミクログリアへの作用点が不明であるうえ、臨床試験においては有効な結果を得られていない。

そこで、ミクログリアの活性化制御因子として新たに芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor; AhR) に着目した。芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor; AhR) は bHLH-PAS (basic helix-loop-helix-per-arnt-sim) ファミリーに属する転写因子である。リガンドが結合していない定常状態では不活性であり、分子シャペロンである heat shock protein 90 (Hsp90) や p23, XAP2, c-Src と会合した状態で細胞質に優位に存在する (Fig. 39)。これらの結合により AhR タンパク質はリガンドと結合可能な構造を保っている。2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin (TCDD) や benzo[a]pyrene (BaP) などの外因性化学物質は主要な AhR リガンドである (Nguyen and Bradfield, 2008)。リガンドが結合すると、AhR は c-Src のリン酸化と並行して複合体から解離しながら核内移行する。核内で AhR は aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) とヘテロ二量体を形成し、CYP1A1 や UGT1A1 などのリガンド代謝酵素のプロモーター領域にあるダイオキシン応答配列 (dioxin responsive element; DRE) に結合する。このように AhR は、外因性の有害な化合物に対する解毒代謝機能を発揮することで知られる (Rothhammer and Quintana, 2019)。

AhR は mRNA とタンパク質ともに脳内での発現が確認されている。Real-time PCR と in situ ハイブリダイゼーションを用いた Kimura らの研究 (Kimura and Tohyama, 2017) によると、AhR mRNA は脳の発達初期 (胎生 12.5 日目) のマウス大脳皮質において検出された。胎生 18.5 日以降になると、海馬、小脳、嗅球においても発現が認められた。また、AhR タ

シグナル伝達については、初代培養マイクログリア (Lee et al., 2015), 初代培養アストロサイト (Filbrandt et al., 2004; Pravettoni et al., 2005), 初代培養ニューロン Ref, 初代培養内皮細胞 Refにおいて検出されており、脳の構成細胞に広く発現することが判明している。

近年では、AhR がサイトカインやケモカインなどの炎症因子を誘導するなど、炎症反応を制御することが示されている (Gutiérrez-Vázquez and Quintana, 2018). たとえば、マイクログリアへのリポポリサッカライド (lipopolysaccharide; LPS) 処置により TNF- α が誘導されるが、AhR の siRNA や AhR ノックアウトマウスにおいてこの発現は抑制される (Lee et al., 2015). また、炎症の応答のマスター転写因子である NF- κ B は、AhR の活性化を誘導していくつかの炎症関連因子の転写を増強する (Vogel et al., 2014).

これらの知見を総合すると AhR は炎症反応を増強することが考えられ、虚血後の AhR 活性化が血管透過性亢進に寄与し、浮腫を増悪させる可能性がある。しかし、マイクログリア AhR は LPS 単独処置下では炎症促進作用を発揮する一方で、LPS および AhR アゴニストの両処置下では抗炎症作用を発揮する (Lee et al., 2015). このように炎症下での AhR は外部環境に応じて相反する炎症反応を惹起するが、血管原性浮腫に対する AhR の作用は不明である。上述の背景を踏まえ、本章では血管原性浮腫に対する AhR の機能を調べた。

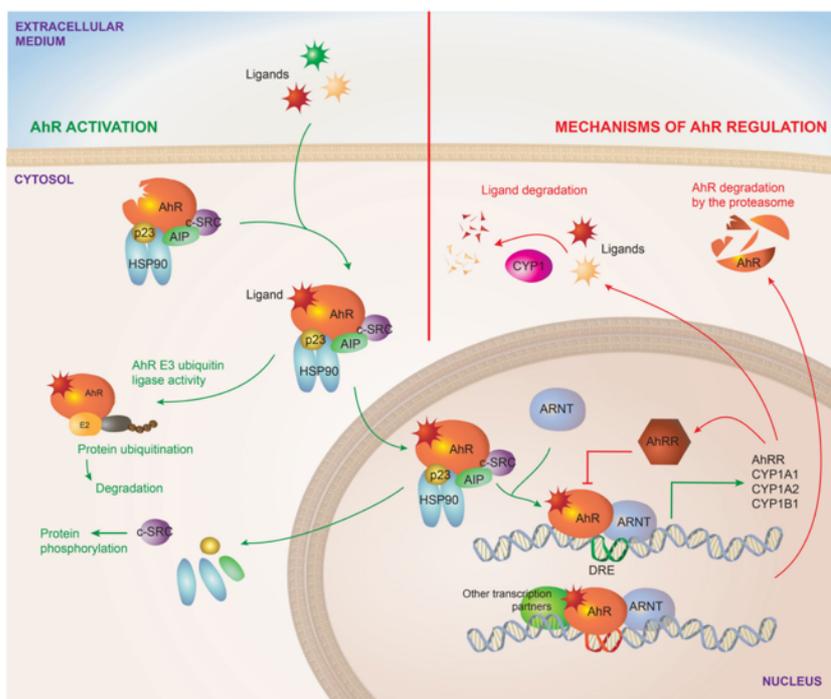


Fig. 39 AhR シグナル伝達経路

引用元 : (Gutiérrez-Vázquez and Quintana, 2018)

4.2 材料と方法

4.2.1 実験動物と飼育環境

第2章と同一の方法により実施した。

4.2.2 AhR アンタゴニストの投与

AhR アンタゴニストとして CH223191 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan) を用いた。CH22319 を 1 mg/mL の濃度となるようにメチルセルロース中に懸濁し、10 mg/kg の濃度で腹腔内投与した。投与 1 時間後に pMCAO を施し脳虚血を誘導した。

4.2.3 ヒト単球系白血病細胞株 (THP-1) の培養と分化

THP-1 (TIB-202) は American Type Culture Collection (Manassas, Virginia) から入手し、10% ウシ胎児血清 (FBS) を添加した RPMI1640 培地にて培養した。160 nM の 13-酢酸 12-ミリスチン酸ホルボール (PMA) を用いて THP-1 細胞 (5×10^5 細胞/mL) を 2 日間かけて分化させ、新鮮な RPMI1640 培地 (10%FBS を含む) 中でさらに 2 日間培養した。

4.2.4 Real-time PCR を用いた遺伝子発現解析

第3章と同一の方法により実施した。用いたプライマーは Table. 8 に示す。

Table. 8 Real-time PCR に使用したプライマー

Target	Forword primer	Reverse primer
Human NOX-2	GGATGAGTCTCAGGCCAATCA	TCATTATCCCAGTTGGGCCG
Human p22phox	TACTATGTTTCGGGCCGTCCT	GCACAGCCGCCAGTAGGTA
Human p40phox	GAGAGGTGAACTCAGCCTGG	GCACAGCCGCCAGTAGGTA
Human p47phox	AGTACCGCGACAGACATCAC	CGCTCTCGCTCTTCTCTACG
Human p67phox	CTTGAACCAGTTGAGCTGCG	TTGTTTCTGGCCTGGTGACA

Human Rac-1	AAACCGGTGAATCTGGGCTT	AAGAACACATCTGTTTGC GGA
Human TNF- α	TCCTTCAGACACCCTCAACC	AGGCCCCAGTTTGAATTCTT
Human β -actin	GGACTTCGAGCAAGAGATGG	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
Mouse p47phox	CTGGAGGGCAGAGACAATCCA	CTGCTTCTCACACAGCGGA
Mouse AhR	ACCAGAACTGTGAGGGTTGG	TCTGAGGTGCCTGAACTCCT
Mouse CYP1A1	GGCCACTTTGACCCTTACAA	CAGGTAACGGAGGACAGGAA
Mouse TNF- α	ATGGCCTCCCTCTCATCAGT	CTTGGTGGTTTGCTACGACG
Mouse IL-1 β	AGCTTCCTTGTGCAAGTGTCT	GCAGCCCTTCATCTTTTGGG
Mouse COX-2	AGCCAGGCAGCAAATCCTT	CAGTCCGGGTACAGTCACAC
Mouse β -actin	AGCCATGTACGTAGCCATCC	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA

4.2.5 イムノブロットィング

試料を緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 154 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT 含有プロテアーゼ阻害剤カクテル) 中で均質化し, 10,000 \times g, 20 分間, 4°Cで遠心分離した. 上清を 100,000 \times g, 4°Cで 60 分間遠心分離し, 得られたペレットを Radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% deoxycholate sodium, 0.1% SDS) で溶解し, イムノブロットィングに使用した. 等量のタンパク質をロードして SDS-PAGE で分離し, ポリビニリデン・ジフルオリド膜に転写した. ブロックした膜を以下の一次抗体とインキュベートした; Anti-p47phox (610354, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), Anti-NADPH oxidase (NOX)-2 (sc-130543, Santa Cruz, Dallas, TX, USA) および Anti- α tubuline (T5168, Sigma-Aldrich). 膜を過酸化物質標識二次抗体 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) とインキュベートし, 過酸化物質基質 (SuperSignal West Pico, Thermo Fisher Scientific) を用いて可視化した.

4.2.6 NOX 活性の測定

NOX 活性は, 主に NOX によって生成されるスーパーオキシドアニオン (O_2^-) レベルにより評価した. スーパーオキシドアニオン量は, シトクロム c よりもスーパーオキシドア

ニオンと特異的に反応するアセチル化シトクロム c (Smith, Thor and Orrenius, 1984; Tarpey and Fridovich, 2001) を用いた方法により定量した (Azzi, Montecucco and Richter, 1975). 培地を交換した後, DMNQ (2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone) をウェルに添加し, 10 分間インキュベートした. 60 μM アセチル化シトクロム c 処置し, 100 μM ジエチルジチオカルバメート (DDC; diethyldithiocarbamate) および 100 U/mL カタラーゼの存在下にて, さらに 2 分間インキュベートした. 還元アセチル化シトクロム c の量は 550 nm と 557 nm の吸光度差により測定した. 培養液中のスーパーオキシドアニオンの総量は, 還元型アセチル化シトクロム c の吸収係数 ($\epsilon_{550-557} = 21.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) を用いて算出し, スーパーオキシドアニオン生成量は $\text{nmol}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$ で示した.

4.2.7 プロモーター解析

ヒトおよびマウス IL-33 の 5'-上流領域のプロモーター解析は TFSEARCH program (Heinemeyer *et al.*, 1998) を用いて実施した. 解析は GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) の遺伝子配列データを使用した.

4.2.8 クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイ

細胞を 1% ホルムアルデヒドで室温 10 分間固定し, Anti-AhR 抗体 (ab2769; Abcam plc., Cambridge, UK) またはコントロール IgG 抗体を用いて Pierce Agarose ChIP Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) のプロトコルに従い実施した. 得られた DNA を含む免疫沈降物を Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts) を用いて, Real-time PCR により解析した. 使用したプライマーは Table. 9 に示す. THP-1 マクロファージから抽出したヒトゲノム DNA をポジティブコントロールとして用いた. 標的配列の増幅は DNA 配列により確認し, Ct 値をもとに各サンプルの値を算出した.

Table. 9 ChIP アッセイに使用したプライマー

Target	Forward primer	Reverse primer
P47 DRE1	ATTAGCCGGACATGGTGGTG	ATGCAGTGGCATGATCTCGGG
P47 DRE2	GCCAACAGGGTGATACCCCT	AGCTTCCCAAGTAGCTGGGA

4.2.9 過酸化脂質レベルの測定

過酸化脂質の指標として、2-チオバルビツール酸反応性物質 (2-thiobarbituric acid reactive substances; TBARS) 量を測定した。試料を 1.15% KCl 水溶液でホモジナイズし、ホモジネートを 7 mM ドデシル硫酸ナトリウム, 16 mM チオバルビツール酸, 340 μ M ジブチルヒドロキシトルエンを含む酢酸を加えて pH3.5 とした。60 分間インキュベートしたのち 1-ブタノール-ピリジン (15:1) 溶液で抽出し、抽出液の吸光度 (532 nm) を測定した。標準物質として 1,1,3,3-テトラメトキシプロパン (C₁₁H₂₄O₄; 1,1,3,3-Tetramethoxypropane) を使用した。

4.2.10 マウス初代ミクログリアの単離と培養

0~1 日齢の ICR マウスから前脳を解離し、10% FBS と 5 μ g/mL インスリンを添加した DMEM からなる組織培養液とともにポリ-L-リジンコーティングプラスチック培養フラスコに細胞を播種した。7~10 日間培養後、0.25 U/mL Collagenase D (Roche Diagnostics K.K., Tokyo, Japan), 8.5 U/mL Dispase II (Roche Diagnostics KK), 0.25 U/mL DnaseI (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, Missouri), 0.1 μ g/mL トシル-L-リシンクロロメチルケトン (tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride; TLCK) を含む細胞溶解液をフラスコに添加した。フラスコをシェーカー上で 20 分間攪拌し、培養液を加えた。穏やかに攪拌した後、細胞を 70 μ m のセルストレーナーに通して細胞懸濁液を得た。細胞を 200 \times g で 6 分間遠心分離し、得られたペレットを 5% FBS および 1mM EDTA を含む PBS 中に再懸濁した。EasySep mouse CD11b Positive Selection Kit II (VERITAS Corporation, Tokyo, Japan) を用いて、製造元のプロトコルに従いミクログリアを分離した。A 液と B 液を混合して室温で 5 分間インキュベートした後、RapidSpheres を混合物に加えて室温で 5 分間インキュベートした。EasySep Magnet を用いて標識ミクログリアを単離し、 1×10^6 cells/mL で播種した。24 時間培養後、各実験に使用した。Iba1 染色によりミクログリアの純度を確認し、98%以上である細胞のみを実験に使用した。

4.2.11 統計解析

データは全て平均値±標準誤差 (S.E.) で示した。統計学的解析のために、Windows 版 Excel 統計 (Social Survey Research Information, Tokyo, Japan) を用いた。統計学的有意差は、P 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判定した。

4.3 実験結果

4.3.1 虚血後マウス脳における AhR 発現と活性化

虚血脳における AhR mRNA の発現を検討した。AhR mRNA レベルは pMCAO から 3 時間後に大脳皮質と線条体の両領域において有意に増加しており、この増加は 6 時間後にも維持されていた (Fig. 40)。ミノサイクリンは、ミクログリア活性化の強力な阻害剤であり、NF- κ B の mRNA 発現だけでなく核内移行も阻害することで炎症性サイトカイン誘導を抑制する (Pang *et al.*, 2012; Kobayashi *et al.*, 2013)。ミノサイクリンの前処理により、全てのタイムポイントにおいて AhR の発現が顕著に抑制されたことから、虚血時にミクログリアの AhR 発現が上昇することが示唆された。

CYP1A1 は、AhR の主要な標的の一つである (Mescher and Haarmann-Stemmann, 2018)。虚血マウス脳における CYP1A1 発現を測定したところ、虚血 3 および 6 時間後に大脳皮質と線条体の両領域において、CYP1A1 の mRNA レベルが上昇した (Fig. 41)。また、AhR の下流標的遺伝子である CYP1A1 の発現増加は、AhR アンタゴニストである CH223191 の前処理により有意に抑制された。したがって、虚血時にはミクログリアの AhR が機能すると考えられる。

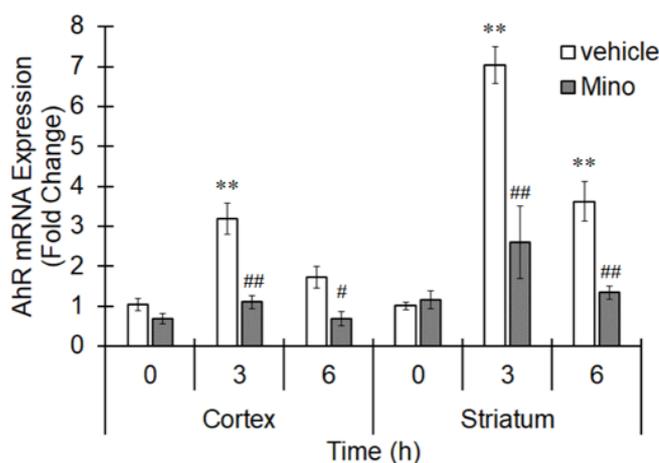


Fig. 40 pMCAO 後の大脳皮質と線条体における AhR 発現の増加

マウスにミノサイクリン (Mino; 100 mg/kg) を腹腔内投与し、1 時間後に pMCAO を施した。pMCAO から 0 時間 (Sham operation), 3, 6 時間後に脳を摘出して大脳皮質と線条体を採取し、AhR の mRNA 発現量を Real-time PCR で評価した。The values represent the mean(n

= 5). The data were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test or Student's t-test.

** $p < 0.01$ vs. the 0 h group. # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ vs. the vehicle group.

4.3.2 AhR 誘導性の炎症関連因子の発現

近年、AhR が炎症性サイトカインの発現を調節し炎症反応を制御することが示されつつある。そこで、AhR により制御される炎症関連因子の発現を調べた。pMCAO 後のマウス脳では、大脳皮質と線条体において時間依存的に TNF- α が発現誘導され、CH223191 の前処置により TNF- α の発現は有意に消失した (Fig. 42-A)。また、IL-1 β とシクロオキシゲナーゼ-2 (cyclooxygenase-2; COX-2) も pMCAO から 3 時間後に発現上昇し、CH223191 の投与によりその上昇が顕著に抑制された (Fig. 42-B)。これらの結果より、虚血後脳では AhR 誘導性の神経炎症が生じることが示された。

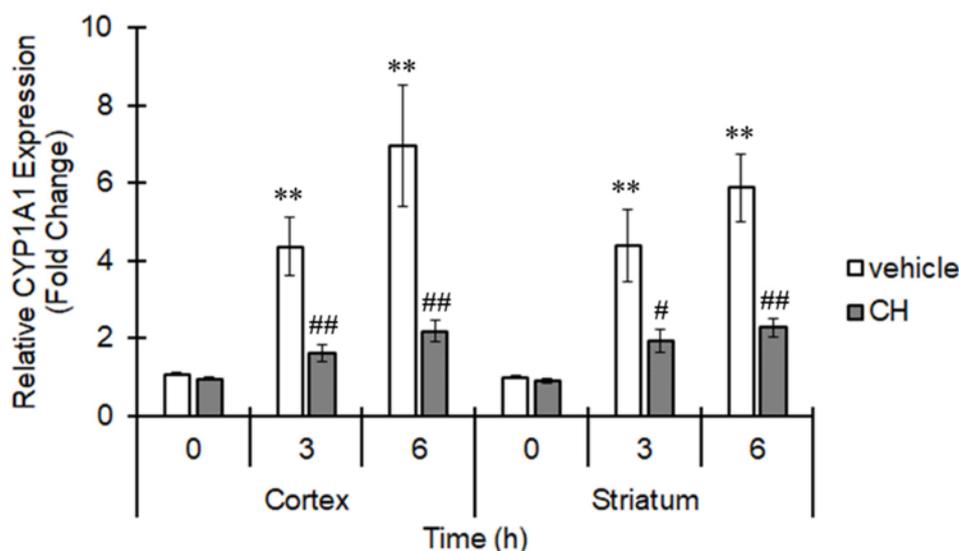


Fig. 41 pMCAO 後の大脳皮質と線条体における CYP1A1 発現の亢進

マウスに CH223191 (CH; 10 mg/kg) を腹腔内投与し、30 分後に pMCAO を施した。pMCAO から 0 時間 (Sham operation), 3, 6 時間後に脳を摘出して大脳皮質と線条体を採取し、CYP1A1 の mRNA 発現量を Real-time PCR で評価した。The values represent the mean S.E. (n = 4). The data were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test or Student's t-test. ** $p < 0.01$ vs. the 0 h group. # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ vs. the vehicle group.

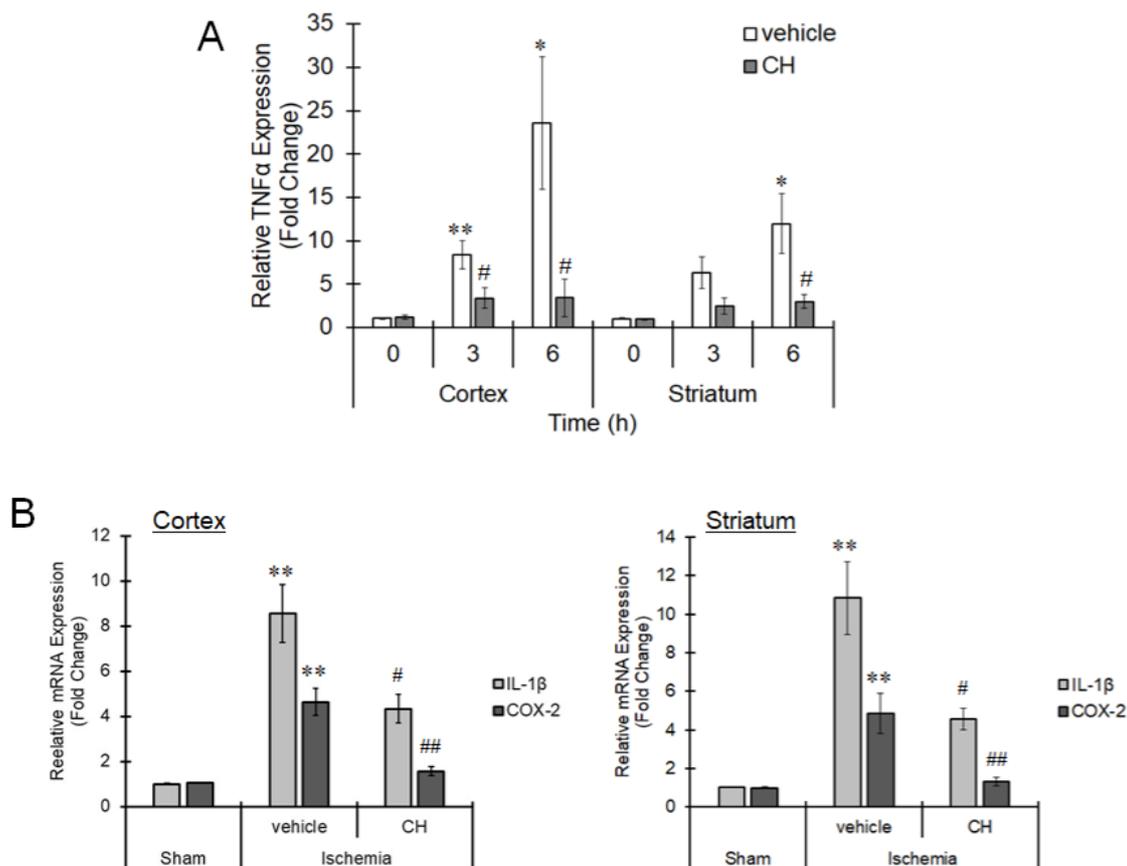


Fig. 42 虚血脳における AhR 依存的な炎症性サイトカインの発現上昇

マウスに CH223191 (CH; 10 mg/kg) を腹腔内投与し、30 分後に pMCAO を施した。pMCAO から 0 時間 (Sham operation), 3, 6 時間後に脳を摘出して大脳皮質と線条体を採取し、(A) 0, 3, 6 時間後の TNF- α , (B) 3 時間後の IL-1 β および COX-2 の mRNA 発現を Real-time PCR により評価した。The values represent the mean S.E. (n = 5). The data were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test or Student's t-test. (A) * p < 0.05 and ** p < 0.01 vs. the 0 h group. # p < 0.05 vs. the vehicle group. (B) ** p < 0.01 vs. the sham group. # p < 0.05 and ## p < 0.01 vs. the vehicle group.

4.3.3 虚血後の脳浮腫および梗塞巣形成における AhR の関与

第3章において、虚血により活性化されたミクログリアが血管原性浮腫の進行を媒介し梗塞巣を形成することを明らかにした。そこで、このミクログリア介在性の血管原性浮腫および梗塞巣の形成における AhR の関与を調べた。pMCAO から 24 時間後の T2 強調画像 (T2-weighted image; T2WI) と TTC 染色画像を重ね合わせると、梗塞周辺部に T2 の高信号領域が認められ、血管原性浮腫が梗塞巣を取り囲むことが示された (Fig. 43-A)。CH223191 の虚血前投与を行うと、血管原性浮腫領域は虚血中心部である染色体領域のみに局在し、虚血辺縁部である大脳皮質へは進行しなかった (Fig. 43-A)。また、CH223191 の虚血前投与により梗塞巣体積が減少した (Fig. 43-B)。乾湿重量測定法により虚血後の脳水分量を算出すると、pMCAO 後に有意に増加した脳水分量は CH223191 投与により正常レベルまで回復した (Fig. 43-C)。さらに、mNSS により神経学的障害度を測定した。Sham operation 群と比較して pMCAO 群では、神経学的障害度は顕著に悪化し、CH223191 の投与により改善された (Fig. 43-D)。上記の結果を総合すると、虚血後脳ではミクログリア AhR が神経炎症を誘発し血管原性浮腫の進行を促進することで神経細胞傷害を増悪することが示唆される。

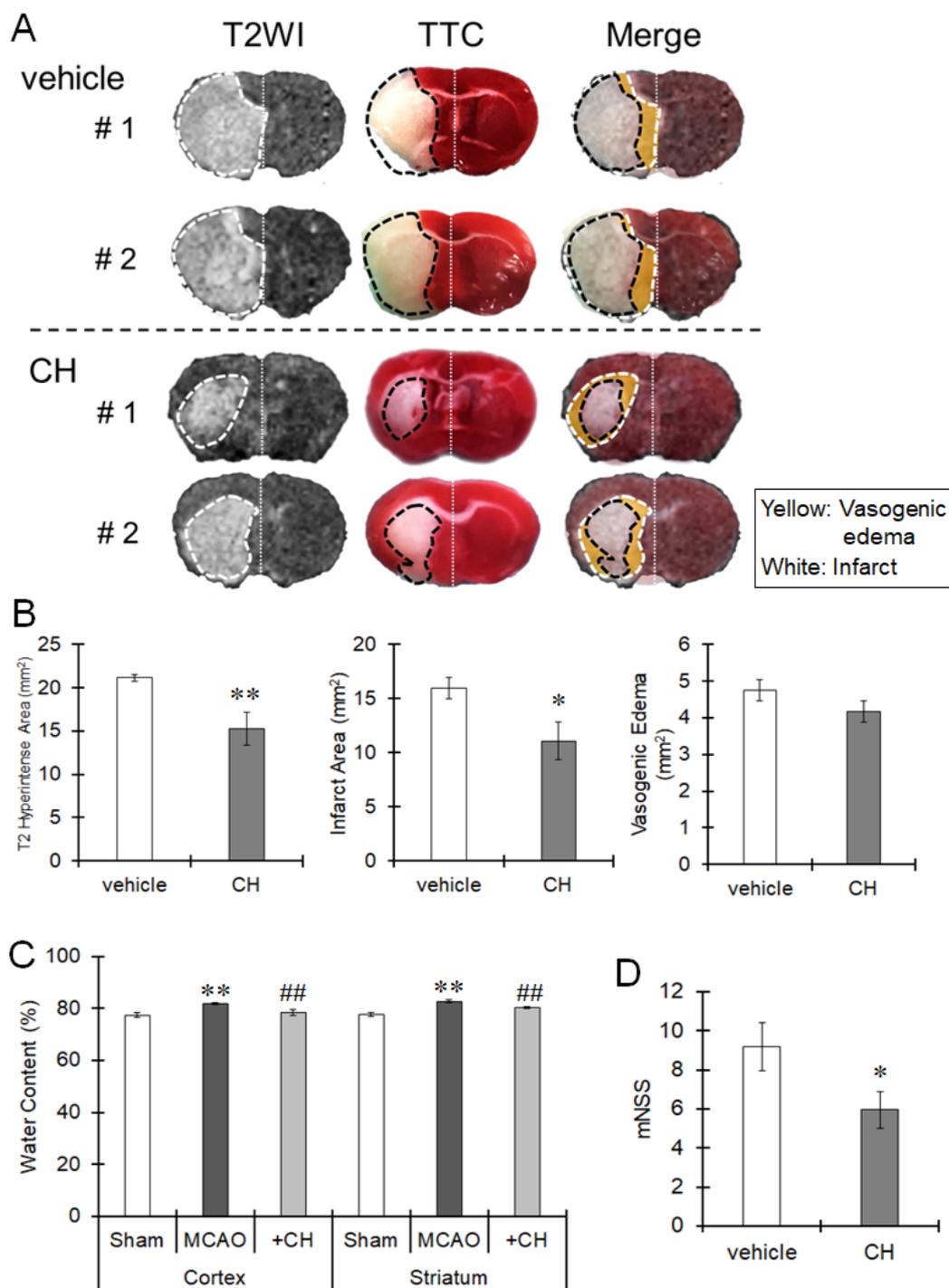


Fig. 43 pMCAO による神経障害に対する AhR の保護作用

マウスに CH223191 (CH; 10 mg/kg) を腹腔内投与し、30 分後に pMCAO を施した。24 時間後に(A) T2WI と TTC 染色の画像を重ね合わせ、梗塞巣領域と血管原性浮腫領域を同定した。重ね合わせ画像の黄色い領域が血管原性浮腫領域である。(B) ImageJ により T2WI 高信号領域、梗塞巣領域、血管原性浮腫領域を定量した。The values represent the mean S.E.

(n = 8 animals in each group). Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Student's t-test. * p < 0.05 and ** p < 0.01 vs. the vehicle group. (C) 虚血 24 時間後に脳を摘出し、大脳皮質と線条体の水分量を測定した。The values represent the mean S.E. (n = 6 animals in each group). The data were analyzed using one-way ANOVA followed by Student's t-test. ** p < 0.01 vs. the vehicle group. ## p < 0.01 vs. the MCAO group. (D) 虚血 24 時間後、mNSS により神経学的重症度を評価した。The values represent the mean S.E. (n = 9 animals in each group). The data were analyzed using one-way ANOVA followed by Student's t-test. * p < 0.05 vs. the vehicle group.

4.3.4 神経炎症における NOX-2 の役割

NADPH オキシダーゼ (NADPH oxidase; NOX) はスーパーオキシドラジカルを産生する酵素であり、宿主防御に重要な役割を担っている (Bedard and Krause, 2007)。NOX は複数のサブユニットから構成されており、その 1 つである p47phox は NOX-2 の調節因子である。P47phox はプロモーター領域にダイオキシン応答配列 (dioxin responsive element; DRE) をもつため AhR によって制御される (Pinel-Marie *et al.*, 2009)。そこで、神経炎症における NOX の役割を検討した。

ヒト単球系白血病細胞株である THP-1 マクロファージを用いて p47phox の発現と機能における AhR の関与を調べた。THP-1 細胞は機能的な AhR を発現していることを以前に報告したためである (Ishihara *et al.*, 2019)。THP-1 マクロファージを AhR リガンドである TCDD または KYN で処理すると、p47phox mRNA の発現が有意に増加したが、他のサブユニット (NOX-2, p22phox, p40phox, p67phox, および Rac-1) の発現は AhR リガンドの影響を受けなかった (Fig. 44-A)。また、p47phox の発現はまた THP-1 マクロファージの LPS による炎症条件下でも誘導された (Fig. 44-A)。p47phox のタンパク質レベルは、AhR アゴニストである TCDD または KYN 刺激によって増加し、この増加は LPS 刺激条件下で増強された (Fig. 44-B)。CH223191 を処置すると、TCDD, KYN および LPS+TCDD または LPS+KYN により誘導される p47phox の発現が著しく抑制された (Fig. 44-C)。これらの結果から、炎症下において p47phox は AhR 依存的に誘導されることが示された。

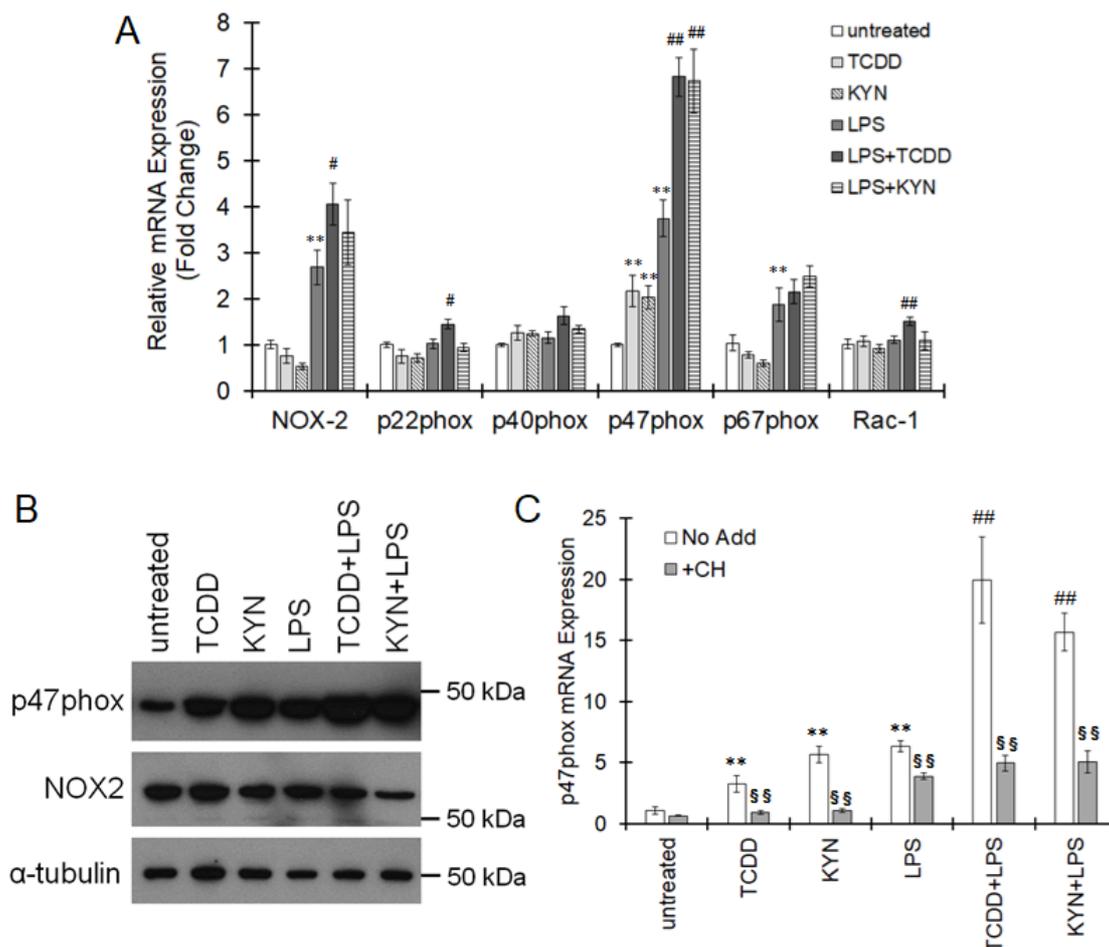


Fig. 44 THP-1 マクロファージにおける AhR 刺激後の p47phox 発現増加

(A,B) THP-1 マクロファージをリポポリサッカリド (lipopolysaccharide; LPS, 10 ng/mL) 処置下または未処置下において, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD; 10 nM) またはキヌレニン (kynurenine; KYN, 50 μM) を 6 時間処理した. (A) NADPH オキシダーゼ-2 (NADPH oxidase-2; NOX-2), p22phox, p40phox, p47phox, p67phox および Rac-1 の発現を Real-time PCR により評価した. The values represent the mean S.E. (n = 4). The data were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test or Student's t-test. ** p < 0.01 vs. the untreated group. # p < 0.05 and ## p < 0.01 vs. the LPS-treated group. (B) p47phox と NOX-2 のタンパク質発現をイムノブロットイングにより測定した. (C) THP-1 マクロファージへ AhR アンタゴニスト CH223191 (10 μM) を処置し, 20 分後に AhR アゴニストである TCDD (10 nM) および KYN (50 μM), または LPS (10 ng/mL) を添加した. AhR アゴニストまたは LPS 処理から 6 時間後, 細胞から total RNA を抽出し, Real-time PCR で p47phox mRNA レベルを測定した. The values represent the mean S.E. (n = 4). The data were analyzed using one-way ANOVA

followed by Dunnett's test or t-test. ** $p < 0.01$ vs. the untreated group. ## $p < 0.01$ vs. the LPS-treated group. §§ $p < 0.01$ vs. the untreated group.

4.3.5 p47phox のプロモーター領域における AhR 結合能の評価

p47phox のプロモーター領域には2つの DRE が存在しており、1つは既報であるが (Fig. 45-A, DRE2), もう1つは新規であった (Fig. 45-A, DRE1). ChIP アッセイにより、TCDD または KYN によって活性化された AhR は p47phox のプロモーター領域の DRE1 および DRE2 の両方にリクルートされることが明らかになった (Fig. 45-B, C).

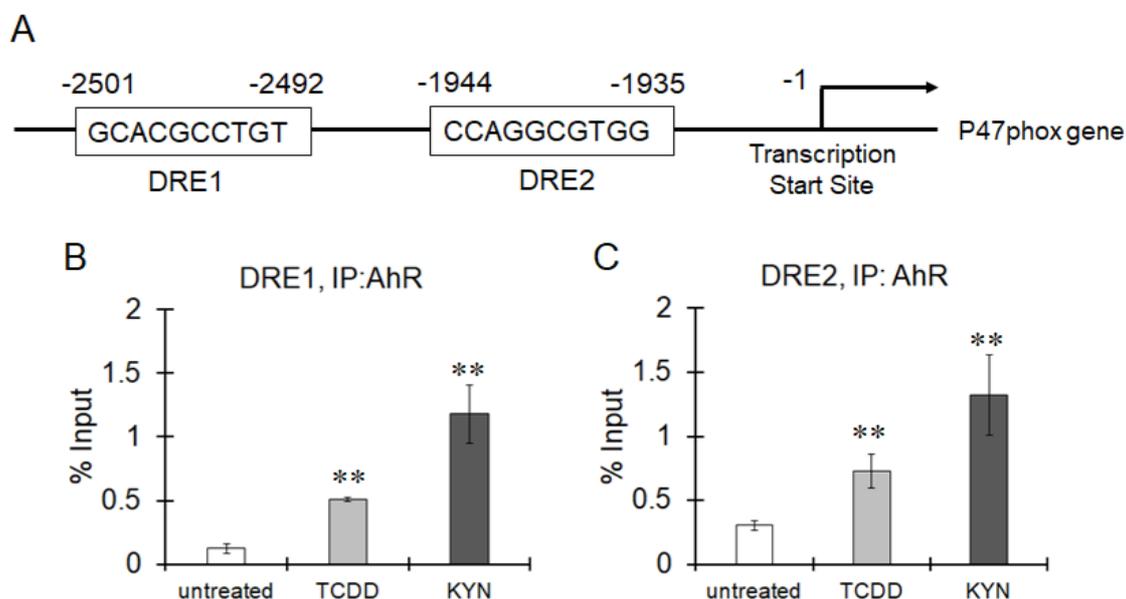


Fig. 45 p47phox プロモーター領域における AhR の DRE へのリクルートメント

(A) ヒト P47phox プロモーターの構造. (B,C) THP-1 マクロファージを TCDD (10 nM) または KYN (50 μ M) で1時間処理し、ヒト p47phox プロモーター領域内のダイオキシン応答配列 (dioxin responsive element; DRE) への AhR 結合能を評価するため ChIP アッセイを実施した. ポジティブコントロールとしてヒトゲノム DNA を用い、ネガティブコントロールとして非特異的抗体 (IgG) による免疫沈降を行った. The values represent the mean S.E. (n = 3). The data were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. ** $p < 0.01$ vs. the untreated group.

4.3.6 NOX 由来の酸化ストレスにおける AhR の関与

NOX のスーパーオキシド生成能は TCDD または KYN 処置によって増加し、この活性は THP-1 マクロファージにおける LPS 誘発炎症下で有意に増強された (Fig. 46). TNF- α の発現は TCDD および KYN による処理によって増加し、この増加はスーパーオキシドディスムターゼ (superoxide dismutase; SOD または NOX 阻害剤であるアポシニンの前処置により有意に抑制された (Fig. 47). SOD またはアポシニン単独処置では TNF- α 発現に影響はなかった (data not shown). したがって TNF- α の発現には、NOX によって生成される活性酸素が関与していると考えられる。以上のことから、AhR 刺激により p47phox の発現が増加すること、特に炎症性条件下において AhR はスーパーオキシド産生を介して TNF- α 発現に関与することが示唆された。

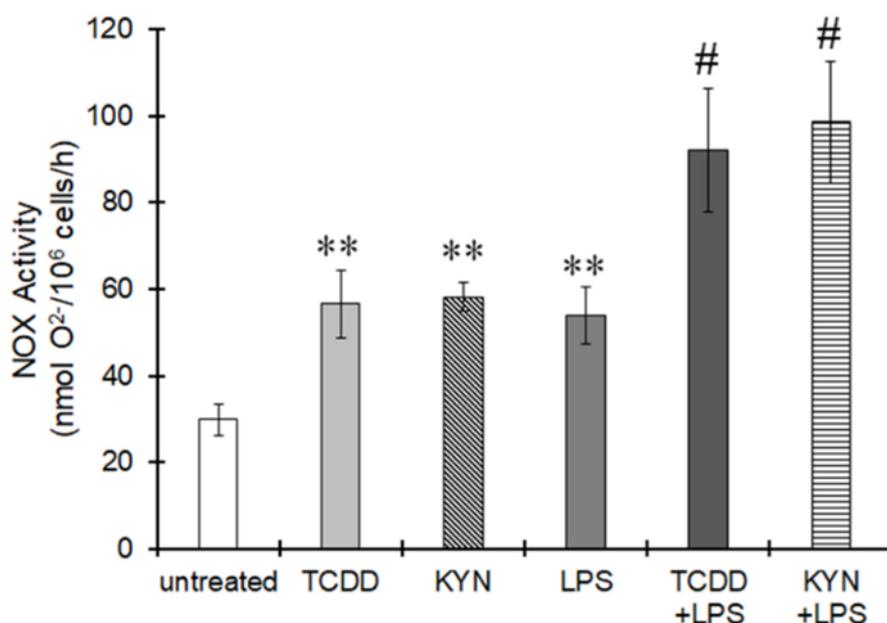


Fig. 46 THP-1 マクロファージにおける AhR リガンドによる NOX 活性の上昇

THP-1 マクロファージを用いて、LPS (10 ng/mL) の存在下または非存在下において TCDD (10 nM) または KYN (50 μ M) を 6 時間処理した。NOX 活性はシトクロム c 法により測定した。The values represent the mean S.E. (n = 4). The data were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test or Student's t-test. ** p < 0.01 vs. the untreated group. # p < 0.05 vs. the LPS-treated group.

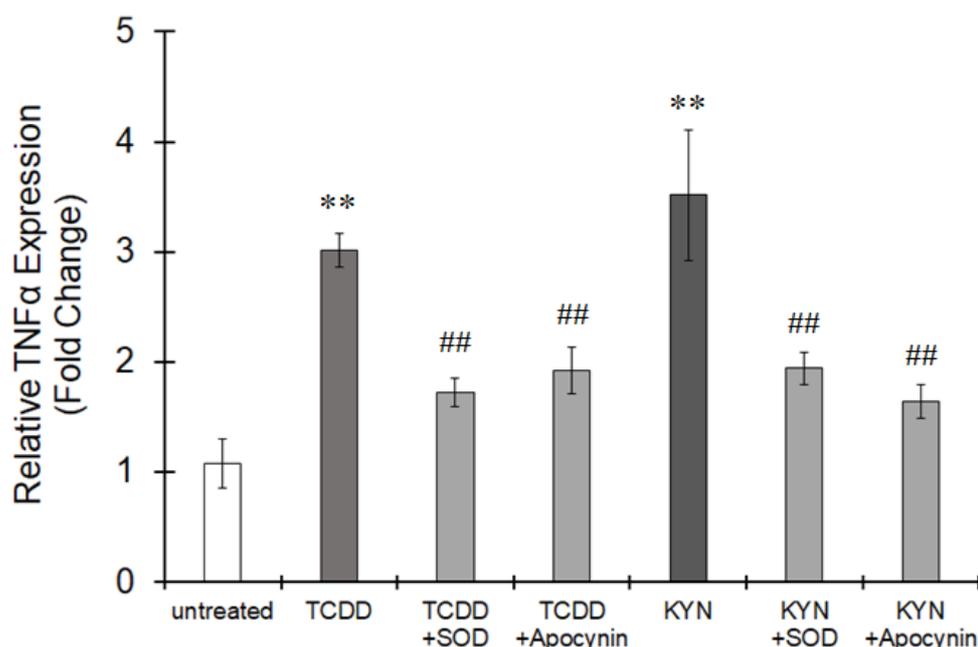


Fig. 47 AhR 刺激下における NOX 由来の活性酸素による TNF- α 発現上昇

THP-1 マクロファージを用いて、スーパーオキシドディスムターゼ-ポリエチレングリコール (100 units/mL) またはアポシニン (300 μ M) の存在下または非存在下において、TCDD (10 nM) または KYN (50 μ M) を 6 時間処置した。TNF- α の発現は Real-time PCR で評価した。The values represent the mean S.E. (n = 5). The data were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test or Student's t-test. ** p < 0.01 vs. the untreated group. ## p < 0.01 vs. the TCDD- or KYN-treated group.

4.3.7 炎症下のミクログリアにおける p47phox 発現

次に、AhR アゴニストがミクログリア p47phox に及ぼす影響について検討した。ミクログリア細胞株 BV-2 は炎症下においては AhR を発現しないため (data not shown), マウス初代培養ミクログリアを使用した。KYN または TCDD を処置すると、マウス初代培養ミクログリアにおける p47phox 発現が有意に増加した (Fig. 48)。以上より、AhR 依存的な p47phox の発現増加は、酸化ストレスや神経炎症に関与する可能性が示された。

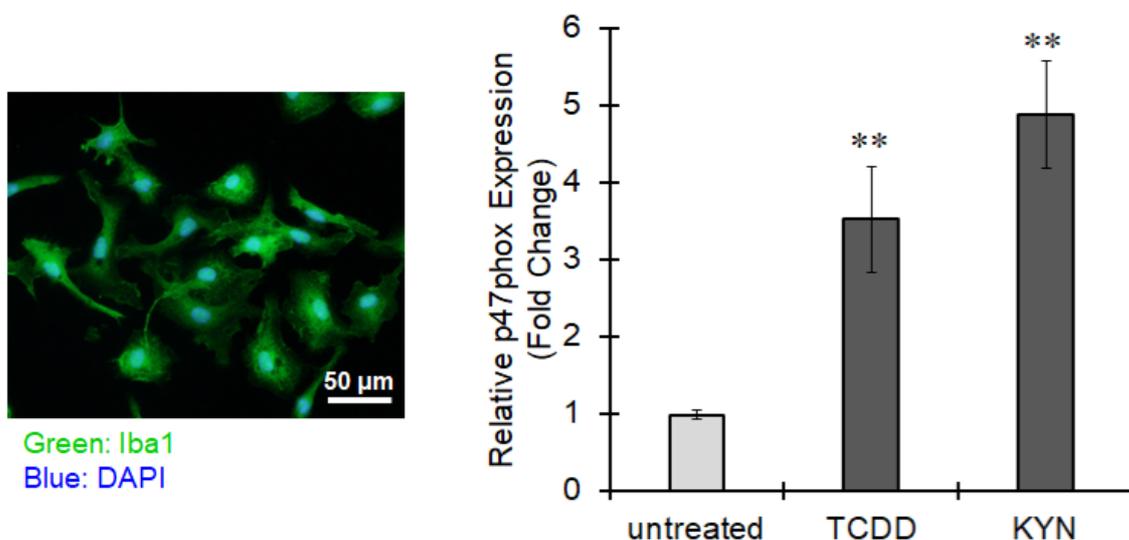


Fig. 48 マウス初代ミクログリアにおける AhR アゴニストによる p47phox の発現上昇

(左) Iba1 (緑) および DAPI (青) により染色した培養マウス初代ミクログリアの代表画像. (右) マウス初代ミクログリアを TCDD (10 nM) または KYN (50 μM) で 6 時間処理し, p47phox の発現を Real-time PCR により評価した. The values represent the mean S.E. (n = 4). The data were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. ** p < 0.01 vs. the untreated group.

4.3.8 虚血後マウス脳における p47phox 発現と酸化ストレス惹起

pMCAO から 3, 6 時間後の大脳皮質と線条体において, p47phox mRNA の発現が増加した (Fig. 49). さらに, この上昇はミノサイクリンの虚血前投与により有意に抑制された. このことから, 虚血後のミクログリア活性化により p47phox の発現が上昇することが示唆された. 酸化ストレスの指標である TBARS レベルは, pMCAO から 24 時間後の線条体と大脳皮質において有意に上昇した. さらに, CH223191 の投与は大脳皮質における TBARS レベルの上昇を顕著に抑制した. したがって, 虚血後には AhR 依存的な酸化ストレスが惹起される可能性がある.

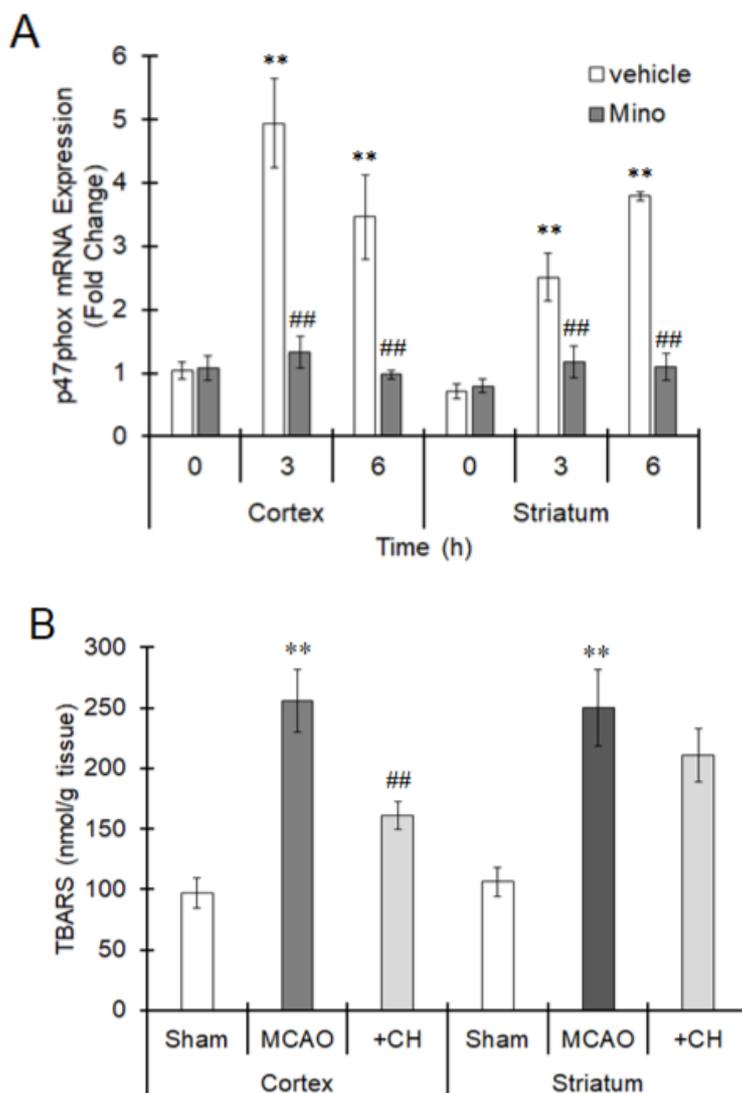


Fig. 49 虚血条件下における p47phox 発現と酸化ストレスの増加

(A) マウスにミノサイクリン (Mino; 100 mg/kg) を腹腔内投与し、1時間後に pMCAO を施した。pMCAO から 0 時間 (Sham operation), 3, 6 時間後に脳を摘出して大脳皮質と線条体を採取し、p47phox の mRNA 発現を real-time PCR で評価した。The values represent the mean S.E. (n = 5). The data were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. ** p < 0.01 vs. the 0 h group. ## p < 0.01 vs. the vehicle group. (B) マウスに CH223191 (CH; 10 mg/kg) を腹腔内投与し、30 分後に pMCAO を施した。pMCAO から 24 時間後に脳を摘出して大脳皮質と線条体を採取し、過酸化脂質濃度を測定した。The values represent the mean S.E. (n = 5). The data were analyzed using one-way ANOVA followed by Student's t-test. Multiple comparisons were made using Holm's correction. ** p < 0.01 vs. the sham group. ## p < 0.01 vs. the MCAO group.

4.3.9 虚血下における内因性 AhR アゴニスト

トリプトファン (tryptophan; Trp) 代謝産物であるキヌレニン (kynurenine; Kyn) やキヌレニン酸 (kynurenic acid; KA) は, AhR に対してアゴニスト活性を示す内因性リガンドであることが近年報告された (Opitz *et al.*, 2011). インドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ (indolamine-2,3-dioxygenase; IDO) は Trp 代謝経路の律速酵素である (Platten *et al.*, 2019). 虚血後マウス脳を用いて IDO1 の発現を調べると, pMCAO の 3 時間後および 6 時間後に IDO の mRNA 発現が上昇した (Fig. 50). このことから, Trp 代謝産物が脳虚血下における AhR 内因性リガンドとして作用することが示唆される.

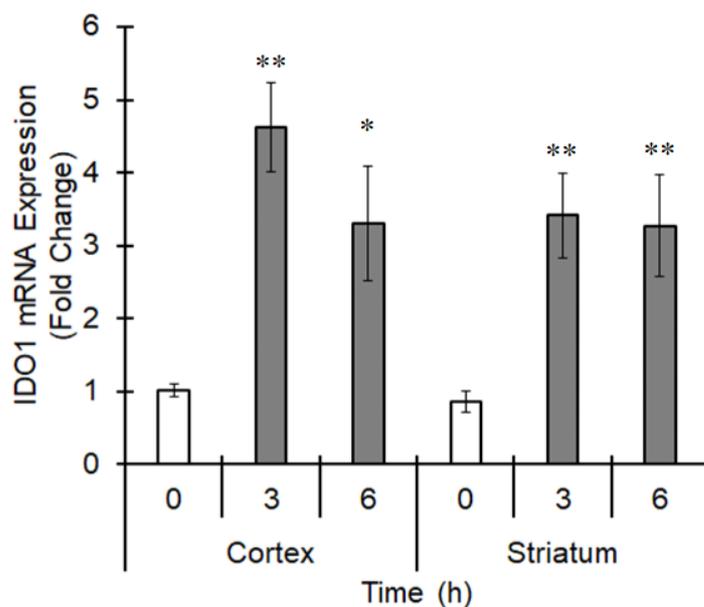


Fig. 50 虚血後マウス脳における IDO1 発現上昇

マウスに pMCAO を施し, pMCAO から 0 時間 (Sham operation), 3, 6 時間後に脳を摘出して大脳皮質と線条体を採取した. IDO1 mRNA 発現を Real-time PCR で評価した. The values represent the mean S.E. (n = 5). The data were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. the 0 h group.

4.4 考察

4.4.1 AhR 遺伝子型とリガンド感受性

AhR は動物種もしくは系統により遺伝子型が異なっており、これらの違いはリガンドへの反応性の差として表れる。Kranslerらの研究においては、反応性の高いモルモットと反応性低いハムスターの間では、AhR リガンドである TCDD への耐性について少なくとも 1,000 倍の差が生じることが示されている (Kransler, McGarrigle and Olson, 2007)。マウスにおいては AhR^{b-1}, AhR^{b-2}, AhR^{b-3} と AhR^d という 4 つの異なる対立遺伝子が存在している (Zhang, 2011)。これらは bHLH ドメイン, PAS ドメイン, transactivation を含むが、リガンドへの親和性が異なる (Curran *et al.*, 2012)。AhR^b 遺伝子はリガンド結合親和性が高い一方で、AhR^d 遺伝子は結合親和性が低い。この差は 37 位に存在するアミノ酸残基の違いによるものであり、AhR^{b-1}, AhR^{b-2}, AhR^{b-3} の 3 つの遺伝子における 375 位はアラニン残基であるが、AhR^d 遺伝子の 375 位にはバリン残基である (Poland, Palen and Glover, 1994)。本研究で用いた ICR マウスは 375 位にアラニン残基が存在するため、リガンドと高い親和性で結合する AhR^b をもっていると考えられる。

加えて、AhR の反応性に関しては、遺伝子型のみならず AhR とその結合タンパク質である ARNT の発現量も重要である (Jana *et al.*, 1998)。ICR マウスは C57B6L マウスと比較して AhR 発現レベルが極めて低く (Zhang *et al.*, 2004)、リガンドに対して低い反応性を示す。なお、ヒト AhR の 381 位 (マウスの 375 位に相当する) アミノ酸はバリン残基であり、リガンドへの結合親和性が低い (Okey *et al.*, 2005)。重要なことに、ICR マウスとヒトの AhR の反応性は極めて近いことが報告されている (Zhang *et al.*, 2004)。これまで AhR を標的とした疾患研究においては、C57BL6 マウスが頻用されてきた (Cuartero *et al.*, 2014; W.-C. Chen *et al.*, 2019)。しかし、C57BL6 マウスのもつ遺伝子型はリガンドへの反応性が高い AhR^{b-1} であるうえ発現量も多いためヒトへの外挿性には疑問が残る。よって、AhR の作用を検討する際には、AhR の遺伝子型と発現量を考慮し結果を解釈することが重要である。

4.4.2 脳虚血下における AhR リガンド

AhR は 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) の受容体として初めて同定された (Poland, Glover and Kende, 1976; Poland and Knutson, 1982). TCDD やポリ塩化ビフェニル (polychlorinated biphenyl; PCB) などのハロゲン化芳香族炭化水素 (halogenated aromatic hydrocarbon; HAHs) の他にも, benzo[a]pyrene, benz[a]anthracene など多環芳香族炭化水素 (polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs) などの多数の有毒な生体異物が AhR の外因性リガンドとなることが古くから知られている. 近年では, AhR が発生過程において発現上昇すること (Choudhary *et al.*, 2003; Campbell *et al.*, 2005) や AhR 欠損マウスでは発生や生理状態に異常が生じること (Fernandez-Salguero *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1996; Lahvis *et al.*, 2005) が判明したことにより, AhR の内因性リガンドの存在が注目されつつある (Table. 10).

虚血時の内因性 AhR リガンドとして着目されているものとして, トリプトファン (tryptophan; Trp) 代謝産物がある. 哺乳類における主要なトリプトファン代謝経路はキヌレニン経路 (kynurenine pathway; KP) であり (Fig. 51), 脳虚血障害に対する KP の関与は 1993 年に Saito らのグループにより初めて報告された (Saito, T. S. Nowak, *et al.*, 1993; Saito, T. S. Nowak Jr, *et al.*, 1993). 彼らは, 虚血から数日後にキノリン酸 (quinolinic acid; QUIN) レベルが上昇しており, この上昇は神経細胞の損傷領域と相関することを報告した. 他にも, キヌレニン (kynurenine; Kyn) やキヌレニン酸 (kynurenic acid; KA) が虚血後の脳障害を増悪させることが, 脳卒中モデルマウスや患者の両方において報告されている. たとえば, 脳梗塞モデルマウスに永久虚血を誘導すると, 虚血 3, 16, 24 時間後に脳組織中 Kyn 量が有意に上昇した (Cuartero *et al.*, 2014). この時の脳内では, Trp から Kyn への代謝を担うトリプトファン-2,3-ジオキシゲナーゼ (tryptophan-2,3-dioxygenase; TDO) の mRNA 量, タンパク質量ともに増加が認められた. また, 脳卒中患者は健康な 80 歳以上の男女と比較して, 発症 24 時間後の血漿中 Kyn 量や Kyn:Trp 比が有意に増加したことに加え, 発症 21 日後までの早期に死亡した患者は生存した患者と比較して発症 1 週間後までの血漿中 KA 濃度や Kyn:Trp 比が有意に高いことが報告されている (Darlington *et al.*, 2007). 以上より, KP が脳梗塞の予後増悪と強く関連することが示されており, 脳虚血時の内因性リガンドは Kyn や KA などの Trp 代謝産物であることが考えられる.

Table. 10 内因性の AhR リガンド

引用元：(Gutiérrez-Vázquez and Quintana, 2018).

Group	Compound	Origin
Indole Metabolites	Indole	Dietary metabolite and microbiota metabolism
	Indolo[3,2-b]carbazole (ICZ)	Dietary metabolite
	2-(Indol-3-ylmethyl)-3,3'-diindolylmethane (Ltr-1)	Dietary metabolite
	3,3'-Diindolylmethane (DIM)	Dietary metabolite
	2-(1'H-indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester (ITE)	Endogenous/Chemical process
Phytochemicals	Indigorubin	Plants
	Indigo	Plants
Tryptophan Metabolites	Kynurenine (Kyn)	Host Metabolism
	Kynurenic acid (KA)	Host Metabolism
	Zanthurenic acid	Host Metabolism
	Cinnabarinic acid (CA)	Host Metabolism
	6-Formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ)	Photo-oxidation
	5-hydroxy-tryptophan (5HTP)	Host Metabolism
	Tryptamine (TA)	Microbiota metabolism
	Indol-3-acetic Acid (IAA)	Microbiota metabolism
	3-methylindole (Skatole)	Microbiota metabolism
	Indole-3-aldehyde (IAld)	Microbiota metabolism
	Indoxyl-3-sulfate (I3S)	Microbiota and Host Metabolite
Heme-derived	Bilirubin	Host Metabolism
	Biliverdin	Host Metabolism
Arachidonic Acid Metabolites	Lipoxin 4A	Host Metabolism
	Prostaglandin PGG2	Host Metabolism
	Hydroxyeicosatrienoic acid ([12(R)-HETE])	Host Metabolism

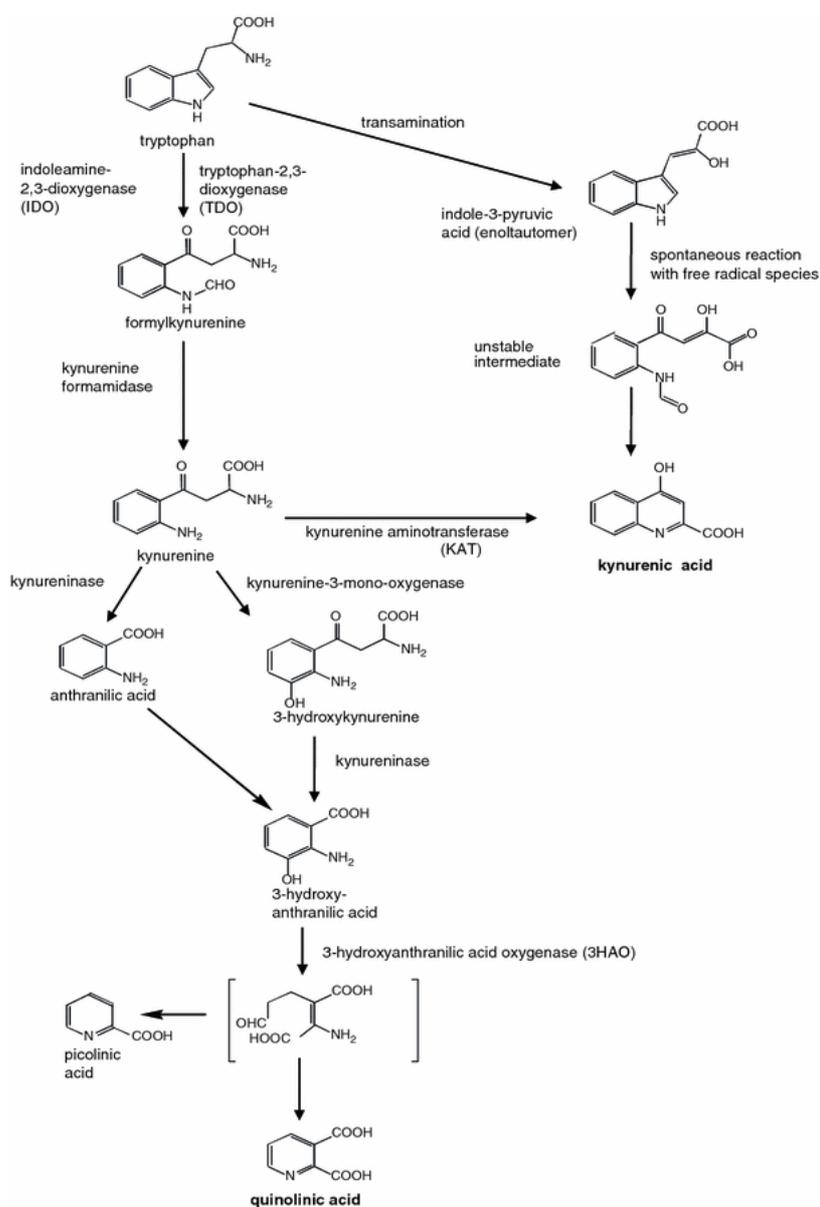


Fig. 51 キヌレニン経路

引用元：(Stone *et al.*, 2012)

4.4.3 内因性 AhR リガンドの産生細胞

キヌレニン経路 (kynurenine pathway; KP) は哺乳類における Trp の主要な代謝経路である。Trp はタンパク質の生合成に用いられる必須アミノ酸であり、セロトニンやメラトニンなど、いくつかの生理活性分子の前駆体でもある。Trp の約 90% は肝臓で TDO により Kyn に代謝され、肝外組織における KP を介した Trp 分解に対する寄与率 5-10% と非常に低い (Badawy, 2017)。TDO は肝臓に特異的であるが、発生期のマウス脳においては 2 種類の TDO バリエントが同定されている (Kanai, Nakamura and Funakoshi, 2009)。

肝外組織、特に免疫系や中枢神経系の細胞では、この経路の律速酵素である IDO に Trp の分解により KP が開始され、その後 2 つの主要な経路に分岐する。1 つは神経保護的に作用する経路、もう 1 つは神経障害的に作用する経路であり、これらは細胞腫により分類される (Fig. 52)。生理的条件下では、脳内のキヌレニンのほとんどが、主にアストロサイトに発現するキヌレニンアミノトランスフェラーゼ (kynurenine aminotransferase; KAT) の働きにより NMDA および $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体拮抗薬のキヌレン酸に代謝され、神経保護経路を活性化する (Zwilling *et al.*, 2011)。炎症状態下では、キヌレニン-3-モノオキシゲナーゼ (kynurenine 3-monooxygenase; KMO) を介して代謝が進行し、3-ヒドロキシキヌレニン (3-Hydroxykynurenine; 3-HK) やキノリン酸 (quinolinic acid; QUIN) などの毒性代謝物を生成する (Cuartero *et al.*, 2016; Badawy, 2017)。KMO は、主にミクログリアやマクロファージに高発現している (Parrott and O'Connor, 2015)。本研究においては AhR 下流で神経障害的な作用が発現したことを考慮すると、AhR リガンドの主な産生源はミクログリア/マクロファージであると推察される。

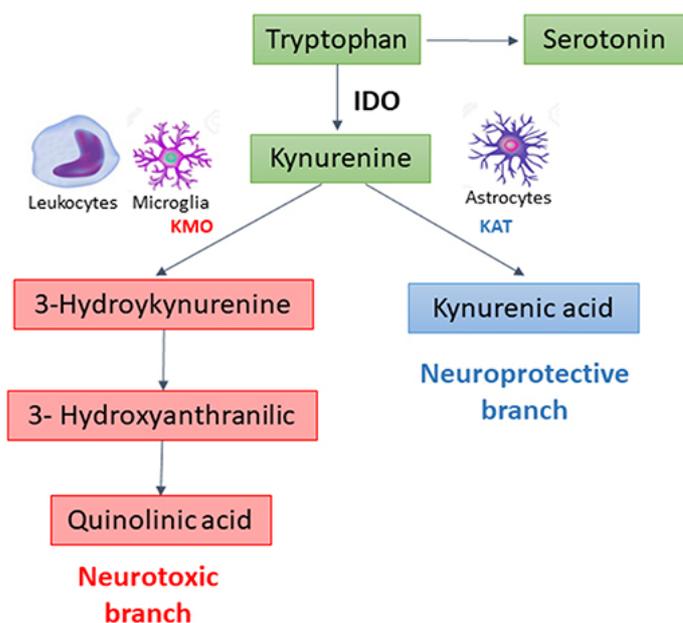


Fig. 52 神経障害的または神経保護的なキヌレニン経路と各種代謝酵素の産生細胞
引用元：(Colpo *et al.*, 2019).

4.4.4 外因性 AhR リガンドによる脳梗塞予後への影響

本研究では、内因性リガンドである Kyn や KA などの Trp 代謝産物による AhR 活性化を介して神経炎症が惹起され、虚血後の脳障害が悪化することが明らかになった。興味深いことに、AhR の外因性リガンドとなりうる微小粒子状物質 (particle matter 2.5; PM2.5) への曝露により脳梗塞予後が悪化するとの疫学結果が近年増加している。PM2.5 は「粒径が 2.5 μm の粒子を 50% の割合で分離できる分粒装置を用いて、より粒径の大きい粒子を除去した後に採取される微小粒子」と定義されるものである (今井浩孝, 小椋康光, 2020)。PM2.5 は多環芳香族炭化水素 (polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs) などの AhR の外因性リガンドが多量に含まれており、体内深部へ侵入しやすいため毒性が高いと考えられる。本邦では、PM2.5 が呼吸器や循環器へ悪影響を及ぼすとの国内外の疫学知見をもとに環境基準濃度を「1年平均 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下かつ1日平均 35 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下」に定めている。しかし、中国や東南アジアなどの地域では 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3/\text{day}$ を超える日が多く、1時間あたりの最大値としては北京で 993 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ が観測された例も存在する (Uno *et al.*, 2014)。

PM2.5 曝露による脳梗塞予後の増悪を示す疫学報告としては、Miller らの研究がある (Miller *et al.*, 2007)。この研究によると、PM2.5 濃度が 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 上昇することにより脳血管

障害による死亡リスクが83%増加することが明らかになった。これらのデータはPM濃度3.4-28.3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ における解析結果であるため、比較的低濃度のPM2.5曝露によっても脳梗塞による死亡率が上昇すると考えられる。ほかにも、PM2.5濃度が10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 上昇することにより脳梗塞発症後の致死率が有意に増加し、入院期間が有意に長期化することが複数報告されている (Yang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017; G. Chen *et al.*, 2019)

現在、当研究室においてPM2.5の鼻腔内曝露により脳梗塞予後が顕著に悪化するとのデータを得ている(未発表データ)。AhRの外因性リガンドである多環芳香族炭化水素(polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs)を多量に含むPM2.5をマウスに7日曝露し(100 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$)、Photothrombosisにより脳虚血を誘導すると、対照群であるSaline投与群と比較して虚血7日後までの運動機能や梗塞巣体積が有意に悪化した。また、PM2.5曝露後のマウス脳内における遺伝子発現を解析すると、IL-1 β 、TNF- α などのサイトカイン発現が増加傾向を示した。重要なことに、有機溶媒によりPAHsを除去したPM2.5 (PM2.5-core)曝露群では、PM2.5曝露群で生じた予後悪化は認められなかった。さらに、AhR遺伝子ノックアウトマウス群にPM2.5を曝露すると脳梗塞後の予後悪化が抑制されることが判明した。以上の結果より、外因性リガンドであるPAHsによってもAhRを介した神経炎症が惹起され、脳梗塞予後が増悪する可能性が示唆された。

他のさまざまな中枢神経系疾患についてもPM2.5により病態が増悪、または発症リスクが上昇することが明らかになりつつある。たとえば、近年、PM曝露により認知症 (Cacciottolo *et al.*, 2017; Shou *et al.*, 2019; Grande *et al.*, 2020; Patten *et al.*, 2021) やうつ病 (Braithwaite *et al.*, 2019) の発症リスクが増加することが疫学研究により報告された。このようにAhRは脳梗塞を含む多くの神経炎症疾患の病態形成に強く関与する可能性があるにもかかわらず、その分子メカニズムはほとんど解明されていない。今後、AhRを介した神経炎症について分子レベルでの解明が進むことが期待される

総括および結論

脳梗塞は脳血管の閉塞により脳の血液循環が障害される疾患であり、重度の神経機能障害をもたらすことで生涯にわたり患者の生活の質 (quality of life; QOL) を悪化させる。その罹患率は極めて高いうえ高齢化進行による患者数の急増が危惧されており、患者の QOL 向上は全世界において喫緊の課題である。QOL 向上のためには急性期の治療が重要である。しかし、2022 年現在、最も有効な治療法である静注血栓溶解療法や血栓回収療法は適用条件が厳しいため、9 割以上の患者は適応外 (禁忌) となり血流回復による治療が不可能である。

脳梗塞発症後、虚血の持続により種々の二次障害が生じ、病態が重症化する。なかでも脳浮腫は脳実質に過剰量の水分が蓄積するものであり、脳体積増大による脳機能低下や脳ヘルニアを発生させることで患者の転機を著しく悪化させる。脳浮腫の軽減は非常に重要な臨床課題であるが、詳細な病態形成メカニズムは不明であるために根治療法は存在しない。脳浮腫は水分の蓄積場所により 2 つに大別される。血管原性浮腫は血液脳関門 (blood brain barrier; BBB) の機能障害により細胞外腔に水分が蓄積する浮腫であり、脳体積増加の直接的な原因となる。主な研究対象は Aquaporine 4 (AQP4) などの水チャネルやイオントランスポーターであり、水の流入抑制を狙いとしている。しかし、これらの因子は水の排出経路としても機能するため顕著な効果は期待しがたい。

水の流入制御に代わる治療法として、炎症制御がある。血管原性浮腫の病態形成には BBB の機能障害が重要であることから、血管透過性亢進に関与する因子の発現制御が有効だと考えられる。虚血後には中枢神経系の免疫細胞ミクログリアや、好中球、T 細胞、B 細胞などの末梢からの浸潤細胞により種々の血管透過性亢進因子が産生される。しかし、永久虚血下ではこれらの浸潤細胞の増加は認められず、治療効果が乏しいことが動物モデルを用いた研究により報告されている。さらに、脳梗塞患者の脳組織標本を用いた病理解析においても顕著な活性化を示すのはミクログリアであることが報告されている。上述の背景を踏まえ、永久虚血下において生じる血管原性浮腫の形成および進行過程を精査し、特にミクログリアに着目して有望な治療標的を見出すべく、2015 年より研究を開始した。

第2章では、永久虚血下において生じる脳浮腫の形成過程を時空間的に解析した。脳浮腫を評価する際には、一般的に、乾湿重量測定法が用いられる。しかしこの手法は脳水分量を算出できるのみであり、脳浮腫の動態については明らかにできない。そこで、生体内に存在する水素原子核(プロトン)の空間分布を解析することにより水分量の多い領域を描出できる核磁気共鳴画像法(magnetic resonance imaging; MRI)を用いた。T2強調画像(T2-weighted image; T2WI)によりマウス脳を撮像すると、線条体を含む虚血中心部において水分量が上昇をはじめ、時間経過により浮腫範囲が増大することが明らかになった。TTC染色により脳虚血後の死細胞塊(梗塞巣)を同定すると、浮腫が生じた領域ではその後に梗塞巣が形成されることが判明した。さらにT2WIとTTC染色画像の重ね合わせにより血管原性浮腫を描出した結果、血管原性浮腫は虚血6時間後から虚血中心部において生じ、時間の経過とともに虚血辺縁部へと進行することが判明した。

第3章では、第2章で明らかにした血管原性浮腫の形成過程におけるミクログリアの役割を調べた。浮腫形成前後の各タイムポイントにおいてIba1とCD68の二重免疫蛍光染色や炎症性因子の発現解析を行い、ミクログリア活性状態を評価した。その結果、ミクログリアは虚血中心部において顕著な活性化をはじめ、時間経過とともに虚血辺縁部へと活性化が進行する様子が認められた。炎症性因子による内皮細胞への影響を調べるため、マウス脳微小血管内皮細胞bEnd.3を培養した。TNF- α とIL-6を処置すると、タイトジャンクションタンパク質(tight junction proteins; TJPs)発現が顕著に低下しており、これらの炎症性因子が血管透過性を亢進させることで血管原性浮腫が形成されることが示唆された。さらに、ミクログリア活性化抑制による血管原性浮腫への影響を検討するためミノサイクリン(minocycline; MINO)を投与すると、MINO投与群では血管原性浮腫の進行が顕著に抑制され、虚血24時間後の神経機能障害が有意に改善された。

第4章では、虚血後の炎症制御因子として芳香族炭化水素受容体(AhR)に着目した解析を行なった。炎症下においてAhRは、外部環境に応じて相反する炎症反応を惹起する。しかし、虚血性脳浮腫に対する作用は不明であるため、神経炎症および血管原性浮腫におけるAhRの役割を検討した。虚血後マウス脳では、AhR下流標的遺伝子である薬物代謝酵素CYP1A1や炎症関連因子IL-1 β 、TNF- α およびCOX-2が発現上昇した。AhR阻害剤CH223191を投与すると、これらの遺伝子の発現増加や血管原性浮腫の形成、および神経障害度が抑制され、AhR阻害により虚血後の脳障害が改善することが示された。THP-1マクロファージにAhRリガンドを処置すると、特に炎症条件下においてNADPH oxidase(NOX)サブユニットp47phoxが有意に発現上昇した。アポシニン処置によるNOX活性の

抑制, または Super oxide dismutase (SOD) 処置によるスーパーオキシドの除去を行うと, AhR リガンドにより誘導される TNF- α 発現が減少した. また, AhR リガンドはマウス初代ミクログリアにおいて p47phox の発現を惹起した. したがって, p47phox は酸化ストレスとそれに続く炎症に重要である可能性がある. 中大脳永久閉塞中術 (permanent middle cerebral artery occlusion; pMCAO) モデルマウスでは, 虚血によりミクログリアでの P47phox の発現が上昇した. pMCAO によって誘導された脂質過酸化は, CH223191 によって抑制された. これらの結果より, 虚血後の神経炎症および血管原性浮腫の発生には, p47phox の発現上昇とそれに続く酸化ストレス亢進が関与することが示唆された.

本研究では永久虚血下において生じる脳浮腫の時空間的な形成過程を精査し, 虚血中心部から虚血辺縁部へと血管原性浮腫が進行する様子を明らかにした. また, 血管原性浮腫の形成に先行してミクログリアが活性化の様相を呈し, 血管透過性亢進因子による内皮細胞 TJPs の発現低下により血管原性浮腫が形成される可能性を示した. さらに, ミクログリアの炎症制御因子として AhR に着目し, AhR-NOX2 経路を介した神経炎症の抑制により血管原性浮腫を軽減できることを明らかにした. 以上, 本研究により得られた知見は脳虚血における AhR の病態生理学的役割の一端を示すものであり, 脳浮腫の治療薬開発に資する基礎的知見を提供するものである.

研究業績一覧

発表論文

主論文を構成する論文

- **Miki Tanaka**, Yasuhiro Ishihara, Shodo Mizuno, Atsuhiko Ishida, Christoph F. Vogel, Mayumi Tsuji, Takeshi Yamazaki, and Kouichi Itoh. 2018. “Progression of Vasogenic Edema Induced by Activated Microglia under Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 496 (2): 582–87.
- **Miki Tanaka**, Masaho Fujikawa, Ami Oguro, Kouichi Itoh, Christoph F. A. Vogel, and Yasuhiro Ishihara. 2021. “Involvement of the Microglial Aryl Hydrocarbon Receptor in Neuroinflammation and Vasogenic Edema after Ischemic Stroke.” *Cells* 10 (4). <https://doi.org/10.3390/cells10040718>.

その他の論文

- Ishihara, Yasuhiro, Kouichi Itoh, **Miki Tanaka**, Mayumi Tsuji, Toshihiro Kawamoto, Suguru Kawato, Christoph F. A. Vogel, and Takeshi Yamazaki. 2017. “Potentiation of 17 β -Estradiol Synthesis in the Brain and Elongation of Seizure Latency through Dietary Supplementation with Docosahexaenoic Acid.” *Scientific Reports* 7 (1): 6268.

学会発表

国際学会発表 (ポスター発表)

- **Miki Tanaka**, Yasuhiro Ishihara, Kouichi Itoh, Atsuhiko Ishida, Takeshi Yamasaki. “A Role of Microglia in the Progression of Ischemic Brain Edema”, *Neuroscience 2017* (Washington D.C.), 2017/11/12
- **Miki Tanaka**, Yasuhiro Ishihara, Kouichi Itoh, Christoph F. A. Vogel, Atsuhiko Ishida, Takeshi Yamasaki. “A role of aryl hydrocarbon receptor in vasogenic brain edema”, *Neuroscience 2018* (San Diego), 2018/11/06
- **Miki Tanaka**, Kouichi Itoh, Yasuhiro Ishihara. “Activated microglia in ischemic stroke aggravate brain edema in mice”, *Glia in Health & Disease* (Online), 2020/07/16-19

国内学会発表 (ポスター発表)

- **田中美樹**, 石原康宏, 伊藤康一, 石田敦彦, 山崎岳, 「A Role of Microglia in the Progression of Ischemic Brain edema」, 第40回日本神経科学大会 (幕張), 2017年07月21日
- **田中美樹**, 石原康宏, 伊藤康一, 石田敦彦, 山崎岳, 「脳浮腫の進展における芳香族炭化水素受容体 (AhR)の役割」, 日本薬学会第138年会 (金沢), 2018年03月26日
- **田中美樹**, 伊藤康一, 鍋谷悠, 石原康宏, 「大気中微粒子曝露による脳梗塞予後への影響の解析」, 第47回日本毒性学会学術年会 (オンライン), 2020年06月29日

国内学会発表 (口頭発表)

- **田中美樹**, 石原康宏, 伊藤康一, 石田敦彦, 山崎岳, 「虚血により生じる脳浮腫とミクログリア活性化との関連」, 第55回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 (岡山), 2016年11月06日
- **田中美樹**, 石原康宏, 伊藤康一, 石田敦彦, 山崎岳, 「虚血による脳浮腫の形成におけるミクログリアの役割」, 第58回日本生化学会 中国・四国支部例会 (高松), 2017年05月20日
- **田中美樹**, 石原康宏, 伊藤康一, 石田敦彦, 山崎岳, 「ミクログリアの芳香族炭化水素受容体 (AhR) は脳浮腫を進行させる」, 第133回日本薬理学会 近畿支部会 (広島), 2018年06月01日
- **田中美樹**, 伊藤康一, 鍋谷悠, 石原康宏, 「マウスへの微小粒子状物質 (PM2.5)曝露による炎症誘発と脳梗塞予後の増悪」, 第137回日本薬理学会 近畿支部会 (オンライン), 2020年06月20日
- **田中美樹**, 伊藤康一, 鍋谷悠, 石原康宏, 「浮遊粒子状物質曝露マウスを用いた脳梗塞予後への影響の解析」, 第61回日本生化学会 中国・四国支部例会 (オンライン), 2020年07月13日
- **田中美樹**, 伊藤康一, 鍋谷悠, 石原康宏, 「マウスへの微小粒子状物質 (PM2.5)曝露による炎症誘発と脳梗塞予後の増悪」, 第93回日本生化学会大会 (オンライン), 2020年09月14日

- 田中美樹, 大黒亜美, 鍋谷悠, 奥田知明, 伊藤康一, 石原康宏, 「微小粒子状物質 (PM2.5) 曝露による虚血性炎症の亢進と脳梗塞予後の増悪」, 第 48 回日本毒性学会 学術年会 (神戸), 2021 年 07 月 07 日

その他参考となるもの

学会発表賞

- 2017 年 05 月 21 日, 第 58 回日本生化学会中国・四国支部例会, 学術奨励賞
- 2018 年 06 月 01 日, 第 133 回日本薬理学会近畿部会, 学生優秀発表賞
- 2020 年 07 月 01 日, 第 47 回日本毒性学会学術年会, 学生ポスター発表賞
- 2021 年 07 月 09 日, 第 48 回日本毒性学会学術年会, 優秀研究発表賞

その他の発表賞

- 2019 年 06 月 30 日, 未来博士 3 分間コンペティション 2019 広島大学大会, オーディエンス賞 (日本語部門)
- 2019 年 06 月 30 日, 未来博士 3 分間コンペティション 2019 広島大学大会, 優秀プレゼンテーション銀賞 (日本語部門)
- 2019 年 09 月 14 日, 未来博士 3 分間コンペティション 2019, 優秀賞 (日本語部門)
- 2019 年 09 月 14 日, 未来博士 3 分間コンペティション 2019, JSW 日本製鋼所賞
- 2019 年 11 月 16 日, 広島大学大学院 統合生命科学研究科 生命医科学セミナー2019, 優秀発表賞
- 2020 年 10 月 24 日, 広島大学大学院 統合生命科学研究科 生命医科学セミナー2020, 優秀発表賞

助成金および奨学金の採択

- 2019年05月31日, 独立行政法人日本学生支援機構, 大学院第一種奨学金 全額返還免除, 211.2万
- 2019年06月03日, 一般財団法人 中辻創智社, 会議開催費助成, 40万
- 2019年06月18日, 公益財団法人 テルモ生命科学振興財団, 国際交流助成金, 50万
- 2019年07月26日, 公益財団法人 サントリー生命科学財団, 学術集会助成, 5万
- 2019年11月11日, 統合生命科学研究科 生命医科学プログラム奨学生, 30万
- 2020年03月24日, 公益財団法人 テルモ生命科学振興財団, 国際交流助成金, 50万
- 2020年04月24日, 日本学術振興会 特別研究員 DC2 (研究課題: 20J10103), 700万 (特別研究員奨励費 220万円, 研究奨励金 480万円)
- 2020年04月27日, 公益財団法人 サントリー生命科学財団, 学術集会助成, 5万
- 2020年05月28日, 一般財団法人 中辻創智社, 会議開催費助成, 30万

学会誌および学会 HP への掲載

- 2019年12月, 公益社団法人 日本生化学会, 学会誌「生化学」, 第91巻, 第6号, pp. 841-842, 「生化学若い研究者の会『第59回 生命科学夏の学校』開催報告」
- 2020年08月, 一般社団法人 日本毒性学会, 学会 HP, 「毒性研究者紹介」
- 2020年12月, 公益社団法人 日本生化学会, 学会誌「生化学」, 第92巻, 第6号, pp. 872-873, 「生化学若い研究者の会『第60回 生命科学夏の学校』開催報告」
- 2021年08月, 一般社団法人 日本毒性学会, 学会 HP 「毒性研究者紹介」
- 2021年10月, 一般社団法人 日本毒性学会, 学会 HP 「毒性用語解説」

略語一覧

略語	正式名称
•O ₂ -	スーパーオキサイドアニオンラジカル (superoxide anion radical)
3-HK	3-ヒドロキシキヌレニン (3-hydroxykynurenine)
3HMP	(3-hydroxymethyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl)
AhR	芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor)
BBB	血液脳関門 (blood-brain barrier)
C11H ₂₄ O ₄	1,1,3,3-テトラメトキシプロパン (1,1,3,3-Tetramethoxypropane)
CCA	総頸動脈 (common carotid artery)
COX-2	シクロオキシゲナーゼ-2 (cyclooxygenase-2)
DAMPs	ダメージ関連分子パターン (damage-associated molecular patterns)
DAPC	ジストロフィン関連タンパク質複合体 (dystrophin-associated protein complex)
DDC	ジエチルジチオカルバメート (diethyldithiocarbamate)
DMEM	ダルベッコ改変イーグル培地 (dulbecco's modified eagle medium)
DMNQ	2,3-ジメトキシ-1,4-ナフトキノン (2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone)
DMSO	ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide)
DRE	ダイオキシン応答配列 (dioxin responsive element)
DWI	拡散強調画像 (diffusion weighted image)
ECA	外総頸動脈 (external carotid artery)
EtOH	エタノール (ethanol)
FBS	ウシ胎児血清 (fetal bovine serum)

ICA	内総頸動脈 (internal carotid artery)
IDO	インドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ (indolamine 2,3-dioxygenase)
KAT	キヌレニンアミノトランスフェラーゼ (kynurenine aminotransferase)
KMO	キヌレニン-3-モノオキシゲナーゼ (kynurenine 3-monooxygenase)
Kyn	キヌレニン (kynurenine)
LPS	リポポリサッカリド (lipopolysaccharide)
MCA	中大脳動脈 (middle cerebral artery)
mNSS	(modified neurological severity score)
MRI	核磁気共鳴画像 (magnetic resonance imaging)
NaOH	水酸化ナトリウム (sodium hydroxide)
NMDA	N-メチル-D-アスパラギン酸 (n-methyl-d-aspartate)
NOx	窒素酸化物 (nitrogen oxides)
NOX	NADPH オキシダーゼ (NADPH oxidase)
PAHs	多環芳香族炭化水素 (polycyclic aromatic hydrocarbons)
PBS	リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline)
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction)
PFA	パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde)
PM2.5	微小粒子状物質 (particle matter 2.5)
PMA	13-酢酸 12-ミリスチン酸ホルボール (phorbol 12-myristate 13-acetate)
pMCAO	中大脳動脈永久閉塞術 (permanent middle cerebral artery occlusion)
QOL	生活の質 (quality of life)
QUIN	キノリン酸 (quinolinic acid)

rCBF	局所脳血流量 (regional cerebral blood flow)
RCT	ランダム化比較試験 (randomized controlled trial)
RNA	リボ核酸 (ribonucleic acid)
rt-PA	遺伝子組換え組織プラスミノゲン活性化因子 (recombinant tissue-type plasminogen activator)
SOD	スーパーオキシドディスムターゼ (superoxide dismutase)
T1WI	T1 強調画像 (T1-weighted image)
T2WI	T2 強調画像 (T2-weighted image)
TBARS	2-チオバルビツール酸反応性物質 (2-thiobarbituric acid reactive substances)
TDO	トリプトファン-2,3-ジオキシゲナーゼ (tryptophan 2,3-dioxygenase)
TLCK	トシル-L-リシンクロロメチルケトン (tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride)
TPF	トリフェニルホルマザン (1,3,5-triphenylformazan)
TTC	トリフェニルテトラゾリウムクロライド (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride)
XRE	異物応答配列 (xenobiotic response element)

参考文献

- Abdullah, Z. *et al.* (2015) “Inhibition of TNF- α protects in vitro brain barrier from ischaemic damage,” *Molecular and cellular neurosciences*. Elsevier BV, 69, pp. 65–79.
- Abramoff, M. D. (2007) “ImageJ as an image processing tool and library,” *Microscopy and microanalysis: the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada*. Cambridge University Press (CUP), 13(S02). doi: 10.1017/s1431927607079652.
- Armstead, W. M. *et al.* (1992) “Polyethylene glycol superoxide dismutase and catalase attenuate increased blood-brain barrier permeability after ischemia in piglets,” *Stroke; a journal of cerebral circulation*. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health), 23(5), pp. 755–762.
- Armstead, W. M. (2001) “Vasopressin-induced protein kinase C-dependent superoxide generation contributes to atp-sensitive potassium channel but not calcium-sensitive potassium channel function impairment after brain injury,” *Stroke; a journal of cerebral circulation*. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health), 32(6), pp. 1408–1414.
- Aronson, A. L. (1980) “Pharmacotherapeutics of the newer tetracyclines,” *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 176(10 Spec), pp. 1061–1068.
- Asahi, M. *et al.* (2001) “Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia,” *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(19), pp. 7724–7732.
- Azzi, A., Montecucco, C. and Richter, C. (1975) “The use of acetylated ferricytochrome c for the detection of superoxide radicals produced in biological membranes,” *Biochemical and biophysical research communications*. Elsevier BV, 65(2), pp. 597–603.
- Badaut, J. *et al.* (2014) “Aquaporin and brain diseases,” *Biochimica et biophysica acta*, 1840(5), pp. 1554–1565.
- Badawy, A. A.-B. (2017) “Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: Regulatory and functional aspects,” *International journal of tryptophan research: IJTR*. SAGE Publications, 10, p. 1178646917691938.

- Barza, M. *et al.* (1975) “Relation between lipophilicity and pharmacological behavior of minocycline, doxycycline, tetracycline, and oxytetracycline in dogs,” *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 8(6), pp. 713–720.
- Bedard, K. and Krause, K.-H. (2007) “The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology,” *Physiological reviews*. American Physiological Society, 87(1), pp. 245–313.
- Berrouschot, J. *et al.* (1998) “Mortality of space-occupying (‘malignant’) middle cerebral artery infarction under conservative intensive care,” *Intensive care medicine*, 24(6), pp. 620–623.
- Bhaskar, S. *et al.* (2018) “Reperfusion therapy in acute ischemic stroke: dawn of a new era?,” *BMC neurology*, 18(1), p. 8.
- Braithwaite, I. *et al.* (2019) “Air pollution (particulate matter) exposure and associations with depression, anxiety, bipolar, psychosis and suicide risk: A systematic review and meta-analysis,” *Environmental health perspectives*. Environmental Health Perspectives, 127(12), p. 126002.
- Brott, T. *et al.* (1989) “Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale,” *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 20(7), pp. 864–870.
- Brown, G. C. and Neher, J. J. (2012) “Eaten alive! Cell death by primary phagocytosis: ‘phagoptosis,’” *Trends in biochemical sciences*, 37(8), pp. 325–332.
- Cacciottolo, M. *et al.* (2017) “Particulate air pollutants, APOE alleles and their contributions to cognitive impairment in older women and to amyloidogenesis in experimental models,” *Translational psychiatry*, 7(1), p. e1022.
- Campbell, S. J. *et al.* (2005) “The murine Cyp11a1 gene is expressed in a restricted spatial and temporal pattern during embryonic development,” *The journal of biological chemistry*. Elsevier BV, 280(7), pp. 5828–5835.
- Chamorro, Á. *et al.* (2012) “The immunology of acute stroke,” *Nature reviews. Neurology*. Springer Science and Business Media LLC, 8(7), pp. 401–410.
- Chen, G. *et al.* (2019) “Long-Term Exposure to Air Pollution and Survival After Ischemic Stroke,” *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 50(3), pp. 563–570.

- Chen, J. *et al.* (2001) “Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats,” *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 32(4), pp. 1005–1011.
- Chen, W.-C. *et al.* (2019) “Aryl hydrocarbon receptor modulates stroke-induced astrogliosis and neurogenesis in the adult mouse brain,” *Journal of neuroinflammation*, 16(1), p. 187.
- Chopra, I. and Roberts, M. (2001) “Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance,” *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*. American Society for Microbiology, 65(2), pp. 232–60 ; second page, table of contents.
- Choudhary, D. *et al.* (2003) “Comparative expression profiling of 40 mouse cytochrome P450 genes in embryonic and adult tissues,” *Archives of biochemistry and biophysics*. Elsevier BV, 414(1), pp. 91–100.
- Cohen, S. S. *et al.* (2013) “Effects of interleukin-6 on the expression of tight junction proteins in isolated cerebral microvessels from yearling and adult sheep,” *Neuroimmunomodulation*, 20(5), pp. 264–273.
- Colovic, M. and Caccia, S. (2003) “Liquid chromatographic determination of minocycline in brain-to-plasma distribution studies in the rat,” *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 791(1–2), pp. 337–343.
- Colpo, G. D. *et al.* (2019) “Systematic review on the involvement of the kynurenine pathway in stroke: Pre-clinical and clinical evidence,” *Frontiers in neurology*. Frontiers Media SA, 10, p. 778.
- Crockard, A. *et al.* (1980) “Cerebral blood flow and edema following carotid occlusion in the gerbil,” *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 11(5), pp. 494–498.
- Cserr, H. F. *et al.* (1981) “Efflux of radiolabeled polyethylene glycols and albumin from rat brain,” *The American journal of physiology*, 240(4), pp. F319-28.
- Cuartero, M. I. *et al.* (2014) “L-kynurenine/aryl hydrocarbon receptor pathway mediates brain damage after experimental stroke,” *Circulation*, 130(23), pp. 2040–2051.
- Cuartero, M. I. *et al.* (2016) “The Kynurenine Pathway in the acute and chronic phases of cerebral ischemia,” *Current pharmaceutical design*, 22(8), pp. 1060–1073.
- Curran, C. P. *et al.* (2012) “Ahrd Cyp1a2(-/-) mice show increased susceptibility to PCB-induced developmental neurotoxicity,” *Neurotoxicology*, 33(6), pp. 1436–1442.

- Darlington, L. G. *et al.* (2007) “Altered kynurenine metabolism correlates with infarct volume in stroke,” *The European journal of neuroscience*, 26(8), pp. 2211–2221.
- Desai, T. R. *et al.* (2002) “Interleukin-6 causes endothelial barrier dysfunction via the protein kinase C pathway,” *The Journal of surgical research*. Elsevier BV, 104(2), pp. 118–123.
- Fadini, G. P. *et al.* (2013) “Monocyte-macrophage polarization balance in pre-diabetic individuals,” *Acta diabetologica*, 50(6), pp. 977–982.
- Farr, G. W. *et al.* (2019) “Functionalized Phenylbenzamides Inhibit Aquaporin-4 Reducing Cerebral Edema and Improving Outcome in Two Models of CNS Injury,” *Neuroscience*, 404, pp. 484–498.
- Feigin, V. L. *et al.* (2014) “Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010,” *Lancet*. Elsevier BV, 383(9913), pp. 245–254.
- Feigin, V. L. *et al.* (2022) “World stroke organization (WSO): Global Stroke Fact Sheet 2022,” *International journal of stroke: official journal of the International Stroke Society*. SAGE Publications, 17(1), pp. 18–29.
- Fenske, A. *et al.* (1973) “Extracellular space and electrolyte distribution in cortex and white matter of dog brain in cold induced oedema,” *Acta neurochirurgica*. Springer Nature, 28(1–2), pp. 81–94.
- Fernandez-Salguero, P. *et al.* (1995) “Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor,” *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science (AAAS), 268(5211), pp. 722–726.
- Filbrandt, C. R. *et al.* (2004) “Presence and functional activity of the aryl hydrocarbon receptor in isolated murine cerebral vascular endothelial cells and astrocytes,” *Neurotoxicology*. Elsevier BV, 25(4), pp. 605–616.
- Foerch, C. *et al.* (2008) “The projected burden of stroke in the German federal state of Hesse up to the year 2050,” *Deutsches Arzteblatt international*, 105(26), pp. 467–473.
- Garcia, J. H., Liu, K. F. and Bree, M. P. (1996) “Effects of CD11b/18 monoclonal antibody on rats with permanent middle cerebral artery occlusion,” *The American journal of pathology*, 148(1), pp. 241–248.

- GBD 2016 Lifetime Risk of Stroke Collaborators *et al.* (2018) “Global, Regional, and Country-Specific Lifetime Risks of Stroke, 1990 and 2016,” *The New England journal of medicine*, 379(25), pp. 2429–2437.
- Gelderblom, M. *et al.* (2009) “Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke,” *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 40(5), pp. 1849–1857.
- Ginhoux, F. *et al.* (2013) “Origin and differentiation of microglia,” *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, p. 45.
- Grande, G. *et al.* (2020) “Association Between Cardiovascular Disease and Long-term Exposure to Air Pollution With the Risk of Dementia,” *JAMA neurology*, 77(7), pp. 801–809.
- Gröger, M. *et al.* (2005) “Release of bradykinin and expression of kinin B2 receptors in the brain: role for cell death and brain edema formation after focal cerebral ischemia in mice,” *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. SAGE Publications, 25(8), pp. 978–989.
- Grønberg, N. V. *et al.* (2013) “Leukocyte infiltration in experimental stroke,” *Journal of neuroinflammation*. Springer Science and Business Media LLC, 10(1), p. 115.
- Gutiérrez-Vázquez, C. and Quintana, F. J. (2018) “Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor,” *Immunity*, 48(1), pp. 19–33.
- Hacke, W. *et al.* (1996) “‘Malignant’ middle cerebral artery territory infarction: clinical course and prognostic signs,” *Archives of neurology*, 53(4), pp. 309–315.
- Halstead, M. R. and Geocadin, R. G. (2019) “The Medical Management of Cerebral Edema: Past, Present, and Future Therapies,” *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 16(4), pp. 1133–1148.
- Hanisch, U.-K. (2002) “Microglia as a source and target of cytokines,” *Glia*, 40(2), pp. 140–155.
- Haruwaka, K. *et al.* (2019) “Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation,” *Nature communications*, 10(1), p. 5816.
- Heinemeyer, T. *et al.* (1998) “Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL,” *Nucleic acids research*. Oxford University Press (OUP), 26(1), pp. 362–367.
- Holness, C. L. and Simmons, D. L. (1993) “Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins,” *Blood*, 81(6), pp. 1607–1613.

- Hossmann, V., Hossmann, K. A. and Takagi, S. (1980) “Effect of intravascular platelet aggregation on blood recirculation following prolonged ischemia of the cat brain,” *Journal of neurology*, 222(3), pp. 159–170.
- Iliff, J. J. *et al.* (2012) “A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β ,” *Science translational medicine*. American Association for the Advancement of Science (AAAS), 4(147), p. 147ra111.
- Iliff, J. J. *et al.* (2013) “Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI,” *The journal of clinical investigation*, 123(3), pp. 1299–1309.
- Ishihara, Y. *et al.* (2019) “Interleukin 33 expression induced by aryl hydrocarbon receptor in macrophages,” *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*. Oxford University Press (OUP), 170(2), pp. 404–414.
- Jana, N. R. *et al.* (1998) “Strain differences in cytochrome P4501A1 gene expression caused by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat liver: role of the aryl hydrocarbon receptor and its nuclear translocator,” *Biochemical and biophysical research communications*, 248(3), pp. 554–558.
- Jin, R., Yang, G. and Li, G. (2010) “Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells,” *Journal of leukocyte biology*, 87(5), pp. 779–789.
- Johnston, K. C. *et al.* (1998) “Medical and neurological complications of ischemic stroke: experience from the RANTTAS trial. RANTTAS Investigators,” *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 29(2), pp. 447–453.
- Jolivel, V. *et al.* (2015) “Perivascular microglia promote blood vessel disintegration in the ischemic penumbra,” *Acta neuropathologica*, 129(2), pp. 279–295.
- Kanai, M., Nakamura, T. and Funakoshi, H. (2009) “Identification and characterization of novel variants of the tryptophan 2,3-dioxygenase gene: differential regulation in the mouse nervous system during development,” *Neuroscience research*. Elsevier BV, 64(1), pp. 111–117.
- Keep, R. F., Hua, Y. and Xi, G. (2012) “Brain water content. A misunderstood measurement?,” *Translational stroke research*. Springer Science and Business Media LLC, 3(2), pp. 263–265.

- Kettenmann, H. *et al.* (2011) “Physiology of microglia,” *Physiological reviews*, 91(2), pp. 461–553.
- Kim, G. W. *et al.* (2001) “The cytosolic antioxidant, copper/zinc superoxide dismutase, attenuates blood-brain barrier disruption and oxidative cellular injury after photothrombotic cortical ischemia in mice,” *Neuroscience*. Elsevier BV, 105(4), pp. 1007–1018.
- Kimura, E. and Tohyama, C. (2017) “Embryonic and postnatal expression of aryl hydrocarbon receptor mRNA in mouse brain,” *Frontiers in neuroanatomy*. Frontiers Media SA, 11, p. 4.
- King, M. D., Alleyne, C. H., Jr and Dhandapani, K. M. (2013) “TNF-alpha receptor antagonist, R-7050, improves neurological outcomes following intracerebral hemorrhage in mice,” *Neuroscience letters*. Elsevier BV, 542, pp. 92–96.
- Klatzo, I. (1987a) “Blood-brain barrier and ischaemic brain oedema,” *Zeitschrift für Kardiologie*, 76 Suppl 4, pp. 67–69.
- Klatzo, I. (1987b) “Pathophysiological aspects of brain edema,” *Acta neuropathologica*. Springer Nature, 72(3), pp. 236–239.
- Klein, N. C. and Cunha, B. A. (1995) “Tetracyclines,” *The Medical clinics of North America*. Elsevier BV, 79(4), pp. 789–801.
- Kobayashi, K. *et al.* (2013) “Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia,” *Cell death & disease*. Springer Science and Business Media LLC, 4(3), pp. e525–e525.
- Kransler, K. M., McGarrigle, B. P. and Olson, J. R. (2007) “Comparative developmental toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the hamster, rat and guinea pig,” *Toxicology*. Elsevier BV, 229(3), pp. 214–225.
- Kurushima, H. *et al.* (2000) “Surface expression and rapid internalization of macrosialin (mouse CD68) on elicited mouse peritoneal macrophages,” *Journal of leukocyte biology*, 67(1), pp. 104–108.
- Lahvis, G. P. *et al.* (2005) “The aryl hydrocarbon receptor is required for developmental closure of the ductus venosus in the neonatal mouse,” *Molecular pharmacology*. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET), 67(3), pp. 714–720.
- Lee, Y.-H. *et al.* (2015) “Aryl hydrocarbon receptor mediates both proinflammatory and anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-activated microglia,” *Glia*, 63(7), pp. 1138–1154.

- Liebeskind, D. S. *et al.* (2019) “Cerebral Edema Associated With Large Hemispheric Infarction,” *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 50(9), pp. 2619–2625.
- Liesz, A. *et al.* (2011) “Inhibition of lymphocyte trafficking shields the brain against deleterious neuroinflammation after stroke,” *Brain: a journal of neurology*. Oxford University Press (OUP), 134(Pt 3), pp. 704–720.
- Liu, H. *et al.* (2017) “Ambient Particulate Matter Concentrations and Hospitalization for Stroke in 26 Chinese Cities: A Case-Crossover Study,” *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 48(8), pp. 2052–2059.
- Liu, W. *et al.* (2009) “Normobaric hyperoxia attenuates early blood-brain barrier disruption by inhibiting MMP-9-mediated occludin degradation in focal cerebral ischemia,” *Journal of neurochemistry*, 108(3), pp. 811–820.
- Luo, Z.-W. *et al.* (2020) “Drug development in targeting ion channels for brain edema,” *Acta pharmacologica Sinica*, 41(10), pp. 1272–1288.
- Manley, G. T. *et al.* (2000) “Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke,” *Nature medicine*, 6(2), pp. 159–163.
- McColl, B. W., Rothwell, N. J. and Allan, S. M. (2008) “Systemic inflammation alters the kinetics of cerebrovascular tight junction disruption after experimental stroke in mice,” *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(38), pp. 9451–9462.
- Mescher, M. and Haarmann-Stemann, T. (2018) “Modulation of CYP1A1 metabolism: From adverse health effects to chemoprevention and therapeutic options,” *Pharmacology & therapeutics*. Elsevier BV, 187, pp. 71–87.
- Mestre, H. *et al.* (2020) “Cerebrospinal fluid influx drives acute ischemic tissue swelling,” *Science*, 367(6483). doi: 10.1126/science.aax7171.
- Michinaga, S. and Koyama, Y. (2015) “Pathogenesis of brain edema and investigation into anti-edema drugs,” *International journal of molecular sciences*, 16(5), pp. 9949–9975.
- Miller, K. A. *et al.* (2007) “Long-term exposure to air pollution and incidence of cardiovascular events in women,” *The New England journal of medicine*, 356(5), pp. 447–458.
- Möller, T. *et al.* (2016) “Critical data-based re-evaluation of minocycline as a putative specific microglia inhibitor,” *Glia*, 64(10), pp. 1788–1794.

- Nagelhus, E. A. and Ottersen, O. P. (2013) “Physiological roles of aquaporin-4 in brain,” *Physiological reviews*, 93(4), pp. 1543–1562.
- National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) (1990) “Special report from the National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Classification of cerebrovascular diseases III,” *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 21(4), pp. 637–676.
- Nestic, O. *et al.* (2006) “Acute and chronic changes in aquaporin 4 expression after spinal cord injury,” *Neuroscience*, 143(3), pp. 779–792.
- Nguyen, L. P. and Bradfield, C. A. (2008) “The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor,” *Chemical research in toxicology*. American Chemical Society (ACS), 21(1), pp. 102–116.
- Okey, A. B. *et al.* (2005) “Toxicological implications of polymorphisms in receptors for xenobiotic chemicals: the case of the aryl hydrocarbon receptor,” *Toxicology and applied pharmacology*, 207(2 Suppl), pp. 43–51.
- Okuda, T. *et al.* (2015) “Development of a high-volume PM2.5 particle sampler using impactor and cyclone techniques,” *Aerosol and Air Quality Research*. Taiwan Association for Aerosol Research, 15(3), pp. 759–767.
- Opitz, C. A. *et al.* (2011) “An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor,” *Nature*. Springer Science and Business Media LLC, 478(7368), pp. 197–203.
- Oshio, K. *et al.* (2004) “Expression of aquaporin water channels in mouse spinal cord,” *Neuroscience*, 127(3), pp. 685–693.
- Owolabi, M. O. *et al.* (2022) “Primary stroke prevention worldwide: translating evidence into action,” *The lancet. Public health*. Elsevier BV, 7(1), pp. e74–e85.
- Pang, T. *et al.* (2012) “Minocycline ameliorates LPS-induced inflammation in human monocytes by novel mechanisms including LOX-1, Nur77 and LITAF inhibition,” *Biochimica et biophysica acta. General subjects*. Elsevier BV, 1820(4), pp. 503–510.
- Papadopoulos, M. C. *et al.* (2004) “Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema,” *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(11), pp. 1291–1293.

- Parrott, J. M. and O'Connor, J. C. (2015) "Kynurenine 3-Monooxygenase: An Influential Mediator of Neuropathology," *Frontiers in psychiatry*. Frontiers Media SA, 6. doi: 10.3389/fpsyt.2015.00116.
- Patten, K. T. *et al.* (2021) "The Effects of Chronic Exposure to Ambient Traffic-Related Air Pollution on Alzheimer's Disease Phenotypes in Wildtype and Genetically Predisposed Male and Female Rats," *Environmental health perspectives*, 129(5), p. 57005.
- Pinel-Marie, M.-L. *et al.* (2009) "Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of the NADPH oxidase subunit NCF1/p47phox expression leading to priming of human macrophage oxidative burst," *Free radical biology & medicine*. Elsevier BV, 47(6), pp. 825–834.
- Platten, M. *et al.* (2019) "Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond," *Nature reviews. Drug discovery*. Springer Science and Business Media LLC, 18(5), pp. 379–401.
- Pm *et al.* (1997) "Mass effect and death from severe acutestroke," *Neurology*, 49, p. 1090–109.
- Poland, A., Glover, E. and Kende, A. S. (1976) "Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase," *The journal of biological chemistry*. Elsevier BV, 251(16), pp. 4936–4946.
- Poland, A. and Knutson, J. C. (1982) "2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity," *Annual review of pharmacology and toxicology*. Annual Reviews, 22(1), pp. 517–554.
- Poland, A., Palen, D. and Glover, E. (1994) "Analysis of the four alleles of the murine aryl hydrocarbon receptor," *Molecular pharmacology*, 46(5), pp. 915–921.
- Pravettoni, A. *et al.* (2005) "Ontogenetic development, sexual differentiation, and effects of Aroclor 1254 exposure on expression of the arylhydrocarbon receptor and of the arylhydrocarbon receptor nuclear translocator in the rat hypothalamus," *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*. Elsevier BV, 20(4), pp. 521–530.
- Prestigiacomo, C. J. *et al.* (1999) "CD18-mediated neutrophil recruitment contributes to the pathogenesis of reperfused but not nonreperfused stroke," *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 30(5), pp. 1110–1117.

- Qureshi, A. I. *et al.* (2003) “Timing of neurologic deterioration in massive middle cerebral artery infarction: a multicenter review,” *Critical care medicine*, 31(1), pp. 272–277.
- Rasmussen, M. K., Mestre, H. and Nedergaard, M. (2018) “The glymphatic pathway in neurological disorders,” *Lancet neurology*, 17(11), pp. 1016–1024.
- Redin, G. S. (1966) “Antibacterial activity in mice of minocycline, a new tetracycline,” *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 6, pp. 371–376.
- Rochfort, K. D. *et al.* (2014) “Downregulation of blood-brain barrier phenotype by proinflammatory cytokines involves NADPH oxidase-dependent ROS generation: consequences for interendothelial adherens and tight junctions,” *PloS one*. Public Library of Science (PLoS), 9(7), p. e101815.
- Rosenberg, G. A. and Yang, Y. (2007) “Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia,” *Neurosurgical focus*, 22(5), p. E4.
- Rothhammer, V. and Quintana, F. J. (2019) “The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease,” *Nature reviews. Immunology*. nature.com, 19(3), pp. 184–197.
- Saito, K., Nowak, T. S., *et al.* (1993) “Kynurenine pathway enzymes in brain-responses to ischemic brain injury versus systemic immune activation,” *J Neurochem*, 61, pp. 2061–2070.
- Saito, K., Nowak, T. S., Jr, *et al.* (1993) “Mechanism of delayed increases in kynurenine pathway metabolism in damaged brain regions following transient cerebral ischemia,” *Journal of neurochemistry*. Wiley, 60(1), pp. 180–192.
- Schindelin, J. *et al.* (2012) “Fiji: an open-source platform for biological-image analysis,” *Nature methods*. Springer Science and Business Media LLC, 9(7), pp. 676–682.
- Schmidt, J. V. *et al.* (1996) “Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 93(13), pp. 6731–6736.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. and Eliceiri, K. W. (2012) “NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis,” *Nature methods*. Springer Science and Business Media LLC, 9(7), pp. 671–675.

- Sensenbrenner, M., Lucas, M. and Deloulme, J. C. (1997) “Expression of two neuronal markers, growth-associated protein 43 and neuron-specific enolase, in rat glial cells,” *Journal of molecular medicine*. Springer Science and Business Media LLC, 75(9), pp. 653–663.
- Sharma, R. *et al.* (2016) “Minocycline as a re-purposed anti-Wolbachia macrofilaricide: superiority compared with doxycycline regimens in a murine infection model of human lymphatic filariasis,” *Scientific reports*, 6, p. 23458.
- Shou, Y. *et al.* (2019) “A review of the possible associations between ambient PM2.5 exposures and the development of Alzheimer’s disease,” *Ecotoxicology and environmental safety*, 174, pp. 344–352.
- Simard, J. M. *et al.* (2007) “Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications,” *Lancet neurology*. Elsevier BV, 6(3), pp. 258–268.
- Simard, J. M. *et al.* (2009) “Protective effect of delayed treatment with low-dose glibenclamide in three models of ischemic stroke,” *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 40(2), pp. 604–609.
- Smith, M. T., Thor, H. and Orrenius, S. (1984) “Detection and measurement of drug-induced oxygen radical formation,” *Methods in enzymology*, 105, pp. 505–510.
- Solenov, E. *et al.* (2004) “Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method,” *American journal of physiology. Cell physiology*, 286(2), pp. C426-32.
- Starling, E. H. (1896) “On the absorption of fluids from the connective tissue spaces,” *The journal of physiology*. Wiley, 19(4), pp. 312–326.
- Steiner, T., Ringleb, P. and Hacke, W. (2001) “Treatment options for large hemispheric stroke,” *Neurology*, 57(5 Suppl 2), pp. S61-8.
- Stiver, S. I. (2009) “Complications of decompressive craniectomy for traumatic brain injury,” *Neurosurgical focus*, 26(6), p. E7.
- Stokum, J. A., Mehta, R. I., *et al.* (2015) “Heterogeneity of aquaporin-4 localization and expression after focal cerebral ischemia underlies differences in white versus grey matter swelling,” *Acta neuropathologica communications*. Springer Science and Business Media LLC, 3(1), p. 61.

- Stokum, J. A., Kurland, D. B., *et al.* (2015) “Mechanisms of astrocyte-mediated cerebral edema,” *Neurochemical research*. Springer Science and Business Media LLC, 40(2), pp. 317–328.
- Stokum, J. A., Gerzanich, V. and Simard, J. M. (2016) “Molecular pathophysiology of cerebral edema,” *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 36(3), pp. 513–538.
- Stone, T. W. *et al.* (2012) “Involvement of kynurenines in Huntington’s disease and stroke-induced brain damage,” *Journal of neural transmission*, 119(2), pp. 261–274.
- Stroke Scale 委員会委員長 後藤文男 (1997) “日本脳卒中学会・脳卒中重症度スケール (急性期) の発表にあたって,” *Jpn. J. Stroke*, 19(1), pp. 1–5.
- Strong, A. J. *et al.* (1983) “The cortical ischaemic penumbra associated with occlusion of the middle cerebral artery in the cat: 2. Studies of histopathology, water content, and in vitro neurotransmitter uptake,” *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 3(1), pp. 97–108.
- van Swieten, J. C. *et al.* (1988) “Interobserver agreement for the assessment of handicap in stroke patients,” *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 19(5), pp. 604–607.
- Symon, L., Branston, N. M. and Chikovani, O. (1979) “Ischemic brain edema following middle cerebral artery occlusion in baboons: relationship between regional cerebral water content and blood flow at 1 to 2 hours,” *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 10(2), pp. 184–191.
- Tait, M. J. *et al.* (2008) “Water movements in the brain: role of aquaporins,” *Trends in neurosciences*. Elsevier BV, 31(1), pp. 37–43.
- Tarpey, M. M. and Fridovich, I. (2001) “Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite,” *Circulation research*. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health), 89(3), pp. 224–236.
- Thrane, A. S., Rangroo Thrane, V. and Nedergaard, M. (2014) “Drowning stars: reassessing the role of astrocytes in brain edema,” *Trends in neurosciences*, 37(11), pp. 620–628.
- Uno, I. *et al.* (2014) “Record heavy PM_{2.5} air pollution over China in January 2013: Vertical and horizontal dimensions,” *SOLA*. Meteorological Society of Japan, 10(0), pp. 136–140.
- Vakili, A., Kataoka, H. and Plesnila, N. (2005) “Role of arginine vasopressin V1 and V2 receptors for brain damage after transient focal cerebral ischemia,” *Journal of cerebral blood*

flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism. SAGE Publications, 25(8), pp. 1012–1019.

- Venero, J. L. *et al.* (2001) “Aquaporins in the central nervous system,” *Progress in neurobiology*. Elsevier BV, 63(3), pp. 321–336.
- Vogel, C. F. *et al.* (2014) “Cross-talk between Aryl Hydrocarbon Receptor and the Inflammatory Response: A role for nuclear factor-kappaB,” *J. Biol. Chem*, 289, pp. 1866–1875.
- Wartenberg, K. E. (2012) “Malignant middle cerebral artery infarction,” *Current opinion in critical care*, 18(2), pp. 152–163.
- Weed, L. H. and McKibben, P. S. (1919) “EXPERIMENTAL ALTERATION OF BRAIN BULK,” *American Journal of Physiology-Legacy Content*. American Physiological Society, 48(4), pp. 531–558.
- Wolf, S. A., Boddeke, H. W. G. M. and Kettenmann, H. (2017) “Microglia in Physiology and Disease,” *Annual review of physiology*, 79, pp. 619–643.
- Xiong, B. *et al.* (2017) “Precise cerebral vascular atlas in stereotaxic coordinates of whole mouse brain,” *Frontiers in neuroanatomy*, 11, p. 128.
- Yang, C. *et al.* (2019) “Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke,” *American journal of physiology. Cell physiology*, 316(2), pp. C135–C153.
- Yang, M. *et al.* (2009) “Temporal changes in expression of aquaporin-3, -4, -5 and -8 in rat brains after permanent focal cerebral ischemia,” *Brain research*, 1290, pp. 121–132.
- Yang, W.-S. *et al.* (2014) “An evidence-based appraisal of global association between air pollution and risk of stroke,” *International journal of cardiology*. Elsevier BV, 175(2), pp. 307–313.
- Yang, Y. *et al.* (2007) “Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat,” *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(4), pp. 697–709.
- Young, W. *et al.* (1987) “Regional brain sodium, potassium, and water changes in the rat middle cerebral artery occlusion model of ischemia,” *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 18(4), pp. 751–759.

- Zhang, N. (2011) “The role of endogenous aryl hydrocarbon receptor signaling in cardiovascular physiology,” *Journal of cardiovascular disease research*. SynthesisHub Advance Scientific Research, 2(2), pp. 91–95.
- Zhang, R. L. *et al.* (1995) “Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rat,” *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 26(8), pp. 1438–42; discussion 1443.
- Zhang, W. *et al.* (2004) “A Cyp1a2-luciferase transgenic CD-1 mouse model: responses to aryl hydrocarbons similar to the humanized AhR mice,” *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*. Oxford University Press (OUP), 82(1), pp. 297–307.
- Zhao, H.-Y. *et al.* (2021) “Chebulic acid derivatives from *Balakata baccata* and their antineuroinflammatory and antioxidant activities,” *Bioorganic chemistry*, 116, p. 105332.
- Zhou, J. *et al.* (2017) “Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Minocycline against *Acinetobacter baumannii* in a Neutropenic Murine Pneumonia Model,” *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(5). doi: 10.1128/AAC.02371-16.
- Zrzavy, T. *et al.* (2018) “Dominant role of microglial and macrophage innate immune responses in human ischemic infarcts,” *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. Wiley, 28(6), pp. 791–805.
- Zwillig, D. *et al.* (2011) “Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration,” *Cell*. Elsevier BV, 145(6), pp. 863–874.
- 今井浩孝, 小椋康光 (2020) *衛生薬学 (改訂第3版) : 基礎・予防・臨床*. 南江堂.
- 国循脳卒中データベース 2021 編集委員会 (ed.) (2021) *脳卒中データベース 2021*. 中山書店.
- 政策統括官付参事官付世帯統計室 (2020) *2019 年 国民生活基礎調査の概況*. 厚生労働省. Available at: <https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-tyosa/k-tyosa19/dl/14.pdf>.
- 政策統括官付参事官付人口動態・保健社会統計室 (2021) *2020 年 人口動態統計の概況*. 厚生労働省. Available at: https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei20/dl/15_all.pdf.
- 政策統括官付参事官付保健統計室 (2019a) *平成 29 年 (2017) 患者調査の概況*. 厚生労働省. Available at: <https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/17/dl/kanja.pdf>.

- 政策統括官付参事官付保健統計室 (2019b) 平成 29 年 国民医療費の概況. 厚生労働省.
Available at: <https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-iryohi/17/dl/data.pdf>.
- 脳卒中ガイドライン委員会日本脳卒中学会 (ed.) (2021) 脳卒中治療ガイドライン 2021. 協和企画.

謝辞

本研究を遂行し論文をまとめるにあたり根絶丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました，広島大学 大学院統合生命科学研究科 石原康宏 准教授に心より感謝申し上げます。2015年10月から6年以上にわたり研究面，生活面，社会面において多くのご指導をいただきました。挫けることも多い研究生活の中，幾度も先生の温かく優しいお言葉に救われました。至らぬ点が多い不出来な学生だったことと存じますが，長きにわたり大変丁寧かつ辛抱強きご指導いただきましたこと，感謝の念に堪えません。また，研究留学の機会を与えてくださり，多くのご助言とご指導をいただきました徳島文理大学 香川薬学部 伊藤康一 教授，博士号の学位審査にあたり，副査の労をおとりいただきました広島大学大学院医系科学研究科 古武弥一郎 教授，同研究科 森岡徳光 教授，大学院統合生命科学研究科 山崎岳 教授に深謝申し上げます。

また，広島大学 分子脳科学研究室および生体機能化学研究室に所属メンバーである高橋亮平さん，竹本拓矢さん，島田真一さん，尾崎華さん，吉川量子さん，脇田知寛さん，櫻井光さん，伊藤弘音さん，谷口瑠梨さん，早弓恵里香さん，本田達也さん，廣池怜奈さん，大島理加さん，王佳さん，難波貴彦さん，新留康詞さん，藤川真穂さん，藤田健太さん，岩坪美緒さん，川野真慈さん，難波楓さん，西村咲野さん，根津直幸さんに心より感謝いたします。

最後に，私の良き理解者であり，研究活動に専念できるよう今日に至るまで経済的にも精神的にも支えてくださった家族に対し深い感謝の意を捧げ，結びの辞といたします。

2022年2月22日 田中 美樹