

砂ネズミ海馬 CA1 sector 遅発性神経細胞壊死における経時的 局所脳血流量変化と hemodilution の効果に関する研究

奈良県立医科大学第2外科学教室

金 良 根

SEQUENTIAL CHANGE OF REGIONAL CEREBRAL BLOOD FLOW AND EFFECT OF HEMODILUTION ON DELAYED NEURONAL DEATH IN GERBIL HIPPOCAMPUS CA1 SECTOR

YANG KEUN KIM

The 2nd Department of Surgery, Nara Medical University

Received January 30, 1991

Summary: Regional cerebral blood flow (RCBF as a percent of control) in gerbil hippocampus CA1 sector was measured by Laser Doppler flowmetry prior to, during, and serially after 3 or 5 minute occlusion of the bilateral carotid arteries. Regional CBF was also measured in groups of 5 minute ischemia after hemodilution. In three groups, delayed neuronal death (DND) was evaluated. Hemodilution was performed to exchange human albumin for gerbil blood, after which the values of hematocrit decreased by about 26%. Sequential change of RCBF could be continuously evaluated as a definite pattern. It was clarified that constant residual blood flow at the occlusion (nil) is noted, and ischemic injury is prescribed by only ischemic time in this model, and difference of the post-ischemic hypoperfusion finally resulted. The longer the ischemic time (the larger the ischemic injury), the stronger the degree of the hypoperfusion becomes, and DND occurred strongly. It was suggested that ischemic injury in this experimental animal model was caused finally by twice ischaemiae, and post-ischemic hypoperfusion is related to the cause of DND. Post-ischemic hypoperfusion could be relieved by appropriate reduction of the hematocrit by hemodilution, and that DND could be also somewhat inhibited. As its mechanisms, it was estimated that hemodilution improves cerebral microcirculation, and relieves the secondary ischemia after ischemia, and accelerates the recovery from disturbance of cerebral blood flow and metabolism.

Index Terms

gerbil, delayed neuronal death, regional cerebral blood flow, hemodilution, Laser Doppler flowmetry

緒 言

脳は虚血に対して脆弱で、もし血流が遮断されればほぼ10-20秒後には脳波の活動が消滅し、10-20分後には脳の形態学的変化が引き起こられると考えられてき

た¹⁾。

ところが、近年になって Kirino²⁾³⁾⁴⁾ が砂ネズミ5分間両側総頸動脈閉塞による前脳虚血 (forebrain ischemia) モデルで、また Pulsinelli *et al.*⁵⁾⁶⁾ がラット4血管結紮モデル (four vessel occlusion model) でいわゆる「遅

発性神経細胞壊死 (Delayed Neuronal Death)」という現象がある事を発見して、虚血後の神経細胞障害の概念は大きく変わってきている。すなわち一過性のそれも極めて短時間の虚血侵襲後、約 48 時間の潜伏期において神経細胞のみが死に至るといった現象が発見された。しかも砂ネズミの場合には海馬 CA1 (conus ammonius sector 1) のみにこの現象が見られ、その再現性も極めて高くほぼ 100%^{7,8)}にみられる。この発生機序については多くの研究がなされているが、いまだ決定的な結論は出ていない。

一般に、動物実験で脳虚血モデルを作製する場合、動物の種類と実験操作の違いによって側副血路に差が生じ、一定した虚血侵襲を加えることは困難である。更に虚血侵襲後の 2 次的血流動態や代謝動態変化にも、より大きな差が生じるため、虚血侵襲時および、その後の局所脳血流量や病理学的変化を一定して捉えることは極めて困難である。

今回著者は、砂ネズミ前脳虚血モデルにおける遅発性神経細胞壊死の高い再現性は、虚血侵襲そのもの、および虚血侵襲後の血流・代謝動態が一定していることに起因しているのではないかと考えて、血流遮断時・再開通後の局所脳血流量変化を連続的に測定し、微小循環動態を一定パターンとして捉えようと意図した。さらに、血流遮断時間を変えたときにそのパターンがどの様に変化するのか、血流量の変化と遅発性神経細胞壊死との間にもどのような関係があるのかを検討した。

遅発性神経細胞壊死は、不可逆的な病理学的変化に進展するまでの経過が緩徐であるため、各種治療法を検討する上で、有利な動物実験モデルとされている。事実、これまでに様々な薬物で海馬の遅発性神経細胞病変に対する保護効果が検討されている⁹⁾。今回著者は虚血脳の血流改善に有効であるとされている血液希釈法 (hemodilution)^{10,11)}に着目し、これが砂ネズミ前脳虚血モデルにおける局所脳血流量変化にどのような効果を発揮し、さらに、最終的な神経細胞壊死を抑制しうるのかを検討した。今回の研究課題は、脳微小循環動態の面から遅発性神経細胞壊死の発生機序を考察する上でも極めて重要なものと考えられる。

実験方法

実験動物は大阪ケアリ K. K. から購入し、当教室で室温 20—25℃、湿度 50—70% の環境のもとに、同一家系で繁殖させた 10—16 週齢、体重 60—90 g の砂ネズミ (Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*) 65 匹を雌雄の別なく使用した。

1. 両側総頸動脈閉塞・再開通群作製

麻酔は 3% ハローセン吸入で導入し、その後 1.5% ハローセン吸入で維持した。

(1) モデル作製法

砂ネズミは仰臥位で実験台に固定し、頸部正中に約 2 cm の縦切開を加え、手術用顕微鏡下に両側の総頸動脈を周囲組織から剝離・露出した。Kirino²⁾ の原法では血管クリップで総頸動脈を閉塞しているが、今回は血流測定をしながら閉塞・再開通をおこなうために Tone *et al.*¹²⁾ が用いた方法を応用した。5-0 ナイロン糸を両側総頸動脈にそれぞれポリエチレンリングを介してループ状にかけ、皮下を通して後頸部に出し、皮膚縫合後ナイロン糸牽引によって閉塞しナイロン糸抜去によって再開通するように工夫した (Fig. 1)。その後、頸部の手術創を閉じ、麻酔を切って動物が完全に覚醒するのを待った。

(2) 総頸動脈閉塞・再開通の確認実験

(1) の操作で確実に両側総頸動脈の閉塞と再開通が可能で、遅発性神経細胞壊死がおこることを確認するため、10 匹の砂ネズミを用い手術用顕微鏡で総頸動脈を直視下に観察しつつ 5 分間ナイロン糸牽引の後抜去をおこなった。皮膚縫合後 96 時間後に断頭して脳を取り出し、光学顕微鏡標本を作製し海馬領域を組織学的に観察した。

(3) 局所脳血流量測定法

脳血流量の測定には Laser Doppler Flowmeter (バイオメディカルサイエンス社製、LBF-221) を使用した。前述の手術操作を完了し、総頸動脈の閉塞・再開通が可能となった砂ネズミを腹臥位で定位脳固定装置に固定した。頭部正中に約 2 cm の縦切開を加え、手術用顕微鏡を用い bregma の後方 1.5 mm・正中から側方 1.5 mm の部位に直径約 2 mm の骨窓を開け硬膜を切開した。Luskota *et al.*¹³⁾ の砂ネズミ脳解剖図譜に従って脳表より深

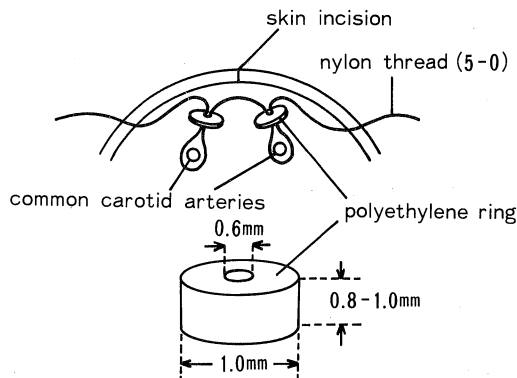


Fig. 1. Diagram of procedure for bilateral common carotid occlusion. (Tone *et al.*)

さ2.0 mmの海馬 CA1 sector にニードル型センサー (LFN-50:直径0.55 mm) を micromanipulator を用いて定位的に刺入し, 両側総頸動脈閉塞前から再開通30分後まで連続的に脳血流量を測定した。

以上のような方法で3分間閉塞・再開通群, 5分間閉塞・再開通群それぞれ10匹について連続的脳血流量測定を行い, 局所脳血流量の経時変化については閉塞前値を100%とした相対値で評価した。以上の実験終了後, 96時間後に脳を取り出し, 光学顕微鏡標本を作製し海馬領域を組織学的に観察した。

(4) sham 群作製

同系砂ネズミ5匹を用いて同じ操作で, ナイロン糸を総頸動脈にかけ, 脳血流量測定センサーを刺入したのち, ナイロン糸牽引による総頸動脈閉塞はおこなわず局所脳血流量を連続測定して sham 群とした。

2. hemodilution 前処置閉塞・再開通群作製

(1) hemodilution の方法

麻酔は3%ハローセン吸入で導入して, その後1.5%ハローセン吸入で維持した。砂ネズミの大腿動静脈にそれぞれポリエチレンチューブ (Clay Adams 社製, PE10) を挿入した。次に, 毎分0.3 ml の速度で, 体重10 g に対して0.15 ml の脱血を動脈側から, プラズマ (pH: 6.4-7.4, 生理食塩液に対する浸透圧比: \times 約1, Na: 148 mEq/l, K: 0.25 mEq/l, Cl: 100 mEq/l, アルブミン: 44 mg/ml) 注入を静脈側から同時に1回, 手動的に施行し大腿部を皮膚縫合した後一旦覚醒状態とした。

(2) 動脈血ガス分析・ヘマトクリット (Hct) 測定

今回の実験系におけるハローセン吸入麻酔の影響および hemodilution の効果を確認するために, 別に20匹の砂ネズミについて検討した。すなわち, 砂ネズミは全血流量4-5 ml の小動物であるため, 血液希釈などの操作終了後にさらに採血をおこなうことによって, 全身循環動態に不全をきたし, 以後の実験に影響を与えたと考えられたからである。したがって, 動脈血ガス分析・Hct の検討のために別の20匹の動物を用い, 採血を動脈ルートよりおこなった。hemodilution を行わなかったものをコントロール (5匹) として, hemodilution 5分後 (5匹)・20分後 (5匹)・及び120分後 (5匹) のそれぞれにつき動脈血ガス分析と Hct の測定をした。ガス分析には Radiometer 社製 ABL330 を用いた。

(3) 閉塞・再開通実験

10匹の砂ネズミを用いて hemodilution 終了1時間後に, 麻酔条件・虚血作製法等を5分間閉塞・再開通群と全く同様にして局所脳血流量測定を行った。この群についても96時間後, 光顕標本を作製して海馬領域を組織学

的に観察した。

3. 光顕標本作製および評価法

脳虚血負荷後, 砂ネズミを実験前と同様の条件で飼育して96時間後にエーテル麻酔のもとに開胸し, 経心的灌流固定を行った。灌流液には10%ホルマリン溶液を用い, 灌流圧は130 cm 水柱圧とした。断頭した後脳をとりだし上昇系エタノールで脱水, キシレンで置換した後パラフィン包埋し, 背側海馬を通る冠状断面で6 μ m 厚の切片を作製した。これにヘマトキシリン-エオジン染色を施し, 光顕的に観察して海馬 CA1 の mm 単位当りの錐体細胞の残存数を定量的に評価した。

結 果

1. 総頸動脈閉塞・再開通の確認

ナイロン糸の牽引によって両側総頸動脈はポリエチレンリングの内腔に絞厄陥入して閉塞され, 抜去によって絞厄が解除されて血流が再開し動脈の径も完全に戻っているのが手術用顕微鏡直視下にみられ, 本モデル作製法における虚血負荷・再開通の有効性が確認できた。また, 光顕的観察の結果, 虚血負荷96時間後の10匹すべての砂ネズミにおいて海馬 CA1 sector の選択的な神経細胞壊死が観察され, 本実験系の高い再現性が確認された (Photo 1)。海馬を除く脳組織には病理学的な変化は認めなかった。

2. 動脈血ガス分析と hemodilution による Hct の変化

20匹について行った動脈血ガス分析の結果は, PaO₂ が 189 \pm 59 mmHg, PaCO₂ が 47.3 \pm 5.1 mmHg, 及び pH が 7.31 \pm 0.2 でほぼ脳血流量に影響のない範囲の値を取っていた。hemodilution による Hct の変化は, コントロール群で 45.8 \pm 1.7 であるのに対し, hemodilution 5分後 34.8 \pm 2.3, 60分後 33.7 \pm 1.9, 及び120分後 34.1 \pm 1.7 とほぼ一定した値に低下しており, 1回の hemodilution で120分まで低い Hct が維持できた (Fig. 2)。

3. 局所脳血流量変化

それぞれの群の局所脳血流量変化の代表例を Fig. 3 に示す。また虚血負荷群についてはその変化のまとめを Table 1・Fig. 4 に示した。

(1) sham 群

局所脳血流量は安定した値を取り続け, この実験系における麻酔その他の侵襲による脳血流量に対する影響はほぼ無視できると判断された。

(2) 3分間閉塞・再開通群

測定開始後約5分間で測定値は安定し, ナイロン糸牽

Table 1. Regional cerebral blood flow as a percent of control in the hippocampus CA1 sector after recirculation. Values are given as mean ± SD *** P : <0.01

	Time post-ischemia (minutes)		
	10	20	30
3min ischemia (n=10)	105±15	93.0±18	89.2±19
5min ischemia (n=10)	86.7±19	51.8±12*	38.9±10**
5min ischemia (post-hemodilution) (n=10)	99.1±15	82.5±6.3*	69.4±5.2**

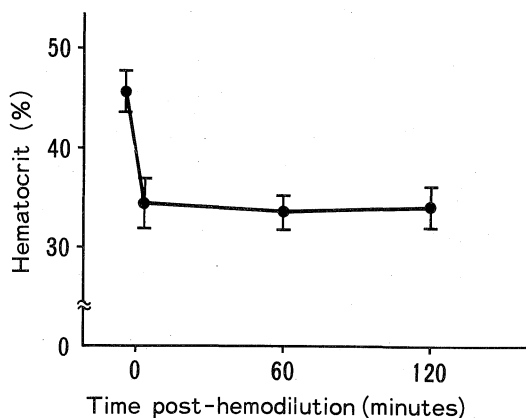


Fig. 2. The sequential changes of Hct after hemodilution; the Hct values decreased 45.8 to 34.7, 33.7 and 34.1.

引による両側総頸動脈閉塞で局所脳血流量は直ちにほぼ0の状態となり、血流遮断中その状態が持続した。ナイロン糸除去による再開通後には局所脳血流量は速やかに増加し、虚血前より一旦高値 (post-ischemic hyperperfusion) となった。最高値は虚血前の129±14%となった。その後再び徐々に減少した (post-ischemic hypoperfusion)。虚血前局所脳血流量と比較して、再開通10分後で105±15%、20分後では93.0±18%、また30分後には虚血前の89.2±19%となった。すべての動物において、このような脳血流量変化の一定パターンを示した。

(3) 5分間閉塞・再開通群

局所脳血流量変動パターンは3分間閉塞・再開通群と同様であり虚血中にはほぼ0で、post-ischemic hyperperfusion (最高値 119±110%)、post-ischemic hypoperfusionもみられた。しかし post-ischemic hypoperfusion の程度は3分間閉塞・再開通群に対して

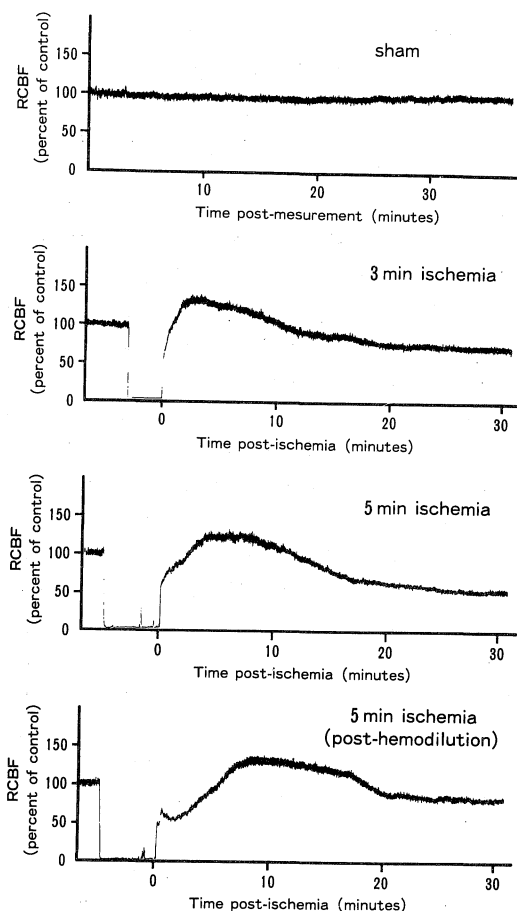


Fig. 3. Regional cerebral blood flow (RCBF; as a percent of control) in the hippocampus CA1 sector continuously measured by Laser Doppler Flowmeter prior to, during, and serially after occlusion of the bilateral common carotid arteries.

有意に強く、再開通 10 分後で $86.7 \pm 19\%$ 、20 分後で $51.8 \pm 12\%$ 、また 30 分後で $38.9 \pm 10\%$ となった。

(4) hemodilution 前処置 5 分間閉塞・再開通群

虚血・虚血後の局所脳血流量変動パターンは 3 分間閉塞・再開通群、及び 5 分間閉塞・再開通群と同様であり、post-ischemic hyperperfusion 中は最高値 $120 \pm 16\%$ をとった。post-ischemic hypoperfusion は 10 分後で $99.1 \pm 15\%$ 、20 分後で $82.5 \pm 6.3\%$ 、及び 30 分後で $69.4 \pm 5.2\%$ となって 3 分間閉塞・再開通群と 5 分間閉塞・再開通群の中間の値となった。hemodilution 前処置 5 分間閉塞・再開通群と 5 分間閉塞・再開通群の脳血流量には最開通 20 分後および 30 分後で有意差を認めた。

なお最高値に達するまでの時間には上記 3 群の間に統計学的有意差を認めなかった。

4. 病理組織学的検討

本モデルにおいては両前脳虚血であるので海馬の病理学的変化は常に左右差なく出現する。したがって、今回の病理学的検討にはニードル型センサー刺入と反対の海馬 CA1 錐体細胞層を観察することとし、その錐体細胞の残存数を定量的に評価した。遅発性神経細胞壊死の起こったものでは、錐体細胞は萎縮し、核は濃縮、細胞体はびまん性にエオジン好性となる ischemic cell change の像を呈するのが観察された。

対照群と比較して正常な海馬 CA1 錐体細胞の数が 90% 以上が残存しているものを intact (Photo 2)、50% 以上 90% 未満を mild (Photo 3)、10% 以上 50% 未満を severe (Photo 4)、10% 未満を complete (Photo 5) と分類すると以下のような結果となった (Table 2)。

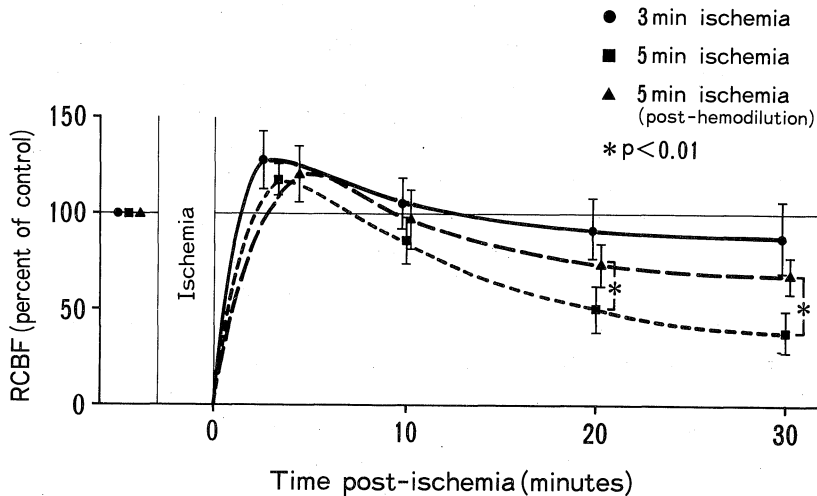


Fig. 4. RCBF as a percent of control is plotted versus time following a variable period of post-ischemia in three groups. Post-ischemic hyperperfusion and hypoperfusion were demonstrated.

Table 2. Delayed Neuronal Death in the hippocampus CA1 sector of 96 hours after transient forebrain ischemia

	Delayed Neuronal Death			
	intact	mild	severe	complete
3min ischemia (n=10)	8	2	0	0
5min ischemia (n=10)	0	0	1	9
5min ischemia (post-hemodilution) (n=10)	0	4	4	2

intact $\geq 90\%$, $90\% > \text{mild} \geq 50\%$, $50\% > \text{severe} \geq 10\%$, $10\% > \text{complete}$

3分間閉塞・再開通群：10匹のうち8匹がintact, 2匹のみがmildであった。

5分間閉塞・再開通群：severe 1匹, complete 9匹できわめて再現性良く遅発性神経細胞壊死を認めた。

hemodilution前処置5分間閉塞・再開通群：mild 4匹, severe 4匹, complete 2匹となり無前処置の5分間閉塞・再開通群に比し, 明かな遅発性神経細胞壊死の抑制効果がみられた。

なおsham群の海馬CA1錐体細胞層は完全な生理学的構造を呈しており, 海馬を除く他の脳組織にも病理学的な変化を認めないことが確認できた。

考 察

脳卒中による脳虚血や, 心不全・ショック等による全脳虚血は, いずれも脳梗塞の原因となり得る。その病態の概念は「虚血侵襲が十分に強ければ神経細胞は比較的早期に, しかもある決まった経過をたどって壊死にいたる¹⁴⁾。その変化は光学顕微鏡的には数十分から2-3時間のうちに観察できるようになり, 以後の経過はその時点で予測できてしまう¹⁵⁾。」というものであった。血流が遮断されると, 細胞への酸素やglucoseの供給不足に加えて, 代謝環境の悪化(例えばacidosis)がおり, 細胞は水や電解質その他の細胞膜内外の物理化学的環境の恒常性を保つために必要なenergyを産生できなくなり, 死に至るものと考えられてきた。その際には神経細胞のみならずグリア細胞, 血管内皮細胞の壊死も進行する。これに対して, 1982年Kirino²⁾が砂ネズミ海馬CA1に見いだした遅発性神経細胞壊死という現象は, 前述のような概念だけで説明することは不可能である。

海馬の虚血に対する選択的脆弱性(selective vulnerability)¹⁶⁾は古くから知られた現象であり, 海馬は記憶や学習に関する重要な役割を担っている¹⁷⁾とも考えられてきた。また, てんかん患者の脳でも海馬CA1領域に神経細胞の脱落を認める¹⁸⁾¹⁹⁾ことが19世紀にはすでによく知られていて, てんかん発作と海馬病変との関係が研究され, 側頭葉てんかんの外科的治療へとその流れは続いている。このように臨床上重要である上に, 海馬CA1が選択的に脆弱で遅発性神経細胞壊死のおこる部位であることは興味深い。しかも, Petito *et al.*²⁰⁾が遅発性神経細胞壊死がヒトにおいても認められ, この現象が実験動物に限らない普遍的なものである事を示しており非常に興味を持って研究されるに至っている。

遅発性神経細胞壊死の研究は, 虚血性神経細胞障害一般のメカニズムの解明に役立ち, それを防御する手段の開発に資するという点でも重要である。きわめて再現性

が高く, 障害の進行が緩徐であるため虚血侵襲後に実験操作を加える余裕もあり, 薬剤の効果等を検討するにも有利である。

海馬CA1が選択的に脆弱である原因については2つの仮説をめぐって長い論争の歴史を持っている。仮説の1つはSpielmeyer²¹⁾の言うvasculo-hemodynamic theoryで, 海馬領域の血管構築は極めて細く長く曲がりくねっており, 脳の他の領域と比べて血流動態が障害され易いとするものである。もう1つの仮説はVogt²²⁾の提唱したpathocllisis (topistic) theoryで, 虚血の程度そのものに差はないが, 細胞自体が元々持つ物理化学的性質に差異があり, 虚血に対して脆弱性を反映するというものである。現在に至るもなおその結論は得られていない。

近年, 海馬CA1の選択的脆弱性に関する研究は飛躍的に進歩しており, しいていうならばpathocllisis theoryの系統が主流をなしていると思われる。自発活動電位の測定で, 5分間虚血後の海馬CA1錐体細胞は電気生理学的に1日間は生存する²³⁾という報告や, ATPなどの高エネルギーリン酸化合物も虚血後12時間から神経細胞壊死のおこる48時間までは正常レベルをたもつ²⁴⁾とする報告や, さらに虚血後1日-2日の海馬の血流は完全に回復している²⁵⁾, という報告があいつぎ, 脳血流やエネルギー代謝と直接関係のないメカニズムによって細胞壊死が進行するという仮説がとらえられた。あるいは, アミノ酸の取り込み異常を示してBodsch & Takahasi²⁶⁾は蛋白代謝障害が細胞死の第一の原因であると考えた。1983年頃からは, 遅発性神経細胞壊死の著しい特徴がシナプス後部病変であり, 最も大きな原因は興奮性神経伝達物質, 特にグルタミン酸・アスパラギン酸などの興奮性アミノ酸の細胞外への過剰放出による神経細胞の過興奮である(excitotoxicity theory²⁷⁾²⁸⁾²⁹⁾)とする仮説がとらえられた。その結果として細胞内のCa²⁺濃度の上昇を招き, Ca²⁺依存性プロテアーゼの活性化による構造蛋白の破壊, フォスホリパーゼの活性化による膜構造の破壊が進み, 細胞死につながっていくと考えられている(calcium theory³⁰⁾³¹⁾)。しかし, このような機序が病態の主体かどうかとなるとまだ不明な点も多い。Kogureは, ゆるやかに進行するエネルギー代謝の相対的障害が遅発性神経細胞壊死の原因であると述べている³²⁾。すなわち, 虚血によって細胞膜が損傷され, 細胞内のイオンホメオスタシスの乱れが生じこれを修復するために大量のエネルギーが消費される。このため本来細胞の生存に必要な生合成にエネルギーをふりかけることができなくなり, それは重要な生体高分子の減少をひきおこすと

いうもので、大部分の神経細胞は血流再開でこのような危機をのりきり、回復するのであるが、選択的に脆弱な神経細胞はこの危機を克服できない。これが遅発性神経細胞壊死であると主張している。

一方、海馬 CA1 の毛細管密度が他の領域より疎で、虚血後の循環障害からの回復が悪く³³⁾、虚血後に CA1 領域のみに一過性の組織 pH の低下のみられる³⁴⁾ことが指摘され hemodynamic な要素の重要性も主張されており、現在のところその機序を説明する決定的な結論には至っていない。

虚血に対する海馬 CA1 の選択的脆弱性の原因は、その錐体細胞の topistic な脆弱性も肯定した上で、虚血による錐体細胞への障害が虚血後の血流障害（2次虚血）によって、より強調されるであろう事も否定できないであろう。vasculo-hemodynamic theory と topistic theory の両仮説を考慮しないでその発生機序を解釈することは困難だとも考えられる。すなわち、蛋白代謝障害であれ、excitotoxicity theory であれ、あるいは calcium theory であれいずれにしても、虚血侵襲から生き延びようとする神経細胞にとっては、エネルギー源となる酸素やグルコースの供給を十分に受け、毒素となる物質や有害な代謝産物ができるだけはやく wash out されることが重要である。血流再開によって著明な浮腫をきたしたり、出血性梗塞を惹起することのある脳梗塞モデルと、砂ネズミ遅発性神経細胞壊死のモデルとの大きな違いがこういう点にもある。

そこで今回著者は砂ネズミに前脳虚血を負荷した時、遅発性神経細胞壊死が起こる場合と起こらない場合にとのような微小循環動態の違いを示すのかを明らかにした。

局所脳血流量の測定法としては従来水素クリアランス法³⁵⁾³⁶⁾、オートラジオグラフィ法³⁷⁾³⁸⁾等が用いられてきたが、何れの方法でも脳血流量を連続測定することはできない。今回用いた Laser Doppler Flowmeter は、波長 780 nm の半導体レーザー光を光ファイバーで組織に照射し、血球の動きによって変調された光を光ファイバーを通して受光し、電気信号に変換して血流量を算出するものである³⁹⁾。センサー先端部の局所脳血流量が連続的に算出され表示されるので、その時間的変動を評価するには適している。絶対値を評価するには問題が残っている⁴⁰⁾が、水素クリアランス法・オートラジオグラフィ法との比較検討では相対値を評価するには問題がない⁴¹⁾⁴²⁾とされている。

Suzuki, R., et al.²³⁾²⁵⁾ は砂ネズミ両側総頸動脈 5 分間閉塞・再開通モデルで、3H-nicotin 法を用いて海馬の脳血流量を測定し、再開通 6 時間後には閉塞前値に戻って

いる事を示した。しかし、その報告でも血流量測定は断続的な 3 回の測定にとどまり、現時点でも連続的な血流変動の報告はない。虚血の病態を考察する上で、虚血後の血流増加現象 (post-ischemic hyperperfusion)、あるいは、血流減少現象 (post-ischemic hypoperfusion) の詳細を把握することは極めて重要である。

今回の連続血流量測定の結果は以下のように要約される。

1. 砂ネズミでは、両側総頸動脈閉塞によって残存血流量はほぼ 0 となり、閉塞時間が 3 分間でも 5 分間でも閉塞中を通じて増加しない。これは先天的に頸動脈系と椎骨動脈系の間には側副血行路を欠くことで、あるいはこのモデルでは側副血行路が有効に働かないために、短時間であっても両側総頸動脈閉塞だけで極めて不変的に最重度の前脳虚血を作れることを意味し、このことは 5 分間虚血による遅発性神経細胞壊死の再現性の高さにつながっている。また、虚血侵襲の大きさが虚血時間によってのみ規定されることをも意味する。これは例えば、田村・佐野⁴³⁾が成猫中大脳動脈 2 時間閉塞・再開通実験を行い、水素クリアランス法で測定した脳血流量が、残存血流量が一定しないために多彩なばらつきを認めたのと対照的である。

2. 3 分間閉塞・5 分間閉塞ともに再開通後すみやかに hyperperfusion となるが、これは酸素や glucose の供給不足による組織 pH の低下にとまらぬ脳血管の拡張、虚血による脳血管反応性自身の障害等を反映していると考えられた。最高値に達するまでの時間は 3 分間閉塞に比べ 5 分間閉塞のほうが長い傾向がみられたが統計学的有意差を認るには至らなかった。

3. 5 分間閉塞・再開通群が 3 分間閉塞・再開通群より有意に post-ischemic hypoperfusion の程度が強かったのは、より強い虚血侵襲であったがために、浮腫や血管壁の物質透過性の異常、血管外への水や血漿成分の移動による血液の濃縮と粘度の増加、血小板機能の亢進、赤血球変形能の低下等が強く起こった事を反映したものと考えられた。それらは結果的に 2 次的虚血をきたし、再び酸素や glucose の供給不足を招くのみならず、虚血後の不利な代謝環境 (acidosis, 相対的エネルギー不足等) からの立ち直りを阻害させるものと推察される。その結果として 5 分間閉塞では遅発性神経細胞壊死を引き起こし、3 分間閉塞では壊死に至らなかったのではないかと考えられた。すなわち、遅発性神経細胞壊死の発生に post-ischemic hypoperfusion が悪影響を及ぼしているものと考えられた。

虚血脳において、hemodilution によって Hct を減少

させ血液粘度を下げると、微小循環が改善されて脳血流量が増加するとの報告は多く⁴⁴⁾⁴⁵⁾⁴⁶⁾、臨床応用もされている。その際、脳組織への酸素運搬能を考慮すると至適 Hct は動物実験で約 33 %⁴⁷⁾と報告されている。今回の実験では Hct が 2 時間にわたって約 34 %となっていたので、hemodilution は酸素運搬能の面からも充分に有効に働いたと判断された。

5 分間両側総頸動脈閉塞中の血流量は hemodilution 前処置群でも、一定して 0 の値をとり続けたことから、hemodilution によっても側副血行の改善はなく、希釈された血液が血管内にとどまっていたと考えられる。この間の酸素供給能は赤血球濃度が低い分だけ低下しており、組織は hemodilution をしなかったものより、より強い hypoxia となっていたと推定される。しかし、再開通後の血流量変動をみると、post-ischemic hyperperfusion の程度も変わらず、むしろ post-ischemic hypoperfusion が改善されている。血液粘度が低く抑えられ血小板機能亢進も抑制されるなどして、微小循環においては血流速度が速くなっていたと推定された。結果的には局所脳血流量は 3 分間閉塞群・5 分間閉塞群の中間の値をとり、遅発性神経細胞壊死もかなり抑制される事がわかった。これは、hemodilution 前処置が遅発性神経細胞壊死に対して防御効果を有することを示唆した。また、砂ネズミ前脳虚血モデルにおける遅発性神経細胞壊死に、post-ischemic hypoperfusion が関与している事を支持する結果とも考えられた。

結 語

1. 砂ネズミ両側総頸動脈閉塞・再開通モデルにおいて、閉塞時間を 3 分間、5 分間とした際の閉塞・再開通時局所脳血流量の変化を一定パターンとして連続的に捉えることができた。

2. 閉塞時の残存血流量は 0 で一定し、このモデルでは虚血侵襲が虚血時間のみ規定される事が明かとなり、結果的には post-ischemic hypoperfusion の差となってあらわれた。

3. 虚血時間が長い程（虚血侵襲が大きい程）hypoperfusion の程度は強くなり、遅発性神経細胞壊死も強く起こった。

4. 以上のことから、この動物実験モデルは虚血侵襲で結果的に 2 回の虚血にさらされることを意味し、遅発性神経細胞壊死の成因に post-ischemic hypoperfusion が関与している事が示唆された。

5. hemodilution で Hct を適度に下げると、虚血後の hypoperfusion を軽減でき、遅発性神経細胞壊死をあ

る程度抑制できる事もあきらかとなった。その機序として、hemodilution は脳微小循環を改善し虚血後の 2 次虚血侵襲を軽減させ、脳循環代謝障害からの回復を促進させるものと推察された。

本論文の要旨は、第 14 回・第 15 回日本脳卒中学会総会（1989、東京・1990、盛岡）、第 48 回日本脳神経外科学会総会（1989、盛岡）、第 1 回日本脳循環代謝学会総会（1989、東京）において発表した。稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜った榊 寿右教授に深甚の謝意を捧げるとともに、御指導御校閲を賜った高柳 哲也教授、日浅義雄教授に深謝致します。さらに御助力頂いた平松謙一郎博士、生野慶子・森本かおる嬢に感謝致します。

文 献

- 1) Siesjö, B. K.: Brain energy metabolism. Jhon Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, 1978.
- 2) Kirino, T.: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. Brain Res. 239: 57-69, 1982.
- 3) Kirino, T. and Sano, K.: Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. Acta Neuropathol. 62: 201-208, 1984.
- 4) Kirino, T. and Sano, K.: Fine structural nature of delayed neuronal death following ischemia in the gerbil hippocampus. Acta Neuropathol. 62: 209-218, 1984.
- 5) Pulsineri, W. A., James, B. B. and Plum, F.: Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. Ann. Neurol. 11: 491-498, 1981.
- 6) Pulsinelli, W. A., Levy, D. E. and Duffy, T. E.: Regional cerebral blood flow and glucose metabolism following transient forebrain ischemia. Ann. Neurol. 11: 499-509, 1981.
- 7) Rudolphi, K. A., Keil, M. and Hinze, H. J.: Effect of theophylline on ischemically induced hippocampal damage in mongolian gerbils: A behavioral and histopathological study. J. Cereb. Blood Flow Metab. 7: 74-81, 1987.
- 8) Hiramatsu, K., Kyoji, K., Utsumi, S., Okuchi, K. and Kim, Y. K.: The calcium antagonist, Diltiazem attenuate hippocampal damage following

- cerebral ischemia in the gerbils. *Jpn. Pharmacol. ther.* **17**: 1733-1739, 1989.
- 9) 小暮久也: 虚血性神経細胞障害. *神経進歩* **30**: 1122-1127, 1986.
 - 10) Wood, J. H. and Kee, D. B.: Hemorheology of the cerebral circulation in stroke. *Stroke* **16**: 765-772, 1985.
 - 11) Little, J. R., Slugg, R. M., Latchaw, J. P. and Lesser, R. P.: Treatment of acute focal cerebral ischemia with concentrated albumin. *Neurosurgery* **9**: 552-558, 1981.
 - 12) Tone, O., Miller, J. C., Bell, J. M. and Rapport, S. I.: Regional cerebral palmitate incorporation following transient bilateral carotid occlusion in awake gerbils. *Stroke* **18**: 1120-1127, 1987.
 - 13) Loscota, W. J., Lomax, P. and Verity, M. A.: A Stereotaxic Atlas of the Mongolian Gerbil Brain (*Meriones unguiculatus*). *Ann. Arbor Science, Ann. Arbor*, 1974.
 - 14) Salford, L. G., Plum, F. and Brierley, J. B.: Graded hypoxia-oligemia in rat brain. II. Neuropathological alterations and their implications. *Arch. Neurol.* **29**: 234-238, 1973.
 - 15) Brierley, J. B.: Cerebral hypoxia. (Blackwood, W. and Corsellis, J. A. N., eds.). 3rd. ed., Edward Arnold, London, p41-85, 1976.
 - 16) Bouchet, C. and Cazauviel, H.: Del'epilepsie consideree dans ses rapports avec l'alienation mentale. *Arch. Gen. Med.* **9**: 510-542, 1825.
 - 17) Squire, L. R.: Mechanisms of memory. *Science* **232**: 1612-1619, 1986.
 - 18) Sommer, W.: Erkrankung des Ammonshorns als ätiologisches Moment der Epilepsie. *Arch. Psychiat.* **19**: 631-675, 1880.
 - 19) Pfleger, K.: Beobachtung über Schrumpfung und Sclerose des Ammonshornes bei Epilepsie. *Allg. Z. Psychiat.* **36**: 359-365, 1880.
 - 20) Petito, C. K., Feldmann, E., Pulsinelli, W. A. and Plum, F.: Delayed hippocampal damage in human following cardiopulmonary arrest. *Neurology* **37**: 1281-1286, 1987.
 - 21) Spielmeier, W.: Zur Pathogenese der örtlich electiyer Gehirnveränderungen. *Z. Ges. Neurol. Psychiat.* **99**: 756-77., 1925.
 - 22) Vogt, O.: Der begriff der Pathoklise. *J. Psychol. Neurol.* **31**: 245-255, 1925.
 - 23) Suzuki, R., Yamaguchi, T., Li, C. L. and Klatzo, I.: The effect of 5-minute ischemia in mongolian gerbil; II. Changes of spontaneous neuronal activity in cerebral cortex and CA1 sector of hippocampus. *Acta Neuropathol.* **60**: 217-222, 1983.
 - 24) Arai, H., Passanneau, J. V. and Lust, W. D.: Energy metabolism in delayed neuronal death of CA1 neurons of the hippocampus following transient ischemia in the gerbil. *Metabol. Brain Dis.* **1**: 263-278, 1986.
 - 25) Suzuki, R., Yamaguchi, T., Kirino, T., Orzi, F. and Klatzo, I.: The effect of 5-minute ischemia in mongolian gerbil.; I. Blood-brain barrier, cerebral blood flow, and local cerebral glucose utilization changes. *Acta Neuropathol.* **60**: 207-216, 1983.
 - 26) Bodsh, W. and Takahashi, K.: Selective neuronal vulnerability to cerebral protein and RNA-synthesis in the hippocampus of the gerbil brain. *in Cerebral ischemia* (Bes, A., Braquet, P. and Paoletti, R., eds.). Elsevier, New York, p197-208, 1983.
 - 27) Olney, J. W., Ho, O. L. and Rhee, V.: Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp. Brain Res.* **14**: 61-76, 1971.
 - 28) Kogure, K., Scheinberg, P., Matsumoto, A., Busto, R. and Reinmuth, O. M.: Catecholamines in experimental brain ischemia. *Arch. Neurol.* **32**: 21-24, 1975.
 - 29) Monaghan, D. T., Holets, V. R., Toy, D. W. and Cotman, C. W.: Anatomical distributions of four pharmacologically distinct 3H-L-glutamate binding sites. *Nature* **306**: 176-179, 1983.
 - 30) Siejö, B. K.: Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1**: 155-185, 1981.
 - 31) Siejö, B. K. and Bengtsson, F.: Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **9**: 127-140, 1989.
 - 32) 小暮久也, 飛田宗重, 佐藤博美, 泉山公明: 虚血に

- よる脳細胞壊死の機序. 臨床科学 22: 453-460, 1986.
- 33) **Imdal, A. and Hossmann, K. A.**: Morphometric evaluation of post-ischemic capillary perfusion in selective vulnerable areas of gerbil brain. *Acta Neuropathol.* 69: 267-271, 1986.
- 34) **Munekata, K. and Hossmann, K. A.**: Effect of 5-minute ischemia on regional pH and energy state of the gerbil brain: Relation to selective vulnerability of the hippocampus. *Stroke* 18: 412-417, 1987.
- 35) **Fieschi, C., Bozzaro, L. and Agnoli, A.**: Regional clearance of hydrogen as a measure of cerebral blood flow. *Acta Neurol. Scand.* 14: 46-52, 1965.
- 36) 田村 晃, 浅野孝雄, 卓 允吉, 間中信也, 平川公義, 佐野圭司: 水素クリアランス法による脳局所血流量の測定. 脳神経 30: 47-54, 1978.
- 37) **Sakurada, O., Kennedy, C., Jehle, J., Brown, J. D., Carbin, G. L. and Sokoloff, L.**: Measurement of local cerebral blood flow with iodo(14c) antipyrine. *Am. J. Physiol.* 234: H59-H66, 1978.
- 38) **Ginsberg, M. D.**: Autoradiographic measurement of local cerebral blood flow. *Cerebral blood flow.* mcgraw, p299-308, 1987.
- 39) 鹿嶋 進, 橋爪俊幸, 満井顕太郎: レーザー血流計の特性. 日本レーザー医学会誌 9: 3-7, 1988.
- 40) 富田 稔: 脳循環測定法—その pitfall について. 第1回日本脳環代謝学会総会抄録. p 31, 1989.
- 41) **Dirnagl, U., Kaplan, B., Jacewicz, M. and Pulsinelli, W.**: Continuous measurement of cerebral blood flow by laser-doppler flowmetry in a rat stroke model. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 9: 589-596, 1989.
- 42) **Arbit, E., DiResta, G. R., Bedford, R. F., Snah, N. K. and Galicich, J. H.**: Intraoperative measurement of cerebral and tumor blood flow with laser-doppler flowmetry. *Neurosurgery* 24: 166-170, 1989.
- 43) 田村 晃, 佐野圭司: 脳血流における血流再開の意義. 脳神経 31: 1005-1014, 1979.
- 44) **Heros, R. C. and Korosue, K.**: Hemodilution for cerebral ischemia. *Stroke* 20: 423-427, 1989.
- 45) **Hyodo, A., Heros, R. C., Tu, Y-K., Ogilvy, C., Graichen, R., Lagree, K. and Korsue, K.**: Acute effect of hemodilution with crystalloid in a canine model of focal cerebral ischemia. *Stroke* 20: 534-540, 1989.
- 46) **Vorstrup, S., Andersen, A., Juhler, M., Brun, B. and Boysen, G.**: Hemodilution increases cerebral blood flow in acute ischemic stroke. *Stroke* 20: 884-889, 1989.
- 47) **Kee, D. B. and Wood, J. H.**: Rheology of the cerebral circulation. *Neurosurgery* 15: 125-131, 1983.

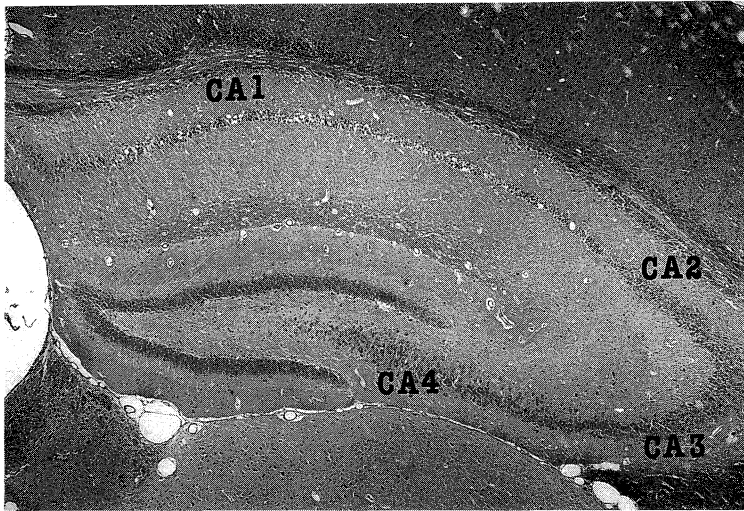


Photo 1. Photomicrograph of hippocampus 96 hours after transient forebrain ischemia. Note the pyknotic necrosis of pyramidal cells in the CA1 sector. Subdivision of conus ammonius (CA) is indicated by its abbreviation. (Hematoxylin-Eosin stain×30)

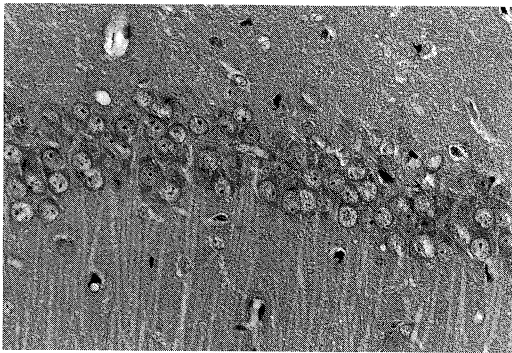


Photo 2. CA1 pyramidal cells (neurons) 96 hours after ischemia appears intact. (Hematoxylin-Eosin stain×200)

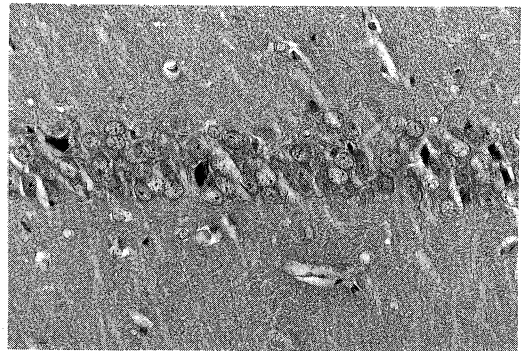


Photo 3. CA1 pyramidal cells 96 hours after ischemia shows mild neuronal death. (Hematoxylin-Eosin stain×200)

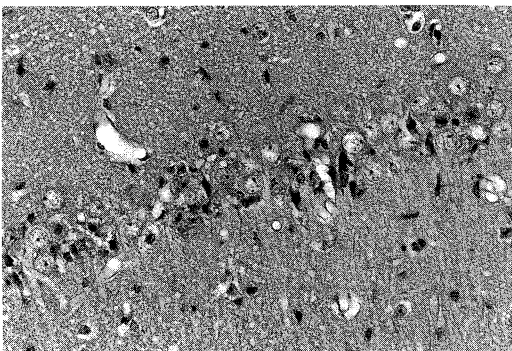


Photo 4. CA1 pyramidal cells 96 hours after ischemia shows severe neuronal death. (Hematoxylin-Eosin stain×200)

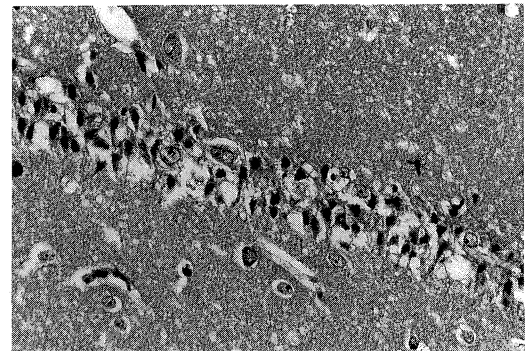


Photo 5. CA1 pyramidal cells 96 hours after ischemia shows complete neuronal death. (Hematoxylin-Eosin stain×200)