

# 脳低温下における局所脳血流量の変化と脳保護効果の検討

## —ラット局所脳虚血・再灌流モデルを用いた実験的研究—

熊田 恵介

虚血・再灌流時の血流動態が、虚血脳の予後を決定する大きな要因であることから、ラット局所脳虚血・再灌流モデルを用いて脳低温下における虚血中および再灌流後の局所脳血流量 (regional cerebral blood flow ; 以下 rCBF と略す) の変化を検討した。また、脳低温下に虚血時間を2時間延長した場合の再灌流24時間後の脳保護効果について、rCBF、梗塞巣、アポトーシス、IL-6 値から検討した。その結果、脳低温により虚血中心部では再灌流直後におこる高血流とその後の低血流が抑制されること、虚血辺縁部では rCBF が増加し、その後も rCBF が保たれること、虚血遠隔部では rCBF の変化が少なかったことが明らかとなった。また、脳低温により皮質領域での rCBF は再灌流までの時間を延長しても保たれ、アポトーシス細胞の出現もみられず、脳組織 IL-6 値の増加も認めなかった。このことから、脳低温が therapeutic time window の延長の手段となりうることが示唆された。

(平成13年7月9日受理)

## The Effect of Mild Hypothermia on Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat

### — Effect on Regional Cerebral Blood Flow and the Therapeutic Time Window —

Keisuke KUMADA

**Background and Purpose :** Mild hypothermia is possibly the single most effective method of cerebroprotection developed to date, but there have been few reports regarding regional cerebral blood flow (rCBF). In this study, the results of two investigations designed to determine the chronological changes in rCBF under mild hypothermia and their effects on infarct size, programmed cell death, and IL-6 bioactivity are presented.

**Methods :** In the first study (I), two hours of transient middle cerebral artery occlusion and reperfusion were performed with a rat suture model under normothermic and hypothermic conditions, rCBF was measured during ischemia, 2 hr after reperfusion, and 24 hr after reperfusion. In the second study (II), four hours of transient middle cerebral artery occlusion (prolonged ischemic time under hypothermia) and reperfusion were performed under hypothermic conditions, rCBF, infarct size, programmed cell death, and IL-6 bioactivity were measured 24 hr after reperfusion.

**Results :** Acute post-ischemic hyperperfusion and delayed hypoperfusion in the ischemic core area were inhibited, rCBF was highly maintained in the ischemic penumbra area, no effect in

ischemic remote area (I). When the reperfusion time was prolonged under mild hypothermia, extension of the infarct region was suppressed by an increase in rCBF. Apoptotic cells were absent in the subcortical cortex, and IL-6 bioactivity in the ischemic hemisphere did not increase (II).

Conclusions: These results demonstrated the effect of mild hypothermia on rCBF, and showed that this therapy prolonged the therapeutic time window. (Accepted on July 9, 2001) *Kawasaki Igakkaishi 27(2): 123-132, 2001*

**Key Word** ① Cerebral ischemia ② Hypothermia  
③ Regional cerebral blood flow ④ Apoptosis ⑤ Interleukin-6

## はじめに

近年、脳の温度をわずかに低下させることで顕著な脳保護効果のあることが確認され<sup>1)</sup>、臨床では頭部外傷だけでなく、脳塞栓症の急性期の治療にも有効であることが報告されている<sup>2)</sup>。しかし、脳低温による脳保護のメカニズムは未だ不明な点も多い。また、脳虚血においては虚血・再灌流時の局所脳血流量 (regional cerebral blood flow; 以下 rCBF と略す) の変化は予後判定因子の一つであり、脳低温下での rCBF については不明な点も多い。そこで、虚血・再灌流時の rCBF の変化について、ラット局所脳虚血・再灌流モデルを用いて脳低温下で検討するとともに、その脳保護効果について検討した。

なお、本実験は川崎医科大学動物実験委員会への承認を受け (No.99-001)、同大学の動物実験指針に基づき行った。

## 対象と方法

### 1. 虚血再灌流モデルの作成

実験には 8～9 週齢の雄性 Wistar ラットを用いた。70%笑気、30%酸素に 4%ハロセンを加えた混合気を吸入させ、導入麻酔を行い、その後はハロセン 1%で維持した。虚血の作成は小泉ら<sup>3)</sup>の方法にならい、右総頸動脈から 4-0 ナイロン糸を挿入し右中大脳動脈入口部を閉塞後、ナイロン糸を抜去することにより再開通可能な虚血再灌流モデル (intraluminal suture 法) を作成した。

### 2. 脳低温作成

まず、脳温 (脳組織温) と深部体温の関係を知るために、脳温の測定として、ラットを脳定位固定装置に固定後、頭頂部の皮膚を 1 cm 縦切開し、Bregma より後方に 1 mm、外側に 4 mm の部位に小孔を開け、脳表から 5 mm の位置 (線条体の中央部) に、脳温測定用のプローブ (PH-MT 29/1: Physitemp) を挿入した。直腸温を深部体温とし、脳温と直腸温の相関を求めたところ、両者には強い相関関係にあることが判明したので ( $y = 0.777x + 7.417$   $r^2 = 0.921$ )、本実験では、脳温測定による脳損傷を避けるために、直腸温を脳温の代わりに用いることとした。脳低温は、自発呼吸下に冷風を動物に均一に当てることによって作成し、30分以内に目標温度 (33°C) まで低下させ<sup>4)</sup>、これを虚血中から再灌流後 2 時間まで維持した。なお、復温には赤外線ランプを、約 1 時間照射することによって行い、その後は室温下に管理した。尚、実験中は、生理、生化学的パラメーターとして、pH、PaCO<sub>2</sub>、PaO<sub>2</sub>、BE、乳酸、Na、K を測定した。

### 3. 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の測定は、Paxinos ら<sup>5)</sup>や Zilles ら<sup>6)</sup>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 0.2 mm、後方に 3.3 mm、5.3 mm) から設定した。虚血中心部は大脳皮質体性感覚野 (frontoparietal cortex, somatosensory area: 以下 FPS と略す) と線条体 (caudate putamen: 以下 CP と略す) に、虚血辺縁部は大脳皮質運動

## marginal area (penumbra)

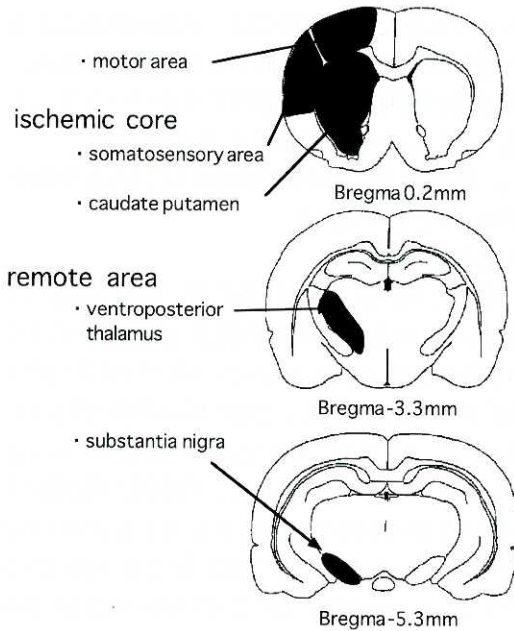


Fig. 1. Coronal section of rat brain

The coronal levels were 0.2mm anterior (level of caudate putamen), 3.3mm posterior (level of thalamus), and 5.3mm posterior (level of substantia nigra) to the bregma.

野 (frontoparietal cortex, motor area : 以下 FPM と略す) とし, また, 虚血遠隔部は視床後腹側核 (ventroposterior thalamus : 以下 THAL-VP と略す), 黒質 (substantia nigra : 以下 SNR と略す) とした (Fig. 1).

## 4. rCBF の測定

rCBF の測定は,  $^{123}\text{I}$ -IMP (N-isopropyl-p-[ $^{123}\text{I}$ ] 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で行い, その絶対値を reference sampling 法の原理に従って算出した<sup>7)</sup>.

## 5. 梗塞巣の測定

梗塞巣の観察は, 再灌流24時間後に断頭して, 20 $\mu\text{m}$ 厚の冠状断切片を作成し, HE染色により行った. 梗塞領域は虚血中心部にあたる bregma から前方0.2 mm の冠状断切片を中心として, その前後1 mm 毎の梗塞となった冠状断面積を画像解析装置 (iBAS 2000 : CARL ZEISS) を用い算出した後, 前後径と梗塞面積の積から

算出される値を, 積算することにより求めた<sup>8)</sup>.

## 6. プログラム細胞死の検出

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP nick end-labeling : 以下 TUNEL と略す) 法でプログラム細胞死を検出した. 再灌流24時間後に灌流固定し, 脳組織を摘出後, 直ちに4%パラホルムアルデヒド液 (リン酸緩衝生理食塩水-PBS, pH 7.4) で固定し, アルコール系列で脱水した後パラフィン包埋し, ミクロトームで5 $\mu\text{m}$ 切片を作成した. 脱パラフィンした後, PBS で洗浄し, 室温で30分間0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (99%メタノール) に浸漬した. 再度 PBS で洗浄し, TUNEL 反応液 (In Situ Cell Death Detection Kit, POD, Cat. No. 1684817, Boehringer Mannheim 社製) で60分間37 $^{\circ}\text{C}$ で反応させた. 次に再び PBS で洗浄した後, コンバーター POD 液 (ペルオキシダーゼ標識羊由来抗フルオレセイン抗体) を30分間37 $^{\circ}\text{C}$ で反応させた. PBS 洗浄後, DAB (3, 3-ジアミノベンジン) で2分間発色させ, 顕微鏡観察した. 対照標本は TUNEL 反応液のかわりにターミナルトランスフェラーゼを含まない標識液で処理した. 虚血中心部及び虚血辺縁部で, 0.5 mm<sup>2</sup> の領域内を任意に3領域抽出し, そこでの TUNEL 陽性細胞数とアポトーシス細胞数のそれぞれの平均値を求めた<sup>9)</sup>. アポトーシス細胞は核の狭小化を伴い, 細胞質の消失を認めたものとした<sup>10)</sup>.

## 7. 脳組織中の IL-6 の測定

IL-6 の測定は ELISA 法に基づいて測定した. Loddick ら<sup>11)</sup>の方法にならい, 再灌流24時間後, 直ちに脳を摘出凍結し, 虚血側, 非虚血側に分けそれぞれ1 ml の phosphate buffer 液を加え homogenise した. それを遠心分離後, IL-6 EIA キット (Wako 社) を用い, 吸光度測定は ウェルリーダー SK 601 (生化学工業) で行った.

## 8. 検討項目

以上の方法を用いて, 以下のことについて検討した.

1) 脳低温下における虚血中および再灌流後の rCBF の変化

常温下2時間虚血再灌流群(2 hr normothermia group; 以下2 NT 群と略す: n = 5) をコントロール群として, 脳低温下2時間虚血再灌流群(2 hr hypothermia group; 以下2 HT 群と略す: n = 5) と, それぞれの虚血2時間直後, 再灌流2時間後, 再灌流24時間後における関心領域のrCBFの検討.

2) 脳低温下に虚血時間を2時間延長した場合の再灌流24時間後の脳保護効果

2 NT 群, 2 HT 群, 虚血から再灌流までの時間を2時間延長した脳低温下4時間虚血再灌流群(4 hr hypothermia group; 以下4 HT 群と略す: n = 5) の, 再灌流24時間後のrCBF, 梗塞領域, プログラム細胞死および脳組織IL-6値からの比較検討.

#### 9. 統計学的有意差の検定

得られた実験結果はすべて mean  $\pm$  SD で表示した. 統計学的有意差の検討は, 一元分散分析による解析を行った後, Student's t-test を用い, 5%未満をもって有意差ありとした.

## 結 果

生理学的パラメーター (Table 1) では, 平均血圧および PaCO<sub>2</sub> は各グループ間で大きな変化は認めなかったが, 常温群 (2 NT 群),

脳低温群 (2 HT 群) いずれも虚血2時間直後および再灌流2時間後では, 乳酸の増加によると思われる軽度の代謝性アシドーシスを認め, 再灌流24時間後では代謝性アルカローシスによると思われる, 低K血症を認めた.

1) 脳低温下における虚血中および再灌流後のrCBFの変化 (Fig. 2)

#### ・虚血中心部

虚血2時間直後では2 NT 群, 2 HT 群間には有意差はなかったが, 再灌流2時間後では2 NT 群のFPSで189.2  $\pm$  21.2, CPで157.7  $\pm$  22.3 ml/100 g/min に対し, 2 HT 群のFPSで75.1  $\pm$  9.6 (p < 0.001), CPで56.5  $\pm$  3.2 ml/100 g/min (p < 0.001) であった. 再灌流24時間後では2 NT 群のFPSで19.6  $\pm$  8.0, CPで17.6  $\pm$  8.2 ml/100 g/min に対し, 2 HT 群ではFPS 123.9  $\pm$  6.3 (p < 0.001), CPで164.64  $\pm$  16.2 ml/100 g/min (p < 0.001) であった.

#### ・虚血辺縁部

虚血2時間直後には有意差は認めなかったが, 再灌流2時間後には2 NT 群で67.6  $\pm$  8.6 に対し, 2 HT 群で86.0  $\pm$  12.4 ml/100 g/min (p < 0.05) と増加していた. 再灌流24時間後には2 NT 群で47.7  $\pm$  4.5 に対し, 2 HT 群では110.1  $\pm$  3.7 ml/100 g/min (p < 0.001) であった.

#### ・虚血遠隔部

Table 1. Physiological parameters during ischemia and after reperfusion

		MABP(mmHg)	pH	PaO <sub>2</sub> (mmHg)	PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	BE(mEq/l)	Na(mEq/l)	K(mEq/l)	lactate(mEq/l)
2NT	2hr ischemia	117.5 $\pm$ 6.2	7.37 $\pm$ 0.03	99.0 $\pm$ 0.8	34.4 $\pm$ 3.3	-3.90 $\pm$ 2.06	143.2 $\pm$ 2.4	4.3 $\pm$ 0.2	5.2 $\pm$ 1.5
2NT	reperfusion 2hr	102.8 $\pm$ 10.6	7.39 $\pm$ 0.02	89.6 $\pm$ 8.9	38.7 $\pm$ 2.5	-3.18 $\pm$ 2.00	143.0 $\pm$ 1.0	4.3 $\pm$ 1.0	4.5 $\pm$ 1.8
2NT	reperfusion 24hr	99.22 $\pm$ 1.6	7.46 $\pm$ 0.07	88.8 $\pm$ 7.7	37.6 $\pm$ 6.9	0.57 $\pm$ 1.51	146.0 $\pm$ 2.5	3.9 $\pm$ 0.3	2.0 $\pm$ 0.9
2HT	2hr ischemia	104.2 $\pm$ 16.1	7.33 $\pm$ 0.06	103.3 $\pm$ 7.7	34.5 $\pm$ 6.9	-5.70 $\pm$ 4.78	140.0 $\pm$ 1.2	4.6 $\pm$ 0.5	5.7 $\pm$ 2.9
2HT	reperfusion 2hr	93.1 $\pm$ 6.2	7.38 $\pm$ 0.06	104.0 $\pm$ 16.5	38.4 $\pm$ 5.9	-1.60 $\pm$ 1.61	135.8 $\pm$ 1.7	4.6 $\pm$ 0.7	4.6 $\pm$ 1.2
2HT	reperfusion 24hr	118.4 $\pm$ 14.9	7.44 $\pm$ 0.04	90.2 $\pm$ 7.1	38.9 $\pm$ 3.7	2.68 $\pm$ 3.14	141.8 $\pm$ 1.2	3.4 $\pm$ 1.9	3.4 $\pm$ 1.9
4HT	reperfusion 24hr	110.6 $\pm$ 13.4	7.43 $\pm$ 0.04	91.4 $\pm$ 7.3	38.2 $\pm$ 3.9	1.76 $\pm$ 2.37	145.9 $\pm$ 2.6	3.8 $\pm$ 0.4	3.5 $\pm$ 1.1

Results are expressed as means; values in parenthesis are standard deviations of the mean (SD), n = 5 in each group.

MABP, mean arterial blood pressure; BE, base excess

2 NT, 2 hr MCAo normothermia group; 2 HT, 2 hr MCAo hypothermia group; 4 HT, 4 hr MCAo hypothermia group

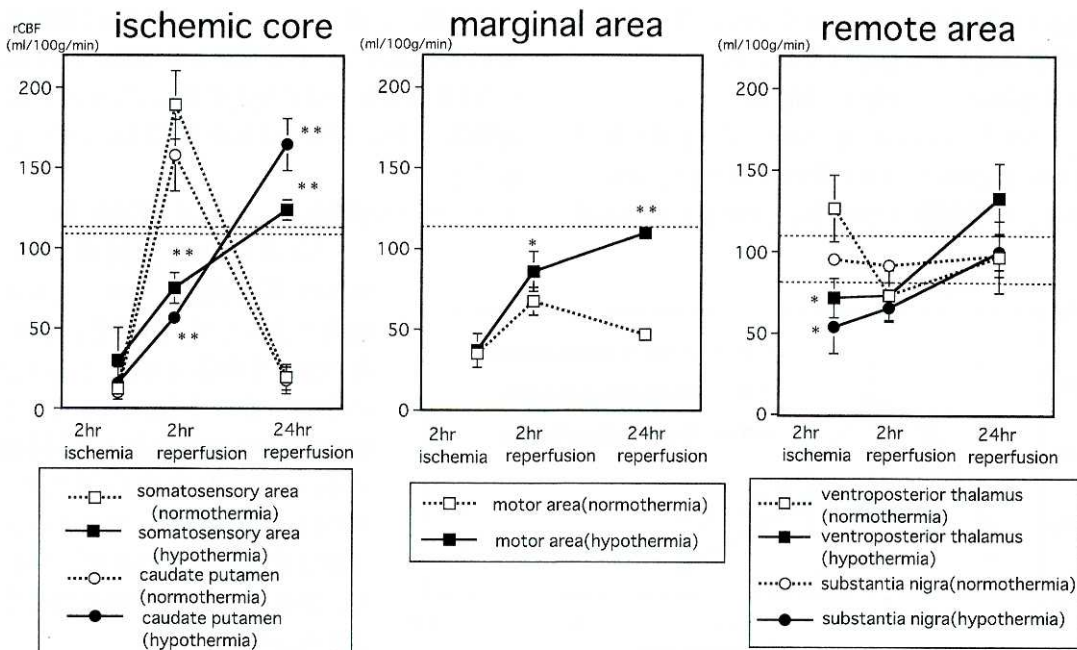


Fig. 2. Time course of rCBF in ischemic regions of interest (ROIs), ischemic core (somatosensory area, caudate putamen), penumbra (motor area) and remote areas (ventroposterior thalamus, substantia nigra), of the normothermia group and hypothermia group. Dotted lines indicate normal regional cerebral blood flow. Data are expressed as mean  $\pm$  SD.

\*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.001$

虚血2時間直後では2NT群でのTHAL-VPで $126.5 \pm 50.4$ , SNRで $95.2 \pm 4.9$  ml/100 g/minに対し, 2HT群ではTHAL-VPで $71.7 \pm 12.1$  ( $p < 0.05$ ), SNRで $53.8 \pm 16.3$  ml/100 g/min ( $p < 0.05$ )とともに低下していた。再灌流2時間後, 再灌流24時間後ではTHAL-VP, SNRともに両群間で有意差を認めなかった。

2) 脳低温下に虚血時間を2時間延長した場合の再灌流24時間後の脳保護効果

・rCBFからの検討 (Fig. 3)

4HT群では虚血中心部のFPSで $107.3 \pm 43.7$  ( $p < 0.001$ ), CPで $38.5 \pm 17.9$  ml/100 g/min ( $p < 0.05$ )であり, 2NT群と比較

すると共に有意に増加していた。虚血辺縁部では $105.8 \pm 11.5$  ml/100 g/min ( $p < 0.001$ )であ

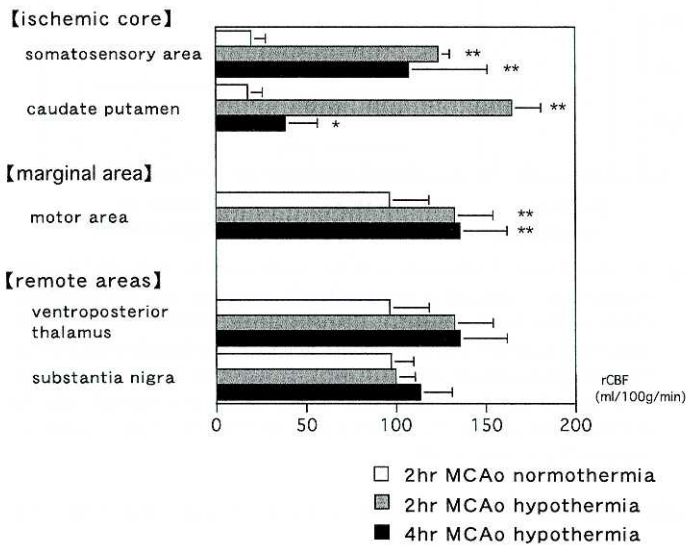


Fig. 3. Regional cerebral blood flow in the ischemic core, penumbra and remote areas of the normothermia group and hypothermia group (2 hr and 4 hr).

Values are mean  $\pm$  SD,  $n =$  five in each group

\*\*  $p < 0.001$  \*  $p < 0.05$

り, これも2NT群と比較すると増加していた。遠隔部はTHAL-VPで $136.6 \pm 26.3$ , SNRで

113.4 ± 17.6 ml/100 g/min であり、これらは 2 NT 群に対して有意差はなかった。

#### ・梗塞領域からの検討 (Fig. 4)

2 NT 群で 199.5 ± 25.8 mm<sup>3</sup> で、2 HT 群で 29.6 ± 2.2 mm<sup>3</sup>、4 HT 群で 84.05 ± 11.2 mm<sup>3</sup> であり、脳低温群 (2 HT 群, 4 HT 群) は常温群

(2 NT 群) に対して、いずれも有意に梗塞巣の縮小を認めた。虚血部位としては、4 HT 群では CP はほぼ全域に梗塞に陥っていたが、皮質領域 (FPS, FPM) では梗塞にはなっていない。

#### ・プログラム細胞死からの検討 (Table 2)

2 NT 群の虚血辺縁部には TUNEL 陽性細胞、アポトーシス細胞を認めたが、2 HT 群、4 HT 群の虚血辺縁部には両者ともに認めなかった。また、2 HT 群、4 HT 群の FPS 領域においても同様であった。虚血中心部での TUNEL 陽性細胞数、アポトーシス細胞数を測定した結果、2 NT 群、2 HT 群、4 HT 群間に有意差はみられなかった。

#### ・脳組織 IL-6 値からの検討 (Fig. 5)

コントロールでの IL-6 値は 24.8 ± 7.6 IU/hemisphere であった。2 NT 群の虚血側の IL-6 値は 1354.8 ± 205.3 IU/hemisphere に対し、非虚血側は 107.5 ± 34.6 IU/hemisphere で、両者間に有意差を認めた (p < 0.001)。また、2 HT 群での虚血側は 172.5 ± 56.2 IU/hemisphere、非虚血側 97.3 ± 43.4 IU/hemisphere、4 HT 群での虚血側は 190.9 ± 60.3 IU/hemisphere、非虚血側は 65.5 ± 41.9 IU/hemisphere であり、いずれも、2 NT 群よりは有意に低下していたが、2 HT 群、4 HT 群間には有意差は認めなかった。

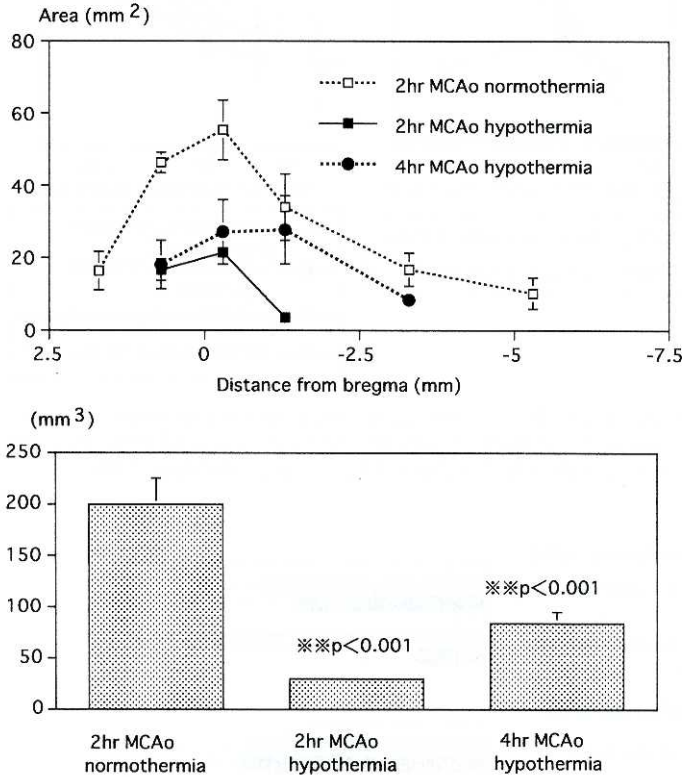


Fig. 4. Mean areas of infarction and total tissue injury for normothermia and hypothermia, evaluated at coronal levels traversing the anteroposterior extent of the lesion (upper). Quantification of infarct volume in the normothermia group, 2 hr hypothermia group and 4 hr hypothermia group at 24 hours postischemia (lower). The 2 hr and 4 hr hypothermia groups were showed significant decrease in infarct volume as compared with the normothermia controls by ANOVA and the Student's t test. Data are expressed by as mean ± SD.

Table 2. Quantification of apoptotic nuclei at 24 hours after reperfusion following two hours of MCAo.

Region	2NT		2HT		4HT	
	apoptotic cell	TUNEL	apoptotic cell	TUNEL	apoptotic cell	TUNEL
motor area(penumbra)	29.8 ± 5.3	114.5 ± 28.0	0	0	0	0
somatosensory area(ischemic core)	35.4 ± 2.4	114.0 ± 19.0	0	0	0	0
caudate putamen(ischemic core)	41.3 ± 4.7	135.5 ± 17.3	45.6 ± 5.4	123.3 ± 13.8	42.5 ± 6.1	131.4 ± 12.3

Data are mean ± SD.

2 NT, 2 hr MCAo normothermia group ; 2 HT, 2 hr MCAo hypothermia group ; 4 HT, 4 hr MCAo hypothermia group

TUNEL : TUNEL positive cells

## 考 察

脳低温の脳保護作用として、

1. グルタミン酸放出抑制
2. 虚血後のカルシウムホメオス

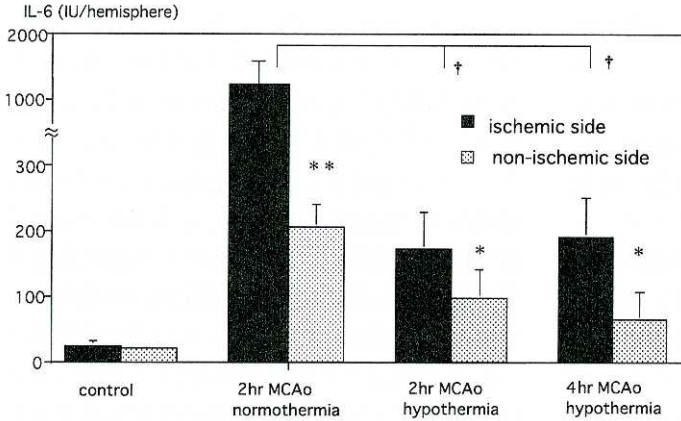


Fig. 5. Effect of MCAo on brain IL-6 bioactivity. Data are presented as the amount of IL-6 bioactivity (mean  $\pm$  SD) detected in the hemispheres after MCAo.

\*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.0001$  versus contralateral hemisphere  
†  $p < 0.05$  versus 2 hr MCAo normothermia

ターシスの破綻抑制 3. 蛋白リン酸化酵素の変動の抑制 4. 転写制御因子の発現抑制 5. 活性酸素, NOの産制抑制 6. 脳血管門の破綻抑制等がいわれている<sup>12)</sup>。また, その作用機序だけでなく脳低温の方法についても検討され, Huang ら<sup>13)</sup>は, 虚血中脳低温群と, 虚血再灌流後脳低温群, 虚血中及び再灌流後脳低温群で比較した結果, 虚血中及び再灌流後脳低温群で最も効果が得られたとしている。その至適脳温度については, Maiser ら<sup>14)</sup>は, 33℃群と30℃群に分けて検討した結果, 両群間では有意な差はなく, 33℃が至適温度であるとしている。しかし, 脳低温下における rCBF の詳細な変化や脳低温下で虚血から再灌流までの時間の延長が可能であるかについては明らかにされていない。以上から33℃の脳低温とし, 虚血中及び再灌流後における rCBF の変化と, 脳低温による保護効果について検討した。

#### 1) 脳低温下における虚血中および再灌流後の rCBF の変化

脳低温下における rCBF について, Michenfelder ら<sup>15)</sup>は正常なサル体温を29℃にまで下げた段階で rCBF を測定したところ, 60~70%の血流の低下を認めたと報告し, 温度1℃低下ごとに rCBF は6~7%低下するとしている。虚血・再灌流の脳低温時における,

rCBF の変化についての報告は, 虚血中心部だけでは Karibe ら<sup>16)</sup>や Huang ら<sup>13)</sup>が, レーザー血流計により脳血流を計測し, 再灌流後の高血流が抑制されることを報告しているが, プローベの範囲内での血流の測定のみで, 虚血中心部でも CP など深部組織の血流や, 他の部位での脳血流の変化, 絶対値の算出, 再灌流後長期にわたっての測定もなされていない。そこで, 今回はオートラジオグラフィ一法により, 虚血中心部, 虚血辺縁部, さらに transneuronal に影響をうける虚血遠隔部の各部位での

rCBF の変化とその絶対値を算出し, 再灌流24時間後の rCBF も測定した。その結果, 虚血中心部での FPS では, 過去の報告例<sup>13), 16)</sup>と同様に脳低温下では再灌流後にみられる高血流が抑制されることが確認され, CP も同様であった。これは, 虚血再灌流後の高血流は血管拡張物質の放出によるもので, 脳低温下では再灌流に伴う拡張物質の放出が抑制される<sup>13)</sup>ため高血流を生じなかったと思われる。また, 脳低温群では再灌流24時間後の rCBF は100 ml/100 g/min 以上であり, 常温下で脳虚血再灌流後にみられる高血流後の低血流<sup>17)</sup>は認めなかった。虚血辺縁部では, 常温群においても脳低温群においても再灌流後早期の高血流はみられず, 特に脳低温群では rCBF は常温群に比べ高値で, 再灌流24時間後の時点でも rCBF が高く保たれた。これは脳低温により, 虚血辺縁部での脳虚血の影響が軽度となったためと考えられる。また, 虚血遠隔部では, 虚血2時間の時点では常温群と脳低温群で有意差を認めたものの, その後の経過では両群間では差を認めなかった。このように, 常温群と脳低温群での虚血中心部での変化が確認され, 脳低温下での虚血辺縁部, 虚血遠隔部での rCBF の変化が明らかとなった。

2) 脳低温下に虚血時間を2時間延長した場合の再灌流24時間後の脳保護効果

Pulsineli<sup>18)</sup>は、脳虚血発症後、ある治療が脳損傷の程度を軽減し、機能回復を促進し、長期的な結果を改善しうるある一定の期間が存在するとし、その許容時間のことを therapeutic time window と定義している。一般に虚血脳の機能回復が可能な時間は虚血後約3時間とされ、3時間を経過すると細胞障害の範囲はほぼ確定するとされている<sup>19)</sup>。Yang ら<sup>20)</sup>は虚血3時間後の再灌流は、永久虚血よりも再灌流障害が強度となり、梗塞巣が拡大するとしているが、宮軒<sup>7)</sup>は rCBF からの検討で、2時間虚血でほぼ一定の梗塞巣が得られ、虚血再灌流の time threshold は1.5時間としている。また、脳低温下に therapeutic time window が延長できるか、つまり細胞死までの時間が延長できるかについては検討されていない。そこで、2時間虚血再灌流モデルを基に、脳低温下に再灌流までの時間を延長することが可能であるかを様々な面から検討した。今回、常温下で虚血時間を4時間に延長し、再灌流を行った場合では、5匹中4匹が6時間以内に死亡した(生存率20%)。小泉ら<sup>3)</sup>も、閉塞時間が3時間に及ぶと血流再開後24時間以内に動物は70%以上死亡し、6時間閉塞の場合には血流再開後4時間以内に100%死亡したと述べている。以上から、常温下4時間虚血再灌流群との比較は困難であるため、2 NT 群、2 HT 群と比較検討することにした。

rCBF からみると、虚血辺縁部では脳低温下に虚血時間を4時間に延長しても、2 HT 群と同様に rCBF は保たれ、虚血遠隔部においても rCBF の変化も認めなかった。虚血中心部では虚血侵襲の影響を最も受ける CP においては、rCBF の低下を認めたが、皮質領域である FPS では2 HT 群と同様に rCBF は100 ml/100 g/min 以上であった。梗塞領域からみても4 HT 群では、梗塞巣は皮質には及んでおらず、CP に局限していた。皮質領域が梗塞にならず、かつ、rCBF が保たれた原因としては、脳低温下におくことにより、脳血流が維持され、皮質領域では前大脳動脈からの側副血行により虚血侵襲に抵抗性を示したため<sup>21)</sup>と考えられた。

虚血中心部や虚血辺縁部などの神経細胞死にはネクロシスだけでなくアポトーシスのメカニズムも関与していることがいわれていることから<sup>22), 23)</sup>、今回は TUNEL 法を用いて、アポトーシスの発現からも検討を行った。その結果、脳低温下に虚血時間を延長しても虚血辺縁部で TUNEL 陽性細胞及びアポトーシス細胞は認めず、虚血中心部でも両者の細胞数には変化はなかった。脳低温がアポトーシスに及ぼす機序について、Ding ら<sup>24)</sup>は脳低体温はカスパーの反応を阻止するか、bcl-2 の活性を促進することにより、アポトーシスへのカスケードの進行を止めることを in vitro の実験により報告しているが、その詳細については明らかとはなっていない。いずれにせよ、脳低温により虚血から再灌流までの時間を延長しても、虚血辺縁部と虚血中心部においては、アポトーシスの発現状況には変化はなかった。

また、IL-6 は、免疫担当細胞や血管内皮細胞から産生される炎症性サイトカインの一つと捉えられており、実験では、脳虚血により、IL-6 が上昇することが報告されている<sup>11)</sup>。臨床では脳梗塞の病巣が大きい程高値を示すこと<sup>25)</sup>や、重症頭部外傷では脳低温管理下で、常温群に比べ、血中 IL-6 値は有意に低下していたこと<sup>26)</sup>などが報告されている。今回、これらの脳障害の指標として、脳組織 IL-6 値による評価を行ったが、常温群においても脳低温群においても虚血側は非虚血側に比べて有意に上昇していた。また、脳低温群(2 HT 群、4 HT 群)は常温群に比べ有意に減少し、脳低温群(2 HT 群、4 HT 群)は常温群に対して、いずれも有意に減少していた。しかし、2 HT 群、4 HT 群の間では有意差は認めなかった。

以上、虚血から再灌流までの時間を延長した場合、皮質領域が梗塞にならなかったこと、rCBF が維持されたこと、アポトーシス細胞は認めなかったこと、脳組織 IL-6 値の増加も認めなかったことなどからも、脳低温が therapeutic time window を延長できたと思われる。



## 結 論

ラット局所脳虚血・再灌流モデルを用いて脳低温下の局所脳血流量の変化と脳保護効果を検討し以下の結果を得た。

1. 脳低温により、虚血中心部では再灌流直後におこる高血流とその後の低血流が抑制されること、虚血辺縁部では rCBF が増加し、その後も rCBF が保たれること、虚血遠隔部では rCBF の変化が少なかったことが、明らかとなった。

2. 脳低温により再灌流までの時間を延長しても皮質領域での rCBF は保たれ、アポトシス細胞の出現もみられず、脳組織 IL-6 値の増加も認めなかった。このことから、脳低温が therapeutic time window の延長の手段となりう

ることが示唆された。

本論文の要旨は第12回日本脳循環代謝学会総会（2000年12月5日、仙台）、第4回日本脳低温療法研究会（2001年7月6日、山口）において発表した。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導と御鞭撻を賜りました川崎医科大学救急医学教室 小濱啓次教授に深甚なる謝意を表します。また、御高聞いただきました川崎医科大学救急医学 福田充宏助教授に深く感謝いたします。なお、本研究の一部は、大学院重点特別経費（平成10年度）および川崎医科大学プロジェクト研究費（10-708, 11-705）の援助によって行われたことを付記し深謝します。

## 参 考 文 献

- 1) Busto R, Dietrich DW, Globus MYT, Valdes I, Scheinberg P, Ginsberg MD : Small differences in intras ischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 7 : 729-738, 1987
- 2) 成富博章, 清水隆男 : 軽微低体温療法による脳塞栓症急性期の治療. *医学のあゆみ* 176 : 227-230, 1996
- 3) 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
- 4) Markarian GZ, Lee JH, Stein JD, Hong SC : Mild hypothermia : therapeutic window after experimental cerebral ischemia. *Neurosurg* 38 : 542-551, 1996
- 5) Paxinos G, Watson C : The rat brain stereotaxic coordinates. 1st ed. New York, Academic Press, 1982, pp 13-100
- 6) Zilles K : The Cortex of the Rat. New York, Springer-Verlag. 1985, pp 11-39
- 7) 宮軒 将 : 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. *川崎医学会誌* 25 : 181-192, 1999
- 8) Markgraf CG, Kraydieh S, Prado R, Watson BD, Dietrich DW, Ginsberg MD : Comparative histopathologic consequences of photothrombotic occlusion of the distal middle cerebral artery in Sprague-Dawley and Wistar rats. *Stroke* 24 : 286-293, 1993
- 9) Kitagawa H, Hayashi T, Mitsumoto Y, Koga N, Itoyama Y, Abe K : Reduction of ischemic brain injury by topical application of glial cell line-derived neurotrophic factor after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 29 : 1417-1422, 1998
- 10) Li Y, Sharov VG, Jiang N, Zaloga C, Sabbah HN, Chopp M : Ultrastructural and light microscopic evidence of apoptosis after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol* 146 : 1045-1051, 1995
- 11) Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ : Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 18 : 176-179, 1998
- 12) Kataoka K, Yanase H : Mild hypothermia—a revived countermeasure against ischemic neuronal damages. *Neurosurg Res* 32 : 103-117, 1998

- 13) Hung FP, Zhou LF, Yang GY : The effect of extending mild hypothermia on focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *Neurol Res* 20 : 57 - 62, 1998
- 14) Maier CM, Ahern KB, Cheng ML, Lee JE, Yenari MA, Steinberg GK : Optimal depth and duration of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia. *Stroke* 29 : 2171 - 2180, 1998
- 15) Michenfelder JD, Theye RA : Hypothermia : Effect on canine brain and whole-body metabolism. *Anesthesiology* 29 : 1107 - 1112, 1968
- 16) Karibe H, Zarow GJ, Graham SH, Weinstein PR : Mild intras ischemic hypothermia reduces postischemic hyperperfusion, delayed postischemic hypoperfusion, blood-brain barrier disruption, brain edema, and neuronal damage volume after temporary focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 14 : 620 - 627, 1994
- 17) 松本昌泰, 鎌田武信 : 虚血性脳疾患の病態 - 遅発性脳虚血後低灌流 -. *血栓と循環* 3 : 24 - 31, 1995
- 18) Pulsinelli WA, Jacewicz M, Levy DE, Pettito CK, Plum F : Ischemic brain injury and the therapeutic window. *Ann NY Acad Sci* 835 : 187 - 193, 1997
- 19) Jones TH, Morawetz RB, Crowell RM, Marcoux FW, Fitzgibbon ST, DeGirolami U, Ojemann RG : Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys. *J Neurosurg* 54 : 773 - 782, 1981
- 20) Yang GY, Betz LA : Reperfusion-induced injury to the blood-brain barrier after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 25 : 1658 - 1665, 1994
- 21) Kawai N, Okauchi M, Morisaki K, Nagao S : Effects of delayed intras ischemic and postischemic hypothermia on a focal model of transient cerebral ischemia in rats. *Stroke* 31 : 1982 - 1989, 2000
- 22) Li Yi, Chopp M, Jiang N, Zang ZG, Zaloga C : Induction of DNA fragmentation after 10 to 120 minutes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 26 : 1252 - 1258, 1995
- 23) Marlangue CC, Margail I, Represa A, Popovici T, Plotkine M, Ari BY : Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia : an in situ DNA fragmentation analysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 16 : 186 - 194, 1996
- 24) Ding D, Moskowitz SI, Li R, Lee SB, Esteban M, Tomaselli K, Chan J, Bergold PJ : Acidosis induces necrosis and apoptosis of cultured hippocampal neurons. *Exp Neuro* 162 : 1 - 12, 2000
- 25) Fassbender K, Rossol S, Kammer T, Daffertshofer M, Wirth S, Dollman M, Hennerici M : Proinflammatory cytokines in serum of patients with acute cerebral ischemia : kinetics of secretion and relation to the extent of brain damage and outcome of disease. *J Neurolog Sci* 122 : 135 - 139, 1994
- 26) Aibiki M, Maekawa S, Ogura S, Kinoshita Y, Kawai N, Yokono S : Effect of moderate hypothermia on systemic and internal jugular plasma IL-6 levels after traumatic brain injury in humans. *J Neurotrauma* 16 : 225 - 232, 1999