

一時的脳虚血におけるプリン代謝産物と脳軟膜動脈血管径

—特に脳梗塞との関連について—

奈良県立医科大学第2外科学教室

富永正夫

PURINE CATABOLITES AND PIAL ARTERIOLAR DIAMETER
IN TRANSIENT CEREBRAL ISCHEMIA
—RELATION BETWEEN PURINE CATABOLISM
AND CEREBRAL INFARCTION—

MASAO TOMINAGA

The 2nd Department of Surgery, Nara Medical University

Received December 3, 1997

Abstract: Twenty adult cats were divided into 4 groups. Ischemia of 30 minutes and 1, 2 and 3 hours duration was respectively induced by unilateral occlusion of the left middle cerebral artery. Extracellular purine catabolites in the gray matter at the ectosylvian gyrus were analyzed with in vivo brain microdialysis technique. Simultaneously, diameter of the pial arteriole was measured through the cranial window using an intravital microscope and a width analyzer.

Extracellular concentrations of adenosine, hypoxanthine and xanthine were found to be $0.86 \pm 0.16 \mu\text{M}$, $4.01 \pm 2.73 \mu\text{M}$, and $3.93 \pm 2.39 \mu\text{M}$, respectively. During ischemia, the concentration of adenosine increased 8.7-fold and arterioles dilated in diameter to 170% in comparison with the resting values. These findings in extracellular adenosine concentration and pial arteriolar dilatation during ischemia support a role of adenosine in regulation of cerebral blood flow and protection of the brain tissue.

After reperfusion, arteriolar diameter had returned to 120% of the resting state. But 50 minutes after reperfusion, pial arteriole began to dilate. This late arteriolar dilatation was coincident with the increasing of the xanthine concentration in 1-3 hours ischemia animals. These results suggest that free radicals might be produced and could affect pial arterioles and brain tissue 50 minutes after reperfusion in 1-3 hours ischemia animals.

In the 30 minutes ischemia, pial arterioles did not dilate again and the xanthine concentration was unchanged. We speculate that D-to-O conversion might not be promoted in the 30 minutes ischemia animals.

Index Terms

purine catabolites, pial arteriole, microdialysis, free radicals, cerebral ischemia

はじめに

以前より脳虚血とラジカル反応の関係は注目を浴びて

いたが、最近になって、少なくとも虚血性の病態にラジカル反応が関与している証拠がいくつも見出された¹⁾²⁾。虚血後には、プリン代謝系の xanthine oxidase やアラキ

ドン酸代謝系の cyclooxygenase などのラジカル発生源となる酵素が活性化されてくる可能性が指摘されている。また、ラジカルを消去する系に着目して, superoxide dismutase を注入すると虚血による神経細胞死を防御できるという報告もなされている⁷⁾。ラジカル説は比較的長時間の脳虚血の後に血流が再開してくる場合の脳組織損傷に関与するのではないかと考えられている。

現在のところ, 虚血性神経細胞死の問題については, その膨大な研究にもかかわらず, 全容は解明されていない。脳虚血に際して起こる様々な現象には, プリン代謝系も少なからず関与しているものと思われる。本研究では, プリン代謝系が一時的脳虚血とその後の再灌流においてどのように変動し, 脳血管・脳組織にどのような影響を与えるかについて検討し, 今後の脳虚血治療の一助にしたいと考えた。

方 法

1) 実験動物の管理・維持

2.2—4.4 kg の雑種成猫 20 匹を雌雄の区別なく使用した。気管内挿管を行い pancuronium bromide (Mioblock[®]) にて無動化, 人工呼吸器 (Harvard apparatus Model 607, Harvard 社製, U.S.A.) を用いて調節呼吸を行った。麻酔の維持にはハロセン (0.5—1.0%) を用いた。平均動脈圧 (SMAP)・脈拍 (PR) の測定および動脈血の採血のためのチューブを大腿動脈から腹部大動脈まで挿入, 薬剤注入および補液路としてのチューブを大腿静脈から下行大静脈に挿入した。多用途計測記録装置 (RM-6200 G, 日本光電社製) を用いて血圧を連続測定し, 動脈血ガス分析装置 (ABL 330, Radiometer 社製, Copenhagen) で血液ガスを適宜測定した。また, ガスアナライザー (POET II, Criticare Systems 社製, U.S.A.) を用いて呼吸終末ガス濃度も持続的に測定した。体温は自動体温調節装置 (TK-43, 朝日電子社製) を使用して直腸温を $37.5 \pm 0.8^\circ\text{C}$ に保った。これらの操作により, $\text{pH} (7.34 \pm 0.04) \cdot \text{PaCO}_2 (31 \pm 2 \text{ mmHg}) \cdot \text{PaO}_2 (135 \pm 20 \text{ mmHg}) \cdot \text{SMAP} (115 \pm 18 \text{ mmHg}) \cdot \text{BE} (0 \pm 5)$ を調節して一定条件下で実験を行った。

2) Cranial window 作製 (Fig. 1)

腹臥位で東大脳研式動物固定台に頭部を固定, 頭部正中に約 5 cm の縦切開を加え, 左側頭頂部を露出した。Cranial window は手術用顕微鏡 (Zeiss 社製) を用い, Auer¹⁾の方法に準じて左側で矢状縫合より 25 mm 側方, 冠状縫合より 15 mm 後方 (Ectosylvian gyrus 直上) を中心に直径 10 mm の骨窓を作製した。硬膜を切開し, 脳表を観察できるようにして直径 12 mm, 厚さ 0.15 mm

のカバーガラス (Matusnami No.1) を閉鎖して Acrylic glue (Histoacryl[®]) で固定した。ここより脳表血管 (径 40—70 μm の動脈) を生体顕微鏡下にビデオシステム (C 2400: Hamamatsu Photonics 社製) で連続的に記録, 血管径を Width analyzer (C 3161: Hamamatsu Photonics 社製) で計測した。また, rCBF の経時的变化を連続測定するために Laser Doppler flowmeter (ALF 21, Advance 社製) を用い, そのプローブを Cranial window のカバーガラスに触れない程度に充分近づけて万能電極支持台 (SM-15, Narishige 社製) で固定した。

3) 脳微小透析法 (Fig. 1)

更に Cranial window の近傍に小孔を設けて, ここよりプリン代謝産物のサンプリングを行った。透析膜は Microdialysis model CMA/10 probe (Carnegie Medicin 社製, Sweden) で外径 0.5 mm, 長さ 2 mm のものを用いた。灌流装置は Microinjection pump CMA/100 (Carnegie Medicine 社製, Sweden) に 1.0 ml のシリンジ (Hamilton 社製, U.S.A.) を装着した。灌流液は $\text{Na} : 143 \text{ mEq/L}, \text{K} : 2.9 \text{ mEq/L}, \text{Ca} : 2.4 \text{ mEq/L}, \text{Mg} : 2.4 \text{ mEq/L}, \text{Cl} : 126.0 \text{ mEq/L}, \text{HCO}_3^- : 23.0 \text{ mEq/L}$ の人工髄液を濾過して使用し, 灌流速度は 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ とした。各実験ごとにプローブの回収率の検定を in vitro で行った。実験前に 10 μM の各プリン代謝物質を含む標準試料液を 37°C でサンプリングし, 採集した灌流液と標準試料液の濃度比を求め回収率とし, アデノシンの回収率が 8% 以上のものを用いた。測定は陽イオン交換カラム (Nucleosil: 4.0 mmID \times 110 mm, 粒径 3 μm ,

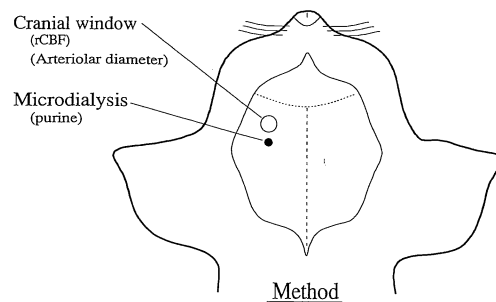


Fig. 1. Through the cranial window on the left ectosylvian gyurs, rCBF was measured and pial arteriole was observed continuously. Extracellular purine catabolites were sampled by in vivo brain microdialysis technique from the gray matter at ectosylvian gyrus.

BAS社製)を使用し、溶出液は8%メタノールを含む0.01 M 磷酸緩衝液(pH 5.5)を用いた。高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)装置はBAS社製のものを用い、流速0.7 ml/minで溶出した。測定物質の同定は紫外分



Fig. 2. Coronal section of feline brain. Extracellular purine catabolites were sampled from the gray matter at ectosylvian gyrus (arrowhead).

光光度計検出器(Variable Wavelength Monitor, BAS社製)を用いて254 nmの波長で行い、標準既知サンプルを基準として溶出時間より決定した。その定量はChromatocorder 12(System Instrument社製)を用いて溶出曲線を面積計算して行い、回収率の逆数を乗じて脳組織間質液中の濃度とし、 μM で表示した。

4) 中大脳動脈の一時閉鎖

O'Brienら⁹⁾の方法に準じて経眼窩的に中大脳動脈(MCA)を露出した。左眼球を摘出後、視神経管上内側を開放拡大して硬膜・くも膜を順次切開、MCAを露出した。脳表血管がCO₂反応性の検定も含め生理的状态にあることを確認後、MCAの基部をZen式クリップ(欧和通商社製)で閉塞、それぞれの閉塞時間(30分、1時間、2時間、3時間)のちに再開通した。

脳微小透析用のプローブを脳表約2 mm(Fig. 2)の深さまで挿入して90分経過後の安定した各プリン代謝産物の値を基礎値とし、虚血前30分から再開通後180分までrCBF、脳軟膜動脈血管径、プリン代謝産物を経時的に測定した。

5) 梗塞面積の測定

各群とも再開通5時間後に開胸して10%ホルマリン溶液を用いて、経心的に灌流固定を行った。その後、直ちに脳を取り出し、さらに10%ホルマリン溶液で3日以上浸潤固定してからWaltzら¹⁴⁾に準じて、temporal tip, chiasma, mamillary bodyを通る部位で冠状に脳を切り出した。その脳の冠状断標本を上昇系エタノール

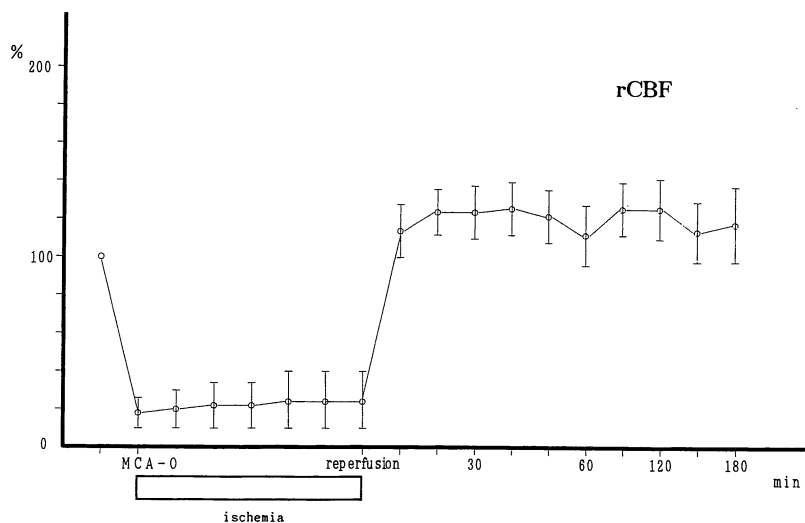


Fig. 3. During ischemia, rCBF was about 20-40% of the resting state. After reperfusion, rCBF quickly recovered to the resting state.

で脱水してキシレンで置換した後、パラフィン包埋し、6 μm 厚の切片を作製した。Hematoxylin-Eosin(HE)染色を施し、光学顕微鏡で観察した。光学顕微鏡で核の pyknosis や空胞化を認めた部分を梗塞と判断しその範囲を確かめた後、画像解析装置(Microcomputer imaging device, Canada Imaging Research 社製)で定量的に測定し、その面積が患側半球を占める比率で梗塞の程度を表現した。

結 果

1) 局所脳血流の変化

各実験ごとでの虚血前の resting state の rCBF をそれぞれ 100 % とした。30 分—3 時間閉塞群ともに、rCBF はほぼ同様の変化を示した。つまり、虚血中は resting state の約 20—40 % に減少してプラトーの状態になり、再開通後は resting level に回復した (Fig. 3)。

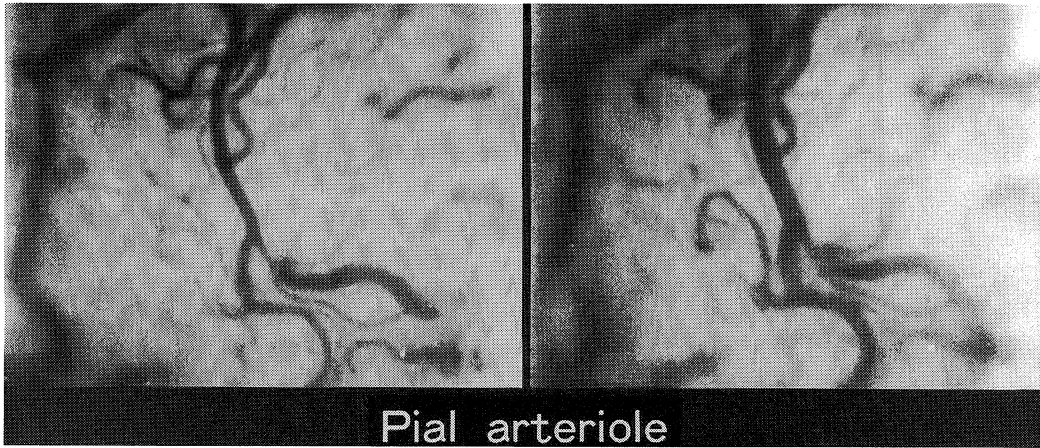


Fig. 4. Intravital microscopic photograph through the cranial window. Before ischemia (left). During ischemia (right).

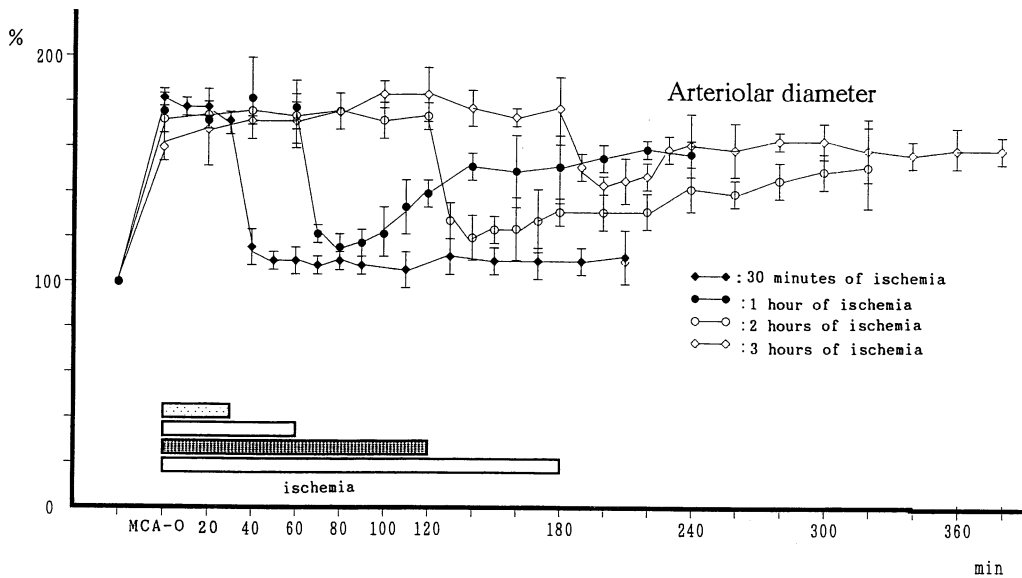


Fig. 5. During ischemia, pial arteriolar diameter was 170% of the resting state. After reperfusion, arteriolar diameter had returned to 110-140% of the resting state. But 50 minutes after reperfusion, pial arteriole began to dilate again at 1-3 hours of ischemia.

2) 脳軟膜動脈血管径の変化

各実験ごとの虚血前の resting state の脳軟膜動脈血管径(40-70 μm)をそれぞれ 100%とした。30分-3時間閉塞群ともに虚血中、血管径は rCBF の減少にやや遅れて約 170%に拡張した(Fig. 4)。30分閉塞群では再開通後、rCBF の変化にやや遅れて約 110%まで回復し、以後変化がなかった。1時間閉塞群・2時間閉塞群では

再開通後、約 120%まで回復したが、再開通 50分前後より再度拡張し始めて再開通 3時間後では 150%となった。3時間閉塞群では再開通後、約 140%までの回復にとどまり、やはり徐々に再拡張した(Fig. 5)。

3) プリン代謝産物の変動

アデノシン・ヒポキサンチン・キサンチンの resting stateでの基礎値はそれぞれ $0.86 \pm 0.16 \mu\text{M}$, $4.01 \pm$

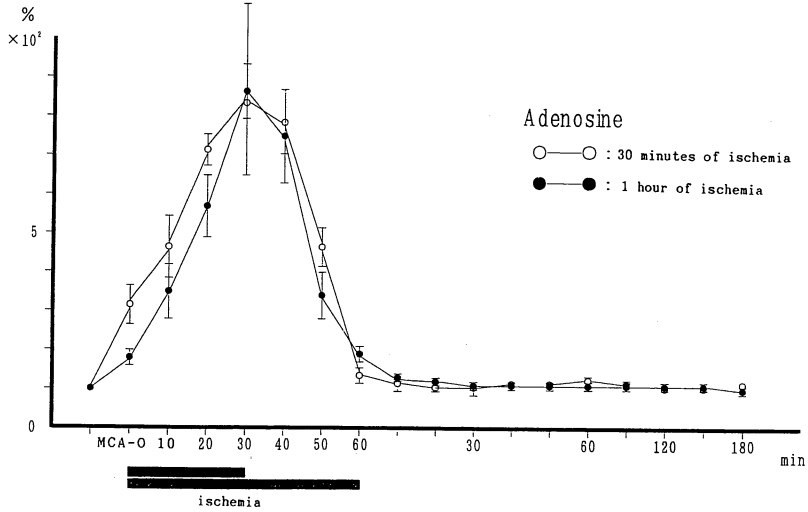


Fig. 6. Extracellular adenosine concentrations at 30 minutes and 1 hour of ischemia. There were the peaks of adenosine concentrations 30 minutes after ischemia respectively.

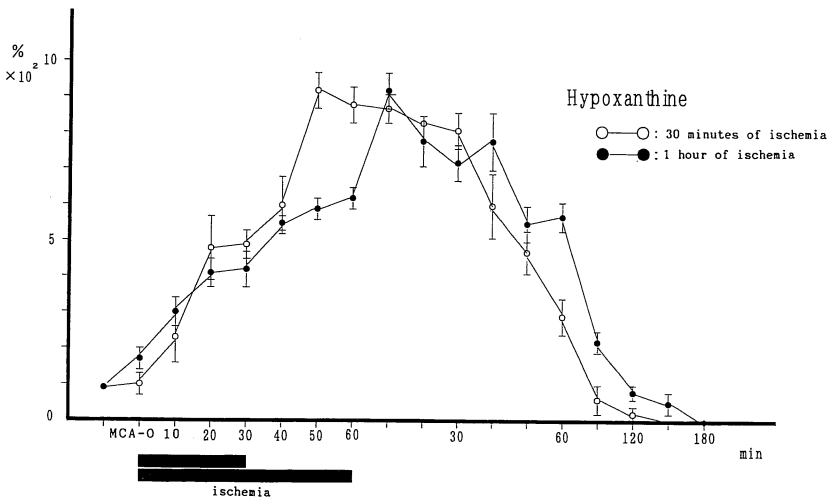


Fig. 7. Extracellular hypoxanthine concentrations at 30 minutes and 1 hours of ischemia. There were the peaks of hypoxanthine concentrations 10 minutes after reperfusion respectively.

2.73 μM , 3.93 \pm 2.39 μM であった。1-3時間閉塞群で、その最大値はアデノシン：虚血30分後(基礎値の約8.7倍)、ヒポキサンチン：再開通10分後(基礎値の約9.0倍)、キサンチン：再開通50分後(基礎値の約9.5倍)と順次出現し、アデノシン・ヒポキサンチン・キサンチン

ともに再開通180分後にはほぼ基礎値まで回復した。30分閉塞群では、アデノシン・ヒポキサンチンの最大値は1-3時間閉塞群と同様に出現したが、キサンチンの有意な上昇は認めなかった。(Fig. 6, 7, 8).

4) 梗塞面積

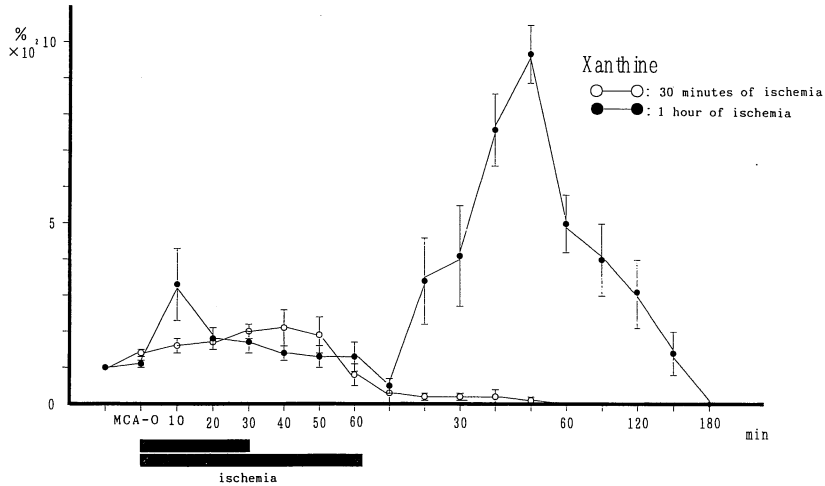
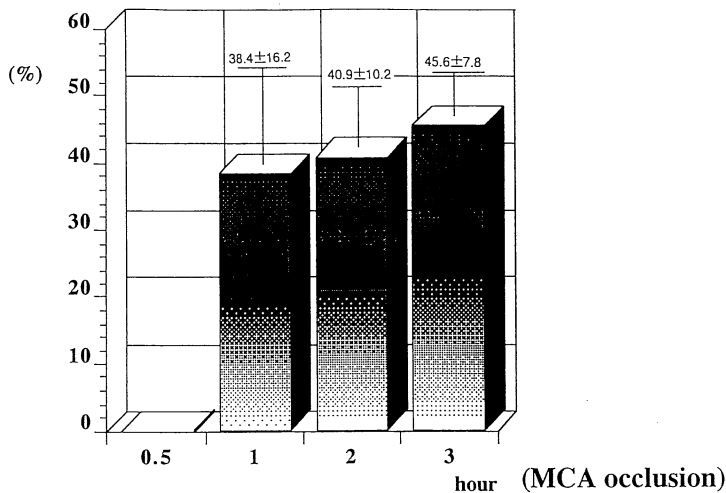


Fig. 8. Extracellular xanthine concentrations at 30 minutes and 1 hour of ischemia. There was the peak of xanthine concentration 50 minutes after reperfusion at 1 hour of ischemia. But xanthine didn't increase at 30 minutes of ischemia.



Infarction (percentage of hemisphere)

Fig. 9. No infarction was found at 30 minutes of ischemia. The infarcted area was about 40% of hemisphere at 1-3 hours of ischemia.

30分閉塞群では明らかな梗塞巣は同定できなかった。1時間以上の閉塞群では梗塞巣を認め、その面積が患側半球に占める比率はそれぞれ1時間閉塞群：38.4±16.2、2時間閉塞群：40.9±10.2、3時間閉塞群：45.6±7.8となった(Fig. 9)。

全例で局所脳血流が減少していることを測定し、観察部位での虚血が確実に生じていることを確認した。アデノシンは虚血中30分前後に最大値を示し、脳軟膜動脈も虚血中は拡張した。1—3時間閉塞群では再開通50分後にキサンチンが最大値を示し、その時期に一致して脳軟膜動脈も再拡張し始めた。30分閉塞群では脳軟膜動脈の再拡張は認められず、キサンチンの増加もみられなかった。また、1—3時間閉塞群では患側半球の約40%に梗塞巣がみられたが、30分閉塞群では梗塞巣はみられなかった。

考 察

1974年Berne²⁾が脳虚血でもアデノシンが産生されることを見出し、脳血管抵抗に及ぼすアデノシンの作用を初めて論じて以来、脳虚血におけるプリン作動性物質の研究も数多くなされてきた。これら研究の結果、アデノシンはその受容体A₁およびA₂を介して特異的な生理作用を発揮することが分かっている¹¹⁾。ATPの分解産物であるアデノシンがA₂受容体を介して脳血管拡張作用をもっていることはよく知られており、ラットでCranial windowからアデノシンを投与して血管の反応をみた結果では1μMでresting stateの120—130%、1mM(10₃μM)で約180%前後に拡張すると報告されている⁶⁾。しかし、脳虚血(血流低下)によるアデノシンの上昇が血管拡張にどの程度関与するかについての報告はない。本実験結果では虚血時のアデノシンは最大値でもせいぜい8.4μMに上昇したのみであり、Cranial windowにアデノシンを投与した結果からは血管径の拡張は120—130%と推察されるが、実際には170%前後の拡張を認めており、血管拡張のすべてをアデノシンでは説明できない。いずれにしても、虚血中には、増加した細胞外液中アデノシンが脳軟膜動脈の拡張を促し、脳循環を保とうとしているように思われる。また、アデノシンはA₁受容体を介して細胞の興奮性を抑えることにより脳保護作用を有しており、アデノシンレセプターアゴニストであるプロベントフィリンが脳虚血後神経細胞の遅発性損傷に対する保護作用を持つことやテオフィリン誘導体によるA₁受容体のブロックが虚血時の組織傷害を悪化させることから^{4,10)}、虚血中にもA₁受容体を介して細胞保護に有効に働いているものと考えられる。更に、アデノ

シンやアデノシン誘導体によってグルタミン酸放出が抑制されることも明らかにされている¹³⁾。本研究では、細胞外液中アデノシン濃度は虚血30分間は上昇し続け、それ以上の虚血を行っても上昇せずに低下した。このことは、アデノシンが30分までの虚血では脳を保護しようとする因子の一つとして細胞外液中で働いている可能性を示唆している。つまり、虚血30分までは、アデノシンは脳軟膜動脈の拡張を促し、グルタミン酸の放出を抑制しているものと思われる。また、30分間の虚血では明らかな梗塞巣はみられなかった。このことから、少なくとも30分までの脳虚血では、脳を保護しようとする方向にプリン代謝系が働いているものと思われる。

一方、脳虚血とラジカル反応は脳虚血の実験において、かつて最も注目を浴びた分野であった。ラジカル反応は自己増殖的に増大する傾向が強いため保護機構が適切に作用しなければ容易に細胞を破壊するに至る。しかし、虚血の後に確かにラジカル反応が起こったという確証を得るのは手技的に難しく、様々な実験がなされてきたにもかかわらず、いずれも細胞死にラジカル反応を直接結び付けるものとは成り得なかった。最近になって、少なくとも虚血性の病態にラジカル反応が関与している証拠がいくつか見い出されている¹²⁾。虚血後には、アラキドン酸代謝系のcyclooxygenaseやプリン代謝系のxanthine oxidaseなどのラジカル発生源となる酵素が活性化されてくる可能性が指摘されている。従来、哺乳動物の脳組織内におけるプリン代謝はヒポキサンチンで終了し、脳組織内で尿酸が生成されることはないものと考えられており、脳の虚血性組織傷害に関与するfree radical productsの発生源に関してはエイコサノイドの代謝に研究が集中していた。しかし、Betz⁹⁾によってラットの脳内毛細血管にキサンチンオキシデース活性が認められることが報告され、脳組織内でもキサンチンオキシデースによるsuperoxide anionの産生が注目されるようになった。そして、この増加したキサンチンオキシデースが再開通後に血液中の酸素を利用してヒポキサンチンの代謝を触媒し、その時に発生するsuperoxide anionが組織傷害に重要な役割を果たすことも示唆されている⁹⁾。我々の実験では、1—3時間閉塞群においてはアデノシンからヒポキサンチン→キサンチンと順次最大値が出現しており、再開通時にキサンチンオキシデースによる代謝が進行していることが示唆された。また、再開通50分後にキサンチン濃度の最大値が出現しており、この時点で酸素を利用したキサンチンオキシデースによるヒポキサンチン→キサンチン→尿酸の代謝が進行してsuperoxide anionが産生され、これが周囲の血液脳関門の透

過性亢進・浮腫形成・血管内皮細胞傷害などに一部関与したものと思われる。キサンチンオキシダーゼ系の直接的な脳軟膜動脈拡張作用の報告もあるが、今回の実験でのキサンチン濃度の最大値に一致した脳軟膜動脈の拡張は superoxide anion の関与した周囲脳実質の変化により、頭蓋内圧が亢進し、perfusion pressure が低下したためであると考えられる⁹⁾。1-3時間閉塞群での約40%の梗塞巣の出現にはこの reperfusion injury が関与しているものと思われる。このように1-3時間閉塞群ではプリン代謝系は再開通後には細胞傷害性に働いているようである。30分閉塞群では再開通後にキサンチン濃度は上昇せず、脳軟膜動脈も拡張しなかった。また、梗塞巣も出現しなかった。これは30分閉塞群では、D-to-O conversion があまり進行せずにキサンチンオキシダーゼ活性が増加しなかったためではないかと推測される。

結 語

1) 一時的脳虚血におけるプリン代謝系の脳循環・脳組織への関与について検討した。

2) 少なくとも30分までの脳虚血において、虚血中にはプリン代謝系は脳循環を保って脳組織を保護しようとする方向に働いている。

3) プリン代謝系では、再灌流50分前後にキサンチンオキシダーゼを介したラジカル反応によって superoxide anion が産生され、これが脳組織並びに脳循環を傷害する。ただし、30分の閉塞では、この再灌流時の傷害は生じないようである。

4) 以上の結果より、プリン代謝系から考慮した場合、脳組織に傷害を与えない虚血時間は30分前後と考えられる。また、再灌流50分前後でのラジカル消去作用を有する薬剤の投与が再灌流傷害に有効であると思われる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究において種々御指導いただきました第二外科学榊 寿右教授、耳鼻咽喉科学松永喬教授および生化学吉原紘一朗教授に深謝致します。

文 献

- 1) Auer, L. M. : The Pathogenesis of hypertensive encephalopathy. Experimental data and their clinical relevance with special reference to neurosurgical patients. *Acta Neurochir (Wien)* **27** (Suppl) : 1-111, 1978.
- 2) Berne, R. M., Rubio, R. and Curnish, R. R. : Release of adenosine from ischemic brain. Effect

on cerebral vascular resistance and incorporation into cerebral adenine nucleotides. *Circ. Res.* **35** : 262-271, 1974.

- 3) Betz, A. L. : Identification of hypoxanthine transport and xanthine oxidase activity in brain capillaries. *J. Neurochem* **44** : 574-579, 1985.
- 4) DeLeo, J., Toth, L., Schubert, P., Rudolphi, K. and Kreutzberg, G. W. : Ischemia-induced neuronal cell death, calcium accumulation, and glial response in the hippocampus of the mongolian gerbil and protection by propentofylline (HWA 285). *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **7** : 745-751, 1987.
- 5) Granger, D. N., Rutili, G. and McCord, J. M. : Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* **81** : 22-29, 1981.
- 6) 石田泰史, 榊 寿右, 笹岡保典, 西谷昌也, 辻本正三郎 : 一時的脳虚血における脳の reversibility に関する研究—脳血管反応性と組織学的変化から—。 *脳神経外科* **19** : 1039-1046, 1991.
- 7) Liu, T. H., Beckman, J. S., Freeman, B. A., Hogan, E. L. and Hus, C. Y. : Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *Am. J. Physiol.* **256** : H589-H593, 1989.
- 8) Morii, S., Nagai, A. C. and Winn, H. R. : Reactivity of rat pial arterioles and venules to adenosine and carbon dioxide : with detailed description of the closed cranial window technique in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **6** : 34-41, 1986.
- 9) O'Brien, M. D. and Waltz, A. G. : Transorbital approach for occluding the middle cerebral artery without craniectomy. *Stroke* **4** : 201-206, 1973.
- 10) Rudolphi, K. A., Keil, M. and Hinze, H. J. : Effect of theophylline on ischemically induced hippocampal damage in mongolian gerbils : a behavioral and histopathological study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **7** : 74-81, 1987.
- 11) Rudolphi, K. A., Schubert, P., Parkinson, F. E. and Fredholm, B. B. : Adenosine and brain ischemia. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* **4** : 346-369, 1992.
- 12) Siesjo, B. K., Agardh, C. D. and Bengtsson, F. :

- Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* **1** : 165-211, 1989.
- 13) **Simpson, R. E., O'Reagan, M. H., Perkins, L. M. and Phillis, J. W.** : Excitatory transmitter amino acid release from the ischemic rat cerebral cortex : effects of adenosine receptor agonists and antagonists. *J. Neurochem.* **58** : 1683-1690, 1992.
- 14) **Waltz, A. G.** : Effect of blood pressure on blood flow in ischemic and in nonischemic cerebral cortex. The phenomena of autoregulation and luxury perfusion. *Neurology* **18** : 613-621, 1968.