脳室内血液成分注入の脳脊髄液の 産生吸収に及ぼす影響(1)

浅井 堯彦

The Effect of the Intraventricular Blood Component on Both the Production and Absorption Rate of the Cerebrospinal Fluid in Dog (Part—I)

TAKAHIKO ASAI

Department of Neurosurgery, Nagoya University

Summary

Previous experimental studies have demonstrated an increased rate of the CSF production following bleeding episodes in the ventriculo-cisternal perfusion system.

Preliminary trials of the autologous blood injection into the system showed the same effect. However, when serum only was applied into the system, cerebrospinal fluid (CSF) was produced for a short period up to two to three times as much as an ordinary case, whereas the red blood cell (RBC) suspension failed to show any effect on the production rate.

These two blood components did not affect the absorbing mechanism of CSF.

Key words: ventriculo-cisternal perfusion, CSF production rate, vascular permeability, bradykinin

I はじめに

1962年, Pappenheimer ら²⁰⁾ がヤギの脳脊髄液系を, inulin を含む人工脳脊髄液で灌流する方法を確立して以来, 脳脊髄液(以下CSFという)の産生吸収を測定した研究成果が数多く報告されている¹⁾²⁾⁵⁾⁸⁾¹⁰⁾¹¹⁾²¹⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾. これらの実験に用いられる側脳室一大槽灌流法はその灌流系の設置にきわめて繊細な技術が要求され, 側脳室の穿刺不良のために出血したり, 大槽からの流出圧が低すぎると徐々に灌流系内に出血することがまある. この際, その灌流系内に新しく産生される CSF の量は正常とは異なり, 経験的に産生量が増加することが知られていたが, 灌流系内に出血をきたしたものは実験は不成功であるとしてデータは廃棄され, CSF産生量が増加する

理由については未知のまま放置されて今日に至った.

一方 CSF 腔内に出血するという事態は, 臨床的にはけっして稀ではなく, しかもその急性期に種々の臨床症状が発現する機構については未解決の点がきわめて多く, 疑問解明への努力が重ねられてきている. そこで, CSF腔内に出血をきたした際の CSF 産生の動態を知ること, 一つには CSF 産生の機構解明のための示唆が得られようし, また一つにはクモ膜下出血や脳室内出血の際の病像の解明に端緒を与え, ひいてはそれに対処する方策を見出す手がかりを得られるとも考えられる. このため人為的に脳室内に血液成分を注入して, CSFの産生動態を調べるべく計画した.

名古屋大学脳神経外科

〔連絡先: 〒466 名古屋市昭和区妙見町 2-9, 名古屋第二赤十字病院脳神経外科, 浅井堯彦〕

1977年7月8日 受稿

II 方 法

1. 実験動物と麻酔

体重15~20kgの雑種成犬を用い、体重kg当り30 mg の pentobarbital を腹腔内投与し麻酔。気管内挿管し、腹臥位のまま頭をやや高举して実験台上に固定する。麻酔レベルを一定にするため、succinyl choline chloride を20 mg 筋注し、気管内チューブを人工呼吸器に連結し、毎分28~32回の割合で実験中継続して陽圧換気を行った。必要に応じて筋弛緩剤を追加した。

2. 灌流系の設置

後頭突起の前方1~1.5 cmで、正中線から5 mmの部に小さいburr hole を設け、ここから側脳室を20 Gの針で穿刺し、針をbone wax で頭蓋骨に固定する。内径2 mmのNF-2 silicon rubber tube を用意し、CSF reservoir 端には18 Gの針をつけ、他端は穿刺針に連結する。20 Gの針で大槽を穿刺してoutflow drainage とする。灌流にはSharp SP-11のrotary pump を使用し、毎分約0.3 mlの割合で人工CSFを注入する。

3. 灌流液

灌流液は、イヌのCSFの平均的組成として次のものを含む⁷⁾。

Sodium 153.20 mEq/L, chloride 122.27 mEq/L, potassium 2.86 mEq/L, HCO_3^- 27.95 mEq/L, HPO_4 5.87 mEq/L. 実験数時間前にさらに次のものを加える。Calcium 1.30 mEq/L, magnesium 1.73 mEq/L, chloride 3.03 mEq/L.

灌流の直前にinulin 約25 mgを上記人工CSF 100 ml中に加温しながら溶解せしめて灌流液とする。

4. 灌流法

まず予備灌流を行うが、inulinの脳室内での十分な拡散をみるのは約60分後で、ここからoutflowのsamplingを開始する。灌流は流出圧を100 mmH₂Oに固定して行う。

試料注入前に2回outflow samplingを行い、試料(後述)注入5分後から10分間ずつ続けて3回、20分間のsampling 休止を経て次に10分間ずつ2回、以後同様にして試料注入から150分まで採取する。

5. 注入試料の作製と注入

実験本来の目的からすれば全血を入れるべきであるが、血球成分と血漿成分とではそれぞれ反応が異なることも予想されたので、血清、血球それぞれに分離して実験を行った。

血清の分離は、採取した自家静脈血をそれぞれガラス製遠沈管およびpolyethylene製遠沈管にとり、37℃、

3,000 rpm で10分間遠沈し、上清を使用する。

また血球成分は血球浮遊液として使用するため、自家血採取時に必要量のcitrateをよく混和させ、37℃および溶血防止の目的のため-15℃冷却のそれぞれの条件下で、4,500 rpm, 15分間遠沈し上清を捨て、さらにcitrate加生理食塩水で2回洗浄遠沈した上で、分離した血漿と同量のcitrate加生理食塩水中にこの沈渣を再浮遊させる。

これらの試料を灌流系の脳室穿刺針の直前に設置したゴム管壁を穿刺して、1 ml を3~5分かけて緩徐に注入する。この際試料の注入圧や速度については注入そのものがmanualに行われるので、CSF産生に対して何らかの影響なしとしないが、可及的にこれらのfactorを避けるため緩徐に注入するように努めた。

6. Inulin の定量

Inulinの定量は、George E. Schreiner²⁷⁾のresorcinol法により、inulinを発色させて行う。Outflow sample, 灌流液および数種の濃度の標準inulin液のそれぞれ2系列を作り、発色させて島津製Beckmann電気分光光度計により、490 Åの波長で吸光度を測定する。同一のものを2系列作ることにより、稀釈、pipettingおよび光度計の読み等の誤差をチェックする。

7. イヌのCSFの産生量計算

Heiseyら¹¹⁾によれば、CSF産生量は次式により計算できる。すなわち、

$$\dot{V}_f = (\text{O}-\text{I}) + \dot{V}_a$$

しかしBering and Sato⁶⁾は、イヌでは次式によることを提唱している。すなわち、

$$\dot{V}_f = 0.048 (\pm 0.008) - 0.031 (\pm 0.032) \times 10^{-3} (\text{CSFP} - \text{SSVP})$$

III 結 果

試料注入の効果

1. 血清成分

ガラス製遠沈管で作製した試料1 mlの注入によって起こるCSF産生量の変化はFig. 1のごとくで、産生量増加の傾向をみせてはいるものの高低まちまちであり、かつ、late effect様にみえる70~110分後のminor peakもときにみられることがあった。しかし注目すべきことは、試料注入後5分から30分までに示される変化で、CSFの産生は注入15分後で最高を示し、正常犬の平均産生量⁶⁾の約2~3倍に達し、30分後には通常の産生レベルに復帰し、以後このレベルを維持することである。

これに対してpolyethylene製遠沈管で作製した試料では、前者の示したようなCSF産生量変化のばらつき

は減少し、また70~110分後の minor peak をも示さなかった (Fig. 2). この CSF 産生量の変化の推移は, bradykinin 10^{-8} M を注入した場合と類似する (Fig. 3).

2. 血球浮遊液

冷却遠沈法で作製したものの注入では、血清注入による変化とまったく同様であった。すなわち、試料注入後15分で CSF 産生量は通常の2~3倍に増加し、30分後には通常のレベルに復帰し、以後そのレベルを維持する

Fig. 1 Increase of the CSF production rate by the autologous serum which was centrifuged with glass tube. Sometimes, minor peaks appeared at 70 to 110 minutes after introduction of serum

Fig. 2 Increase of the CSF production rate by the autologous serum which was centrifuged with polyethylene tube

Fig. 3 Effect of the introduction of 10^{-8} m of bradykinin

(Fig. 4).

一方37℃で遠沈作製した血球浮遊液を用いると、試料注入後の CSF 産生動態は一定の傾向を示さず、CSF 産生に対しての効果は不明である。そこでさらに採血時から Trasylol を作用させ、37℃で遠沈作製した血球浮遊液を注入すると、CSF 産生にはまったく変化が起きなかった (Fig. 5).

3. 灌流液

試料注入による CSF 産生量の変化をみる際の対照試料として、灌流液そのものを選んだ。注入の結果はCSF 産生量には何らの影響を与えず、注入直後も実験終期にもまったく増減はなく、通常の0.042~0.047 ml/min 前後を示した (Fig. 6). このことはまた、試料注入が manual に行われることの実験への影響はないことをも示している。

4. Bradykinin および 5-hydroxytryptamine

以上のように試料注入により CSF 産生の増加をもたらすような既知の物質として、蛋白質研究奨励会製の bradykinin と Nippon Merck-Banyu 社製の 5-hydroxytryptamine (serotonin) とを選び、同様の実験を試みた。Bradykinin では Fig. 3 のごとく、また5-hydroxy-

Fig. 4 The effect of the RBC suspension which was refrigerated and centrifuged

Fig. 5 Effect of the RBC suspension which was treated with Trasylol

Fig. 6 Effect of the perfusion fluid itself

Fig. 7 Effect of 5-hydroxytryptamine. There was no effect by 0.25 $\mu\text{g/ml}$ of 5-HT

tryptamine では Fig. 7 のごとくであって、前者では 10^{-8} M という僅少の用量で CSF 産生量の変化が起こるのに対し、後者では正常な血液 1 ml 中に含まれている (すべて血小板内) 0.25 $\mu\text{g}^{29)}$ では CSF 産生量の変化は起こらず、この 2,000 倍の濃度でほぼ血清 1 の注入で起こる変化に匹敵する。

IV 考 察

これらの実験結果から、血清および冷却遠沈作製法による血球浮遊液中には、CSF の産生増加をもたらす何らかの要因があることは確実である。

実験の当初、著者は試料の注入によって脳室内の浸透圧が変化するためではないかと考えて、経時的に採取した out flow の浸透圧を氷点降下法により測定したが、わずかに浸透圧の上昇をみるものがあるものの、ほとんど変化はなく、血清と等張であり 285 mosm 前後を示した。灌流系内の液の浸透圧変化が CSF 産生にいかなる影響を及ぼすかは、すでに 1972 年に Maza¹⁸⁾ がすぐれた報告をしており、これと対照すると CSF と等張である試料の注入では浸透圧は変化せず、この実験で浸透圧が CSF 産生量の増加に関与していないことが了解できる。

従来 CSF 産生の主たる場は choroid plexus と考えら

れており、近年になり Sato and Bering²⁵⁾ や Pollay ら²¹⁾ により、choroid plexus 以外にクモ膜下腔や脳室壁にもその産生能があることが報告され、一般に認められてきている。しかし産生そのものの機構については諸説があり、carbonic anhydrase を介するような酵素化学的ないわゆる分泌による様式と、一部には物理化学的な要因による濾出があるとされ、これも一般に認められている。Sato²⁴⁾²⁶⁾, Tsugane²⁸⁾, Amano¹⁾, 原¹⁰⁾らが示すように、steroid hormone の投与や、実験犬を低体温環境下におくことにより、CSF 産生量が約 1/2 に減少するという報告や、carbonic anhydrase 阻害剤としての acetazolamide や ouabain の投与により、同様に CSF 産生量が減少するという報告²⁾ がある。これらは主として CSF 産生の酵素化学的な面を抑制するためと考えられる。

今回の実験結果が示すように、CSF 産生量の経時的変化が急速かつ著明なのは、choroid plexus などの CSF 産生部位の血管透過性を変化させるような物理化学的な要因を左右する物質が、注入試料中に存在するためである可能性が十分に考えられる。そのような物質は、1. acetylcholine, 2. histamine, 3. 5-hydroxytryptamine, 4. bradykinin 等々が考えられる。この際 acetylcholine や、histamine は血液中にはなく、また血液成分からは生成されないもので、血液由来のものとしては 5-hydroxytryptamine かまたは bradykinin がより可能性が大きい。さらに 5-hydroxytryptamine による血管透過性の亢進は、ラットおよびマウスに限られ⁵⁾²²⁾²³⁾、他の動物ではあってもきわめて弱いので、後者の可能性がより強いと思われる。Bradykinin の生成についてはすでに詳細な報告があり、次のようにまとめられている (Fig. 8)。

この他に plasmin, trypsin による生成経路も示されている。

つまり血液を扱う際、ガラスとの接触は kinin 生成の

Fig. 8 Diagram of the kinin formation through Hageman factor

引金を引くことを意味し³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾、この実験にはガラス製器具は使用できない。このためガラス製実験器具はすべて siliconize するか、または polyethylene 製のものを使用する必要がある。また bradykinin 生成の酵素系は 37°C でもっとも安定⁴⁾ していて、これより高温でも低温でも生成が開始されることが、実験に際して注意されなくてはならない。

冷却遠沈法で作製した血球浮遊液中には、bradykinin 様物質が生成されている可能性があり、これが2回の血球洗浄では完全に除去できず稀釈されて残ったり、あるいは血球表面に吸着されて残っていると考えられ、このため血清注入と同様の効果を示したと思われる。Bradykinin の生成は、加熱⁹⁾ により生成系酵素群を不活性化するか、soy bean trypsin inhibitor¹²⁾³⁰⁾³¹⁾³²⁾ により kallikrein を阻害するか、または多価阻害剤である Trasylol¹³⁾¹⁷⁾³³⁾ により kallikrein, plasmin, および trypsin の活性を抑制することで防止できる。採血時から Trasylol を作用させて作製した血球浮遊液では、遠心分離の際血清から不本意に bradykinin を賦活することがないので、まったく CSF 産生動態には影響を与えない。

したがって CSF 系に出血したとき、CSF の産生増加が起こるのは、血清中の成分が主として CSF によって稀釈されること¹⁸⁾ により bradykinin を生成し、これが choroid plexus などの血管に作用して血管透過性が高まり、血液中の液性成分が濾出するためであろうと考えられる。一方血球そのものにはその作用がなく、また血球内にも bradykinin を生成する要素は含まれていない。

Bradykinin は、Fig. 3 のように 10^{-8} M でも、また 10^{-7} M, 10^{-6} M 等の濃度でも、それぞれが CSF 産生に及ぼす影響に差がないが、5-hydroxytryptamine では正常の血液 1 ml 中に含まれる $0.25 \mu\text{g}$ ¹⁶⁾ では反応がなく、この 2,000 倍の濃度ではじめて CSF 産生が増加している。このことから CSF 産生の増加に関与している未知物質が、bradykinin であることが強く示唆される。

以上の第 1 の実験で bradykinin が close up されてきたので、この定性および定量実験が必要となった。

V ま と め

1. 血清から CSF 産生増加をもたらす物質が生ずるが、血球からは生じない。
2. 血清注入による CSF 産生の増加は、通常の 2 ~ 3 倍に達し、早期にその効果は消失する。
3. この CSF 産生の変化は、 10^{-8} M の bradykinin 注入により惹起される変化に酷似する。
4. 5-hydroxytryptamine の関与は少ないと考えられ

る。

文 献

- 1) AMANO, Y.: The cerebrospinal fluid production rate in the experimentally induced edematous brain and influences of dexamethasone upon it. *Nagoya J Med Sci* 31: 427-441, 1969
- 2) AMES, A. III., HIGASHI, K. & NESBETT, F. B.: Effects of PCO_2 , acetazolamide and ouabain on volume and composition of choroid plexus fluid. *J Physiol* 181: 516-524, 1965
- 3) ARMSTRONG, D. A. J., JEPSON, J. B., et al.: Pain producing substance in human inflammatory exsudates and plasma. *J Physiol* 135: 350-370, 1957
- 4) ARMSTRONG, D. A. J.: Actions on the human cold-activated plasma kinin forming system of pre-heating at 56°C and 60°C. *Pharmacol Res Comm* 1: 30-35, 1969
- 5) BENDITT, E. P. & ROWLEY, D. A.: Antagonism of 5-hydroxytryptamine by chlorpromazine. *Science* 123: 24, 1956
- 6) BERING, E. A. J. & SATO, O.: Hydrocephalus; Changes in formation and absorption of cerebrospinal fluid within the cerebral ventricle. *J Neurosurg* 20: 1050-1063, 1963
- 7) BERING, E. A. J.: Composition of cerebrospinal fluid under varying conditions. *Neurology* 8: Suppl. 1, 129-130, 1958
- 8) CURRAN, R. E., MOSHER, M. B., et al.: Cerebrospinal fluid production rate determined by simultaneous albumin and inulin perfusion. *Exp Neurol* 29: 546-553, 1970
- 9) EISEN, V.: Observations on intrinsic kinin-forming factors in human plasma; The effect of acid, acetone, chloroform, heat, and englobulin separation on kinin formation. *J Physiol* 166: 496-513, 1963
- 10) 原 誠: イヌの脊髄クモ膜下腔に於ける脳脊髄液の産生に及ぼす dexamethasone phosphate の影響. 名古屋医学 95: 41-47, 1973
- 11) HEISEY, S. R., HELD, D & PAPPENHEIMER, J. R.: Bulk flow and diffusion in the cerebrospinal fluid system of the goat. *Am J Physiol* 203: 775-781, 1962
- 12) 岩永貞昭, 鈴木友二: プラディキニンとカリジンの生化学. 生化学 39: 137-151, 1967
- 13) KRAUT, H., BHARGAVA, N., et al.: Versuch zur Isolierung des Kallikrein Inaktivators IV. Kristallisation und Aminosäurezusammensetzung, Vergleich mit dem Trasylol-Inhibitor von Kunitz und Northrop. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 334: 230-235, 1963
- 14) MARGOLIS, J.: Activation of plasma by contact with glass: Evidence for a common reaction

- which releases plasma kinin and inhibits coagulation. *J Physiol* 144: 1-22, 1958
- 15) MARGOLIS, J.: The mode of action of Hageman factor in the release of plasma kinin. *J Physiol* 151: 238-252, 1960
 - 16) MARGOLIS, J. & BISHOP, E. A.: Interrelations between different mechanisms of release of biochemically active peptides from blood plasma. *Nature* 194: 749-751, 1962
 - 17) MARX, R., CLEMENTE, P., et al.: Zum Problem eines Antidotes in der internen Thorombotherapie mit Fibrinolytika. *Blut* 5: 367-375, 1959
 - 18) MAZA, T.: Effect of intraventricular osmotic pressure on the formation rate of cerebrospinal fluid and subsequent distribution of electrolytes between the fluid and serum in rabbit. *Bull Yamaguchi Med School* 19: 1-16, 1972
 - 19) MILES, A. A.: Large molecular substances as mediators of the inflammatory reaction. *Ann N Y Acad Sci* 166: 855-865, 1964
 - 20) PAPPENHEIMER, J. R., HEISEY, S. R., et al.: Perfusion of the cerebral ventricular system in unanesthetized goat. *Am J Physiol* 203: 763-774, 1962
 - 21) POLLAY, M. & CURL, F.: Secretion of cerebrospinal fluid by the ventricular ependyma of the rabbit. *Am J Physiol* 213: 1031-1038, 1967
 - 22) ROWLEY, D. A. & BENDITT, E. P.: 5-hydroxytryptamine and histamine as mediators of the vascular injury produced by agents which damage mast cell in rat. *J Exp Med* 103: 399-411, 1956
 - 23) ROWLEY, D. A.: Venous constriction as the causes of increased vascular permeability produced by 5-hydroxytryptamine, histamine, bradykinin, and 48/80 in the rat. *Br J Exp Path* 45: 56-67, 1964
 - 24) SATO, O., HARA, M., ASAI, T., et al.: The effect of dexamethasone phosphate on the production rate of cerebrospinal fluid in the spinal subarachnoid space of dogs. *J Neurosurg* 39: 480-484, 1973
 - 25) SATO, O.: The effect of dexamethasone on cerebrospinal fluid production rate in the dog. *Brain Nerve* 19: 485-492, Tokyo, 1967
 - 26) SATO, O. & BERING, E. A. J.: Extra-ventricular formation of cerebrospinal fluid. *Brain Nerve* 19: 883-885, Tokyo, 1967
 - 27) SCHREINER, G. E.: Determination of inulin by means of resorcinol. *Proc Soc Exp Biol Med* 74: 117-120, 1950
 - 28) TSUGANE, R.: The production rate of cerebrospinal fluid under hypothermia. *Brain Nerve* 20: 901-907, Tokyo, 1968
 - 29) UDENFRIEND, S. & WEISSBACH, H.: Studies on serotonin (5-hydroxytryptamine) in platelet. *Fed Proc* 13: 412-413, 1954
 - 30) WERLE, E. & MAIER, L.: Ueber die chemische und pharmakologische Untersuchung von Kallikrein verschiedener Herkunft. *Biochem Z* 323: 279-283, 1952
 - 31) WERLE, E. & KAUFMANN-BOETSCH, B.: Ueber eine esterspaltende Wirkung von Kallikrein. *Naturwissenschaften* 46: 559, 1959
 - 32) WERLE, E. & KAUFMANN-BOETSCH, B.: Kallikrein und Trypsin und ihre Hemmung durch Kallikrein und Trypsin Inhibitoren. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 319: 52-63, 1960
 - 33) WERLE, E., MAIER, L. & RINGELMANN, E.: Hemmung von Proteinasen durch Kallikrein-Inaktivatoren. *Naturwissenschaften*, 39: 328, 1952