

## 外傷性脳損傷の病態生理にかんする実験的研究

はやし  
林 たつお  
龍男

### 緒 言

外傷性脳損傷の病態はさまざまであり、頭部外傷直後にはほとんど症状を呈さなかった症例が、急激に悪化し、死の転帰をとることも稀ならず経験する<sup>1)</sup>。これは外傷により直接脳に与えられた一次性脳損傷により惹起された、二次性脳損傷の悪化によるものである<sup>2)</sup>。そこで私は頭部外傷後に惹起される二次性脳損傷発生のメカニズムについての検索を、聖マリアンナ医科大学脳神経外科学教室大学院生の研究テーマとし、共同で実験的に研究したのでそれらにつき報告する。

### 材料および方法

#### 1. 実験的脳損傷の作成方法

実験動物には、ウサギあるいはウイスターラットを使用した。

##### a ウサギあるいはラットの脳表にステンレス製円柱を落下させる方法

ウサギあるいはラットの右前頭部に burr hole を作成し、そこにウサギでは質量 10 g、ラットでは、質量 8 g のステンレス製円柱を、ガラス管を通して脳表に自由落下させ、直達外力を脳表に与える方法で脳損傷を作成した<sup>3-9)</sup>。

##### b pneumatic impactor を用いる方法

ラットの右前頭部に burr hole を作成し、硬膜上から、pneumatic impactor (Virginia Commonwealth Univ. 製) を用い、controlled impact injury model を作成した<sup>10-13)</sup>。

#### 2. 外傷性脳損傷部の肉眼的観察

脳損傷作成後 5 分、30 分、1 時間、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間、48 時間後に屠殺し、脳を摘出し、10 % ホルマリン液に 1 週間固定後、脳を冠状断し、それぞれの時期の損傷脳の状態を観察し、楕円立方体の公式 ( $4/3 \text{ abc}$ ) より各時相の血腫量の近似値を求めた<sup>3)</sup>。

#### 3. 脳血管透過性および形態学的変化の検討

前述の外傷性脳損傷作成後の各時相 15 分前に Evans blue 2 % 生食溶液を 40 mg/kg を投与し、15 分間生体灌流し、その後屠殺し、脳断面を作成、生体顕微鏡にて観察し、脳血管の透過性の変化を見た。この実験により作成した標本をパラフィン包埋し、薄切した。これに hematoxylin-eosin+Klüver-Barrera 染色を行い、光学顕微鏡で観察した<sup>3)</sup>。

#### 4. 脳血流量の測定

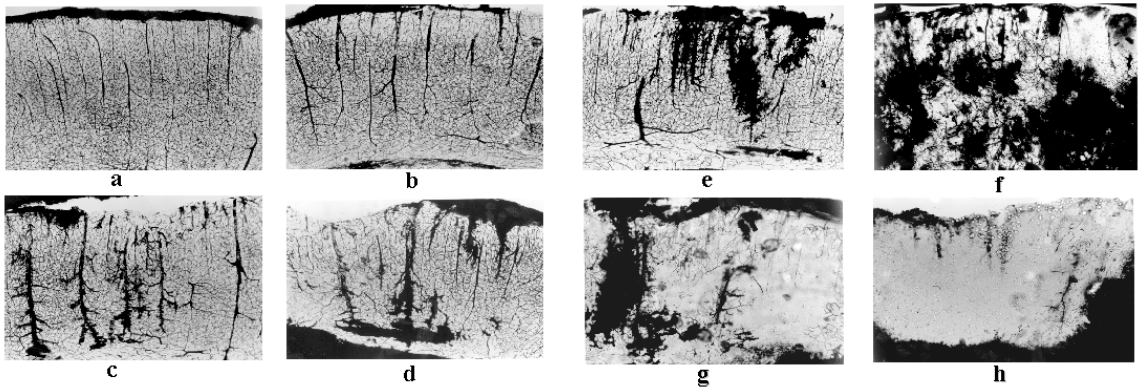
損傷部脳表の局所脳血流量をレーザー組織血流計 ALF21 と直径 1 mm の N 型プローブを用い、burr hole を通し、損傷脳表の脳血流量を測定した<sup>4)</sup>。

#### 5. Microangiography の作成

ラットを用い、脳損傷作成前、脳損傷直後、15 分後、30 分後、1 時間後、3 時間後、6 時間後、24 時間後、48 時間後の 9 群に分けて、10 % ゼラチン加医学墨汁 20 ml を 3 分間で右頸動脈内に挿入したカテーテルから注入する方法で microangiography を行い、脳損傷による脳血管の形態学的変化を観察した<sup>11)</sup>。

#### 6. 脳組織水分、電解質含量の測定

ラットに脳損傷作成後 3、6、12、24、48 時間後および 1 週間後に脳組織内水分含有率、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> 含有量を測定した。水分含有率は乾燥重量法で、Na<sup>+</sup> と K<sup>+</sup> は乾燥脳組織を 0.1 N 硝酸でホモジナイズし、その上澄中の Na<sup>+</sup> および K<sup>+</sup> の含有量を蛍光光度法で測定した<sup>14), 15)</sup>。



**Fig 1.** Coronal sections of injured brain tissue with microangiography.

No destruction of the normal vascular structure was seen (a). However, perforated cortical vessels increased in size, and leakage of carbon black solution began to occur soon after the brain injury (c).

a. control, b. immediately, c. 15 minutes, d. 30 minutes, e. 1 hour, f. 3 hours, g. 6 hours, h. 24 hours, i. 48 hours after brain injury.

## 7. グルタミン酸の測定

ウサギを用い、脳損傷が作成されるであろう部位およびその脳損傷部から 3 - 5 mm 離れた部位の脳皮質に 1 本づつ microdialysis probe を挿入した後、脳損傷を作成した。脳損傷時より 2 時間にわたり、酵素電極法にて細胞外腔のグルタミン酸濃度を連続的に測定した<sup>5)</sup>。

## 8. Nitric oxide (NO) の測定

ウサギを用い、作成される脳損傷部直下 (脳表より 5 mm) に microdialysis probe を設置し、リング液を流速 2  $\mu$ l/min で 2 時間灌流した後、15 分毎に脳透析液を採取し酸化窒素分析システムに注入し、NO の最終産物である nitrite ( $\text{NO}_2^-$ )・nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) の総和  $\text{NO}_x$  ( $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ) を測定した<sup>6)</sup>。

## 9. フリーラディカルの測定

フリーラディカルの測定は 300 MHz in vivo electron spin resonance (ESR) spectroscopy を用いて測定した。脳損傷作成後ラットを生体計測用セルに固定し ESR 装置に設置した。スピンプローブとして C-PROXYL (3-carbamoyl-2, 2, 5, 5-tetramethyl-pyrrolidine-1-oxyl) を投与し、ESR を用いて、観察される超微細分裂吸収からなる C-PROXYL の 3 本のスペクトルのうち、第一シグナルの変化を投与 30 秒後より 30 秒毎に 20 分間測定を行った。その波高 (signal intensity : SI) を計測し、SI の自然対数を時間に対しプロットして得ら

れた減衰曲線を検討に用いた<sup>10, 13)</sup>。フリーラディカル捕捉剤である edaravone の損傷脳における有効性も検討した。

## 結 果

### 1. 外傷性脳損傷部の肉眼的観察結果

外傷後 30 分で受傷周辺一部に点状出血が始まり、1 時間、3 時間後では点状出血が線状出血や直径 1 mm 程度出血斑に発展、6 時間では出血斑が拡大し、互いに融合する。12 時間後では、それらの出血が脳実質内で線状出血の形で成長、拡大し、24 時間たつと、ほぼ脳実質内を出血がうめつくし、一塊の脳内血腫の像を呈した (Fig. 1)。

### 2. 脳血管透過性および形態学的変化の観察

Evans blue の漏出は脳損傷後 30 分ですでに認められ、この時期に最も著明に漏出していた。脳損傷部の光顕所見をのべる。外傷後 5 分で赤血球の血管外漏出が見られ、その血管は非損傷部の血管に比べやや拡張していた。30 分後では、小出血は密となり、中心の血管はさらに拡張していた。その後、それらの小出血は互いに融合し、12 時間後には大きな血腫へと進展し、24 時間後にはさらに大きな血腫となり、中心部の血管はむしろ縮小し、外傷性脳内血腫の形を示した。

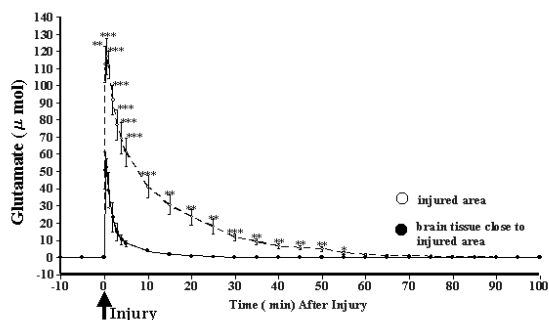


Fig. 2. Changes in dialysate concentration of glutamate obtained from injured brain tissue (open circles) and from brain tissue 3-5 mm distant from area of the injury (closed circles). Marked increase in the concentration of glutamate was demonstrated in the injured brain tissue, comparing with the concentration of glutamate obtained from the brain tissue 3-5 mm distant from area of the injury.

### 3. 脳血流量の変化

脳損傷部の脳血流量連続測定結果は、脳損傷後 20 秒くらいで脳血流量は減少し始め、15 分後では、脳損傷前値  $572 \pm 32$  mV から  $184 \pm 40$  mV と損傷前脳血流量値の 1/3 の量まで低下し、1 時間後も  $175 \pm 44$  mV と減少したままで回復しなかった。

### 4. Microangiography の所見

対照群 (Fig. 1a) と比較すると、脳損傷そのものによる血管構築の破壊はなかったが、脳損傷直後から皮質穿通血管末梢に棍棒状の拡張所見がみられ、その周囲の毛細血管網の描出低下を認める。(Fig. 1b)。15 分後皮質穿通血管はさらに拡張し、穿通枝の一部から墨汁の血管外漏出が始まった (Fig. 1c)。30 分 1 時間後には墨汁の血管外漏出が増強し (Fig. 1d, e)，3 時間後に墨汁の血管外漏出の程度が最大となり、いたるところで近隣のものとの癒合が認められ、皮質穿通血管および皮質血管網の造影は不良となってくる (Fig. 1f)。6 時間後には皮質穿通血管およびその周囲の皮質血管網の造影は著明に減少し (Fig. 1g)，脳損傷後 24 - 48 時たつと穿通血管，毛細血管網はほぼ造影されなくなった (Fig. 1h, i)。

### 5. 脳組織水分，電解質含量の変化

対照群のラットでの脳組織水分含量は  $78.9 \pm 0.9$  % であった。脳損傷 3 時間後の損傷脳内水分含量は  $82.7$

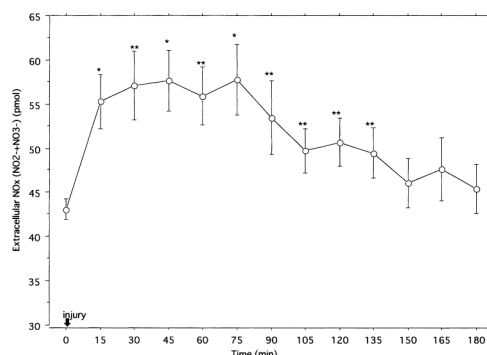


Fig. 3. The values of extracellular NOx (NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub>-) during 180 minutes after brain injury. Marked increase in the value of extracellular NO was demonstrated soon after brain injury and continued for 135 minutes after brain injury.

$\pm 1.0$  %，6 時間後  $83.5 \pm 0.8$  %，12 時間後  $86.0 \pm 1.3$  %，24 時間後  $84.3 \pm 0.7$  %，48 時間後  $85.5 \pm 0.7$  % と対照群に対し有意の増加を示した ( $p < 0.01$ )。脳組織内 Na<sup>+</sup> 含量は対照群では  $201.8 \pm 36.9$  mEq/kg で、脳損傷 3 時間後の損傷脳での Na<sup>+</sup> 含量は  $397.8 \pm 39.3$  mEq/kg，6 時間後  $433.2 \pm 34.4$  mEq/kg，12 時間後  $651.0 \pm 35.1$  mEq/kg，24 時間後  $546 \pm 37.1$  mEq/kg，48 時間後  $599.0 \pm 163.1$  mEq/kg と有意に増加し ( $p < 0.01$ )，6 時間後から 12 時間後での増加が著明であった。K<sup>+</sup> 含量は対照群と比較して著明に減少し、6 時間後から 12 時間後での減少率が大きかった。

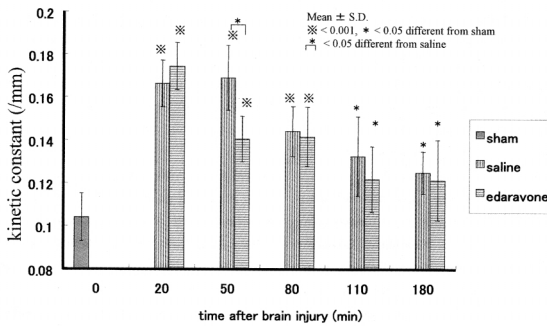
### 6. グルタミン酸の測定結果

脳組織内グルタミン酸濃度は、脳損傷部では平均 32 秒で最高値 ( $128.18 \pm 9.48$  μM) に達し、5 分後では  $61.32 \pm 8.33$ ，15 分後  $30.74 \pm 5.50$ ，30 分後  $11.40 \pm 1.88$  μM と徐々に低下し、平均約 68 分で受傷前値にもどった。脳損傷周辺部では平均 27 秒で最高値に達し、その後平均 23 分 30 秒で受傷前値にまで低下した (Fig. 2)。

### 7. 細胞外腔一酸化窒素最終産物 NOx

#### (NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub>-) の経時的変化

細胞外腔 NOx 値は脳損傷前値の  $43.1 \pm 3.4$  pmol から脳損傷 15 分後  $55.3 \pm 9.2$  pmol と増加し始め、30 分後  $57.1 \pm 11.7$ ，60 分後  $55.9 \pm 9.8$ ，75 分後では  $57.7 \pm 12.0$  pmol と増加したままで、脳損傷後 75 分



**Fig. 4.** Time course of the kinetic constants of spin clearance for C-PROXYL. The kinetic constants for C-PROXYL at all time points were significantly higher in the edaravone and saline groups than in the sham group ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$  respectively). The most significant difference between the saline group and edaravone group was apparent at 50 minutes after brain injury ( $p < 0.05$ ). Values are mean  $\pm$  standard deviation. Standard deviations are represented by the vertical bars.

以降は漸減したが、135分値まで対照群と比べ有意に ( $p < 0.05$ ) 増加を示した (Fig. 3)。

#### 8. 損傷脳組織内でのフリーラジカルの変化

C-PROXYL 投与後、ESR spectra は徐々に減少して行った。脳損傷群では、脳損傷作成後、減衰曲線定数は20 - 50分後で最大を示し、徐々に減少して行ったが、損傷後180分まで対照群値に比べ有意差 ( $p < 0.05$ ) をもって増加していた。また、フリーラジカル捕捉剤である edaravone の損傷脳における有効性も確認された (Fig. 4)。

### 考 按

Marshall ら<sup>16)</sup> は頭部外傷患者で入院時会話が可能であったが、その後急激な意識障害を呈して死亡した34例を talk and deteriorate として検討し、増悪の原因は脳挫傷の経時的悪化による脳内血腫や硬膜下血腫の発生であると報告している。このように損傷脳組織が経時的に悪化していく病態を把握するために、実験的に外傷性脳損傷を作成し検索した。

実験的検索で得られた脳損傷部の所見を、受傷から

時間を追ってまとめると、光学顕微鏡上外傷後30分で皮質穿通枝の拡張と漏出性出血による小出血巣が形成され始め、脳血管透過性亢進を示す Evans blue の漏出が著明となり、漏出性小出血は互いに融合し、12時間後には大きな血腫へと進展し、24時間で臨床上の所見と同様の外傷性脳内血腫が形成された。

microangiography 上には受傷そのものによる血管構築の破壊はなかったが、受傷直後 - 30分後にかけて皮質穿通枝の拡張と小血管網を構成する血管の狭小化が進行し、墨汁の血管外漏出が始まる。これが経時的に集簇し、大きな墨汁の塊となり、24時間後には変化の終末像と考えられる小血管網自体の消失が見られた。

脳血流量は受傷15分後には受傷前の1/3の量へと低下し、そのまま回復せず、低下したままであった。これらの検索結果から、外傷性脳損傷による脳の病態の悪化は、血流のうっ滞を伴った血管の過度の拡張と、血漿、赤血球の透過性の亢進を伴った血管の変性と壊死<sup>17)</sup>、それによる脳血流量の減少と考えた。

このような脳組織の変化をおこさせる原因を検索するために、脳損傷後の脳組織内におけるフリーラジカル、グルタミン酸および Nitric oxide (NO) の測定を行った。脳損傷時におけるフリーラジカルを測定した結果、損傷後20 - 30分後にフリーラジカルの著しい増加が認められ、約180分の経過で徐々に減少していった<sup>9), 13)</sup> が、48時間後でも対照群にくらべその値は上昇していた<sup>10)</sup>。脳損傷時のフリーラジカルの発生について Kontos らは、ネコの fluid percussion モデルを使って検討し、損傷脳における superoxide radical の産生が血管内皮を傷害して異常反応を起こすことを証明している<sup>18)</sup>。また、Hall ら<sup>19)</sup> は損傷脳組織内のフリーラジカルの発生について・OH を salicylate trapping 法にて測定し、外傷を加えた脳を生食で灌流せずに摘出し測定した場合には、外傷を加えないラットと比較して・OH は有意に上昇するが、生食で灌流後に摘出した脳では・OH が外傷を加えないラットと同等になるとし、そのことより、外傷によって発生する・OH の発生源が微小血管、おそらく血管内皮細胞であろうと指摘している。私たちが脳損傷後に測定した脳組織内水分含量は損傷3時間後から著しく増加し始め、経時的に増加をつづけ、24 - 48時間でピークに達しており、脳組織内  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  の含

量も同様な経過で変化しており、血管内皮細胞障害による血管透過性の亢進が惹起された結果と思われる。神経毒作用を有するとされるグルタミン酸の測定では、脳損傷 30 秒から 5 分まで著明に高値を示し、その上昇は脳損傷後約 1 時間持続した。このように損傷後超早期にグルタミン酸の濃度が増加したことより、その原因は脳損傷による細胞膜の構造的破壊によるグルタミン酸の放出と考える<sup>5)</sup>。その結果脳組織内水分、Na<sup>+</sup> 含量は損傷後 1 時間より増加し始め、3 時間後にはさらに増加しており、脳損傷の増悪にグルタミン酸の放出が大きく関与しているものと思われた。さらに、脳損傷後の細胞外腔一酸化窒素最終産物 (NOx) の経時的变化をみると、NOx 値は脳損傷後 15 分 - 75 分あたりで急激に増加し、180 分後にも増加していた。神経型 NO 合成酵素 (nNOS) は Ca<sup>++</sup> 依存性酵素で、NMDA 受容体を介して流入した Ca<sup>++</sup> により活性化され大量の NO が神経で産生され NO・として存在する。これが細胞膜や DNA を損傷し、脳損傷後の二次性脳損傷の増悪を招くといわれている<sup>6)</sup>。

外傷性脳損傷の病態は脳損傷により、その直後 - 30 分くらいで、脳組織内にフリーラジカル、グルタミン酸、一酸化窒素などの神経毒性物質が発現し、それにより脳組織細胞、脳血管細胞の損傷が誘発されてくる。これに伴い、脳組織細胞の膨化、破壊が起こり、また脳血管細胞の障害に起因する脳血管透過性の亢進、外傷性脳虚血が発生し、脳損傷後 3 時間 - 24 時間あたりで、脳損傷周囲には cytotoxic edema, vasogenic edema が惹起される。これらの脳損傷後の病態の悪化と、脳組織内に存在する free radical scavenger などによる homeostasis のバランスにより二次性脳損傷が招来されてくるものと思われ、それらの発生源は頭部外傷後早期にあり、これらの変化に早期から、どのように対処するかということが外傷性脳損傷の予後を決定する上で最も大切な要素と思われた。

## 文 献

- 1) 林 龍男, 安達茂樹, 間 淑郎, 松澤源志, 関野宏明, 坂本辰夫. 軽度 中等度の意識障害を伴う高齢者頭部外傷の検討. 日救急医学会誌 1996; 7: 373-378.
- 2) Langfitt TW, Gennarelli TA, Obrist WD, Bruce DA and Zimmerman RA. Prospect for the failure in the diagnosis and management of head injury: Pathophysiology, brain imaging, and population-based studies. Clin Neurosurg 1982; 29: 353-376.
- 3) 坂本辰夫. 外傷性脳内血腫の病態に関する実験的研究. 聖マリアンナ医大誌 1988; 16: 366-373.
- 4) 坂本辰夫, 林 龍男, 卯津羅雅彦, 浅野寛治, 干川芳弘, 岡田正昭, 関野宏明. 外傷性脳内血腫の形成に関する実験的研究 - Microangiography による脳血管構築の観察と脳血流量の変化. Jpn J Neurosurg 1996; 5: 18-24.
- 5) 浅野寛治. 実験的脳損傷における細胞外腔グルタミン酸濃度の変動. 聖マリアンナ医大誌 1995; 23: 690-698.
- 6) 横峯憲吾. 実験的外傷性脳損傷急性期における nitric oxide (NO) の変動. 聖マリアンナ医大誌 1998; 26: 385-391.
- 7) 干川芳弘. 実験的外傷性脳損傷における経時的脳血流量の変動. 聖マリアンナ医大誌 1994; 22: 573-583.
- 8) 小野 元. 実験的外傷性脳損傷における hydroxyl radical (・OH) の発生と superoxide dismutase (SOD) の効果. 聖マリアンナ医大誌 1996; 24: 477-484.
- 9) 古屋 優. 実験的外傷性脳損傷急性期における Hydroxyl radical の変化. 聖マリアンナ医大誌 1997; 25: 457-467.
- 10) 大塩恒太郎. 実験的脳損傷におけるフリーラジカル反応の研究 - 300 MHz in vivo ESR を用いた解析. 聖マリアンナ医大誌 1999; 27: 457-467.
- 11) 酒井晃治. ラットによる定量的外傷性脳損傷における脳血管形態の変化. 聖マリアンナ医大誌 1999; 27: 469-483.
- 12) 内田一好. 実験的外傷性脳損傷におけるフリーラジカル反応の経時的变化. 聖マリアンナ医大誌 2001; 29: 375-382.
- 13) Nakamura H and Sekino H. Free radical reaction and effects of edaravone on experimental brain injury. St. Marianna Med J 2002; 30: 379-387.
- 14) 林 龍男. 脳神経外科領域における維持輸液に関する実験的研究. 日大医誌 1970; 29: 1028-1051.
- 15) 卯津羅雅彦. ラットにおける実験的外傷性脳内血腫形成時の脳血管透過性亢進に関する研究. 聖マリアンナ医大誌 1991; 19: 562-571.
- 16) Marshall LF, Toole BM and Bower SA. The National Traumatic Coma Data Bank. Part 2; Patients who talk and deteriorate; Implications for treatment. J Neurosurg 1983; 59: 285-288.

- 17) Sheinker IM. Vasoparalysis of the central nervous system. A characteristic vascular syndrome. Significance in the pathology of the central nervous system. *Arch Neurol Psychiatry* 1944; 52: 43-56.
- 18) Kontos HA and Wei EP. Endothelium-dependant response after experimental brain injury. *J Neurotrauma* 1992; 9: 349-354.
- 19) Hall ED, Andrus PK and Yonkers PA. Brain hydroxyl radical generation in acute experimental head injury. *J Neurochem* 1993; 60: 588-594.