

2. 脳虚血と生化学的モニタリング —脳における Redox State の測定—

田村 晃*

1. はじめに

神経細胞の活動を常時維持するために、多くのエネルギーを消費する脳は、エネルギー源であるグルコース・酸素の供給をすべて血流に依存しており、脳における貯蔵がほとんどないため、血流低下したり酸素含量が低下すると脳の機能は、ただちに障害される。脳局所血流量が15~20ml/100g/min以下に低下すると、脳波の平坦化、somatosensory evoked potential (SEP) の消失、spontaneous neuronal spike activityの消失が起こり、10ml/100g/min以下では膜のイオンポンプが障害され、エネルギーおよびイオンホメオスタシスが崩壊する。心停止などの完全虚血状態では、10秒以内に意識消失が起こり、脳波も平坦化し、このような状態が3~10分持続すると、脳は不可逆的損傷を被むる^{10,13}。このように虚血・低酸素状態にもっとも弱い臓器のひとつである脳の状態をモニタリングする方法としては、従来、脳波やその他の電気生理学的パラメーター、脳血流量測定などが行われてきた⁴。われわれは、細胞活動の根源であるエネルギー代謝活動そのものの動きを捉えることを目的とし、ミトコンドリア呼吸鎖の呼吸色素であるビリジンスクレオチドの還元型(NADH)を蛍光測定し、*in vivo*での細胞内ビリジンスクレオチドのredox state(酸化還元状態)を直接記録する装置の開発を行ってきた。ここでは、従来発表してきたファイバースコープ型オルガンレドキシメーター(organ redoximeter)およびTV-ビデオシステムを用い画像表示を出来るようにした、現在開発中の生体画像蛍

光装置の概略と、測定結果の1部を示す。

2. ファイバースコープ型オルガンレドキシメーターによる脳 redox state の測定 (図 1)

測定装置の簡単なブロックダイアグラムを図2に示す。高輝度光源からの光を可視領域のみフィルターにより除去し、紫外領域(366nm)をNADHの励起に、近赤外領域(720nm)を血流変動による光学的補正に用い、NADHの発する蛍光(460nm)を血流臓器において測定出来るようにしたものである^{6~9}。

筋弛緩剤を使用して無動化し人工呼吸下のラットにおいて人工呼吸器停止による asphyxia 時の redox state の変化をみたものが図3で、NADH 蛍光、組織酸素分圧、血圧、脳波を同時にモニターした。呼吸停止とはほぼ同時に組織酸素分圧は低下し(latency 2.5±1.5秒)、それとはほぼ平行してNADH蛍光が増加(latency 9.6±2.3秒)しており、脳波の変化が出現するのは13.2±1.3秒と redox

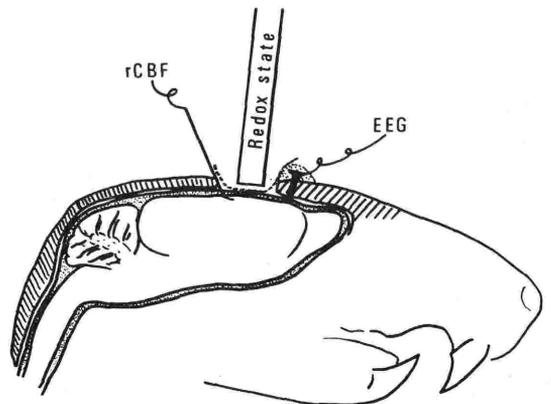


図 1. ファイバースコープ型オルガンレドキシメーターによる脳表 NADH 蛍光測定

* 帝京大学脳神経外科

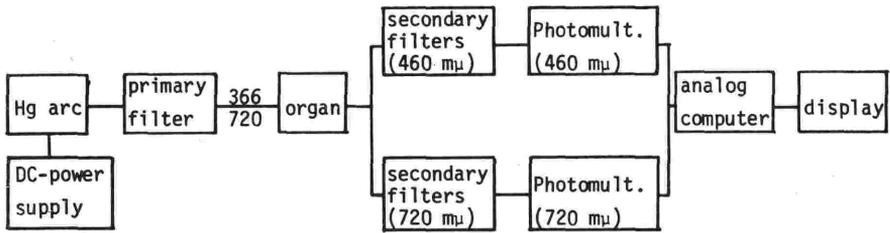


図 2. レドキシメーターのブロックダイアグラム

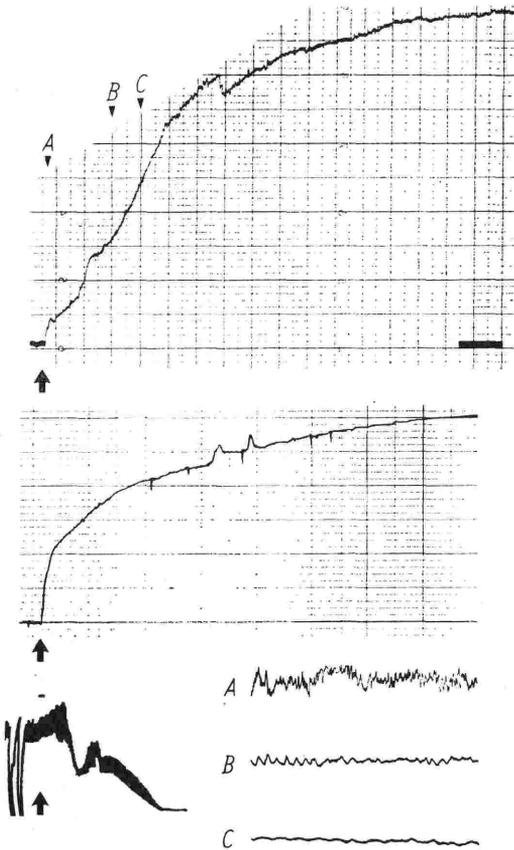


図 3. ラット asphyxia 時の NADH 蛍光(上), 組織酸素分圧(中), 血圧(下, 左), 脳波(下, 右)

蛍光は上方が蛍光増加を, 酸素分圧は上方が減少を示す。前 3 者の time scale は同じである。

state の変化は電気生理学的変化に先行して動く。図 4 は, 同じモデルで asphyxia 後に呼吸を再開させたもので, 図 3 と同様に呼吸停止とほぼ同時に redox state は還元方向に動き, 呼吸再開と同時に速やかに回復しているが, 脳波の回復は約 3 分くらい遅れている。

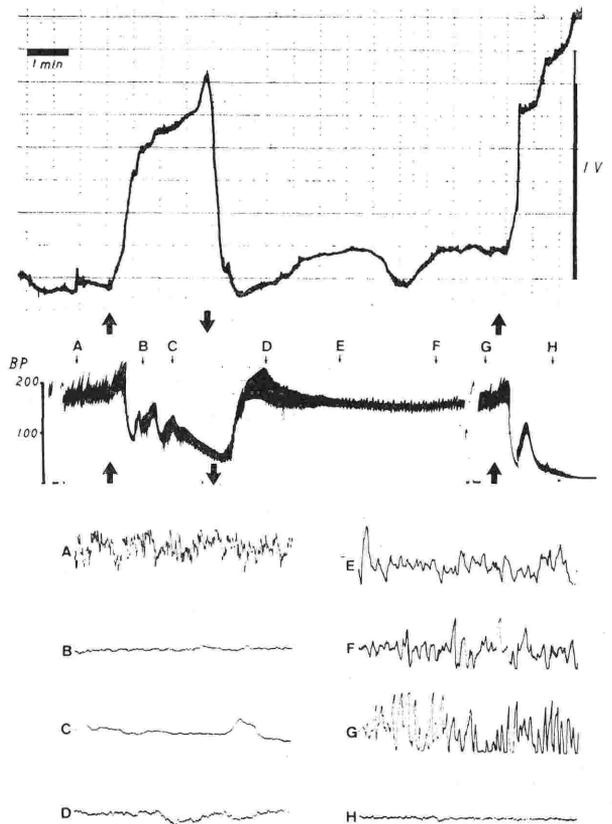


図 4. ラット asphyxia 時の NADH 蛍光(上), 血圧(中), 脳波(下)

腹部大動脈よりの急速脱血による虚血時には, 組織酸素分圧と redox state は同時に急激な変化(latency P_tO_2 2.6 ± 1.1 秒, redox state 2.6 ± 1.8 秒)を示すが, 脳波が平坦化したのは 23.8 ± 2.1 秒であった。

同様の実験を砂ネズミ(mongolian gerbil)の総頸動脈閉塞モデルで行った。砂ネズミは, 先天性にウイルス動脈輪の形成不全があり, 1 側総頸動

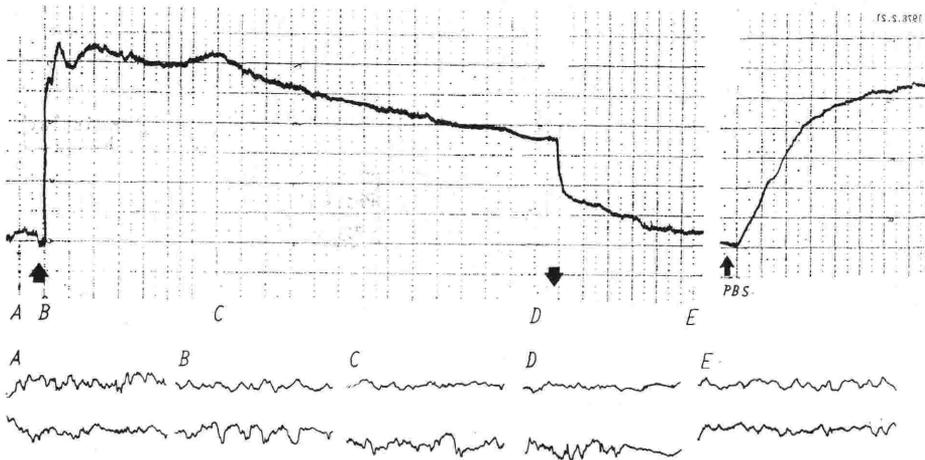


図5. 砂ネズミ1側総頸動脈閉塞時のNADH蛍光(上,)脳波(下)
 ↑は閉塞を↓は閉塞解除を示す. ペントバルビタール(PBS)静注による死亡時を右側に示してある.

脈閉塞により30~50%の動物で神経症状が出現し、脳梗塞で死亡(陽性動物)する。残りの50~70%では、神経症状は軽度または認められず、組織学的にも正常ないし小梗塞が認められるのみである。図5は、砂ネズミ陽性動物におけるNADH蛍光および脳波所見であるが、総頸動脈遮断(↑)と同時に蛍光は瞬時に増加する。その後蛍光は徐々に低下するが、1時間後の遮断解除と同時に元のレベルに戻り、脳波も回復傾向にある。虚血時の蛍光量は、ペントバルビタール(PBS)急速静注による死亡時と同じで、総頸動脈遮断により、この動物ではピリジヌクレオチドは還元型に完全に移行した後、側副血行路による少量ずつの血流回復により徐々に酸化型へ移っていることが推定される。砂ネズミにおいて、水素クリアランス法による局所脳血流量と redox state との相関をみると、1側総頸動脈遮断後に NADH 蛍光が著明に増加(死亡時にほぼ相当する120%の蛍光増加)しそのまま高値が持続した群では、遮断中の血流量は $3.2 \pm 1.2 \text{ ml}/100\text{g}/\text{min}$ と正常値(32.0 ± 3.7)の20%以下に低下しており1時間の遮断解除後に血流は回復するものの重篤な神経症状を示し、24時間以内に全例が死亡した。蛍光増加が70~80%の群では、神経症状は認められるが生存した。これに対し、NADH蛍光増加が軽度(30%以下)の群では遮断中の血流量も 23.7 ± 1.4 と保たれており、神経症状の発現はみられず、全例生存(陰性

群)した。このように脳 redox state の変化は、脳局所血流量(すなわち、血中酸素ガス分圧が正常であれば酸素供給量)と密接な関係を持ちほぼ血流量と平行した動きを示すが、本法は組織の酸素供給消費状態を組織の側から直接観察しており、redox state の回復が組織機能の回復を直接示すものではないとはいえ、血流以上に組織の状態を示すものといえる。

このような測定法上の最大の障害は、血流による干渉(hemodynamic artifacts)であり、Chanceらの in situ における測定報告の問題点もここにあった^{2,3,8,9,11,12}。われわれの使用した測定装置は小林らの開発したもので、小林らは、このような血液を含有した状態での光量減少が赤血球内の色素の光吸収を伴った濁度(absorption-related turbidity)の問題によるものであり、Chanceらが当初問題としたヘモグロビンの酸素化の問題ではないことを指摘し、電気的な hemodynamic artifact の除去の演算回路を組み込んだ装置を開発した⁶⁻⁹。本装置において、上に述べたような血流臓器における hemodynamic artifact の除去が行われているか否かを確認した実験が図6で、血流量を交叉熱電対法で同時に連続測定した。5% CO₂ 吸入により血流は著明に増加するが、redox state は変化せず、虚血に対しては、両者共に明確に反応しており、血流の影響を除外していることがはっきりと示されている。このように

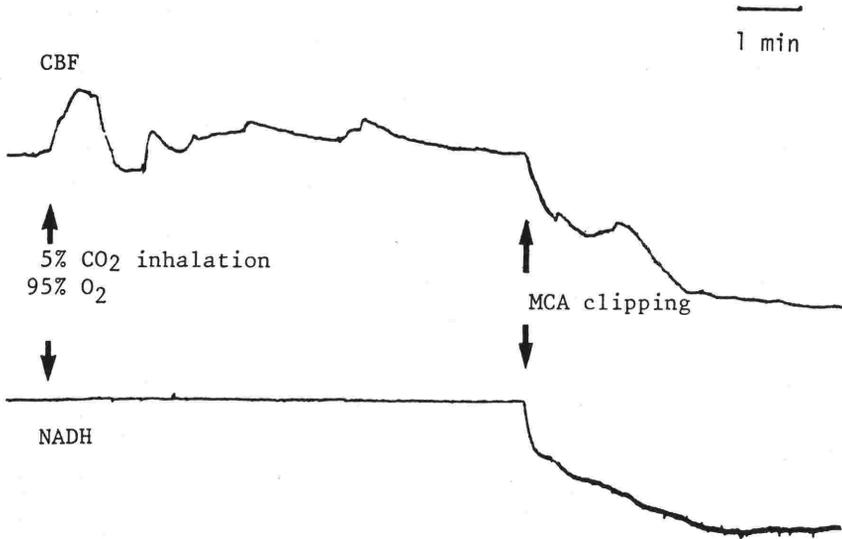


図 6. 脳血流（交叉熱電対による）およびNADH 蛍光の変化を示す。CBF は上方が増加の方向を、NADH 蛍光は下方が蛍光増加の方向を示す。

本装置は、血流臓器においてもNADH蛍光のみを測定しうる優れたものであるが、この装置の問題点は、測定部位を正確には判別出来ないこと、一定の測定部位の蛍光量をアナログ演算回路により測定記録するために測定結果は測定部位全体の平均値であって、変化が混在 (inhomogeneous pattern) するような場合には正確な変化を捉えられ

ないことなどである。このような問題点を改善する目的で、蛍光画像による測定装置を開発した。

3. 生体画像蛍光装置による脳 redox state の測定

本装置の原理は先に述べたものと同様であるが、励起された蛍光画像を2次フィルター（最大透過

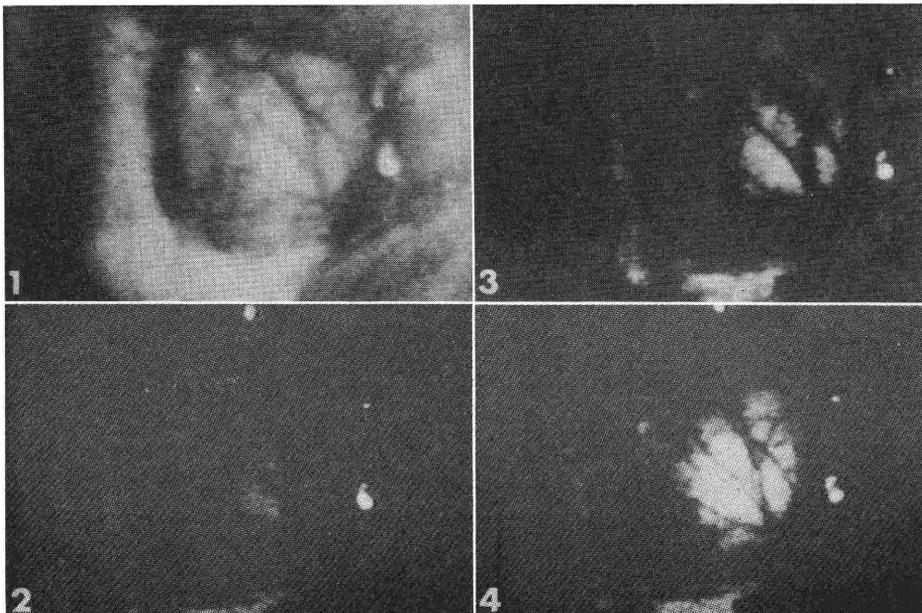


図 7. 生体画像蛍光装置による蛍光低血圧の影響を示す。2は平均血圧 100mmHg, 3は平均血圧 50mmHg, 4は死亡時。

波長 460 nm) でピリジンスクレオチド蛍光像のみを選択透過しイメージインテンシファイアの光電面に結像, 光量増幅された蛍光像を TV カメラで電気信号に変えアナログ-デジタル変換後に任意に画像処理を施しアナログ信号に戻し TV モニターにリアルタイムに表示およびビデオテープレコーダーに記録した. 画像処理法としては Gray level window 法を使用した. この画像処理法により, 動物の実験的処置により蛍光強度の増えた脳表面部位が, その程度に応じた明暗度で TV モニターに画像として表示される.

図 7 は本装置により, 砂ネズミの脳表を撮影したもので, 1 に可視光による脳表の部位を示し, 2 で画像処理により正常状態の蛍光をバックグラウンドとして零レベルに近く設定した. この状態で, ハロセン麻酔濃度を濃くして血圧を 50 mm Hg 程度まで低下させたものが 3 で, 60 mmHg 付

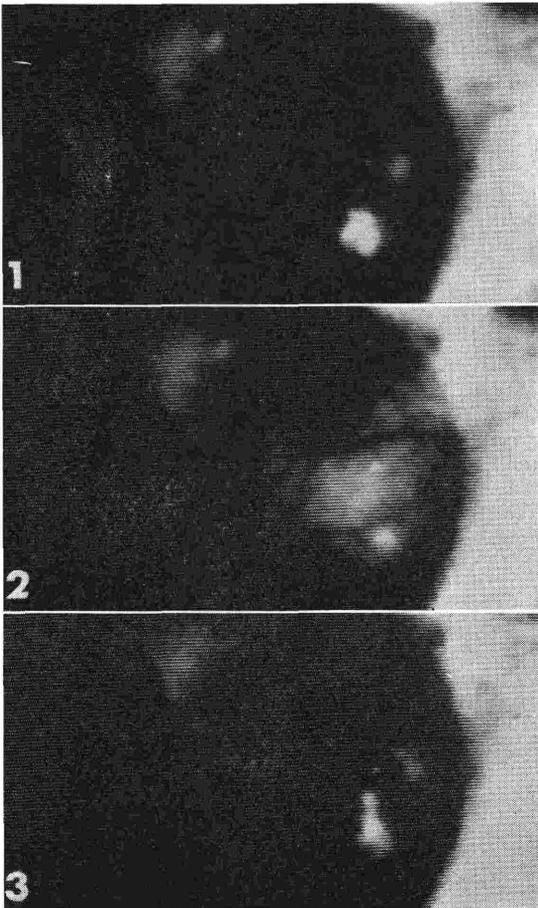


図 8. 生体画像蛍光装置による蛍光砂ネズミにおける総頸動脈閉塞(2)の影響.

近より出現した蛍光がやや増強して認められる. 死亡時の蛍光が 4 で, この状態が最大蛍光と思われる. 図 8 は, やはり砂ネズミの脳表面で, 1 に正常状態を, 2 に 1 測総頸動脈閉塞時の蛍光の出現を, 3 に血流再開後の蛍光の減少を示している. この装置により, 基礎実験として血圧低下時の redox state の変化および虚血的の redox state の変化を検討した. 未だ予備実験の段階ではあるが, 以下のような点が分かった. ① 血圧を低下 (脱血またはハロセン吸入) させると, 正常動物では体血圧が 60 mmHg 程度で NADH 蛍光が出現し, 40 mmHg 以下では著明に増加するが, 血圧上昇により速やかに減少し元に戻る. この蛍光の出現・増加は, ある時点から急速に認められ, 血圧低下に伴う grading な変化ではなく, 蛍光出現は血流域のいわゆる boundary zone (watershed area) からであった. 蛍光出現当初は, inhomogeneous で部位の変化がみられ, いわゆる vasomotion 様であった. ② 砂ネズミの陽性動物では anatomical vascular pattern に一致した著明な蛍光が認められたが, 陰性動物では蛍光の増加は認められなかった. しかしながら, 陰性動物でも, 総頸動脈結紮後に血圧を低下させると 90~60 mmHg で蛍光が出現し, 80~50 mmHg で著明に増加し, このような状態においては閉塞側の予備力が低下していることを示している. ③ 血流遮断または低血圧を繰り返すと蛍光出現の血圧閾値は上昇し, 解除後の回復に要する時間が延長し, 回復しない部分の残存がみられるようになった. このような結果は, 臨床的な病態, 特に脳手術時の病態生理を知る上に重要であり, 本装置による NADH 蛍光のモニタリングが意義を持つことが示唆される.

4. おわりに

細胞内ピリジンスクレオチドの蛍光測定は, 1957年 Duysens らによりイースト菌においてなされた. 1958年 Chance らは分離したミトコンドリアにおける各 metabolic state の各状態における NADH の蛍光測定を報告し, その後, *in vivo*, *in vitro* における多くの報告がなされている^{2,3,11,12,15}. 対象臓器も脳, 腎, 肝, 心から角膜, 甲状腺, 副甲状腺と多岐にわたっており, 測定法自体

も、2次元的なものを行う試みがなされている^{1, 5, 14)}。今回、われわれの行った方法は、TVを使用した画像処理により、解剖学的位置関係との対比で redox state の変化を経時的に測定出来、手術中のモニターなどの目的にはきわめて有用性が高く、また、実験的な面においても、病態生理の解明に果たす役割は大きいものと思われる。現在、血液による干渉を完全に除外しうるか否かを検討しており、また、定量化の試みを行っており、今後の発展が期待される。

本研究にご協力いただいた、立石ライフサイエンス研究所小林茂樹所長、須崎琢而氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Barlow, C. H., Harken, A. H., Chance, B. : Evaluation of cardiac ischemia by NADH fluorescence photography. *Ann. Surg.* **186** : 737~740, 1977.
- 2) Chance, B., Legallais, V., Schoener, B. : Metabolically linked changes in fluorescence emission spectra of cortex of rat brain, kidney and adrenal gland. *Nature* **195** : 1073~1075, 1962.
- 3) Harbig, K., Chance, B., Kovach, A. G. B., Reivich, M. : *In vivo* measurement of pyridine nucleotide fluorescence from cat brain cortex. *J. Appl. Physiol.* **41** : 408~488, 1976.
- 4) Jennett, B., Miller, J. D., Harper, A. M. : Effect of carotid artery surgery on cerebral blood flow. *Excerpta Medica*, Amsterdam, 1976.
- 5) Ji, S., Chance, B., Stuart, B. H., Nathan, R. : Two-dimensional analysis of the redox state of the rat cerebral cortex *in vivo* by NADH fluorescence photography. *Brain Res.* **119** : 357~373, 1977.
- 6) 小林茂樹 : 細胞 REDOX STATE の直接記録法. 化学の領域 **25** : 22~30, 1971.
- 7) 小林茂樹, 尾形悦郎 : 臓器の呼吸代謝. 代謝 **6** : 778~784, 1969.
- 8) Kobayashi, S., Kaede, K., Nishiki, K., Ogata, E. : Microfluorometry of oxidation-reduction state of the rat kidney in situ. *J. Appl. Physiol.* **31** : 693~696, 1971.
- 9) Kobayashi, S., Nishiki, K., Kaede, K., Ogata, E. : Optical consequences of blood substitution on tissue oxidation-reduction state microfluorometry. *J. Appl. Physiol.* **31** : 93~96, 1971.
- 10) 小暮久也 : Anoxia による脳障害とその発生機序. 神経精神薬理 **4** : 277~337, 1982.
- 11) Mayevsky, A. : Ischemia in the brain: The effects of carotid artery ligation and decapitation on the energy state of the awake and anesthetized rat. *Brain Res.* **140** : 217~230, 1978.
- 12) Mayevsky, A., Chance, B. : The effect of decapitation on the oxidation-reduction state of NADH and ECoG in the brain of the awake rat. *Adv. Exp. Med. Biol.* **75** : 307~312, 1976.
- 13) Siesjo, B. K. : Brain energy metabolism, Chichester, John Wiley & Sons, 1978.
- 14) Stuart, B. H., Chance, B. : NADH brain surface scanning and 3-D computer display. *Brain Res.* **76** : 473~479, 1974.
- 15) Sundt, T. M., Jr., Anderson, R. E. : Reduced nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence and cortical blood flow in ischemic and nonischemic squirrel monkey cortex. I. Animal preparation, instrumentation, and validity of model. *Stroke* **6** : 270~278, 1975.