ラットの両側頸動脈結紮後の ABR と脳組織の変化

沈 衛東¹⁾, 加我 君孝¹⁾, 山田 勝士²⁾

¹⁾東京大学耳鼻咽喉科学教室

²⁾帝京大学市原病院耳鼻咽喉科

要旨: ラットの両側頸動脈の血流遮断を行い大脳血管障害のモデルを作成し, 急性期における聴性脳幹反応 (ABR) と脳組織の変化を調べた。

ABR はクリックで刺激し, 経時的に約 8 時間記録した。記録終了後, 脳は灌流固定し, 脳全体の連続組織切片を作成した。結果は以下の通りである。

- 1) ABR の P1 成分の振幅の著しい増大傾向を認めた。P2, P3, P4 の振幅の変化は認めなかった。
- 2) ABR の P1, P2, P3, P4 の潜時の変化は認めなかった。
- 3) 脳の組織学的検索では, 海馬の CA1, CA4 におけるニューロンの部分的脱落と変性を認めた。しかし, 他の部分については特別な変化を認めなかった。

—キーワード—

ラット, 脳死, 聴性脳幹反応

はじめに

大脳の脳血管障害により, 脳死に進展する過程は, 生田¹⁾によると次のとおりである。

初めに脳血管障害に伴って脳浮腫が生じ, ついで側頭葉や小脳の脳幹への陥入が起きる。脳幹が圧迫され, 脳幹内の血管の血流遮断が生じる。すなわち, 大脳の浮腫が進展して, 小脳の陥入による脳幹障害が生じる。脳幹内の血管の赤血球は, 酸素欠乏によりヘモグロビンを失い, ゴースト状になる。しかし, 心臓が働いている限り椎骨動脈の血流は保たれるため脳幹の髄外の血管すなわち, 椎骨脳底動脈およびその分枝内の赤血球は, ヘモグロビンを失うことがなく通常の赤色を保っている。

脳死と ABR の関係については, Uziel ら²⁾, Starr ら³⁾, Kaga ら^{4,5)}, Yamada ら⁶⁾ により報告されている。

すなわちヒトの脳死では ABR は第 I 波のみが残る場合と, 無反応になる場合があり^{2~4)}, 内耳は形態学的に正常な場合と, 自己融解が進んでいる場合があ

る⁴⁾。これらの所見は, 大脳死から脳幹死に至る脳の経時的な変化と関連があるものと推察される。

我々は, 大脳血管障害モデルとしてラットの両側頸動脈の血流遮断を行い, 急性期では ABR がどのような影響を受けるか調べ, さらに, 脳の組織学的検索も行ったので報告する。

対象と方法

1) 対象:

鼓膜所見が正常で, プライエル反射が正常なウイスター系雄ラット 4 匹 (体重 200~300g) を使用した。

2) 方法:

ABR は針電極を頭頂部 (+), 左耳介後部 (-), 頸部皮下 (接地) に刺し, 頭頂部-左耳介後部誘導で記録した。音刺激はクリックを用い, イヤホン (ELEGA Type DR-531) を左耳介に接触させ, 90 dBnHL の音圧で, 毎秒 10 回の頻度で左耳に与えた。右耳には, 40 dBnHL のホワイトノイズを同時に与えた。増幅器の濾波帯域は 50 Hz~3 kHz とし, 解析時間は 10 msec, 300 回の加算をした。陽性電位を上向き

図1 4匹のラットの両側頸動脈結紮前、結紮後の ABR の経時的変化

の波形として記録した。

ラットはペントバルビタールナトリウムを50mg/kgで腹腔内投与を行って麻酔をし、気管切開を行い、レスピレーターを用いて人工呼吸管理とした。次にラットの両側の総頸動脈を露出させて結紮し、更に完璧な血流遮断を目的として切断を行った。

ABRは結紮前にコントロールの波形を記録し、結紮後、5～10分おきに継続的に約8時間前後記録した。心電図でモニターするとともにラットの体温は直腸温でモニターし、体温が実験中変動しないように随時保温を行った。ABRの解析はP1, P2, P3, P4の潜時と振幅を測定した。振幅についてはABRの基線の始まりよりピークの高さを測定した。

記録終了後、ラットは10%ホルマリンで灌流固定し、脳を摘出した。脳はパラフィン包埋し、冠状断連続切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

結 果

1. ABR の変化

4匹のラット(#2, #4, #6, #7)のABRの継続的な変化を図1に示す。各ラットとも両側頸動脈結紮直前と直後および結紮後は10分おきに6～8時間記録を行った。実際の記録波形を図1に示した。ラットの#2, #4, #6, #7のABRはいずれも両側頸動脈結紮後はより振幅が大きくなる傾向にあることがわかる。

図2に4匹のラットについて、P1, P2, P3, P4の各波の振幅を両側頸動脈結紮前の振幅に対する比率をパーセントで示すことにし、時間との関係を線グラフで示した。いずれのラットも、P1は頸動脈結紮前に比べ、結紮後3～4時間までは振幅の増大傾向を認めた。その後は時間の経過とともに減少する傾向を認めた。P2についても軽度増大傾向があるが、P3では、むしろ減少する傾向を示した。

図2 4匹のラットの各波の振幅比の経時変化
縦軸は各波の両側頸動脈結紮前に対する比率をパーセントで示してある。

図3 4匹のラットの各波の振幅比の平均値の経時変化
図2と同様の方法で示した。

4匹の振幅の平均値を図3に示す。P1の時間経過は両側頸動脈結紮後約2倍以上の振幅を示し、3時間～4時間は最高の約2.7倍となり、6時間後は約1.5倍となった。

一方P2、P4の振幅は図3に示すように軽度増大、P3は軽度減少する傾向を示した。潜時については両側頸動脈結紮前、直後およびその後6～8時間の記録では時間経過による変化はほとんどなかった。

図4 海馬を中心としたコントロールのラットの脳の冠状断 CA1, CA4 (10×)の脳組織像。矢印はアーチファクトであり, CA とは cornu ammonis の頭文字である。

図5 図4の脳組織像における*部分の拡大像

図6 ラット #7 における図4の*部分に相当する部位の脳組織の拡大像
CA4 におけるニューロンの萎縮, 部分的脱落と変性 (矢印) を認めた。

2. 脳の組織学的所見

両側頸動脈結紮による脳組織変化を光学顕微鏡で

表1 病理的变化の所見のまとめ

大脳	
大脳皮質	異常なし
皮質下	異常なし
海馬	CA1, CA4 における ニューロンの萎縮, 部分的脱落と変性
小脳	異常なし
脳幹	異常なし
延髄	異常なし

注: H.E 染色、光顕による観察

調べた。大脳については、海馬を除き、大脳皮質、皮質下とも、特別な所見がなかった。海馬については CA (cornu ammonis) 1, CA4 に限局したニューロンの部分的萎縮, 脱落と変性を認めた。小脳, 脳幹, 延髄については特別な所見を認めなかった。以上の所見は4例に共通していた。海馬のコントロールの脳組織像を図4, 図5に示す。海馬の CA1, CA4 を図4に示した。CA4の拡大像を図5に示した。脳組織の標本の一例として P1 の振幅が非常に大きくなったラット #7 の海馬を図6に示す。CA1, CA4 いずれについてもニューロンの脱落と萎縮が見られた (矢印)。脳組織標本の病理の変化を表1にまとめて示した。

考 察

本実験では、両側頸動脈結紮後6～8時間の急性期の ABR は P1～P4 の潜時の変化を認めないが、P1 の振幅のみが増大し、他のピークの振幅はほとんど変化を認めなかった。脳の連続組織標本では、海馬の CA1 と CA4 に限局した神経細胞の乏血変化を認めた。しかし、大脳皮質、皮質下、脳幹には特別な変化を認めなかった。無酸素あるいは低酸素状態による病変として海馬、小脳、基底核、大脳皮質などの部位に、特有の組織変化が発生することが知られている⁷⁾。乏血に対して最も脆弱なのが CA1, 次いで CA4 であり、CA2, CA3 は乏血に抵抗性があることが知られている⁸⁻¹⁰⁾。

P1 の振幅増大と海馬病変の関係であるが、乏血により何らかの機序で脳において遠心性伝導路の抑制が取れるか、あるいは頭蓋内圧刺激により亢進され

るかのいずれかであろう。結果的に P1 が増大する一方、組織学的に CA1, CA4 に変化が生じたものであろう。

P1 の起源, すなわち, 蝸牛神経, および蝸牛神経核レベルで神経の興奮の亢進も否定はできないが, むしろ抑制が取れたことによると考えると, さらに少なくとも二つの可能性が考えられる。

1. 大脳からの抑制の解除とする立場。一つは海馬の病理的变化, すなわち, CA1, CA4 の海馬ニューロンの萎縮に伴うもので, 急性の乏血変化による細胞死に伴い, 細胞内グルタミン酸が遊離され, 細胞内のフリーのカルシウムイオンを上昇させる^{11,12)}。フリーのカルシウムのレベルが上昇すると, 細胞の構造を支える脂質や構造蛋白が破壊され, さらに核酸を切断する酵素の活性化も起こるとされている¹³⁾。この一連の連鎖反応により, 海馬の神経細胞死による, グルタミン酸の放出に伴い, 大脳遠心系の脱抑制現象が一過性に生じ, 蝸牛神経や蝸牛神経核細胞の興奮が亢進し, P1 の振幅増大現象が出現した可能性も考えられる。

2. もう一つは遠心系のオリブ蝸牛神経束の機能低下とする立場。P1 の振幅の増大について, 長井¹⁴⁾, あるいは馬場ら¹⁵⁾ によれば, 患者の意識障害から脳死に至る過程で, やはり I 波が振幅増大する例のあることが報告されている。海馬の CA1, CA4 のニューロンの萎縮, 脱落などの病理的变化により, 海馬の急性の神経細胞死に伴う, グルタミン酸の放出により一過性に遠心系のオリブ蝸牛神経束の脱抑制により蝸牛神経や蝸牛神経核細胞の興奮が亢進し, P1 の振幅増大現象が出現したと考えられる。

本研究は大脳死モデルの作成を意図して計画された。しかし, 両側頸動脈結紮では, われわれの記録した 6~8 時間の範囲内では結果的には障害は脳幹にまで及ぶことはなく, これまでの脳幹死状態での ABR の無反応, あるいは I 波のみという状態にはならなかった。しかし, 本実験では, ABR 全体の波形は保たれているが, 一時的に P1 振幅増大現象が認められ, これは, 脳死の I 波のみが増大することがあるという報告と関連があるかもしれない。さらに CA1, CA4 の乏血変化と I 波の振幅の増大の関係の解明は今後の課題となった。

結 語

ラットの両側頸動脈結紮を行うと急性期では ABR は各波のピークの潜時は変わらないが, P1 の振幅の増大が認められた。これは, 海馬の CA1, CA4 のニューロンの萎縮, 脱落の病理的变化より, 海馬の神経細胞死に伴う, グルタミン酸の放出により一過性に大脳遠心系の脱抑制が生じ蝸牛神経や蝸牛神経核細胞の興奮が亢進し, P1 の振幅増大現象が出現したものと推測した。

謝 辞

本研究の一部は財団法人耳鼻咽喉科振興会 (SPIO) の助成によって行われた。

Changes of Auditory Brainstem Response and Brain Histology After Occluded Bilateral Common Carotid Arteries

Weidong Shen¹⁾, Kimitaka Kaga¹⁾ and Katsushi Yamada²⁾

¹⁾Department of Otolaryngology, Faculty of Medicine, University of Tokyo

²⁾Department of Otolaryngology, Teikyo University School of Medicine

We occluded the bilateral common carotid arteries of 4 rats as a model of brain death auditory brainstem responses (ABRs) were continuously recorded every hour using click stimulus in 4 rats more than 8 hours. And then, rats were perfused and the brain pathology was studied under light microscope. The results were that:

- 1) The amplitude of the P1 increased significantly.
- 2) All the peak latencies had no change.
- 3) The CA1 and CA4 regions of the hippocampus showed atrophic change and necrosis of neurons.

The increased amplitude of P1 which originates from the cochlear nerve and cochlear

nucleus can be considered to be excited itself. But we supposed that according the pathology of the brain, during or following brief ischemia, CA1 and CA4 regions of the hippocampus showed atrophic changes, and necrosis of neurons. Then, extracellular glutamate concentration massively could increase, and cause disinhibition of the efferent nerve pathway of brain and/or the olivocochlear bundle, which could excite the cochlear nerve and cochlear nerve nucleus, and finally could increase the amplitude of P1.

参考文献

- 1) 生田房弘：脳死の病理学組織。救急医学 **16** : 1497-1502, 1992
- 2) Uziel A, Benezech J : Auditory brainstem response in comatose patients: Relationship with brain-stem reflexes and levels of coma. Electroenceph, clinical Neurophysiology **45** : 515-524, 1978
- 3) Starr A : Auditory brain-stem responses in brain death. Brain **99** : 543-544, 1976
- 4) Kaga K, Uebo K, Sakata H : Auditory brain-stem responses and temporal bone and brain-stem pathology in brainstem death, with special reference to autolysis of red blood cells. Acta Otolaryngol (stockh) **115** : 183-186, 1995
- 5) Kaga K, Takiguchi T, Myokai K et al : Effects of deep hypothermia circulatory arrest on the auditory brainstem responses. Arch. Otorhinolaryngol **225** : 199-205, 1979
- 6) Yamada K, Kaga K, Sakata H, Uno A, Tsuzuku T : Auditory evoked potentials under total spinal anesthesia in rats. Annals Otorhinolaryngol **1087-1092**, 1997
- 7) Brierley JB, Graham DI ; Hypoxia and vascular disorders of the central nervous system. In Greenfield's Neuropathology, Fourth Edition, eds by Adams JH, Corsellis JAN, Duchon LW, Edward Arnold, London, 1984, pp125-156
- 8) Shuaib A, Ijaz S, Kanthan R : Clomethiazole protects the brain in transient forebrain ischemia when used up to 4h after the insult. Neurosci-Lett **197 (2)** : 109-112, 1995
- 9) Shuaib A, Wagaar T, Ijaz S : Neuroprotection with felbamate: a 7- and 28-day study in transient forebrain ischemia in gerbils. Brain-Res **727 (1-2)** : 65-70, 1996
- 10) Takemoto O, Tomimoto H, Yanagihara T : Induction of c-fos and c-jun gene products and heat shock after brief and prolonged cerebral ischemia in gerbils. Stroke **26 (9)** : 1639-1648, 1995
- 11) Siesjo BK : Historical overview ; Calcium, ischemia, and death of brain cell. Ann NY Acad Sci **522** : 638-661, 1988
- 12) Siesjo BK, Bengtsson F : Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression ; A unifying hypothesis. J Cereb Blood Flow Metab **9** : 127-140, 1989
- 13) 桐野高明：脳虚血と神経細胞死。神経進歩 **36 (2)** : 225-235, 1992
- 14) 長井大二：急性期意識障害患者の聴性誘発反応による生命および機能予後の評価。帝京医学雑誌 **10 (1)** : 29-44, 1987
- 15) 馬場俊吉：昏睡患者の脳幹機能と予後。日耳鼻 **84** : 1542-1553, 1981

(原稿受付 平成11.10.18)