

Edaravone(ラジカット®)によるラット下肢動脈遮断による 虚血再灌流障害の抑制効果に関する検討：第1報

田中 宏衛 八百 英樹 山村 光弘 宮本 巍

要 旨：今回我々はedaravone(ラジカット®, 三菱ウェルファーマ株式会社)のフリーラジカルの消去による血管内皮細胞障害の抑制作用に注目し, ラジカット®の投与によって雄Lewisラットの下肢動脈急性虚血後の遮断解除に伴う再灌流障害の抑制が可能か否かについて検討した。【方法】雄Lewisラット(n=10)を以下の2群に分類した。ラジカット®群(n=5)(以下R群)：ラジカット®9.0 mg/kgを腹腔内に投与した後, 顕微鏡下手術により両側浅腸骨回旋動脈, 両側浅後腹壁動脈を結紮し, 両側大腿動脈を5時間遮断した。対照群(n=5)(以下C群)：同量の生理食塩液(6ml/kg)を腹腔内に投与し, 同様の操作を施行した。両群とも皮膚切開を縫合閉鎖した5時間後に, 再手術にて遮断を解除し下肢の血行再建再灌流モデルとした。遮断解除5時間後の血清CPKを測定し, 両群間で比較検討した。

【結果】CPK値は, C群; 1438±280 IU/Lで, R群; 763±137 IU/Lであった。R群はC群に比し約半減した(P=0.06)。さらに, 病理組織学的所見ではR群では筋組織の障害の抑制が認められた。【結論】本研究の結果ラジカット®によるフリーラジカル除去効果により局所における再灌流障害が抑制される可能性が示唆された。(日血外会誌 12 : 61-64, 2003)

索引用語：Edaravone(Radicut®), フリーラジカルスカベンジャー, 急性動脈閉塞, 虚血再灌流障害, Myonephropathic metabolic syndrome(MNMS)

はじめに

動脈閉塞後は再灌流の有無にかかわらず組織のフリーラジカル産生が亢進して細胞障害を促進させるといわれている。急性下肢動脈閉塞の虚血再灌流障害であるいわゆるmyonephropathic metabolic syndrome(以下MNMS)の予防と治療法の選択肢の一つとしてフリーラジカルの役割は特に重要である^{1,2)}。近年我々はedaravone(商品名, ラジカット®, 三菱ウェルファーマ株式会社)のフリーラジカルの消去による血管内皮細胞障害を抑制する作用^{3,4)}に注目し⁵⁾, ラットを用いた動物実験で急性下肢動脈閉塞後の血行再建モデルを作成

し, ラジカット®の投与によって再灌流障害の抑制が可能か否かについて検討した。

対象と方法

雄Lewisラット(n=10, 498±16g)を使用し, ペントバルビタール0.04-0.03mg/gの腹腔内投与による全身麻酔下に以下の2群, ラジカット®群(n=5)以下, R群)と対照群(n=5)以下, C群)に分類した。

R群:(n=5)遮断30分前にラジカット®9.0 mg/kgを腹腔内に投与した。

C群:(n=5)同量の生理食塩液(6ml/kg)を腹腔内に投与した。それ以外はR群と同様の操作を行った。手術顕微鏡(Olympus社製耳鼻科・脳外科手術用顕微鏡OME-J&N J73507®)下に両側浅腸骨回旋動脈, 両側浅後腹壁動脈を結紮し, マイクロバスキュラークランプ(協和時計工業, TSK-1, Bear社)を用い, 両側大腿動脈を一過性に遮断し一旦閉鎖した。下肢には遮断中軽度のチ

兵庫医科大学胸部外科(Tel: 0798-45-6852)

〒663-8501 兵庫県西宮市武庫川町1-1

受付：2002年9月24日

受理：2003年3月4日

アノーゼが認められたが、遮断解除後には改善した。また、遮断中下肢を引きずって歩行したが、解除後は改善した。完全血行遮断 (Fig. 1) の時間後に再開創し、マイクロ止血クリップによる遮断を解除した。血行の再開は大腿動脈の血流を顕微鏡下確認し、急性下肢動脈閉塞後の血行再建モデルとした。遮断解除5時間後に犠牲死させ、心臓内血液を採取した。採血後直ちに遠心分離 (3000rpm, 15分) により血清を分離し冷凍保存した。凍結解除後血清中のCPK, Interleukin-8 (以下IL-8) を測定した。統計学的検討はunpaired *t* testを用い $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。一方、採血後直ちに下肢骨格筋 (腓腹筋) を摘出し10%ホルマリン液に固定した後に、Hematoxylin-Eosin染色 (以下H-E染色) にて、病理組織学的所見を比較検討した。

なお、この動物実験はGuide for the Care and Use of Laboratory Animal, Washington DC (1996) に基き、兵庫医科大学動物実験委員会の承認をえて愛護的に行った (承認番号180)。

結 果

- 1) CPK値: R群 763 ± 137 IU/L, C群 1438 ± 280 IU/L であり, R群はC群と比較し約半減する傾向がみられた ($P=0.06$, Fig. 2)。
- 2) IL-8値: R群 8496 ± 3924 pg/ml, C群 8212 ± 2130 pg/ml で両群間に有意差は認められなかった ($P=0.95$, Fig. 3)。
- 3) 腓腹筋のH-E染色においてC群では強い細胞間質の浮腫が認められたが, R群では細胞間質の浮腫の程度は軽く, 毛細血管の内腔は保持されていた (Fig. 4)。

考 察

2001年6月より急性脳梗塞に対するフリーラジカルスカベンジャーとしてラジカット®が市販された。ラジカット®は脳梗塞の急性期の増悪因子であるフリーラジカルを消去して神経細胞を保護するという新しい概念の脳梗塞治療薬で、臨床治験においても極めて高い有用性が報告されている^{3,4)}。

一方、虚血性再灌流障害では、フリーラジカルが病態を促進する因子となっていることが知られている。この機序には未だ統一した見解はないが微小血管の内皮細胞が低酸素-再酸素化により酸素フリーラジカルを放出し^{6,7)} また、虚血後の再灌流により活性化された好

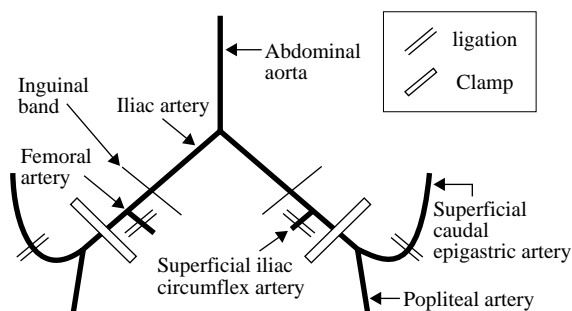


Fig. 1 A model of the ischemic reperfusion injury in rats. After 9.0mg/dl of edaravone were given preoperatively, bilateral common femoral artery were clamped for five hours and released.

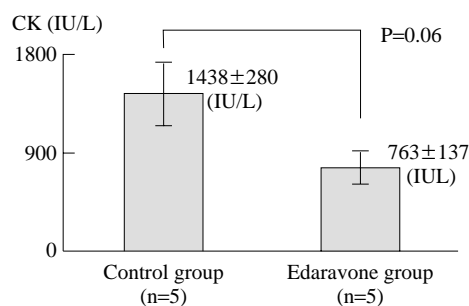


Fig. 2 In the edaravone group, CPK was higher than in the control group (763 ± 137 IU/L: 1438 ± 280 IU/L, $P=0.06$).

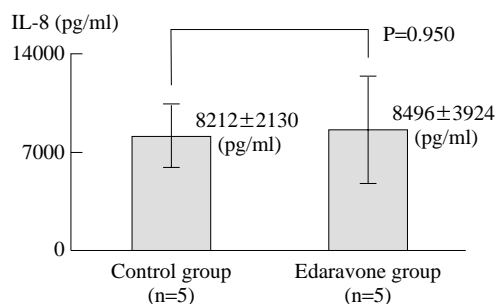


Fig. 3 Interleukin-8 in edaravone group was similar in the control group (8212 ± 2130 pg/ml: 8496 ± 3924 pg/ml, $P=0.95$).

中球もフリーラジカルを産生するといわれている⁸⁻¹⁰⁾。微小血管内皮細胞で産生されたこのフリーラジカルは、細胞膜酸化の連鎖反応を惹起し、Mn-SODなどによる細胞保護作用の弱い細胞が傷害されると考えられて

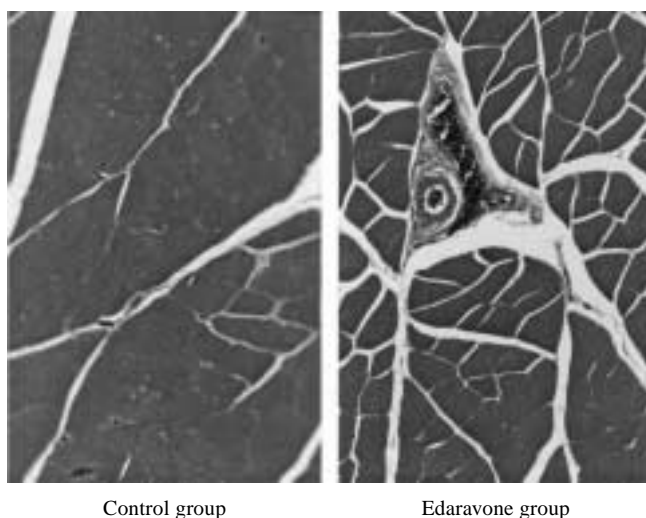


Fig. 4 In edaravone group, the rats muscles showed only slight swelling and better patent capillary vessels compared to control group.

いる¹¹⁻¹³). 従って、再灌流時に血管内皮でのフリーラジカルを消去することは、再灌流に伴う細胞障害の惹起を軽減する上で有効な治療方法の一つと考えられる¹⁴). ラジカット®は動脈への移行が極めて良好であり³), 血管内の血球細胞中でのフリーラジカル産生を抑制し、その結果内皮細胞を保護する作用とそれに伴う内皮細胞レベルでの障害応答反応を抑制する効果を有している。我々はこのラジカット®のフリーラジカルによる細胞障害を抑制する作用に注目した⁵). 今回ラットの急性下肢動脈閉塞後の血行再建モデルを作成し、この実験モデルを用いてラジカット®によって再灌流障害の抑制が可能か否かについて検討した。本研究において、ラジカット®群は対照群に比し、IL-8の上昇を抑制することなく、CPKの逸脱を抑制する傾向がみられた。また病理組織学的所見でも組織障害の抑制が示唆された。これまで急性下肢動脈閉塞症の重篤な再灌流障害であるMNMSにおいてIL-8の上昇などの高サイトカイン血症後に引きつづいて組織障害やCPKの上昇がおけるといわれてきた¹⁵). 炎症局所においては、マクロファージ、上皮細胞が活性化され様々な炎症性サイトカインを放出する。これらのサイトカインにより活性化された血管内皮細胞はICAM-1などの接着分子を多量に放出する。また、活性化された局所のマクロファージ、上皮細胞はIL-8などの白血球活性化因子を血中に放出する。このような因子により活性化された好中球膜状では質

的機能的に局所の血管内皮細胞に対する親和性が獲得され血管内皮細胞への膠着が生じる。続いて好中球は血管内皮間隙を通過し基底膜を破り血管外に遊走する。これに伴い血管内皮と基底膜間にたまっていた高分子物質も血管外に放出され血管周囲に浮腫が生じ助長される。そして白血球由来の組織障害因子の作用により炎症はさらに増悪する。

Sekidoらは抗IL-8抗体により再灌流障害が抑制することができたと報告し¹⁶), 松本らは抗IL-8抗体を投与することにより好中球の活性化、血管内皮への接着の阻止、各種炎症メディエータや活性化酸素放出の抑制が生じ、脳虚血再灌流障害モデルにおいて再灌流障害が好中球の浸潤を抑え再灌流障害の軽減が可能であったと報告している¹⁷).

本実験においてもIL-8の関与に注目し測定した。しかしIL-8値は対照群と比較しても全く抑制されなかった。フリーラジカルは再灌流障害においてIL-8分泌より早い時期での細胞障害に関与するため、ラジカット®の投与により局所の組織障害が軽減されたが、虚血再灌流による、局所の内皮細胞やマクロファージの活性化を完全に抑制することはできず、内皮細胞やマクロファージは少なくともIL-8は対照群と同様に分泌したと考えられた¹⁷).

今後、高IL-8血症がラジカット®投与群でその後も持続するか否か、高IL-8血症を伴うが、肺や腎臓などの他臓器障害も抑制する効果を有するか否か、またラジカット®の至適投与量と投与時期の関係についても引き続きの検討を加える予定である。

結 論

ラットの急性下肢動脈閉塞後の血行再建モデルを用いてラジカット®によるフリーラジカル除去効果により局所における再灌流障害が抑制される可能性を有することが示唆された。

本研究は平成14年度兵庫県医師会勤務医医学助成金によった。

また本論文の要旨は第30回日本血管外科学会総会(2002年5月、沖縄)にて発表した。

文 献

- 1) 渡井健男：MNMSに対する oxygen radical scavenger の効果に関する研究 - とくにSOD活性と組織逸脱酵素に対する実験的検討 - . 日心外会誌, **20** : 5-10, 1990 .
- 2) 森 吉臣：腎における血液再灌流障害, 特に活性酸素による組織障害について . 脈管学, **30** : 103-104, 1990 .
- 3) Watanabe, T., Morita, I., Nishi, H., et al.: Preventive effect of MCI-186 on 15-HPETE induced vascular endothelial cell injury in vitro. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids., **33**: 81-87, 1988.
- 4) 大友英一, 東儀英夫, 小暮久也, 他: MCI-186 の脳梗塞急性期に対する効果 - 前期第二相臨床試験 - . Therapeutic Research, **19** : 1311-1332, 1998 .
- 5) 山村光弘, 田中宏衛, 八百英樹, 他: ラット下肢血行再建モデルにおけるフリーラジカスキャベンジャー(ラジカット®)の再灌流障害抑制効果について . 兵庫県医師会医学雑誌, **45** : 144-145, 2002 .
- 6) 葛谷恒彦, 金 英俊, 北畠 顕, 他: 低酸素 再酸素化における冠微血管内皮細胞フリーラジカル産生 . 脈管学, **30** : 85-87, 1990 .
- 7) Idström, J. P., Soussi, B., Elander, A., et al.: Purine metabolism after in vivo ischemia and reperfusion in rat skeletal muscle. Am. J. Physiol., **258**: H1668-1673, 1990.
- 8) 杉野三千男, 根本 晴: Myoneuropathic-metabolic syndrome(MNMS)に関する実験的研究 - MNMSモデル作成と骨格筋・肺への好中球浸潤および抗ICAM-1抗体, 抗CD18抗体投与の検討 - . 北里医学, **29** : 78-85, 1999 .
- 9) Walz, A., Peveri, P., Aschauer, H., et al.: Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun., **149**: 755-761, 1987.
- 10) Paterson, I. S., Smith, F. C. T., Tsang, M. K., et al.: Reperfusion plasma contains a neutrophil activator. Ann. Vasc. Surg., **7**: 68-75, 1993.
- 11) 蜂谷 仁: 虚血, および虚血後再灌流における骨格筋の病理組織学的, 分子生物学的検討 . 愛知医科大学医学会雑誌, **24** : 109-120, 1996 .
- 12) Granger, D. N., Rutili, G. and McCord, J. M.: Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. Gastroenterology., **81**: 22-29, 1981.
- 13) 梅澤久輝: 下肢急性動脈閉塞症の再灌流障害における白血球の関与 - 急性動脈閉塞症の実験的検討 - . 日心外会誌, **26** : 141-149, 1997 .
- 14) Goldman, G., Welbourn, R., Klausner, J. M., et al.: Oxygen free radicals are required for ischemia-induced leukotriene B₄ synthesis and diapedesis. Surgery, **111**: 287-293, 1992.
- 15) 長 伸介: 急性動脈閉塞症の再灌流障害におけるサイトカインの実験的検討 - IL-8, IL-10について - . 日心外会誌, **27** : 282-287, 1998 .
- 16) Sekido, N., Mukaida, N., Harada, A., et al.: Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. Nature, **365**: 654-657, 1993.
- 17) 松本哲哉: ウサギ脳虚血後再灌流障害モデルにおけるインターロイキン-8(IL-8)の役割 . 金沢大学十全医学会雑誌, **106** : 25-32, 1997 .

Suppression of Lower Exremity Reperfusion Injury in Rats by Edaravone

Hiroe Tanaka, Hideki Yao, Mitsuhiro Yamamura and Takashi Miyamoto

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Hyogo College of Medicine, Nishinomiya, Japan

Key words: Edaravone, Free radical scavenger, Myoneuropathic metabolic syndrome (MNMS), Reperfusion injury

We evaluated whether a free radical scavenger (edaravone) could suppress lower extremity reperfusion injury in rats or not. Rats were divided into two groups: the edaravone group (n=5) which received 9.0 mg/dl of edaravone and control group (n=5) saline solution was given preoperatively. In both groups the bilateral femoral arteries were clamped for five hours and thereafter released. Creatine phosphokinase (CPK) was measured and pathohistological examination (H-E staining) of the muscle was performed at 5 hours after reperfusion. In the edaravone group, CPK values were higher than in the control group (763 ± 137 IU/L: 1438 ± 280 IU/L, $P=0.06$). In the edaravone group, the rats muscles showed only slight swelling and good patent capillary vessels compared to the control group pathohistologically (H-E staining). The results of this preliminary study suggest that edaravone may suppress rats lower extremity reperfusion injury.

(Jpn. J. Vasc. Surg., **12**: 61-64, 2003)