

# 全身の神経系を温存した新しいラット脳灌流モデル

## 学位論文内容の要旨

脳に関する研究は古くからなされその数は膨大であるが、解剖学的にも機能的にも複雑である脳の機構は未だ充分には解明されていない。脳研究には様々な手法が用いられるが、何らかの負荷（薬物など）をかけ、それに対する脳の反応を調べることはよく用いられる方法の一つである。しかし、その負荷が全身にかけられた場合には脳以外の生体組織（特に循環器系）にも影響するため、脳で見られた変化が負荷の直接作用に対する反応なのか、生体に生じた変化の脳に及ぼす影響に対する反応なのかを区別することが難しくなる。このような中枢神経以外の末梢組織からの影響を除くために脳組織切片や細胞を使った実験も行われている。これらの実験では脳細胞自身の機能を知る上では大変有用である一方、複雑な神経回路網上に成り立つ脳全体の機能をみることはできない。今あげた2つの方法、組織・細胞レベルと全身レベルの中間に位置するものとして分離灌流脳を用いた実験がある。灌流脳を用いることの利点は、循環器系などの末梢の影響を取り除くことができることであり、血流や灌流液の組成、電気生理的活動の変化から、かけた負荷のみに由来する脳組織全体の機能の変化をみることができる。しかし、この系では脳幹部以下との連絡が全く途切れており、特殊な状態での脳の機能しかわからないという欠点がある。すなわち、実際に生体で行われているような末梢からの中枢神経への情報伝達や、中枢神経からの指令による末梢組織の反応をみることができない。そこで、我々はラットを用いて脳循環は心臓から分離されているが、中枢神経系とそれ以外の末梢の組織が正常に機能し、両者間で神経を介した情報伝達がなされる点で全身の系とはほとんど変わりのない脳灌流モデルを作製した。この実験は、北海道大学動物実験倫理委員会の承諾を得て行われた。

実験は40匹の雄Wistarラット（10から12週齢、体重200から260g）を用いて麻酔下で行った。気管切開を施し人工呼吸器を装着して従量式換気を行った。換気は動脈血ガスが pH 7.4, PaCO<sub>2</sub> 40mmHg, PaO<sub>2</sub> 150mmHg 前後になるよう調節した。両側の大腿動脈にカニューレを挿入し血液ガス分析と血圧測定に利用した。脳波、誘発電位測定用の電極を設置するため、頭部の皮膚を正中切開し頭蓋骨を露出し、脳波用針電極を頭蓋骨に刺入し固定した。脳内酸素化状態をみるために近赤外分光装置を用いた。近赤外線照射用ライトガイドを頭蓋骨に固定し、硬口蓋に受光用ライトガイドを固定して頭部を透過してくる光を受けた。灌流開始直後から4波長（700, 730, 750, 805nm）の近赤外分光器を用いて酸素化ヘモグロビン（oxy-Hb）、脱酸素化ヘモグロビン（deoxy-Hb）、総ヘモグロビン（t-Hb）、チトクロームオキシダーゼ（cyt. ox.）の濃度の相対変化を測定した。

灌流は両側の総頸動脈起始部、外頸動脈そして椎骨動脈を結紮した後、両側の総頸動脈にカニューレを挿入して、2台のシリンジポンプを使って左右同じ流速で灌流液を送って行った。流速は正常ラット脳血流速度 ( $1.1\text{ml}/\text{min}/\text{g brain}$ ) となるように設定した (コントロール状態)。灌流開始直後に両側の外頸静脈から灌流液を陰圧をかけずに体外へと自然流出させ、その血液のガス分析と温度測定を行った。

本実験系ではヒトO型濃厚赤血球 (血液センターから供給された期限切れ濃厚赤血球) を灌流用血液として用いた。ヒトO型濃厚赤血球を洗浄して2%ウシアルブミンを加えた modified Ringer でヘマトクリットが35%になるように調整した。これを小動物用人工肺に通し、 $\text{O}_2 \cdot \text{CO}_2$  混合ガスを適量加え、血液ガスが正常範囲になるようにした ( $\text{pH } 7.33 \pm 0.33$ ,  $\text{PCO}_2 37.1 \pm 6.2\text{mmHg}$ ,  $\text{PO}_2 178.6 \pm 29.4\text{mmHg}$ )。これに pentobarbital を加えて灌流液とした。この操作はすべて室温 (約  $25^\circ\text{C}$ ) で行った。

灌流開始前と15分後の外頸静脈からの流出血液の血液ガスと血液温度について検討したところ血液の温度は  $30^\circ\text{C}$  であった。血液のガス分析では  $\text{PvO}_2$  と  $\text{SvO}_2$  が灌流前の  $41.7 \pm 3.5\text{mmHg}$ ,  $58.1 \pm 0.1\%$  に対し灌流中は  $47.2 \pm 7.6\text{mmHg}$ ,  $70.2 \pm 0.4\%$  とやや高値を示したが  $\text{pH}$ ,  $\text{PvCO}_2$  に有意の変化はなかった (灌流開始前  $\text{pH } 7.29 \pm 0.03$ ,  $\text{PvCO}_2 45.9 \pm 2.9\text{mmHg}$ 、灌流中  $\text{pH } 7.27 \pm 0.05$ ,  $\text{PvCO}_2 42.7 \pm 3.6\text{mmHg}$ ,  $N=10$ )。

灌流開始によりラットの体循環系への影響は認められず、灌流前の心拍、血圧は  $416.8 \pm 4.0/\text{分}$  (平均 $\pm$ SD)、 $110 \pm 14.1\text{mmHg}$  (平均 $\pm$ SD) に対し灌流中は  $408.2 \pm 36.2/\text{分}$ ,  $115 \pm 11.4\text{mmHg}$  ( $N=10$ ) と有意差はなかったことから体循環系の機能は維持されていたと考える。また、心電図上波形の変化もなかった。

脳機能の指標として脳波と体性感覚誘発電位を測定した。脳波測定は、灌流開始15分前から灌流終了まで行った。灌流前と灌流中に得られた脳波ではいずれの記録でも灌流による変化は認められず、1時間以上にわたって脳活動が確認された。灌流中、波形の平坦化や徐波、痙攣波といった異常波は出現しなかった。また右側の後脛骨神経を刺激し対側の頭蓋骨に設置した電極で体性感覚誘発電位を測定した。灌流前と灌流中の体性感覚誘発電位は全例で低温の影響と思われる潜時の延長が見られたが、反応は灌流中にも認められた。これにより本モデルで末梢知覚神経の機能が確認されるとともに末梢神経から中枢神経への求心性経路が保たれていることがわかった。

さらに pentylenetetrazol (PTZ) で痙攣を誘発して脳および全身に生じる変化を検討した。15匹のラットで灌流中に流速を変えずにPTZ入灌流液に切り替え痙攣を誘発し、脳波、体血圧、脳内酸素化状態を測定した。PTZ注入後、速波に引き続いてスパイク、そしてスパイクのバーストと脳波上痙攣が確認された。大腿動脈で測定した体血圧は、脳波上のスパイクの出現に伴って急速に上昇し、スパイクのバースト出現時に最高値を示しその後スパイクの消失に平行して痙攣前のレベルへ戻った。さらに、PTZによる痙攣誘発時に見られた血圧の上昇は、この実験系では全身の系と違ってPTZは脳にのみ選択的に投与されていることから、脳活動の増加に伴って発せられた交感神経核から

のインパルスによる反応と思われた。従って、神経の遠心性経路も保たれていたことが確かめられた。近赤外分光法による脳内酸素化状態の測定結果だが、痙攣波の出現とほぼ同時に t-Hb、oxy-Hb が増加し deoxy-Hb が減少した。これらの変化は痙攣波消失後ゆっくりコントロールレベルへ戻ったが脳波の回復よりは早かった。cyt. ox. の酸化還元状態に変化は見られなかった。灌流圧はスパイク出現と同時に低下し始め最低  $151.3 \pm 17.9$  mmHg まで低下し、スパイク消失後脳内酸素化状態とほぼ平行してコントロール状態に戻った。スパイクの出現に伴って認められた灌流圧の著明な低下は神経活動の増加にカップリングした小動脈の拡張を示しており、脳血管反応も維持されていることが確認できた。また、近赤外分光法による、脳全体の酸素化状態の測定でも全身の系と同様に oxy-Hb と t-Hb の増加が認められたが、全身の系でみられるような痙攣に伴う脳への灌流速度の増加がないので、これもこの血管拡張を反映したものと思われた。全身を用いた系でも全身の血圧の上昇や脳全体での oxy-Hb と t-Hb の増加が認められるが、心拍出量の影響がとれないため、血管拡張が脳細胞の興奮に伴って起きる能動的なものなのか、心拍出量の増加による受動的なものなのかの判定はできない。今回の実験系の結果からは、定流速灌流であるにもかかわらず、脳内酸素化ヘモグロビンと総ヘモグロビンの増加が認められ、神経活動の増加に伴う血管拡張を捉えることができた。

このモデルは、従来の分離脳や全身の実験系では知り得ない、中枢や末梢組織の活動がどのように起きているのかを探る重要な手段となりうると考える。今後さらに様々な負荷が可能であり、それにより本モデルの有用性が証明されると考える。この実験系は、中枢と末梢の神経系がともに互いの連絡を保ったままの状態で活動し続け、かつ中枢神経系にのみ負荷がかけられる特性を持つものであり、今後脳機能研究の新しい方法の一つとして広く応用が期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦  
副 査 教 授 田 代 邦 雄  
副 査 教 授 小 山 司

学 位 論 文 題 名

## 全身の神経系を温存した新しいラット脳灌流モデル

脳研究の手段の一つに、何らかの負荷（薬物など）に対する脳の反応を調べる方法がある。しかし、その負荷が全身にかけられた場合には脳以外の生体組織にも影響するため、得られた結果が脳への直接負荷に対する反応なのか、生体に生じた変化の脳に及ぼす影響なのかの区別は難しい。脳組織切片や細胞を使う実験もあるが、複雑な神経回路網上に成り立つ脳全体の機能をみることはできない。分離灌流脳は脳幹部以下との連絡が全く途切れており、特殊な状態での脳の機能しかわからない。すなわち、何れの方法も、実際に生体で行われているような末梢からの中枢神経への情報伝達や、中枢神経からの指令による末梢組織の反応をみることができない。申請者はラットを用いて脳循環は心臓から分離されているが、中枢神経系とそれ以外の末梢の組織が正常に機能し、両者間で神経を介した情報伝達が行なわれる点で全身の系とはほとんど変わりのない生理的脳灌流モデルを作製した。

40匹の雄 Wistar ラットに気管切開を施し人工呼吸器を装着した。換気は動脈血ガスが pH 7.4, PaCO<sub>2</sub> 40mmHg, PaO<sub>2</sub> 150mmHg 前後になるよう調節した。両側の大腿動脈にカニューレを挿入し血液ガス分析と血圧測定に利用した。脳波、誘発電位測定のため、脳波用針電極を頭蓋骨に刺入し固定した。脳内酸素化状態をみるため、近赤外線照射用ライトガイドを頭蓋骨に固定し、硬口蓋に受光用ライトガイドを固定して頭部を透過してくる光を受けた。灌流開始直後から4波長の近赤外分光器を用いて酸素化ヘモグロビン (oxy-Hb)、脱酸素化ヘモグロビン (deoxy-Hb)、総ヘモグロビン (t-Hb)、チトクロームオキシダーゼ (cyt. ox.) の濃度の相対変化を測定した。灌流は両側の総頸動脈起始部、外頸動脈そして椎骨動脈を結紮した後、両側の総頸動脈にカニューレを挿入し、2台のシリジポンプを使って左右同じ流速で灌流液を送った。流速は正常ラット脳血流速度となるように設定した。灌流開始直後に両側の外頸静脈から灌流液を自然流出させ、その血液のガス分析と温度測定を行った。

灌流用血液として、ヒト洗浄O型赤血球を2%ウシアルブミンを加えた modified Ringer でヘマトクリット 35%になるように調整した。これを小動物用人工肺に通し、O<sub>2</sub>・CO<sub>2</sub> 混合ガスで、血液ガスが正常範囲になるようにし、pentobarbital を加えて灌流液とした。この操作はすべて室温(約25℃)で行った。

灌流開始前と15分後の外頸静脈からの流出血液の血液の pH, PvCO<sub>2</sub> に有意の変化はなかった。灌流開始によりラットの体循環系への影響は認められず、灌流前後の心拍、血圧に有意差はなく、また心電図上波形の変化もなかったから体循環系の機能は維持されていたと考えた。

脳機能の指標として脳波と体性感覚誘発電位を測定した。脳波測定は、灌流開始15分前から灌流終了まで行った。灌流前と灌流中に得られた脳波ではいずれの記録でも灌流による変化は認められず、1時間以上にわたって脳活動が確認された。灌流中、波形の平坦化や徐波、痙攣波といった異常

波は出現しなかった。灌流前と灌流中の体性感覚誘発電位は全例で低温の影響と思われる潜時の延長が見られたが、反応は灌流中にも認められた。これにより本モデルで末梢知覚神経の機能が確認されたとともに末梢神経から中枢神経への求心性経路が保たれていることがわかった。

15匹のラットで灌流中に流速を変えずに pentylenetetrazol (PTZ)加灌流液に切り替え痙攣を誘発し、脳波、体血圧、脳内酸素化状態を測定した。PTZ 注入後、速波に引き続いてスパイクさらにバーストと脳波上痙攣が確認された。体血圧は、脳波上のスパイクの出現に伴って急速に上昇し、スパイクのバースト出現時に最高値を示しその後スパイクの消失に平行して痙攣前のレベルへ戻った。さらに、PTZ による痙攣誘発時に見られた血圧の上昇は、この実験系では全身の系と違って PTZ は脳にのみ選択的に投与されていることから、脳活動の増加に伴って発せられた交感神経核からのインパルスによる反応と思われた。従って、神経の遠心性経路も保たれていたことが確かめられた。近赤外分光法による脳内酸素化状態の測定では、痙攣波の出現とほぼ同時に t-Hb、oxy-Hb が増加し deoxy-Hb が減少した。これらの変化は痙攣波消失後ゆっくりコントロールレベルへ戻ったが脳波の回復よりは早かった。cyt. ox.の酸化-還元状態に変化は見られなかった。灌流圧はスパイク出現と同時に大きく低下し、スパイク消失後脳内酸素化状態とほぼ平行してコントロール状態に戻った。スパイクの出現に伴って認められた灌流圧の著明な低下は神経活動の増加にカップリングした小動脈の拡張を示しており、脳血管反応も維持されていることが確認できた。また、近赤外分光法による、脳全体の酸素化状態の測定でも全身の系と同様に oxy-Hb と t-Hb の増加が認められたが、全身の系で見られるような痙攣に伴う脳への灌流速度の増加がないので、これもこの血管拡張を反映したものと思われた。今回の実験系の結果からは、定流速灌流であるにもかかわらず、脳内酸素化ヘモグロビンと総ヘモグロビンの増加が認められ、神経活動の増加に伴う血管拡張を捉えることができた。

このモデルは、従来の分離脳や全身の実験系では知り得ない、中枢や末梢組織の活動がどのように起きているのかを探る重要な手段となりうると考える。今後さらに様々な負荷が可能であり、それにより本モデルの有用性が証明されると考える。この実験系は、中枢と末梢の神経系がともに互いの連絡を保ったままの状態でも活動し続け、かつ中枢神経系にのみ負荷がかけられる特性を持つものであり、今後脳機能研究の新しい方法の一つとして広く応用が期待される。

公開発表に際し、副査の田代教授からこのモデルの今後の応用性について、ラットと人の脳の血管支配の差について、脳温との関係について、病理学的検討の有無について、次いで副査の小山教授から、脳波は麻酔下での脳反応と考えるか否か、低体温麻酔状態との関係、分離型脳灌流研究の今後の予想について、最後に主査の小林教授から、灌流血液の組成の工夫について、モデル完成に至る苦勞、脳死の研究への応用の可能性についての質問があった。申請者は何れの質問に対しても、自らの実験結果を基にほぼ妥当な回答をした。

本研究は、脳研究への新しい生体モデルを構築し、今後の幅広い応用研究が期待される。

審査員一同は、これらを高く評価し、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。