

サル脳虚血モデルにおけるフリーラジカルスカベンジャー LY231617 の逆行性脳静脈還流の効果

伊 藤 靖

新潟大学脳研究所臨床神経科学部門

脳神経外科学分野

(主任：田中隆一教授)

Amelioration of Focal Ischemia in Monkey Model by Retrograde Perfusion of Cerebral Vein with Antioxidant LY231617

Yasushi ITO

Department of Neurosurgery, Brain Research Institute, Niigata University

(Director: Prof. Ryuichi TANAKA)

要 旨

脳虚血の治療の問題点の一つとして通常の静脈投与では治療薬剤が十分に患部に到達しないことが上げられる。この問題を解決するために、豊富なネットワークを持つ脳静脈系に注目し、脳静脈に逆行性に薬剤を投与する逆行性脳静脈還流 (retrograde perfusion of cerebral vein, RPCV) の治療実験がラットを用いて種々の薬剤で行われ、その有効性が示されている。今回はよりヒトに生理的に近いアカゲザル局所脳虚血モデルに対して、free radical scavenger の一つである LY231617 を用いて逆行性脳静脈還流 (retrograde perfusion of cerebral vein, RPCV) を行い、その治療効果を PET scan による局所脳血流測定及び 2, 3, 4-triphenyltetrazolium chloride (TTC) による脳虚血巣の検索により検討した。治療群 (LY group) 3 頭では、左中大脳動脈閉塞後 3 時間で初回 PET を撮影、その後 1 時間生理食塩水で superficial middle cerebral vein から逆行性還流を行った後、2 回目の PET を撮影、その後 LY231617 で 1 時間の逆行性還流を行い 3 回目の PET を撮影した。コントロール 1 頭では、初回 PET は治療群と同様に撮影し、2 時間の生理食塩水での逆行性還流の後、2 回目の PET を撮影した。PET scan では治療群において、中大脳動脈領域で LY231617 での治療前に比べ LY231617 での治療 1 時間後の脳血流は有為に上昇した。治療終了後の摘出脳の TTC stain では LY231617 治療群で脳虚血巣の範囲はコントロールに比し有為に減少した。ラットと比べヒトにより近いアカゲザルで局所脳虚血に対する RPCV の有効性が示され、本治療の臨床応用への可能性を強く示唆するものと思われる。

キーワード：脳虚血、逆行性脳静脈還流、フリーラジカルスカベンジャー、PET

Reprint requests to: Yasushi Ito
Department of Neurosurgery
Brain Research Institute
Niigata University
1-757 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8585 Japan

別刷請求先： 〒951-8585 新潟市旭町通り 1-757
新潟大学脳研究所 脳神経外科 伊 藤 靖



図1 Cannulation of cerebral vein

左に開頭時の脳表, 右に cannulation 後の脳表を示す。

はじめに

食生活の欧米化等に伴い、本邦の脳卒中は出血性脳血管障害から虚血性脳血管障害へとシフトしてきており、虚血性脳血管障害の治療の重要性が増してきている。脳虚血の治療には以前より種々の抗血栓、凝固薬や脳保護薬が使用されており、近年は新たな脳保護薬、抗凝固薬等が開発され臨床にも使用されているが、未だ治療成績に限界がある。その一つの理由として、薬剤を静脈投与した場合、血流が低下しているため治療を最も必要とする脳虚血病変部への薬剤の到達が不十分である事が考えられる。その点に注目し、豊富なネットワークを有する脳の静脈系を利用し、虚血領域の脳静脈より逆行性に薬剤を注入する逆行性脳静脈還流（retrograde perfusion of cerebral vein 以下 RPCV）による脳虚血の基礎的実験が行われてきた^{1) - 6)}。今回、生物学的によりヒトに近いアカゲザルを用いて free radical scavenger である LY2316177) を用いた RPCV による治療実験を行い、その効果と臨床応用への可能性を検討した。

材料と方法

アカゲザル（8-10kg）4頭を本研究に用いた。治療実験開始以前に、PET scan 画像の解剖学的

検討のため、すべてのアカゲザルの頭部 MRI 像の撮影を行った。アカゲザルは3頭の治療群と1頭のコントロールに分け、治療実験を試行した。実験時、ketamine hydrochloride の筋注で麻酔を導入し、気管内挿管を行い、人工呼吸器による調節呼吸を行った。麻酔の維持は pentobarbiturate 35mg/kg の静脈注射を適宜追加し行った。実験中の生理学的データのチェックと持続動脈圧測定及び PET scan 時の血液サンプリングのために、右大腿動脈にカテーテルを挿入した。麻酔薬の投与及び PET scan 時の tracer の注射のために右大腿静脈にもカテーテルを挿入した。実験中、調節呼吸下に PaCO₂ は 35 - 40mmHg, 収縮期血圧は 100 - 120mmHg に維持した。深部体温は heating lump と blanket を用いて 36 - 37 °C に維持した。麻酔導入後、左前頭側頭開頭を施行。手術用顕微鏡下に、左中大脳動脈水平部近位部を露出し、杉田動脈瘤クリップで中大脳動脈を閉塞し、その遠位部より分岐する中大脳動脈の穿通枝を凝固焼却した。その後脳表の superficial middle cerebral vein⁸⁾ を穿刺し先端をテーパードした PE10 チューブを静脈の血流と逆行性に挿入した（図1）。実験中の穿刺部よりの出血とチューブの移動を防ぐため、穿刺部はオキシセルコットンとジェルフォームで覆い、Krazy Glue（Chicago, Illinois）で固定した。その後硬膜を縫合、骨片を戻して固定し、

皮膚縫合を行った。

術後、麻酔を維持したままアカゲザルを PET unit に移送した。局所脳血流の測定を $^{15}\text{O}-\text{H}_2\text{O}$ の volous injection 法で行った。尚脳血流測定 of dispersion constant は動物と成人男性の身長差を考え 0.7 とした。また局所脳血流は対側（非治療側）大脳の血流量との比を求め比較をした。PET scan のスケジュールは表 1 のごとく施行した。すなわち、まず脳虚血作成 3 時間後に初回の PET scan を全例に未治療の状態で行った。初回 PET scan 終了後、挿入しておいた PE10 カテーテルより逆行性還流を開始した。逆行性脳静脈還流の詳細は別紙に述べられている¹⁾²⁾が概要は

以下のごとくである。はじめに生理食塩水の注入を輸液ポンプを用いて 60ml/h の速度で行い、還流圧は生理食塩水の塩化ビニールバックを mercurial sphygmomanometer (Tycos, Taylor Instrument Co., Asheville, North Carolina) で加圧し還流液の回路につなぎ、5 分おきに段階的に 25mmHg ずつ圧を上げ 150mmHg で保った。治療群 (LY group) では、生理食塩水で 1 時間逆行性還流を行い、2 回目の PET scan を施行。2 回目の PET scan 終了後、逆行性還流の還流液を生理食塩水に溶解した LY231617 溶液 (1.6mg/ml) に切り替え、同様の速度で 1 時間逆行性還流を行った後、3 回目の PET scan を行った。コントロール例では治療群と同様に初回の PET scan 後、2 時間の生理食塩水での逆行性還流後、2 回目の PET scan を施行した。治療群の 3 回目とコントロール例 (Saline case) の 2 回目の PET scan が終了した時点（中大脳動脈閉塞後 5 時間）で、麻酔を維持したまま、再度手術室に移動し、10 % 2, 3, 4-triphenylte - trazolium chloride (TTC) により経心的に還流を行った。TTC 還流液の温度は 37 °C に保ち、アカゲザルの体温も heating lump で保った。還流終了後、断頭し 10 % formaline で固定を行ない、翌日脳を摘出した。摘出脳は特注のスライサーを用い 4mm 厚で冠状断を行った。各スライスのカラー写真を撮影し、虚血巣と脳浮腫の広がり image analyzer (MCID) を用い Swanson ら⁹⁾の modi-fyed semiautomated method で計測した。

表 1 本実験の経時的な流れを示す。

MCA occlusion
↓
Cannulation of cerebral vein
↓
1st PET scan(3hrs after MCAO)
↓ RPCV with saline for 1hr
2nd PET scan(LY group only)
↓ RPCV with LY231617 for 1hr
3rd PET scan(5hrs after MCAO)
↓
TTC stain

表 2 本実験中の生理学的パラメーターを示す。

	Induction	MCAO	PET scan
Blood Pressure(mmHg)	107.0±11.9	113.8±21.7	106.3±11.1
PaO ₂ (mmHg)	94.9±19.4	96.9±18.9	95.2±12.7
PaCO ₂ (mmHg)	42.5±4.3	41.3±3.9	40.4±2.5
Body Tempreature (°C)	36.2±0.2	36.2±0.2	36.3±0.4

実験中に各パラメーターとも大きな変化は認められない。



図2 左に PET 画像, 中央に術前の MRI, 右にその fusion 画像を示す.

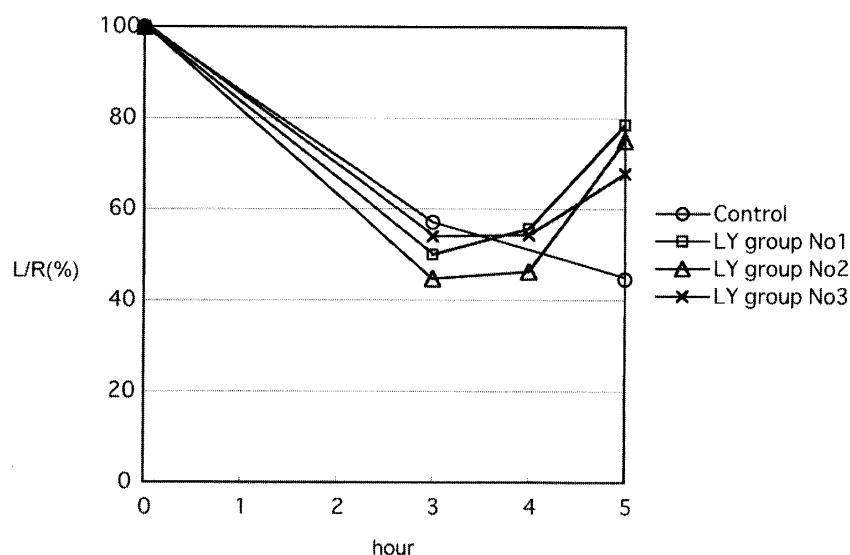


図3 CBF change in Frontal cortex
前頭葉における各 case の脳血流の経時的な変化を示す.

結 果

実験中各種パラメーターは以下のごとく一定に保たれた (表 2). 体温: $36.2 \pm 0.28^\circ\text{C}$ 動脈血圧: $109.0 \pm 14.5 \text{ mmHg}$. PaCO_2 : 41.1 ± 3.3 . PaO_2 : 95.7 ± 15.7 .

1. CBF study

4 頭全例において, 中脳動脈閉塞後 3 時間の PET scan で閉塞側の前頭葉及び基底核部の血流

が対側に比して約 50 % 程度に減少した (図 2, 3, 4). 頭頂後頭葉では対側に比し約 80 % と減少は軽度であった (図 5). LY 治療群 3 例では, 1 時間の生理食塩水による逆行性還流後には脳の全領域において脳血流の改善は見られなかったが, その後 1 時間の LY231617 を用いた逆行性還流後は患側の基底核及び前頭頭頂部の局所脳血流は優位に上昇し (図 6, 7), 頭頂後頭部では優位な上昇は見られなかった (図 8). コントロール例では初回

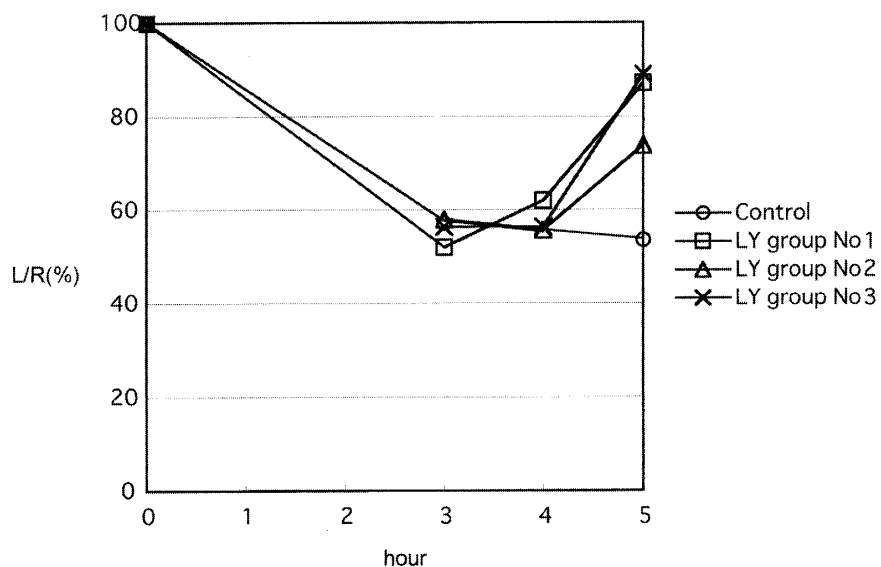


図 4 CBF change in basal ganglia
基底核部における各 case の脳血流の経時的な変化を示す。

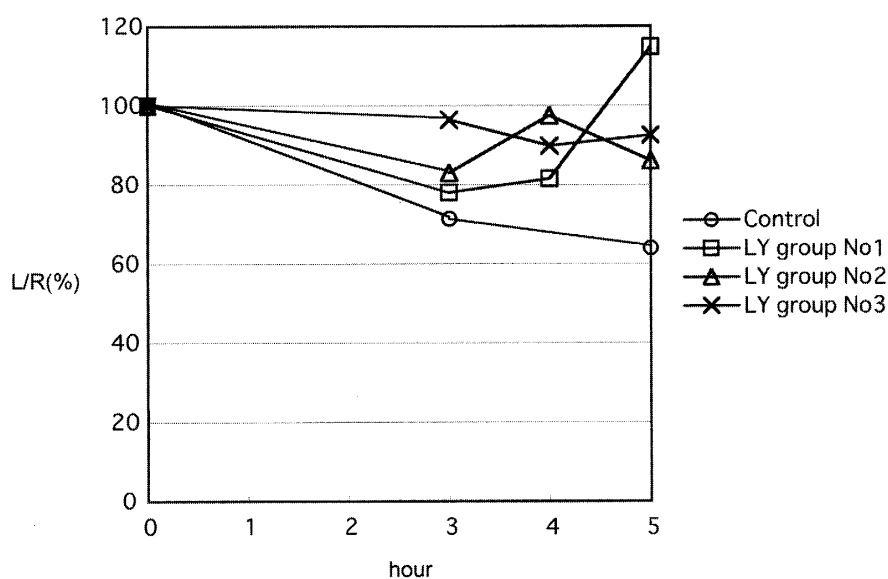


図 5 CBF change in Parietal cortex
頭頂葉における各 case の脳血流の経時的な変化を示す。

と 2 回目の PET scan の間で有為な脳血流の変化は認められなかった。

2. TTC study (図 9, 表 3)

LY group の 3 例では虚血巣はスライス面積全体のそれぞれ 36 %, 32.2 %, 36.9 % (平均 35.1 %) であった。コントロール例では虚血巣は 54.4

% であった。また白質の浮腫では、LY group で 15.4cm², 15.9cm² and 14.9cm² (平均 15.4cm²) でコントロール例では 22.7cm² であり、いずれも LY group がコントロールに比して小さい傾向を示した。

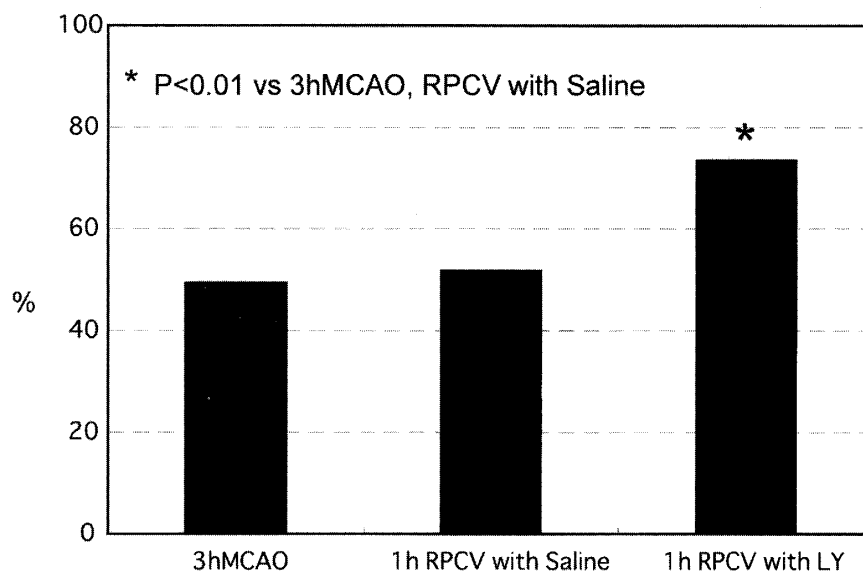


図6 CBF change in Frontal cortex

LY group の前頭葉における経時的な血流の変化を示す。
治療開始後に有為な脳血流の上昇を認める。

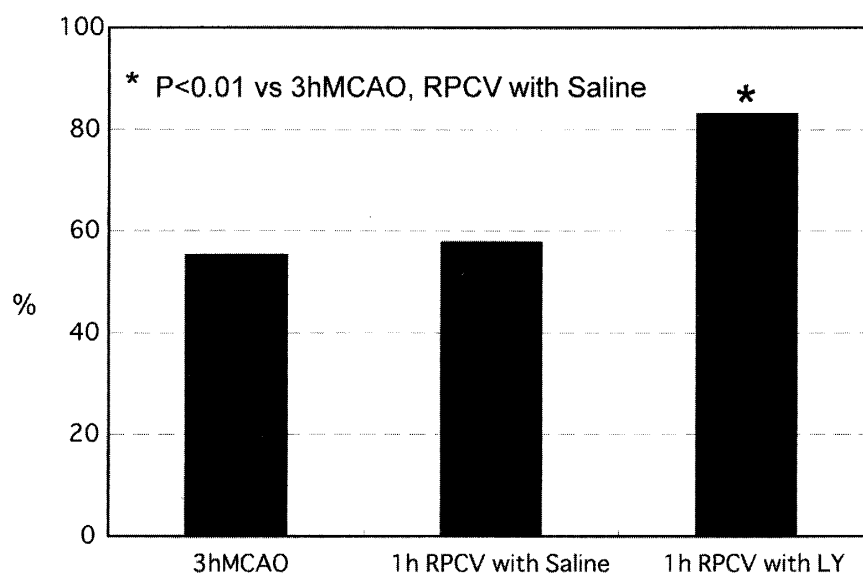


図7 CBF change in basal ganglia

LY group の基底核部における経時的な血流の変化を示す。
治療開始後に有為な脳血流の上昇を認める。

考 察

脳虚血に対する治療は、新たな脳保護薬や抗血栓薬等が発達している。しかし実際の臨床では

治療効果がみられない事もある。その一つの理由として治療薬が虚血の原因となった動脈の閉塞により、虚血に陥った組織に十分行き届かないという問題が存在する。そこで注目されたのが静脈か

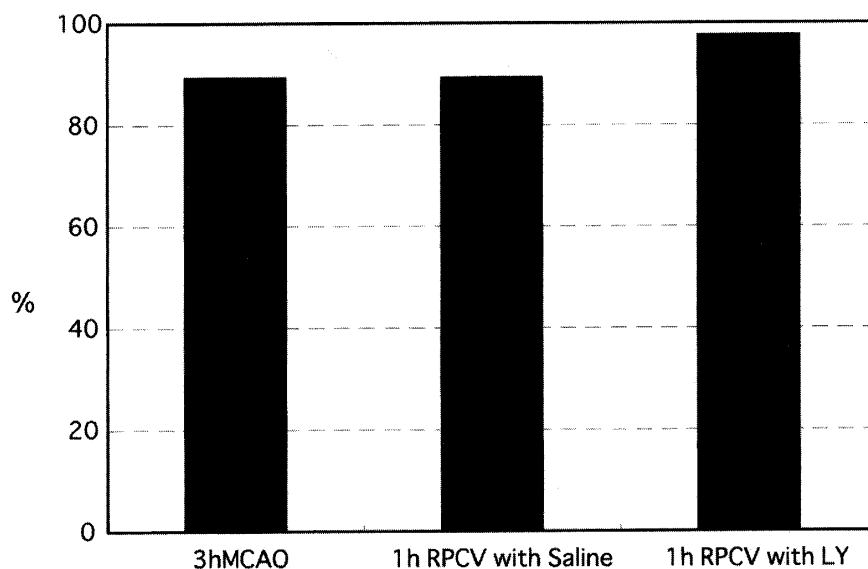


図8 CBF change in Parietal cortex

LY group の頭頂葉における経時的な血流の変化を示す。
有為な脳血流の変化は認められない。

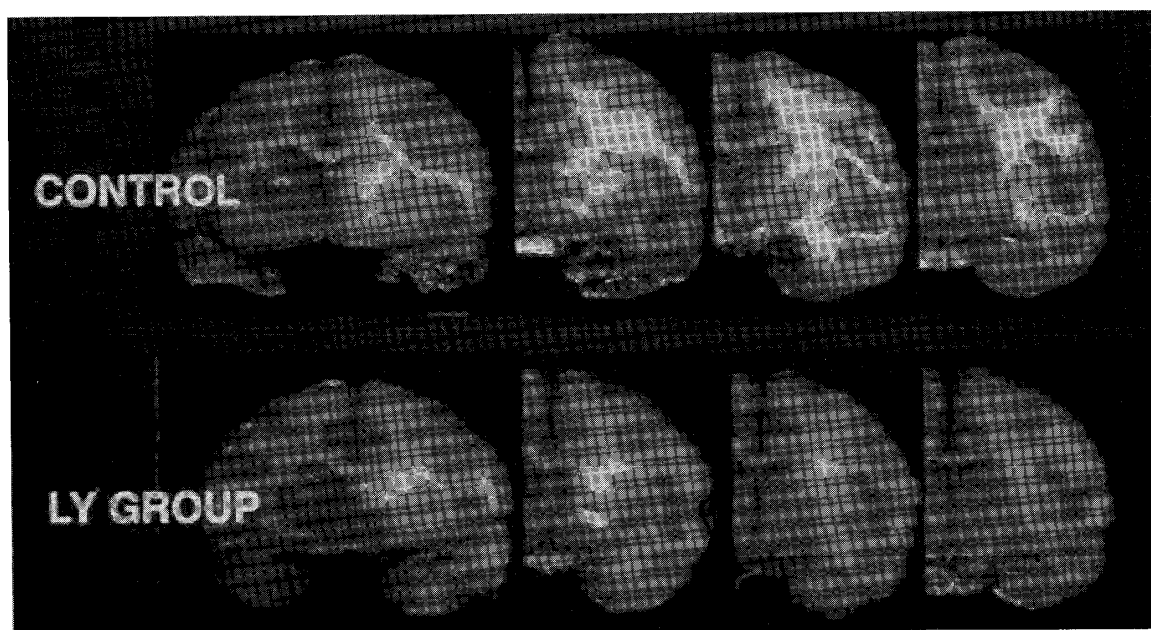


図9 TTC stain

上段にコントロールの TTC 染色のスライス, 下段に LY group のスライスを示す。

らの逆行性に薬物を投与する逆行性脳静脈還流である。脳静脈は豊富なネットワークを持ち薬物の投与には適している。またその際に段階的に圧を上げてゆくと 150mmHg まで、blood brain barrier

に障害を与えることなく加圧することが可能で¹⁾、薬物の逆行性の還流が動物実験上は可能である。今回アカゲザル中大脳動脈閉塞モデルでの RPCV の PET scan を用いた検討で、治療群で1時間生

表3 TTC染色における ischemic damage と edema size を示す.

	ischemic damage	edema size
LY group 1	36.0%	15.4cm ²
LY group 2	32.2%	15.9cm ²
LY group 3	36.9%	14.9cm ²
mean	(mean 35.1%)	(mean 15.4cm ²)
Control	56.4%	22.7cm ²

LY group はコントロールに比して ischemic damage, edema size ともに小さい傾向を示した.

理食塩水で逆行性還流を行っても、脳血流は改善しなかったが、その後1時間のLY231617による治療で中大脳動脈領域の脳血流が優位に上昇した。またコントロール例では生理食塩水での2時間の逆行性還流でも脳血流の改善は認められなかった。以上より今回の実験において、中大脳動脈閉塞4時間後の free radical scavenger であるLY231617による逆行性脳静脈還流は、その1時間後、すなわち虚血発症5時間後までは中大脳動脈領域の脳血流を改善することが示された。またTTCによる脳虚血巣の検討では、やはりLY231617による逆行性脳静脈還流は局所脳虚血5時間後においても脳虚血巣を縮小することが認められ、従来から言われている脳虚血再開通のtherapeutic time windowを広げられる可能性があると思われる。

今まで局所脳虚血に対する逆行性脳静脈還流治療実験はラットを用いて種々の薬剤で行われ報告されてきた^{1)~6)}。今回ラットと異なりヒトに類似するアガゲザルでの本治療実験でラット同様に効果が認められたことは、LY231617を含めた free radical scavenger による逆行性脳静脈還流の実際の臨床応用への可能性を大きく示唆する物と考えられる。また今回の実験では、経静脈還流のカテーテルのcannulationを開頭で静脈を直接穿刺し行ったが、近年の脳血管内手術の進歩により、臨床上Labbe静脈等の脳表の太い脳静脈に経大腿静脈ルートで逆行性にマイクロカテーテルを挿入することは容易となっている。また従来からの

経静脈的線溶療法にくわえ、血管内治療を用いた、経動脈的線溶療法や機械的血栓摘出術が注目を浴びてきており、本邦でもMELT JAPANというstudyが進行中である。しかしいずれにも治療を行うtime windowが4-6時間程度と限られ、その時期以降の再開通は出血性梗塞をきたして、かえって症状が悪化する危険性がある。今回の実験の実験では free radical scavenger によるRPCVで血流改善と虚血巣の縮小がみられており、また同一薬剤のratを用いた実験では虚血5時間後においてもRPCVが有効であると報告されており⁵⁾、RPCVが従来の脳虚血のtherapeutic time windowをも広げる可能性が示唆される。また技術的には脳虚血超急性期症例において、逆行性脳静脈還流による治療と超選択的血行再建術を同時に開始することができる。すなわち脳血管内治療の手技でマイクロカテーテルを用いて逆行性脳静脈還流と超選択的血行再建術を虚血発症超急性期に行う事により、脳梗塞急性期血行再建療法の4-6時間前後と言われているtherapeutic time windowを延長し、その間に有効な血行再建を得ることができれば、虚血による脳のダメージを減少させ、超急性期脳梗塞超急性期の治療成績を飛躍的に向上させることが期待される。

結 論

アガゲザル中大脳動脈閉塞モデルに対するRPCVの治療効果が示された。この結果は本治療

の臨床応用に対する可能性を大きく示唆するもの
と思われた。

文 献

- 1) Ueda T, Yamamoto YL, Takara E and Diksic M: Tolerance of the cerebralvenous sysytem to retrograde perfusion pressure in focal cerebral ischemia in Rats. *Stroke* 20: 378 - 385, 1989.
- 2) Ueda T, Yamamoto YL and Diksic M: Transvenous perfusion of the brain with vera-pamil during focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 20: 501 - 506, 1989.
- 3) Hosaka T, Yamamoto YL and Diksic M: Efficacy of retrograde perfusion of the cerebral vein with verapamil after focal ischemia in rat brain. *Stroke* 21: 1562 - 1566, 1991.
- 4) Shimauchi M and Yamamoto YL: Effect of reterograde perfusion of the brain with combined drug therapy after focal ischemia in rat brain. *Stroke* 23: 1805 - 1811, 1992.
- 5) Nagao T, Yamamoto YL, Inoue N and Ito Y: Retrograde perfusion of the cerebral vein with antioxidant LY231617 reduces brain damage in the rat focal ischemia model. *Neurol Med Chir* 35: 861 - 868, 1995.
- 6) Inoue N, Yamamoto YL, Korematsu K, Goto S, Nagahiro S, Oyama T, Yamada K and Ushio Y: Effectiveness of retrograde perfusion of the cerebral vein for attenuating neuronal injury after transient ischemia following reperfusion in the rat brain. *Neurol Med Chir* 37: 243 - 249, 1997.
- 7) Clemens JA, Saunderd RD, Ho PP and Panetta JA: The antioxidant, LY231617, reduces global ischemic neuronal injury in rats. *Stroke* 24: 716 - 723, 1993.
- 8) Martin Jr. GF: The venous systemo of the head and neck of the rhesus monkey, *Macaca mulatta*. *Ala J Med Sci* 2: 273 - 279, 1965.
- 9) Swanson RA, Morton MT, Tsao - Wu G, Savalos RA, Davidson C and Sharp FR: A semiautomated methodofor measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow & Metab* 10: 290 - 293, 1990.

(平成 17 年 10 月 11 日受付)