

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

NADH fluorescence imaging and histological impact for spreading depolarization of acute phase of subarachnoid hemorrhage in rats

(NADH 蛍光によるラットくも膜下出血急性期における spreading depolarization の可視化及びその組織学的検討)

清水智久、菱川朋人、西廣真吾、新治有径、高杉祐二、春間 純、平松匡文、川瀬宏和、佐藤幸子、溝上良一、武田吉正、杉生憲志、森松博史、伊達 勲

Journal of Neurosurgery (掲載予定)

平成 26 年 10 月 第 73 回 脳神経外科学会学術総会にて発表

主 論 文

NADH fluorescence imaging and histological impact for spreading depolarization of acute phase of subarachnoid hemorrhage in rats

(NADH 蛍光によるラットくも膜下出血急性期における spreading depolarization の可視化及びその組織学的検討)

【緒言】

Early brain injury (EBI)はくも膜下出血(SAH)の予後を規定する重要な因子として注目されてきた。最近、cortical spreading depolarization (CSD)が急性期の SAH で観察されていると報告されている。CSD は 2-5mm/min で広がる脱分極の波である。正常脳では CSD は病原性を持たないが、脳梗塞の際の penumbra では梗塞巣を拡大させる重要な要素であると考えられている。ただ、CSD が急性期 SAH において病原性があるのかについては不明である。本研究では SAH 急性期における細胞膜の脱分極による神経障害について検討した。

Nicotinamide adenine dinucleotide/reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺/NADH)はミトコンドリアにおける好気呼吸の電子伝達体である。細胞膜の脱分極の際、NADH エネルギーの要求に従ってミトコンドリアに蓄積する。酸化型の NAD⁺とは違って、還元型の NADH は 366nm の紫外線に励起され、460nm の蛍光を発するという特徴がある。当研究室では、正常脳および penumbra での CSD の二次元の伝播を、この NADH 蛍光を用いることで視覚化してきた。

本研究は、急性期 SAH における脱分極が組織学的予後に与える影響を評価することを目的とした。ラット脳表上の CSD の動的な伝播は、NADH 蛍光画像と direct-current (DC) potential を用いて検討した。頭蓋内圧 (ICP) および脳血流 (CBF) も同時に測定した。

【材料と方法】

使用動物

306±44g の雄性 SD ラット 24 匹を実験に用いた。

手技

麻酔は 4%イソフルランと酸素にて導入した。経口気管挿管の後に、麻酔は 50%酸素の 1.5%イソフルランとし、人工呼吸機に維持を行った。ポリエチレンカテーテルを持続的な平均動脈血圧測定と血液サンプリングのために右大腿部動脈に留置した。perforator は、左外頸動脈動脈から左内径動脈に挿入し、ラットを定位的固定装置に固定した。NADH 蛍光の観察を可能にするために、脳表面が見えるまで、左頭頂側頭骨を薄く削り、cranial window (7x9mm) を作成した。

膜電位の消失を観察するために、2つのガラス製 DC 電極(先端直径、 $< 5 \mu\text{m}$) (DC potential) が、小さな burr hole に作成した硬膜の切り込みから $750 \mu\text{m}$ の深さで cranial window に挿入した。電極の位置は、bregma の 4mm 後方で、矢状線から 2mm と 5mm 外側とした。脱分極の時間は、DC potential の急激な陰転開始から最大 DC 値の 80% までの回復までの時間とした。CBF を測定するために、外側の DC 電極と隣接してレーザードップラー血流計を留置した。ICP は、bregma の 4mm 後方で、矢状線から 7mm 外側の右側頭部に ICP センサーを挿入し、持続的に測定した。

SAH model

SAH は、報告されている perforation model を少し改変して導入した。Perforator を左 ECA に挿入し、頭蓋内の ACA-MCA 分岐まで進める。アドレナリン ($5 \mu\text{g}$) の投与に続き、SAH はステンレス製ワイヤ (太さ 0.2mm) によって引き起こした。原本の手法では、3-0 prolene フィラメントが perforator として使用され、アドレナリンは使われていない。

NADH 蛍光画像

脳表上の NADH 蛍光想像のための手技については以前に報告されている。脳表上を 360nm 帯域通過フィルタを装着した 200-W キセノン-ランプで照明することで、脳

皮質の NADH を励起させる。NADH 蛍光画像は、surgical microscope に取り付けた 460nm 帯域通過フィルタを装着した電荷結合素子 (CCD) カメラで撮影した。画像は、1 時間の観察期間にわたって 30 秒ごとに撮影された。NADH 蛍光変化率 (80-120%) を計算するために、NADH 蛍光強度は SAH 前の画像で除し、256 段階の gradation grayscale で示された。NADH 蛍光画像のシリーズは、より視覚的に分かりやすくするために『pseudomovie』として構成した。

組織学的評価

SAH の開始の 24 時間後に、ラットに 4% イソフルランにて麻酔をかけた。カニューレを上行大動脈に挿入した後に、生理食塩水および 6% パラホルムアルデヒドによって灌流した。脳を取り出しパラフィン包埋を行い、DC 測定部位で厚さ $5\mu\text{m}$ に冠状断で切片を作成した。すべての切片をヘマトキシリンとエオジンにて染色し、写真を撮影した。DC 測定部位で、頭頂側頭葉の脳表から第 5 層の損傷した錐体神経細胞の数をカウントした。核の染色質の凝集や、細胞質の好酸性沈着物をもつ錐体細胞は損傷されていると判断した。神経細胞損傷率は、100 倍の視野で神経細胞全体に対する損傷した神経細胞割合として求めた。

統計学的解析

実験的データは平均±標準偏差として表記した。DC 電極部位での神経細胞の損傷と虚血性脱分極の時間の関係性を評価するために、プロビット回帰曲線を用いた。この曲線は事象発生の見込みを表現し、一般に、毒物学の 50% 致死量を識別するためなどに使用される。プロビット曲線は、Origin 8 を用いて描出した。すべての統計の比較は、Student's t-test を用いた。統計学的有意差は $p < 0.05$ とした。

【結果】

DC potential、ICP、CBF の測定

DC potential は 24 匹の 48 部位で測定することができた。DC の結果は、SAH に続く虚血性脱分極の表れ方によって 3 タイプに分けられた。Type 1 (n = 21)、虚血性脱分

極は1時間観察期間の間に観察されなかった。Type 2(n = 13)、DC potential はSAHの開始直後に虚血性脱分極を起こすが、 $33.3 \pm 15.8 \text{min}$ (min 4.7 – max 51.3 min)で元の80%まで回復した。Type 3(n = 14)、DC potential は虚血性脱分極を示し、1時間の観察期間の間に回復しなかった。元のICPは、この研究のすべての動物の間で $9.0 \pm 4.8 \text{mmHg}$ であった。Type 1では、CBFは、ICP ($40.1 \pm 20.1 \text{mmHg}$)の増加のため元の $69.6 \pm 9.5\%$ に穏やかに減少したが、SAHの開始の $5.0 \pm 5.2 \text{min}$ 後に元の80%まで回復した。Type 2では、CBFは、ICP ($63.4 \pm 23.3 \text{mmHg}$)の増加のため元の $36.3 \pm 14.9\%$ に中等度に減少したけれども、SAHの開始の $24.0 \pm 19.4 \text{min}$ 後に元の80%まで回復した。Type 3では、CBFは、ICP ($85.7 \pm 12.1 \text{mmHg}$)の増加のため元の $24.6 \pm 17.9\%$ に高度に減少し、1時間の観察期間の終わりの時点でも元の $49.7 \pm 26.0\%$ にとどまって80%まで回復しなかった。

CSDの観察

CSDは、3匹のラットの6か所でSAHの開始の $5.1 \pm 2.2 \text{min}$ 後に観察され、それらは全てtype 1であった。CSDは最初、中枢側のDC電極にて観察され、 $0.95 \pm 0.77 \text{min}$ 後に外側部のDC電極で観察された。再分極は $2.3 \pm 1.2 \text{min}$ 以内に観察された。観察期間の間に複数のCSDの発生は観察されなかった。CBFは、CSD(すなわち、脱分極および再分極)の通過の間に不変(元の $87.0 \pm 6.5\%$)であったが、CSDの通過の後に $32.3 \pm 12.8\%$ 増大し、 $5.2 \pm 0.7 \text{min}$ 以内にそのCSD前のレベルに回復した。ICPは、CSDの通過前後で不変であった($12.8 \pm 5.5 \text{mmHg}$ 、元の値と比較して $p = 0.09$)。

NADH 蛍光画像の動的变化

Type 1では、蛍光はSAHの発生とともに変化はなかった。しかし、Type 2とType 3では、高輝度の蛍光が陰性DC変化に伴って大脳半球全体で認められた。Type 1において、CSD通過の間に、増大したNADH蛍光の波はネガティブなDC偏移と同時に観察された。この増大した蛍光の波は、最初、前方の脳皮質において観察されて、脳全体を後頭葉の方向に $3 \text{mm}/\text{min}$ の速さで広がった。CSDの通過後、NADHは一時的に $9.8 \pm 7.6\%$ 減少(元値と比較して $p = 0.02$)し、同時にCBFは増加した。すべ

での CSD は、大脳半球全体を吻側から尾側に向かって伝わった。

DC 測定部位の組織学的予後

組織学的評価は 13 匹のラットの 26 部位で得られた (Type 1、n= 19 ; Type 2、n= 5 ; Type 3、n= 2) 。24 時間以内に Type 2 の 7 匹のうち 1 匹、および Type 3 の 7 匹のうちの 4 匹が死亡した。6 匹のねずみにおいては、組織の評価の際に DC 記録部位を識別することに失敗した。Type 1 では、CSD 例を含めたすべての部位で組織は正常であった。Type 2 と Type 3 では、組織学的損傷の程度は虚血性脱分極の時間にしたがって出現した。ロジスティクスの回帰曲線では、DC 記録部位において脱分極時間と組織の結果の間の緊密な関係が示された (プロビット曲線、 $r^2 = 0.701$ 、 $P < 0.0001$) 。P50、すなわち錐体細胞が 50% の虚血性変化を起こす脱分極時間は、22.4min と推定された (95% 信頼区間、17.0-30.3min) 。

【考察】

本研究は、ラット SAH 急性期において CSD の二次元の伝播を示した最初の報告である。本研究において、CSD の通過は Type 1 における NADH 蛍光の増加という形で検出された。CSD は、SAH が起こってから 5.1 ± 2.2 min で出現し、前方の脳皮質から後方に向かって $3\text{mm}/\text{min}$ の速さで進み、再分極は 2.3 ± 1.2 min 以内に起こることが観察された。本研究と同様にラット perforation model で MRI の ADC を用いて CSD を観察した研究において、ADC の減少は SAH が起こってから $4.6 \pm 0.6\text{min}$ で始まり、ADC の回復(再分極)は 1.7 ± 1.2 min で起こったとの報告もあり、この結果は我々の研究と同様の結果となっている。

本研究において、NADH 蛍光の減少の波が CSD に続き、 $32.3 \pm 12.8\%$ の CBF の増加が同時に起こった。ヘモグロビンが NADH 蛍光 (460nm) を吸収するため、この NADH の減少は CBF の増加によるものと思われる。エネルギーへの需要を満たすように CSD に続いて CBF の増加が起こることから、正常脳においては CSD に病原性はないことが報告されている。対して、脳梗塞の penumbra では CSD の通過の後で CBF

が増加しないため、CSD が神経細胞障害に大きな役割を果たすことも報告されている。われわれの研究での CSD の後の CBF の変化は正常脳のものに似ており、本研究での CSD は病原性はないものと考えられる。実際、CSD が観察された DC 電極部位では組織学的障害は認められなかった。さらに、CSD は Type 1 において観察され、そこでは SAH 後の虚血性脱分極は観察されず、CSD の脱分極時間 ($2.3 \pm 1.2 \text{min}$) 組織学的障害を起こすには短すぎると考えられる。

Type 2 と Type 3 において、SAH のすぐ後に虚血性脱分極がみられており、側頭頭頂葉皮質の第五層の錐体細胞を 30%、50%、および 70% 障害する脱分極時間は、14.5、22.4、および 30.9 分と予測された。回帰曲線が高い回帰係数 ($r^2 = 0.701$) を示しており、脱分極時間は神経学的障害の深刻さを決定する重要な要素の 1 つであると思われる。50% 神経障害を起こす脱分極時間は、中大脳動脈閉塞モデルを用いた以前の研究において、18.2 分と報告されており、これらの 2 つの研究に強い類似性が認められた。イオンホメオスタシスの混乱が、部分虚血と SAH の perforation model の神経障害を起こす共通のメカニズムに含まれているのかもしれない。

この研究において、Type 2 と Type 3 では、Type 1 に比べてより高い ICP および低い CBF の値を示した。ICP の上昇は、脳灌流圧を減少させ、結果 CBF 減少させると思われる。50% 神経障害を起こす虚血性脱分極時間が、22.4min であると予測されたので、60min より多くの間虚血性脱分極が持続する Type 3 においては治療不可能であるかもしれない。Type 2 と Type 3 の違いをみると、SAH 急性期特に最初の 1 時間の ICP のコントロールが脳保護のためにはもっとも重要な要素と考えられる。この仮説を確認するために更なる研究が必要と思われる。

【結論】

CSD は、NADH 蛍光によって視覚化することができ、前方の脳皮質から後方に向かって CBF の増加とともに伝わるのが観察された。神経細胞が 50% 損害を受ける脱分極時間は 22.4 分と予測された。CSD は、SAH 後最初の 1 時間の間ではもっとも軽症な場合にのみ観察され、組織学的損傷と関連しなかった。