

反射分光解析法を用いたラット慢性脳虚血モデルの 脳循環予備能の検討

学位論文内容の要旨

急性の脳虚血-再灌流の実験的研究が数多く報告される中で、再灌流可能な慢性脳虚血に関する報告はわずかしかない。ラットの一側頸動脈-頸静脈短絡モデルは、短絡側の脳に梗塞に至らない慢性脳虚血状態を惹起し、短絡部の結紮により灌流圧が上昇することより、再灌流可能な慢性脳虚血モデルとしての一側面を持ち合わせている可能性がある。本研究では近年、脳循環動態を低侵襲にリアルタイムに測定できる計測技術の一つとして注目されている分光解析法を用いて、その脳循環動態の評価を試みた。

実験には6～8週令雄性 Wistar rat を用い、右側頸部にて頸動脈-頸静脈短絡を作成した。ラットは一側の内頸動脈閉塞のみではウィリス動脈輪を介する側副血行により脳血流の有意な低下は来さないが、このモデルでは、動静脈短絡部を通じて脳血流が動脈側から静脈側に流出するため、短絡側の脳灌流圧低下により、脳梗塞に至らない中等度の慢性脳虚血状態が得られ、さらに短絡を結紮することにより灌流圧、脳血流量の上昇が得られる。モデル作成8～12週後、全身麻酔、人工呼吸器下にラット頭部を定位脳フレームに固定し、左右の頭頂骨に骨窓(thinned skull window)を作成した。

インドシアニングリーン(ICG)の静脈内投与後、近赤外分光計測にて得られたその時間濃度曲線から計算された BFI は、局所脳表血流量(rCBF)と高い相関を示すことが報告されている。BFI は以下の計算式にて求められる: $BFI = \text{Max} [\Delta ICG] / [\text{rise time}]$, ただし rise time は ΔICG の最大値の 10-90%間に要した時間で表される。ラットの頭部に白色光を外照射し、ICG を急速静注し、頭頂部の脳表から得られる反射光を接眼レンズに挿入した quartz light guide を通してスペクトル分光解析器に取り込み、その反射吸収スペクトルから最小二乗法による多成分解析により ICG の時間濃度曲線を求めた。また、 ΔICG は得られた ICG 濃度と急速静注前の 0-2 秒間の平均 ICG 濃度の差分として求めた。BFI および rise time はそれぞれ、rCBF と平均通過時間(MTT)をある程度反映すると考えられ、これらの値を短絡の同側と対側、短絡の結紮前後で比較検討した。短絡と同側の BFI は対側と比較して有意に低く、また、短絡結紮により上昇傾向を示した。短絡と同側の BFI は対側の平均約 71%に相当し、短絡の結紮により約 37%増加した。一方、短絡と同側の rise time は対側に比べて有意に延長しており、短絡結紮に伴い有意に短縮した。

脳の可視光領域の反射吸収スペクトルは、内因性の生体色素であるヘモグロビン

(Hb)の酸素化、脱酸素化状態とその濃度により主に変化する。よって脳表の反射光の分光解析により、脳表 Hb の酸素飽和度や濃度の変化の推定が可能である。両側頭頂部の脳表の反射光をそれぞれ分光解析器に取り込み、500-650nm の反射吸収スペクトルを経時的に取得し、oxyHb, deoxyHb の濃度変化を多成分解析により求め、動静脈短絡部の同側や対側、あるいは短絡側の短絡結紮前後における各成分の動態や、CO₂ 吸入に伴う脳表の局所 Hb 濃度の推移 (CO₂ 反応性) を比較検討した。total Hb 濃度の変化は脳容積が一定であれば、すなわち局所脳血液量 (rCBV) の変化を反映していると考えられる。また、CO₂ 反応性は以下の式にて求めた: $\Delta \text{concentration (of total Hb) (\%)} / \Delta \text{PaCO}_2 \text{ (mmHg)}$ 。さらに脳表の反射吸収スペクトルより脳表 Hb 酸素飽和度を求め短絡部の同側や対側、短絡側の短絡結紮前後において比較した。短絡側の total Hb の CO₂ 反応性は、対側に比し有意に低く、短絡結紮後、有意に上昇した。一方、短絡側のヘモグロビン酸素飽和度は対側に比し有意に低値であったが、短絡結紮後、有意に上昇した。また短絡結紮後の各成分の動態を経時的に観察すると、短絡結紮により oxyHb は一過性に急上昇し、やや前値に復するも上昇を維持した。一方 total Hb は漸減した。短絡結紮 3 分後、oxyHb は有意に上昇、deoxyHb と total Hb は有意の低下を示した。

本研究では一側内頸動脈-外頸静脈短絡モデルの脳循環動態を反射分光解析法を用いて評価、検討を加えた。脳神経外科領域では脳循環動態の評価に脳血流量のみならず、脳血管拡張作用のある薬剤や吸入ガスの負荷に伴う脳血流量増加反応を脳循環予備能として、疾患の予後や治療方針の決定に役立てている。本研究においては rCBF や MTT の比較検討の目安として BFI および rise time を、rCBV の推移を反映する脳表の total Hb 濃度の CO₂ 反応性を脳循環予備能の指標として用いた。また、脳灌流圧の低下が脳の酸素供給に及ぼす影響を評価するため、脳表の Hb 酸素飽和度の比較検討も行った。その結果、この動静脈短絡モデルの短絡側では対側に比べて rCBF の低下や MTT の延長が認められ、さらに Hb 酸素飽和度や脳循環予備能 (CO₂ 反応性) も低下していることが示唆された。

本研究で用いた動静脈短絡モデルでは、短絡を結紮すると静脈側への血液の流出が消失するため短絡側の脳灌流圧の上昇が得られる。その結果、rCBF の上昇や MTT の短縮、Hb 酸素飽和度の上昇や脳循環予備能 (CO₂ 反応性) の改善が得られることが、上記の実験成績により示唆された。一方、中大脳動脈閉塞などの急性の脳虚血後の再灌流においては、反応性に CBV の上昇が認められることが多いのに対し、当モデルのように慢性脳虚血後の再灌流においては rCBV はむしろ漸減することが短絡結紮後の total Hb 濃度の経時的変化により示唆された。臨床的見地から言えば、慢性脳虚血は今後起こりうる脳梗塞を予防する上で重要な位置にあり、実際、EC-IC バイパスは非梗塞性の慢性脳虚血状態の改善の選択肢の一つと考えられてきた。バイパスの適応を論ずる際、臨床の場では主に血管拡張作用のある Acetazolamide (Diamox) 負荷後の脳血流量上昇率を脳循環予備能の指標として用いているが、本研究はその病態の変化を実験的に裏付ける側面を持ち合わせていると考えられた。本研究により、一側内頸動脈-外頸静脈短絡モデルは再灌流に適した非梗塞性慢性脳虚血モデルで短絡結紮前後の脳循環動態が臨床的な血行再建前後の状態に近似していることから非常に有用性が高いモデルと考えられた。

本研究では脳循環動態の非侵襲的計測法として反射分光解析法を thinned skull window と組み合わせて用いた。この方法は頭蓋骨や硬膜を開放しないため、脳を生理的環境に近い状態で測定が可能であり、脳表の血管の変化も同時に観察可能であり、さらにレーザードップラーなど他の計測法も適用可能であるなど、脳循環動態を低侵襲に異なる視点から解析することができる非常に有用な方法と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 阿 部 弘
副 査 教 授 田 村 守
副 査 教 授 宮 坂 和 男
副 査 教 授 田 代 邦 雄

学 位 論 文 題 名

反射分光解析法を用いたラット慢性脳虚血モデルの 脳循環予備能の検討

急性の脳虚血-再灌流の実験的研究が数多く報告される中で、再灌流可能な慢性脳虚血に関する報告はわずかしかない。ラットの一側頸動脈-頸静脈短絡モデルは、短絡側の脳に梗塞に至らない慢性脳虚血状態を惹起し、短絡部の結紮により灌流圧が上昇する。本研究では、このモデルを再灌流可能な慢性脳虚血モデルとして、その脳循環動態を主に脳循環予備能の視点から反射分光解析法を用いて明らかにした。

実験には6～8週令雄性 Wistar rat を用い、右側頸部にて頸動脈-頸静脈短絡を作成した。モデル作成8～12週後、全身麻酔、人工呼吸器下にラット頭部を定位脳フレームに固定し、左右の頭頂骨に骨窓(thinned skull window)を作成した。

まず脳表に白色光を照射し、その反射光をヘモグロビンの等吸収点にあたる 586nm の干渉フィルターを通して冷却 CCD カメラよりコンピューターに経時的に取り込み、反射光強度の差分画像を作成した。得られた画像は、脳局所ヘモグロビン濃度の変化を反映した画像となるが、その結果、低酸素や二酸化炭素吸入時の局所脳ヘモグロビンの増加反応が短絡側において低下しており、逆に過換気ではむしろ減少していることが示唆された。また、短絡結紮による脳灌流圧上昇に伴い、短絡側の二酸化炭素吸入時の局所脳ヘモグロビンの増加反応(CO₂ 反応性)が改善することが確認された。

解析には関心領域の反射光を接眼レンズにとりつけたプローブからアナライザーに取り込み、その吸収スペクトルからヘモグロビンなどの濃度変化の推移やその酸素飽和度を最小二乗法による多成分解析により求めた。その結果、CO₂ 反応性は短絡側で低下しており、短絡結紮に伴い改善していることが確認された。また、ヘモグロビン酸素飽和度は短絡側で低下しており、短絡結紮に伴い上昇していた。

脳表の pial artery の血管径および二酸化炭素吸入時の反応性を短絡の同側と対側、短絡の結紮前後で比較した。その結果、短絡側の脳表血管径は対側に比し拡張しており、二酸

化炭素吸入に伴う血管拡張率(CO₂ 反応性)も低下していたが、短絡結紮に伴い収縮し、CO₂ 反応性も改善していることが確認された。

インドシアニンググリーン(ICG)の静脈内投与後、その時間濃度曲線から BFI および rise time を算出した。BFI および rise time はそれぞれ、rCBF と平均通過時間(MTT)を反映すると考えられ、これらの値を短絡の同側と対側、短絡の結紮前後で比較検討した。その結果、短絡側の BFI は対側に比し有意に低く、また、短絡結紮により上昇傾向を示した。一方、短絡側の rise time は対側に比し有意に延長しており、短絡結紮に伴い有意に短縮した。以上の実験結果より、慢性脳虚血に伴う脳循環予備能の低下が灌流圧上昇に伴い改善したことが示唆された。

公開発表に於いて宮坂和男教授から短絡結紮後の BFI のばらつきや hyperperfusion について、また、急性と慢性脳虚血における再灌流時の CBV の推移の違いの意義について、次いで、田代邦雄教授からモデルの歴史的背景、脳表の形態学的変化について、また臨床との類似性や acetazolamide test の結果について、次いで、田村守教授から慢性脳虚血時のラットの行動の変化や SEP など電気生理学的反応性の変化について、次いで、阿部弘教授から血管吻合の手技およびその開存の個体差について、及び虚血-再灌流障害について、さらに、黒田敏助手から中大脳動脈閉塞モデルへの応用可能性について、最後に宝金清博講師から短絡結紮時の血管撮影所見についてそれぞれ質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は、自らの研究に基づく経験や過去の論文の結果を引用し、豊富な知識に基づいて明確に回答した。

本研究をとおして「虚血脳では脳血流の低下を代償するため細動脈が拡張状態にあり、血管拡張の余力が残っていないために脳循環予備能が低く、それが血行再建により回復する。」という仮定が実験的に証明された。また、今後こうした反射分光解析法を用いて、急性・慢性の脳虚血の脳循環動態がさらに明らかにされていくと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また、研究者として誠実かつ熱心であり、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。