

ラット中大脳動脈閉塞モデルにおける虚血・再灌流後の梗塞巣と局所脳血流量の変化に関する実験的研究

宮 軒 将

再灌流可能なラットの中大脳動脈閉塞モデルを用いて虚血・再灌流後の梗塞範囲と局所脳血流量 (rCBF: regional cerebral blood flow) の変化について検討した。実験群は雄性ラット43匹を1, 2, 26時間の永久虚血群と, 1, 1.5, 2, 3時間虚血負荷後に血流を再開し, 虚血開始26時間後に観察する再灌流群とに分けて行った。また観察部位は, 虚血中心部とその周辺部である虚血辺縁部, さらに直接虚血に曝されないが虚血中心部と密な神経線維連絡を有する虚血遠隔部の3部位について検討した。

梗塞範囲について, 26時間永久虚血群では虚血中心部のみならず虚血辺縁部におよぶ範囲の梗塞を生じていた。再灌流群において虚血負荷時間が1時間の場合は虚血中心部のみに梗塞を生じたが1.5時間では虚血中心部のみに梗塞を生じる群と虚血辺縁部までその範囲が及ぶ群の2つの梗塞パターンがみられた。さらに2時間では26時間永久虚血群と同等の範囲が梗塞に陥り, 3時間の虚血負荷では26時間永久虚血群より増加した。

永久虚血群の虚血中心部, 辺縁部では虚血時間に応じてrCBFは減少したが, 虚血遠隔部の虚血側の黒質, 視床後腹側核では虚血早期よりrCBFの増加を認めた。再灌流群では永久虚血群と異なり, 虚血時間に応じてそれぞれ異なったrCBF変化を示し, 虚血中心部では虚血時間1.5時間以内では高血流にそれ以上では低血流になった。虚血辺縁部では虚血時間に応じて進行性に血流が低下し, 特に1.5時間を境に著しく低下した。また虚血遠隔部においては, 部位によりその反応性に違いが見られた。

今回の実験モデルにおいては, 再灌流群の虚血辺縁部のrCBF変化, 梗塞範囲, 梗塞率の結果から, 1.5時間以内の再灌流ならば回復の可能性があると思われるが, 3時間以上の脳虚血の場合はむしろ病態を増悪させる可能性があると思われた。また虚血遠隔部のrCBF変化については, 永久虚血群, 再灌流群とも虚血中心部の障害に応じた transneuronal な影響が示唆されたが, 部位によりその反応性に違いがみられた。

(平成11年8月19日受理)

The Changes of Infarcted Area and Regional Cerebral Blood Flow in Rats Subjected to Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion

Shou MIYANOKI

The purpose of this study was to evaluate time dependent changes in rCBF (regional cerebral blood flow) and an infarcted area after temporal middle cerebral artery occlusion in rats. The right

middle cerebral artery and common carotid artery were occluded for 1, 2 and 26 hrs using the intraluminal filament method in permanent occlusion groups. Reperfusion group rats were occluded for 1, 1.5, 2 and 3 hrs, and were sacrificed 26 hrs after onset of ischemia.

Infarction was observed in the ischemic core and the perifocal regions in the 26 hr permanent ischemia group. In the reperfusion groups, the infarcted rate increased rapidly when the ischemic time exceeded 1.5 hrs. The infarcted rate of reperfusion group after 3 hrs of ischemia became worse than that of the 26 hr permanent ischemia group.

The rCBF in the ischemic core and the perifocal regions was reduced time-dependently, but that in the exofocal regions (regions not perfused by the middle cerebral artery but which have a neuronal connection with the ischemic core) increased during permanent ischemia. In the reperfusion groups, rCBF in the ischemic core and the perifocal regions changed variably depending on whether the ischemic time exceeded 1.5 hrs or was within 1.5 hrs. In the exofocal regions, increase in the rCBF was only seen in the SNR (substantia nigra).

The findings in this experimental model suggest that reperfusion done within 1.5 hrs is beneficial to the ischemically injured brain, but that deterioration will have already occurred if reperfusion is done after 3 hrs.

In addition, it was suggested that rCBF in the exofocal regions was changed transneuronally, depending on ischemic damage of the ischemic core. However, the reaction of the rCBF in the exofocal regions differed from each area. (Accepted on August 19, 1999) *Kawasaki Igakkaishi* 25(3): 181-192, 1999

Key Words ① Cerebral ischemia ② Middle cerebral artery occlusion
③ Reperfusion injury ④ Regional cerebral blood flow
⑤ Transneuronal degeneration

はじめに

脳虚血における治療においては、速やかな血流の再開が最も重要である。しかし虚血時間や虚血の程度によっては、血流の再開がむしろ脳障害を増悪させることもあり、これは虚血・再灌流障害として新たな病態ととらえられている。このような病態において、局所脳血流量 (rCBF: regional cerebral blood flow) を測定し脳循環動態を把握することは、治療方法の決定や予後の推定に極めて有用であると思われる。従来の研究では、永久局所脳虚血モデルにおける虚血中心部および虚血辺縁部に注目した rCBF もしくは梗塞範囲の報告が多く、虚血・再灌流後における病態や直接虚血にさらされない虚血遠隔部の rCBF 変化についてまで検討した報告は少

ない。

そこで本研究では、再灌流可能なラットの中大脳動脈閉塞モデルを用いて、永久虚血及び虚血・再灌流モデルを作成し、虚血時間や血流の再開が梗塞範囲や rCBF にどのように影響を及ぼすかを観察した。特に rCBF は虚血中心部、辺縁部のみならず、虚血遠隔部における変化についても測定し、これらの部位の相互関係について検討した。

なお、本実験は川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け、(No. 98-012) 川崎医科大学の動物実験指針に基づき行われた。

対象と実験群

実験には雄性 Wistar 系ラット (280~320 g) を用い、以下のグループに分類した。

コントロール群：6匹，永久虚血群：1時間（1HR：PERM），2時間（2HR：PERM），26時間（26HR：PERM）の虚血の後に測定する3群，それぞれ5匹ずつと，再灌流群：1時間（1HR/25HR），1.5時間（1.5HR/24.5HR），2時間（2HR/24HR），3時間（3HR/23HR）の虚血を加えた後再灌流し，それぞれ虚血開始から26時間後に測定する4群，それぞれ5，7，5，5匹ずつとした。

方 法

1) 脳虚血・再灌流モデルの作成（ナイロン糸を用いた中大脳動脈閉塞モデル）

まずラットに笑気70%，酸素30%および4%ハロセンを加えた混合気を吸入させて麻酔導入を行い，その後はハロセン1～2%で維持した。虚血の作成は3-0ナイロン糸を用いて小泉らの方法¹⁾，いわゆる intraluminal suture 法で行った。なお麻酔中および虚血中は扇風機で冷却，ヒートパッドで加温しながら，直腸温を $38 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に維持した。

2) 関心領域（虚血中心部，虚血辺縁部，虚血遠隔部）の設定

梗塞巣の観察やrCBF測定における関心領域はPaxinosら²⁾，Zillesら³⁾のラット脳の解剖図譜を参照し，3つの冠状断面（bregmaより前方に0.2mm，後方に3.3mm，5.3mm，すなわち線条体，視床，黒質のレベル）から数カ所の領域を設定した（Fig. 1）。ラットの中大脳動脈閉塞モデルでは，虚血中心部が大脳皮質体性感覚野（FPS：frontoparietal cortex, somatosensory area）と線条体（CP：caudate putamen）に，また虚血辺縁部は前大脳動脈，後大脳動脈からも灌流を受けている大脳皮質運動野（FPM；frontoparietal cortex, motor area），大脳皮質視覚野（OCC：occipital cortex visual area），大脳皮質聴覚野（TeAud：temporal cortex, auditory area）になる。また虚血遠隔部は視床後腹側核（THAL-VP：ventroposterior thalamus），黒質（SNR：substantia nigra）などが該当する。本実験では

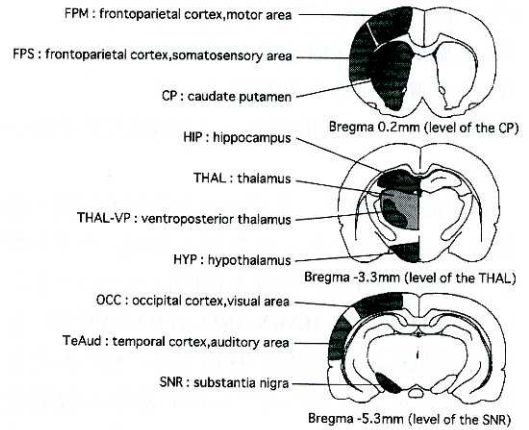


Fig. 1. The regions of interest on the three coronal levels

These coronal levels are 0.2 mm anterior (level of the caudate putamen), 3.3 mm posterior (level of the thalamus), and 5.3 mm posterior (level of the substantia nigra) to the bregma. This figure is used for measurement of rCBF and the infarcted area.

これらのうち，虚血中心部のCP，FPS，虚血辺縁部のFPM，また虚血遠隔部のTHAL-VP，SNRに注目した。

3) 梗塞巣の観察と梗塞率の測定

各群のラット脳について20 μm 厚の冠状断切片を作成し，ヘマトキシリン-エオジン染色により梗塞巣の観察を行った。梗塞範囲は前述した3つの冠状断面の各部位についてその拡がりを見た。梗塞率は画像解析装置（iBAS 2000；CARL ZEISS）を用いて，虚血巣の中央部にあたるbregmaから前方0.2mm（線条体のレベル）の冠状断切片について木佐貫ら⁴⁾の方法に従い以下の式で算出した。

梗塞率（%）=（健側大脳半球面積-患側大脳半球非梗塞面積）/健側大脳半球面積 $\times 100$

4) rCBFの測定

rCBF測定は¹²³I-IMP（N-isopropyl-p-[¹²³I]iodoamphetamine）をトレーサーとしてイメージングプレートを用いたオートラジオグラフィ法（IP-ARG：imaging plate autoradiography）で行い，またrCBFの絶対値測定については，reference sampling法の原理に従い，以下の式で算出した⁵⁾。

$$F = 100 R \cdot Cb / (A \cdot N)$$

F：局所脳血流（ml/100g/min）

Cb:局所脳組織の放射能濃度 (cpm/g)

R:動脈血持続採血速度 (ml/min)

A:全動脈採血中の放射能 (cpm)

N:オクタノール抽出率 (文献値0.75⁵⁾を用いた.)

具体的な手順は、まずラットの左大腿動・静脈にカニューレションを行った後、¹²³I-IMPを0.5 mCi 静注し、静注と同時にハーバードポンプ (PUMP 22: HARVARD APPARATUS) を用いて動脈より持続的に採血した。得られた血液と標準線源に用いる¹²³I-IMP溶液の放射能をウェルカウンター (ARC-300AUTO WELL GAMMA SYSTEM: ALOKA) で測定した。またオートラジオグラム作成のため採血終了と同時に断頭、脳摘出後、O.C.T Compound: (SAKURA) で凍結包埋し、クライオスタット (HM 505 E: KARL ZEISS) で20 μm厚の冠状切片を作成した。また標準線源は前もって用意した既知濃度の¹²³I-IMP溶液とゼラチン溶液を混ぜて冷却し固形化させた後脳切片と同様に20 μm厚の切片を作成した。

この脳と標準線源の切片をイメージングプレートに12時間密着させてオートラジオグラムを得た。これをBAS 2000 バイオイメージングアナライザー (富士写真フィルム株式会社) を用

いて解析した。その結果から、ラット脳関心領域内の¹²³I-IMPの放射能濃度を算定し、これよりrCBFの絶対値を得た。

5) データの解析

各群の計数値は平均値±標準偏差で表現し、コントロール群と比較した。

有意差検定は Student's t-test を用いて行った。

結 果

1) 生理学的パラメーター及び動脈血ガス分析、血液化学検査 (Table 1)

血液ガスでは、2時間永久虚血群で acidosis を呈していた。また虚血・再灌流群において、虚血時間が長いほど血清 Na 値が上昇し、血糖が低下する傾向がみられた。

2) 梗塞巣の観察と梗塞率

1時間及び2時間永久虚血群では梗塞は生じなかった。26時間永久虚血群において大脳皮質のFPM, FPS, OCC, TeAudとCP, HYPにも及ぶ広範囲の領域が梗塞となっていた。また一部の例 (2/5例) で虚血遠隔部のTHAL-VPが梗塞となった。一方、再灌流群についてみると、1時間再灌流群では、CPと一部FPSのみが梗塞に陥っていた。1.5時間再灌流群では、

Table 1. Physiological parameters in the control group, the permanent ischemia groups, and the reperfusion groups

	Groups							
	control (n=6)	Permanent ischemia groups			Reperfusion groups			
		1hr:perm (n=5)	2hr:perm (n=5)	26:perm (n=5)	1hr/25hr (n=5)	1.5hr/24.5h (n=7)	2hr/24hr (n=6)	3hr/23hr (n=5)
BW(kg)	291.67 ± 7.53	293.33 ± 12.11	297.50 ± 9.57	300.00 ± 8.16	294.00 ± 10.49	293.57 ± 4.76	296.67 ± 13.66	334.00 ± 5.48
rectal temp (°C)	38.03 ± 0.24	38.02 ± 0.53	38.33 ± 0.13	38.08 ± 0.59	37.68 ± 0.50	37.77 ± 0.60	38.20 ± 0.40	38.03 ± 0.95
mean BP(mm Hg)	101.06 ± 5.95	122.50 ± 16.67	117.50 ± 6.24	108.25 ± 7.14	105.33 ± 4.48	101.57 ± 3.29	99.22 ± 1.61	112.20 ± 10.11
ph	7.44 ± 0.03	7.44 ± 0.04	7.37 ± 0.03	7.46 ± 0.01	7.44 ± 0.01	7.42 ± 0.01	7.46 ± 0.07	7.41 ± 0.02
PaO2(mm Hg)	96.50 ± 7.53	85.67 ± 7.89	99.00 ± 0.82	87.25 ± 3.30	93.20 ± 6.22	82.17 ± 21.50	88.83 ± 7.68	79.60 ± 8.68
PaCO2(mm Hg)	38.18 ± 1.63	35.97 ± 2.15	34.43 ± 3.30	34.68 ± 4.00	35.72 ± 3.44	41.60 ± 17.99	31.63 ± 6.90	37.60 ± 2.05
BE(mEq/l)	1.90 ± 2.34	-1.62 ± 2.37	-3.90 ± 2.06	2.08 ± 1.96	1.30 ± 1.43	-0.34 ± 1.45	0.57 ± 1.51	0.54 ± 1.88
Na(mEq/l)	142.83 ± 1.72	143.00 ± 1.55	143.25 ± 2.36	144.75 ± 3.30	142.80 ± 3.11	148.71 ± 3.25	146.00 ± 2.53	153.20 ± 2.17
k(mEq/l)	3.63 ± 0.22	4.30 ± 0.42	4.30 ± 0.18	4.38 ± 0.59	3.92 ± 0.19	3.86 ± 0.26	3.90 ± 0.34	3.42 ± 0.54
Ca(mmol/l)	1.26 ± 0.05	1.22 ± 0.06	1.22 ± 0.08	1.24 ± 0.09	1.29 ± 0.09	1.16 ± 0.07	1.20 ± 0.12	1.20 ± 0.10
BS(mg/dl)	129.67 ± 10.35	110.17 ± 9.47	132.25 ± 18.39	152.25 ± 19.00	117.80 ± 8.41	91.86 ± 16.42	84.50 ± 12.85	83.80 ± 4.21
lactate(mEq/l)	2.44 ± 0.73	2.41 ± 0.55	5.16 ± 1.53	4.18 ± 1.74	2.22 ± 0.41	2.20 ± 0.72	2.03 ± 0.85	1.42 ± 0.76

Values are the mean ± S.D.

BW: body weight, BP: blood pressure, BE: base excess, BS: blood sugar

1 HR: PERM, 2 HR: PERM, 26 HR: PERM: The permanent ischemia groups which was subjected 1, 2 and 26 hr MCAO (middle cerebral artery occlusion)

1 HR/25 HR, 1.5 HR/24.5 HR, 2HR/24 HR, 3 HR/23 HR: occlusion time of the middle cerebral artery/reperfusion time

1.5 HR/24.5 HR (mild): The smaller infarction group of 1.5 HR/24.5 HR

1.5 HR/24.5 HR (severe): The larger infarction group of 1.5 HR/24.5 HR

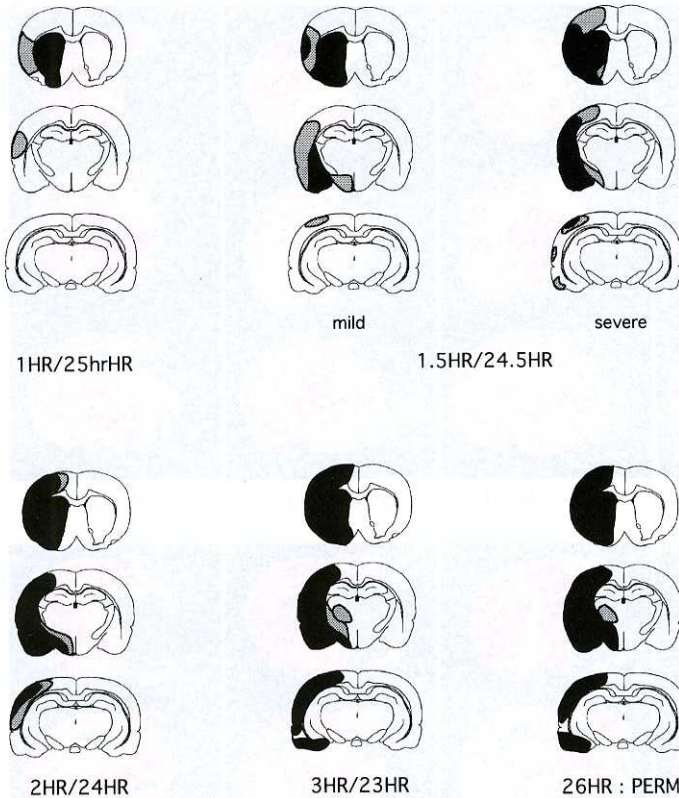


Fig. 2. Schematic illustration of infarcted area

These illustrative coronal sections show the infarcted area in the reperfusion groups and the 26 hr permanent ischemia group. Black area indicate the minimum infarcted area of each group. Black and grey areas together indicate maximum infarcted area of each group.

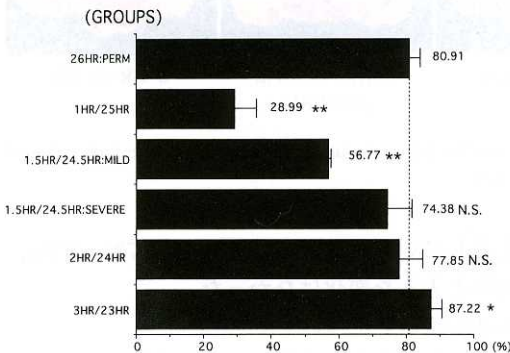


Fig. 3. Infarcted rate

Comparison of the infarcted rate between each of the reperfusion groups and the 26 hr permanent ischemia group.

Bar graphs and error bars represent the mean \pm S.D.
 * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.001$, N.S. : not significant

FPSに加えFPMまで進展する2つのタイプがあり、それぞれを軽度群(1.5hr/24.5hr:mild)、重度群(1.5hr/24.5hr:severe)とした。また2時間再灌流群ではCP、FPSとFPMの約半分から大部分に及び、3時間再灌流群ではCP、FPS、FPM、HYP全体に及び、一部(1/5例)では遠隔部のTHAL-VPが梗塞に陥っていた(Fig. 2)。梗塞率は26時間永久虚血群では $80.91 \pm 3.28\%$ であった。再灌流群においては1時間及び1.5時間再灌流:軽度群ではそれぞれ $28.99 \pm 6.5\%$, $56.77 \pm 0.84\%$ であった。1.5時間再灌流:重度群及び2時間再灌流群では、26時間永久虚血群と同等となりそれぞれ 74.38 ± 7.35 , $77.85 \pm 6.99\%$ となっていた。また3時間再灌流群では26時間永久虚血群を超える $87.22 \pm 3.44\%$ となった(Fig. 3)。再灌流群では、虚血中心部のCPは全て梗塞となっており、

線条体のレベルでの梗塞率の増加は、大脳皮質のFPSと特にFPMの梗塞の有無に大きく左右された。また虚血1.5時間を境にその梗塞範囲が大きく変化した。

3) rCBFについて

I) 永久虚血群 (Table 2), (Fig. 4)

①虚血中心部 (CP, FPS) におけるrCBFの変化

CPにおいて虚血側の虚血1, 2, 26時間後ではそれぞれコントロール群の15, 9, 7%となった。健側の同部位ではそれぞれ93, 84, 91%になった。

またFPSにおいて虚血側の虚血1, 2, 26時間後ではそれぞれコントロール群の15, 10, 5%となった。健側の同部位ではそれぞれ93, 84, 97%になった。

梗塞範囲がCPとFPSのみに生じるものとCP、

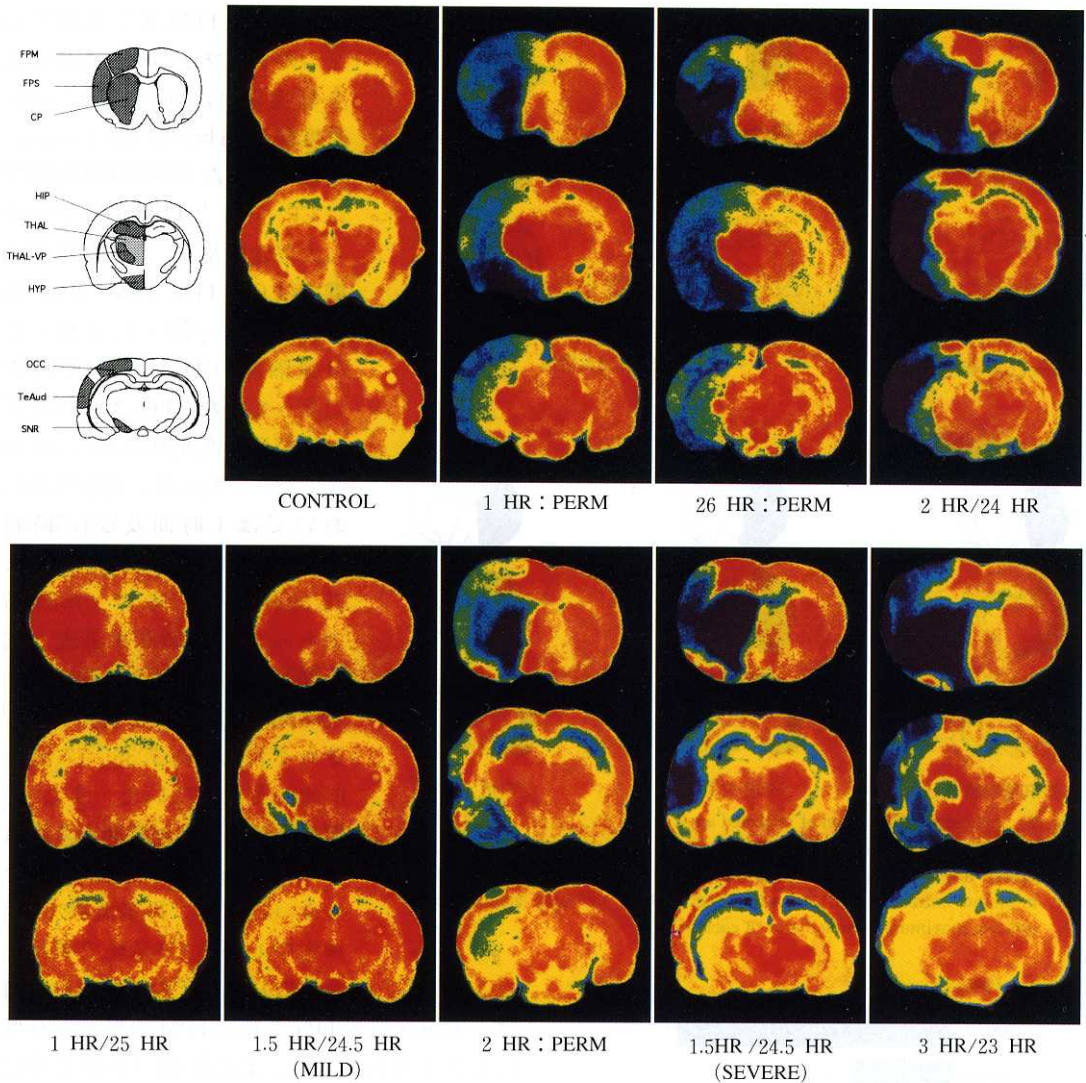


Fig. 4. Representative rCBF autoradiograms in three sections at the level of the caudoputamen, thalamus, and substantia nigra of rat brains in the control, permanent ischemia and reperfusion groups

②虚血辺縁部 (FPM) における rCBF の変化

虚血側では虚血 1, 2, 26時間後ではそれぞれコントロール群の約30, 29, 22%となった。健側の同部位ではそれぞれ87, 85, 90%になった。

③虚血遠隔部 (SNR, THAL-VP) における rCBF の変化

(a) SNR について

虚血側では虚血時間にともない増加し、1時間で114%、2時間で117%、26時間で142%に

上昇していた。健側ではそれぞれ97%、94%、97%と大きな変化はなかった。

(b) THAL-VP について

虚血側は虚血急性期より著しく増加しコントロール群に比し、1時間で164%、2時間で116%、26時間で141%に増加していた。健側ではそれぞれ102%、94%、89%となった。

II) 再灌流群 (Table 2), (Fig. 4)

①虚血中心部 (CP, FPS) における rCBF の変化

Table 2. Regional cerebral blood flow in the control group, the permanent ischemia groups, and the reperfusion groups

REGION	(Ipsilateral)														
	Groups														
	Permanent ischemia groups				Reperfusion groups										
	CONTROL (n=6)	1HR:PERM (n=5)	2HR:PERM (n=5)	26HR:PERM (n=5)	1HR/25HR (n=5)	1.5HR/24.5HR mild(n=4)	1.5HR/24.5HR severe(n=3)	2HR/24HR (n=5)	3HR/23HR (n=5)						
MEAN SD	MEAN SD	MEAN SD	MEAN SD	MEAN SD	MEAN SD	MEAN SD	MEAN SD	MEAN SD							
FrPaM(motor)	122.48 11.69	36.85 6.94 ***	35.16 3.08 ***	26.80 9.61 ***	101.00 12.86 *	113.71 31.99	60.90 33.97 **	47.71 4.59 ***	21.10 9.37 ***						
FrPaS1(somatosensory)	118.97 8.30	18.14 4.97 ***	12.34 5.62 ***	6.50 5.20 ***	159.93 25.40 **	136.29 46.32	24.70 8.54 ***	19.66 8.04 ***	5.76 4.60 ***						
caudate putamen	108.86 6.23	16.40 3.47 ***	9.99 4.03 ***	8.16 3.04 ***	149.69 19.70 **	98.90 41.28	38.67 20.86 **	17.62 8.23 ***	6.16 1.95 ***						
hippocampus	77.65 3.26	49.08 8.50 ***	53.14 13.54 **	65.33 13.84	70.81 9.59	67.96 13.49	70.44 11.18	60.11 6.51 ***	63.07 16.49 ***						
thalamus	108.66 7.07	140.74 44.70 *	108.11 43.40	131.52 35.25 ***	100.06 13.83	90.72 9.71 *	93.37 21.94	83.81 8.32 ***	92.48 17.95 ***						
thalamus-VP	109.18 7.06	179.34 64.21 **	126.52 50.36	154.20 42.95 ***	103.42 15.13	96.54 5.10 *	107.07 33.91	96.59 22.02	98.43 39.57						
hypothalamus	86.72 4.11	25.41 8.19 ***	24.37 3.70 ***	23.21 15.75 ***	78.27 9.71	66.95 2.55 **	71.16 5.85 **	68.18 28.93 ***	33.77 10.82 ***						
parietal(visual)	118.04 13.22	31.81 7.43 ***	36.32 4.92 ***	35.43 11.91 ***	86.93 18.88 *	75.09 13.90 **	63.38 28.15 **	56.34 17.21 ***	33.88 11.60 ***						
occipital(visual)	145.71 14.43	31.72 8.49 ***	35.98 6.64 ***	59.22 43.21 ***	116.83 19.01 *	78.29 14.20 **	79.89 34.81 **	52.57 25.11 ***	25.74 14.18 ***						
SNR	81.59 9.53	92.98 13.05	95.15 4.96 *	116.25 15.44	103.04 10.74 **	92.82 12.06	94.69 11.74	97.35 12.53	104.59 25.98 *						
(Contralateral)															
FrPaM(motor)	119.68 10.43	103.78 11.69 *	102.24 14.31 *	107.97 14.03 *	105.72 15.35	97.87 12.08 *	87.55 6.80 ***	87.10 9.34 ***	90.06 6.09 **						
FrPaS1(somatosensory)	120.81 7.03	112.04 15.44	101.40 9.76 **	116.99 13.30	110.66 12.56	101.13 11.67 *	84.59 6.52 ***	91.75 13.36 ***	99.21 4.95 ***						
caudate putamen	108.79 5.57	101.58 14.97	90.85 8.74 **	99.34 8.06	108.63 9.83	99.66 15.76	81.41 2.03 ***	82.00 4.42 ***	91.54 5.92 **						
hippocampus	77.53 2.58	68.55 11.42	69.84 14.32	69.42 11.37 **	74.30 9.97	73.10 13.20	72.34 6.69	63.66 4.76 ***	67.27 14.44						
thalamus	108.48 6.51	105.90 20.01	96.34 13.34	94.92 10.86 *	101.49 16.63	95.76 12.87	89.80 9.86 **	88.83 9.87 **	91.18 14.22						
thalamus-VP	109.01 7.29	111.21 24.69	102.79 19.14	96.99 12.82 *	104.34 16.23	99.17 14.02	92.56 14.50	93.53 11.88 *	94.70 14.85						
hypothalamus	87.02 7.90	82.54 17.34	73.85 11.80	69.75 9.81 **	76.52 5.12 *	71.74 10.22	66.56 4.06 **	72.91 8.30 *	70.46 5.87 *						
occipital(visual)	118.20 12.91	89.91 12.06 **	87.43 11.85 **	95.76 31.14	93.56 12.07 *	88.30 18.89 *	83.51 12.25 **	81.10 15.99 **	79.37 12.97 **						
temporal(auditory)	144.52 10.42	121.49 20.43 *	111.35 18.98 **	127.13 32.86 **	120.05 22.77 *	136.47 30.86	104.00 25.24 **	101.65 11.80 **	104.68 19.65 **						
SNR	82.32 10.33	79.79 11.59	77.60 4.33	79.64 9.05	76.48 11.65	75.80 6.52	63.28 6.83 *	80.57 15.66	69.67 13.37						

Values represent the mean ± SD (ml/100 g/min)

* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001 compared with the control group

CPでは虚血側の1時間再灌流群においてコントロール群の138%に増加した。一方で1.5時間：軽度及び重度群，2時間群，3時間再灌流群ではそれぞれ91%，36%，16%，66%と段階的に減少したが1.5時間再灌流の軽度群と重度群では大きな差が生じた。健側の1時間及び1.5時間再灌流：軽度群では変化はなく，1.5時間：重度群，2時間群，3時間再灌流群ではそれぞれ75%，75%，84%に減少した。FPSでは虚血側の1時間及び1.5時間再灌流：軽度群においてそれぞれコントロール群の134，115%に上昇した。一方で1.5時間：重度群，2時間，3時間再灌流群ではそれぞれ21%，17%，5%と段階的に減少し，この領域でも1.5時間再灌流：重度群から大きな差がみられた。また健側では1時間再灌流群では変化はなく，1.5時間重度群，2時間及び3時間再灌流群ではそれぞれ70%，76%，82%に減少した。

これらの結果を26時間永久閉塞群と比較すると虚血側において3時間再灌流群ではCP，FPSともに同程度に減少した。また健側では1.5時間，2時間，3時間再灌流群では26時間永久閉塞群より減少していた。

②虚血辺縁部 (FPM) における rCBF の変化

血流の再開によって虚血側の1時間群及び1.5時間再灌流：軽度群ではコントロール群の

それぞれ88%，93%までrCBFは回復したが，1.5時間：重度群，2時間再灌流群ではそれぞれ50%，39%となり，辺縁部においても1.5時間再灌流：重度群から大きな変化を示した。3時間再灌流群では，1%と26時間永久閉塞群よりも減少した。

③虚血遠隔部 (THAL-VP, SNR) における rCBF の変化

(a) SNR

虚血側ではすべての群で26時間永久閉塞時と同様に増加し，コントロール群に比し114～128%に増加した。

(b) THAL-VP

虚血側では各群の平均値ではコントロール群の85から99%の間で大きな差は無く，標準偏差も大きくばらつきがあり，有意差はなかった。しかし3時間再灌流群では2例で118%，121%に増加した。

考 察

脳虚血における脳循環・代謝機能についてはこれまで様々な研究が行われてきた。永久虚血における研究では，蛋白合成の抑制にはじまる機能的障害や不可逆的な損傷をもたらす血流閾値と虚血時間について研究されてきた^{(6),(7)}。一

方、再灌流後の rCBF 変化については水素クリアランス法やレーザードップラー法を用いて虚血中心部あるいは虚血辺縁部における変化について経時的な観察が行われ、脳虚血・再灌流後の高血流や no-reflow といわれる二次虚血の発生などが報告されている。しかしながら、再灌流後の虚血中心部や虚血辺縁部のみならず虚血遠隔部など脳の様々な領域における rCBF を同時に測定し、その相互関係について研究したものは少ない。そこで本実験では永久虚血群、再灌流群を作成し、各群の梗塞範囲や虚血中心部、虚血辺縁部、虚血遠隔部における rCBF の変化を検討し、虚血時間や血流の再開が及ぼす影響について観察し、その病態を考察した。

①虚血中心部について

一般に虚血による細胞機能障害や不可逆的損傷を来す血流閾値については、血流値が正常の 25~50%以下になると脳組織における蛋白合成能の抑制、浮腫、アシドーシスがおこりはじめ、25%以下になると神経細胞の活動電位、誘発電位の消失が見られる。また 10%以下になると細胞膜の脱分極の結果、細胞内へ Ca^{2+} が流入し、不可逆的損傷を来すといわれている^{6),7)}。つまり虚血中心部の血流は、critical なレベルである正常の 10%以下に、虚血辺縁部は上記に示したごとく細胞死には至らないがその機能が停止するレベルの 10~25%になると考えられる。

本実験の永久虚血群において、虚血側の CP、FPS の rCBF は永久虚血 1, 2, 26 時間後ではそれぞれコントロール群の 15, 9, 7%と 15, 10, 5%となり、虚血中心部としての設定が適切であることが確認できた。またその虚血の程度は時間経過とともに増悪していた。一方、再灌流後の rCBF 変化については、従来の研究から再灌流直後の高血流や、血流を再開しても正常の状態に復さない“no-reflow”現象など、二次虚血が生じることが知られている⁸⁾。高血流は虚血組織で生じた乳酸、アデノシン、様々な神経伝達物質、一酸化窒素などが血管を拡張させることにより生じ、血液-脳関門に損傷を与え、再灌流障害を助長させる^{9)~11)}。また二

次虚血では、虚血組織の微小血管周囲組織の浮腫による微小血管の圧迫や血管内皮の腫脹、内皮への好中球の粘着、血栓形成などが微小血管を閉塞し、虚血性障害を増悪させる⁸⁾と考えられている。本実験の再灌流群では、虚血中心部の CP 及び FPS において、1 時間と~1.5 時間再灌流群の一部では高血流となった。一方、のこりの 1.5 時間再灌流群と 2 時間以上の再灌流群では、逆に低血流となり、その間に大きな差がみられた。その推論として 1~1.5 時間再灌流群の虚血中心部は上記の機序による高血流が、より虚血時間が長かった再灌流群では 2 次虚血のプロセスが進み低血流になったことが考えられる。しかし虚血中心部における再灌流後の高血流については、通常、再灌流後数時間以内に消失すると言われている^{8)~12)}が、今回の実験では再灌流後 24 時間後においても高血流となっていた。これについては血液-脳関門の障害により投与した¹²³I-IMP が通常の機序で集積せず、血管外腔に漏れ出て蓄積した状態を高血流と過大評価したことも考えられるが、明らかな機序は不明である。いずれにせよ虚血中心部では、虚血 1.5 時間を境に高血流、低血流と違った病態を生じたことが明らかになった。またその梗塞巣については、再灌流群の虚血中心部のほとんどはすでに非可逆的な損傷に陥っていた。従って再灌流を行っても、この部位の機能回復は望めないが再灌流後の高血流や低血流は、その障害を増悪させ、ひいてはその周囲組織へ悪影響を及ぼす可能性がある。そのため再灌流後における虚血中心部では、これらの病態に留意し、今後そのメカニズムについてさらに解明していく必要があると思われた。

②虚血辺縁部について

永久虚血群において、虚血側の FPM の rCBF は虚血 1, 2, 26 時間後でそれぞれコントロール群の 30, 29, 22%となった。これは前述した、細胞機能障害をうけるが細胞死には至らない血流値であり、虚血辺縁部としての設定も適切であることが確認できた。一方、再灌流群において 1 時間及び 1.5 時間再灌流：軽度群

の rCBF は、血流の再開によってコントロール群の80%以上まで回復するが、1.5時間再灌流：重度群と2時間再灌流群では1時間再灌流群の半分近くまで低下し、3時間群では26時間永久閉塞群より低下していた。このように、虚血辺縁部では虚血時間の増加に伴い rCBF は進行性に低下し、1.5時間を境に著しく低下がみられた。虚血辺縁部では血管閉塞直後から微小血栓形成による微小循環障害が進行する¹³⁾といわれており、今回の検討でも、再灌流後の高血流などは生じず、虚血中心部の再灌流障害とはその病態が異なっていた。梗塞巣の変化において、1時間再灌流群では再灌流により虚血辺縁部は障害を免れていたが、2時間再灌流群では FPM, TeAud, OCC にも障害が及んだ。さらに3時間再灌流群では虚血辺縁部の梗塞範囲が増加した結果、26時間永久虚血群より梗塞率がむしろ増加していた。一方で1.5時間再灌流群では、7例のうち4例が梗塞を免れていたことから、1.5時間以内の再灌流ならば多くの例が虚血辺縁部の不可逆的損傷から免れることが確認された。虚血辺縁部は虚血によって機能的障害を受けるが、早期の再灌流で回復が期待できる領域である。虚血辺縁部の生存性という観点から見ると、今回用いたラットの中大脳動脈閉塞モデルにおいて、その時間的可逆性いわゆる temporal threshold は、従来の報告より短く^{6), 7), 14)}、1.5時間以内と考えられた。

③虚血遠隔部について

ラットの中大脳動脈永久虚血モデルにおいて、虚血側の SNR, THAL-VP などでは直接虚血にさらされない。しかしこれらの部位では、虚血中心部と緻密な神経繊維連絡を有するため影響を受け、transneuronal degeneration とよばれる二次的な変性・萎縮を生じることが知られている^{15), 16)}。

SNR では、その機序として虚血中心部の CP が障害されることにより、その主な神経伝達物質で抑制性神経伝達物質であるガンマアミノ酪酸 (GABA) が SNR で低下するため、視床下核からグルタミン酸作動性神経繊維の入力が無

抑制に入る。その結果、SNR では過興奮状態が長期に持続するため細胞膜の障害をきたし、最終的に細胞死を生ずるといわれている^{17)~19)}。またこの時の SNR の糖、蛋白代謝は亢進し^{18), 19)}血流も虚血30分~1時間後にコントロール群の約140%に増加することが報告されている^{20), 21)}。今回の検討では、永久虚血群では虚血時間にともない rCBF は緩徐に増加し、26時間で143%に上昇していた。一方、THAL-VP は末梢組織から FPS にいたる感覚系経路の上行路の中継点で、両者を結ぶ神経線維には相方向性の投射がある。そのため FPS が梗塞などにより組織障害をうけると連絡する神経経路を介し、逆行性、順行性に変性が起こると考えられている^{15), 16), 22), 23)}。その血流変化については、THAL 全体を関心領域とした場合、血流はコントロール群の60~80%に低下する^{20), 21)}という報告が多い。今回の実験では THAL-VP に関心領域を設定したが、永久虚血1時間から急激に上昇し、26時間後も続いていた。この虚血早期の THAL-VP の血流増加の原因として、大脳皮質の障害により視床の神経終末部から大量のグルタミン酸などの神経伝達物質が大量に放出された結果^{24), 25)}、急激な神経細胞の活動亢進が起こることや、また放出された様々な神経伝達物質が血管拡張を来すことが考えられる²⁴⁾。また興奮毒性によって細胞障害がおり、その結果蓄積した乳酸が血管を拡張させることも推測されるが、明らかな機序は不明である。この THAL-VP の血流増加の程度や時間的経過をみると、神経伝達物質の大量放出を裏付けるようなかなり急激な激しい変化と考えられる。一方で SNR では比較的緩徐な変化を示していることから、血流変化から考えても両者におけるメカニズムはかなり隔たりがあると思われた。

今回永久虚血群の SNR や THAL-VP で虚血早期からみられた同部の血流増加は、従来の報告で虚血後数日から数週でみられる変性・萎縮する部位と一致しており興味のある変化であった^{16)~18), 22), 23), 25)}。また本実験と同モデルで30~90分の一過性虚血後、2週間後に観察した実

験では、組織障害を同定できる⁴⁵CaによるオートラジオグラムでCP, SNR, THAL-VPに集積がみられていた²⁴⁾。さらに本実験の26時間永久閉塞群の一部でもTHAL-VPに変性がみられており、これらのことから同部位の血流の上昇は慢性期の組織障害を予測する predictor としてとらえ得る可能性がある。

従来の研究では、虚血遠隔部の永久虚血時におけるrCBFの変化についての報告はあるが、再灌流時について検討したものはない。今回の実験においてSNRでは、1時間再灌流群をはじめ、すべての再灌流群で上昇した。その原因としてすべての群のCPは梗塞に陥っており、永久虚血群と同様にtransneuronalに影響をうけたことが考えられた。

一方THAL-VPでは、3時間再灌流群の一部で虚血側のrCBFの上昇を認め、一部でTHAL-VPに一致し弧在するように梗塞に陥っていたが、SNRで見られたような虚血中心部の変化に対応した著しいrCBFの上昇は、出現しなかった。transneuronalにTHAL-VPに影響を与えるのはFPSの障害が重要であるとされている^{22)~25)}。本実験では、再灌流群の虚血中心部のCPは全ての群で梗塞が見られていたのに比し、FPSは同程度の虚血を受けていたのにもかかわらず、1.5時間再灌流群でも一部で梗塞を免れるなど、FPSはCPより虚血に対して抵抗性が強かった。このことから、THAL-VPに影響が現れるのは、SNRに変化が出現する虚血時間より時間を要することが想像できる。しかし2時間再灌流群ではFPSが梗塞に陥り、rCBFが低下していたのにもかかわらず、THAL-VPのrCBFはほとんど変化しなかった。このためにTHAL-VPでは、FPSとの連絡のみでなく、他の領域との神経線維連絡を介した影響なども考えられた。しかしその明らかな機序については不明で、今後の検討が必要と思われる。また永久虚血群におけるこれらの部位のrCBFの上昇が慢性期における変性・萎縮を起こす predictor だと仮定すると、SNRでは1時間以上での虚血では慢性期の変性・萎縮をおこ

すプロセスが進んでしまうが、THAL-VPでは2時間以内に再灌流がなされればそれを防止できる可能性があると思われた。

ま と め

ラット中大脳動脈閉塞モデルをもちいて脳虚血・再灌流後の梗塞範囲とrCBFの変化について検討し、以下の結果を得た。

1. 梗塞範囲は永久虚血群において26時間群では、虚血中心部、辺縁部に及んでいた。再灌流群において、その梗塞率は虚血辺縁部の梗塞の有無で大きく変化するため、1.5時間再灌流では軽度群と重度群との間で大きく異なり、1.5時間再灌流：重度群及び2時間再灌流群では26時間永久虚血群とほぼ同じとなり、3時間再灌流群は26時間永久虚血群より高くなった。
2. 永久虚血群では、rCBFは虚血中心部でも、辺縁部でも虚血時間に応じて減少したが、今回注目した虚血遠隔部においては、部位によりその反応の違いはあったがrCBFの増加を認めた。
3. 再灌流群のrCBFは部位別に以下の変化がみられた。
 - (1)虚血中心部においては、1~1.5時間再灌流：軽度群まではrCBFは増加したが1.5時間：重度群以上の再灌流群においては、減少した。
 - (2)辺縁部では再灌流後のrCBFは低下したが、1.5時間再灌流：重度群以上の脳虚血から大きく減少し、3時間再灌流群では26時間永久虚血群よりもrCBFは減少した。
 - (3)遠隔部では、SNRでは永久虚血群と同様にrCBFは増加したが、THAL-VPでは3時間再灌流群においてのみ増加した。これらのことから再灌流群においては、各部位において異なったrCBF変化を示し、特に虚血中心部、辺縁部においては1.5時間再灌流：重度群を境に大きくrCBFが減少した。また遠隔部では脳虚血によりrCBFが増加し、虚血中心部との関係が認められたが、部位により反応

の違いがあり、今後の検討が必要と思われた。

4. 以上のことから、再灌流群においては虚血1.5時間を境目に大きな障害を生じると思われた。また3時間以上の脳虚血後の再灌流は永久虚血よりも悪い結果を生じるものと考えられた。
5. 脳虚血に対して血流を再開させることは治療として重要なことであるが、今回の実験モデルにおいては、1.5時間以内の脳虚血ならば回復の可能性があり、3時間以上の脳虚血

の場合は、かえって病態を増悪させる可能性があると考えられた。

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜りました川崎医科大学救急医学教室小濱啓次教授、福田充宏助教授に深く感謝いたします。本研究は本学プロジェクト研究費(9-709)、大学院重点特別経費(平成8年)の援助によって行われた。

本論文の要旨は、第11回日本脳循環代謝学会総会(1999年10月4日、秋田)において発表した。

文 献

- 1) 小泉仁一, 吉田洋二, 中沢貞二, 大根田玄寿: 虚血性浮腫の実験的研究 第1報ラットを用いた血流再開可能な脳梗塞モデル. 脳卒中 8 : 1 - 8, 1986
- 2) Paxinos G, Watson C: The rat brain in stereotaxic coordinates. 1st ed. New York, Academic Press. 1982, pp 13 - 100
- 3) Zilles K : The Cortex of the Rat. Springer-Verlag, New York, 1985, pp 11 - 39
- 4) 木佐貫 隆雄: 一過性局所脳虚血モデルにおける神経細胞障害に関する実験的研究. 鹿児島大学医学雑誌 46 : 243 - 254, 1995
- 5) Kuhl DE, Barrio JR, Huang SC, Selin C, Ackermann RF, James LL, Wu JL, Lin TH, Phelps ME : Quantifying local cerebral flow by N-isopropyl-p[¹²³I]-iodoamphetamine (IMP) tomography. J Nucl med 23 : 196 - 203, 1982
- 6) Hossmann K-A : Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. Ann Neurol 36 : 557 - 656, 1994
- 7) Siesjo BK : Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I : Pathophysiology. J Neurosurg 77 : 169 - 184, 1992
- 8) Hossmann KA : Hemodynamics of postischemic reperfusion of the brain. In Protection of the brain ischemia, ed by Weinstein PR, Faden AL, Baltimore, Williams & Wilkins. 1990, pp 21 - 36
- 9) Greenberg RS, Helfaer MA, Kirsch JR, Traysman RJ : Effect of nitric oxide synthase inhibition on postischemic cerebral hyperemia. Am J Physiol H : 341 - 347, 1995
- 10) Kuroiwa T, Shibutani M, Okeda R : Nonhyperemic blood flow restoration and brain edema in experimental focal cerebral ischemia. J Neurosurg 70 : 73 - 80, 1989
- 11) Tasdemiroglu E, Christenberry PD, Ardell JL, Chronister RB, Taylor AE : Effect of antioxidants on the blood-brain barrier and postischemic hyperemia. Acta Neurochir 131 : 302 - 309, 1994
- 12) Todd NV, Picozzi P, Crochard A, Pussell RR : Reperfusion after cerebral ischemia : Influence of duration of ischemia. Stroke 17 : 460 - 466, 1986
- 13) 松本昌泰, 堀 正二: 虚血性神経細胞死のメカニズムとその治療戦略. 内科 79 : 605 - 612, 1997
- 14) Kaplan B, Brint S, Tanabe J, Jacewicz M, Wang X-J, Pulsinelli W : Temporal thresholds for neocortical infarction in rats subjected to reversible focal cerebral ischemia. Stroke 22 : 1032 - 1039, 1991
- 15) 田村 晃: 遠隔部の二次変性. 「脳虚血 Update」(田村 晃, 早川 徹, 桐野高明 小暮久也編), 東京, 文進堂. 1994, pp 284 - 292
- 16) Tamura A, Kirino T, Fujie W, Nakane M, Teraoka Y, Tahira Y, Narita K, Nagashima H, Sano K : Neuropathological changes in remote areas after focal cerebral ischemia. In Maturation phenomenon in cerebral ischemia, ed by Ito U, Kirino T, Kuroiwa T, Klatzo I, Berlin, Springer-Verlag. 1990, pp 57 - 64
- 17) Saji M, Blau AD, Volpe BT : Prevention of transneuronal degeneration of neurons in the substantia nigra reticulata by ablation of the subthalamic nucleus. Exp Neurol 141 : 120 - 129, 1996

- 18) Kataoka K, Hayakawa T, Yamada K, Mushiroi T, Kuroda R, Mogami H : Neuronal network disturbance after focal ischemia in rats. *Stroke* 20 : 1226 - 1235, 1989
- 19) Nakagomi T, Kanemitsu H, Narita K, Nakayama H, Ishi T, Tamura A : Enhanced protein synthesis in the ipsilateral substantia nigra following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Acta Neuropathol* 95 : 565 - 570, 1998
- 20) Tamura A, Graham DL, McCulloch J, Teasdale GM. : Focal cerebral ischemia in the rat. : 2. Regional cerebral blood flow determined by [¹⁴C] iodoantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1 : 51 - 60, 1981
- 21) Memezawa H, Minamisawa H, Smith ML, Siesjo BK : Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *Exp Brain Res* 89 : 67 - 78, 1992
- 22) Iizuka H, Sakatani K, Young W : Neuronal Damage in the Rat thalamus after cortical infarcts. *Stroke* 21 : 790 - 794, 1990
- 23) 藤江和貴 : ラット局所脳虚血後にみられた虚血側視床の変性・萎縮について 帝京医学雑誌 11 : 371 - 380, 1988
- 24) Nagasawa H, Kogure K : Exo-focal postischemic neuronal death in the rat brain. *Brain Res* 524 : 196 - 202, 1990
- 25) Ross DT, Ebner FF : Thalamic retrograde degeneration Following cortical injury : An excitotoxic process? *Neuroscience* 35 : 525 - 550, 1990