

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17390255
 研究課題名(和文)脳虚血初期および片頭痛前兆にみられる大脳皮質拡延性抑制と毛細血管血流変化
 研究課題名(英文)Studies on cortical spreading depression and changes in brain capillary blood flow in acute phase of brain ischemia or aura in acute migraine
 研究代表者
 鈴木 則宏(SUZUKI NORIHIRO)
 慶應義塾大学・医学部・教授
 研究者番号：10158975

研究成果の概要：

虚血時の微小循環変化と皮質拡延性抑制(cortical spread depression: CSD)の微小循環変化は類似した表現型を示すが、原因と結果が逆であり発生機序的にまったく異なるものである。CSDにおける微小循環変化は神経細胞脱分極によって二次的に起こる毛細血管血流障害であり、CSDと密接に関連する片頭痛においては血管の一過性の炎症反応を含む異常反応が惹起される可能性がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	6,200,000	0	6,200,000
2006年度	6,100,000	0	6,100,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
計	14,300,000	600,000	14,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科：内科系臨床医学 細目：神経内科学

キーワード：脳虚血、片頭痛、脳微小循環、大脳皮質拡延性抑制

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質拡延性抑制(Cortical spreading depression、以下CSDと略す)は多くの脳疾患(虚血、外傷、てんかん、片頭痛前兆など)の根底にある脳組織に特有な病態生理学的なプロセスである。しかし、その発生機序や生理的あるいは病理的意義はいまだ不明である。

2. 研究の目的

CSDの病態を解明することは、これら脳疾患の病態を解明するのみならず、その治療法の

発見と開発に繋がる可能性を有しており意義深いものと考えられる。

(1)今回の研究では、脳虚血初期における虚血周辺部脱分極(peri-infarct depolarization)の際の毛細血管血流変化と片頭痛前兆にみられるCSDの場合を比較し、CSDの原因が微小循環障害(vascular origin説)によるものか、あるいは神経細胞そのものの脱分極(neuronal origin説)から生じたものかを検討することを第1の目的とした。

(2)CSDは臨床的に頻繁に遭遇する片頭痛の

前兆との関連が議論されている。また脳血管障害の虚血病巣の発生、あるいは拡大において同一の機序が働いているともされる。CSDは神経細胞の脱分極を本質し、それをとりまく毛細血管との密接な相互作用による移動する脳機能不活化として観察され、その際の生化学的な、あるいは分子の遺伝子的な変化も報告されている。CSDはその機能異常が皮質を反復伝播して輪状の広がりを示す。その際に神経細胞と毛細血管の間に介在する星状グリア細胞が多岐にわたる働きをしていて、その機序の解明は決して単純なものではない。本研究においては神経細胞の脱分極が神経自体の異常によるものか、血管収縮 - 組織 asphyxia によるものかを解明することを第2の目的とした。

3. 研究の方法

(1)ラットあるいはマウスの脳にカリウムにより誘発された CSD と、中大脳動脈を閉塞して作成した脳虚血部位において当研究室で開発した高速カメラレーザースキャン共焦点蛍光顕微鏡を用いて、それぞれ微小循環変化を観察し比較した。

(2)CSD の発生機序については、高速 - 高空間分解能脳微小循環測定法を用いて、CSD の発生とそれに伴う毛細血管血流変化を測定し、それを解析して CSD が血管由来か神経細胞由来かを毛細血管口径と赤血球血流と、CSD の広がり際の星状グリア細胞の膨化（組織インピーダンス法）、フィールド電位、脳波との関連を調べた。また同時に得られる画像から、その領域に血液を供給する細動脈の時間的な変化を調べた。

(3)脳虚血病態のみならず片頭痛前兆の病態を明らかにするため、セロトニン(5-HT)と皮質拡延性抑制(CSD)の関係に注目し、5-HT_{1B/1D}受容体刺激が CSD および CSD に伴う脳血流増加反応に及ぼす影響について 5-HT_{1B/1D}受容体刺激薬を用いて検討する。ラット腹腔内麻酔後、調節呼吸下に左後頭部に骨窓を開け硬膜を切開し、1M KCl を浸した脱脂綿を設置して CSD を誘発した。直流電位と Laser Doppler 血流計による局所は、左前頭部に骨窓を開け硬膜を温存した状態で測定する。まず、KCl の局所投与を行い、10 分間直流電位と局所脳血流の変化を測定し、コントロールとし、次いで右大腿静脈か生理食塩水 0.6ml を 1 分間かけて投与し、さらに 20 分間連続的に観

察した。生理食塩水で KCl を洗浄した後、再度 KCl の局所投与を行い、5-HT_{1B/1D}受容体刺激薬の影響を直流電位と局所脳血流の変化を 20 分間連続的に観察した。各ステップにて Keio IS II を適用し、低倍レンズ(対物 10 倍)にて深部ならびに大スライス幅の観察をする。次いで高倍対物レンズ(40 倍)にて毛細血管ならびにその周辺を観察した。赤血球は FITC にてラベルしたものをを用い、大腿静脈から注入して、脳に到達した赤血球を観察した。血管壁は FITC-Dextran を注入して染色する。また、被測定部の組織内の深度を測定し、数値として表示する。さらに、レンズを自動的に急速に上下し画像を取り込み、三次元的に赤血球の動きを観察する付帯装置を開発・設置した。赤血球の速度変化は Matlab ソフトウェアを基礎として自家製ソフトウェア KEIOIS II を用いた。

4. 研究成果

(1) CSD の際の微小循環変化

ラット脳皮質にカリウムを投与して CSD を誘発すると、波状の反射光変化が観察され、これはその近傍で記録した field potential の陰性波とほぼ同期した。

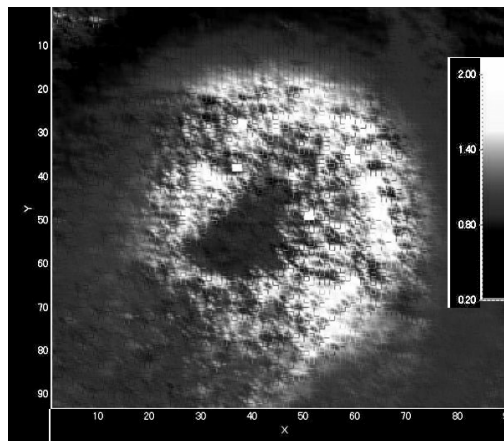


図1 カリウム投与によりラット脳表に生じたリング状に拡散する血流の変化

この光透過性変化は細胞の脱分極、それに伴う細胞のわずかな腫脹を捉らえたものである。CSD の開始はカリウム注入部のみでなく周辺 2 - 3 箇所から始まっており(多焦点)、これはてんかん様の神経細胞の異常放電を示唆するものであった。ビデオカメラでこの際の微小循環変化を観察すると、CSD 伝播とともに観察領域が暗転し(反射光減少)、細

動脈の血流が減少し、それとともに毛細血管を流れる FITC ラベル赤血球の速度も減少、それが時間とともに増強してほぼ停止するまでに至った。細動脈の血流もまた停止、あるいは逆流することも観察された。やがて視野は徐々に再び明るさを取り戻し、それに遅れて血流も回復した。高速カメラで捉えた赤血球の動きをフレームごとに KEIO-IS2 で分析すると、同様に赤血球の速度は徐々に周期的変動を示しながら減少し、赤血球の数も減少、最終的に赤血球の流れは停止した。この停止は使用した 9 匹中 8 匹において観察された ($P < 0.05$)。この停止の時間は平均 3 秒の短時間で終わり、血流は再開した。この毛細血管の中での赤血球の一過性の停止は、正常状態では観察されたことはなく、CSD においてのみみられる特有の現象であった。また、脳表血管においては CSD の進行とともに独特のソーセージ状に収縮と拡張を繰り返す特徴的な口径と形状の変化が観察された。

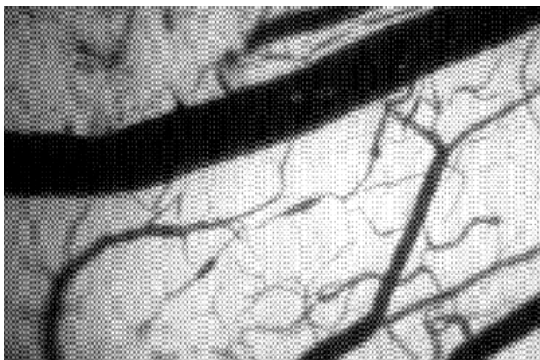


図2 脳表血管のビデオ画像。CSDの進行に伴って出現する脳血管の分節状の収縮 拡張現象。

(2) 脳虚血部急性期の微小循環変化

ラットで脳皮質を透過光法で観察しながら中大脳動脈を閉塞すると、約1分後に中大脳動脈の支配領域で組織の光透過性の亢進が観察されるようになり、この明視領域は徐々に拡大した。この際に周辺部輪郭はCSDと比較して不規則であり、また拡大速度も遅かった。やがて虚血中心部と思われる部分では透過性の減少が始まり、暗い領域となって、その周辺部には光透過性が亢進した部分がコロナ状に見られて、よく知られた penumbra が描き出されてきた。この虚血中心部では閉塞直後に直ちに FITC ラベルの赤血球の消失が観察された。虚血中心部での微小循環変化を長期に観察し続けると、2日目

には組織の崩壊、毛細血管の消失と血管の断片が見られ、一方ではマクロファージの浸潤組織清掃とともに周辺部では中大脳動脈と前大脳動脈の吻合部を中心とした血流の再開が観察され、3日目には静脈系のリモデリングと直線的な新生毛細血管の出現がみられた。

(3) CSD と脳虚血の早期微小循環障害の類似性と相違点

CSD と脳虚血の早期微小循環障害の両者共通することは、赤血球が組織毛細血管から消失したことであり、これは流血中の赤血球のラベリングの手法により始めて観察できたことであった。赤血球は酸素の運搬体であり、プラズマの20倍以上の酸素を組織まで効率よく運び、その消失は組織の anoxia をもたらすと考えられる。両者の相違点は、脳虚血においては血管の閉塞 血流の停止が先行することであり、anoxia により神経細胞の脱分極が起こって、早期の血流が再開されない限り、組織は重篤なかつ不可逆的な変性に陥っていくことを意味する。一方 CSD においては、光反射光から推察する限り、あらかじめ神経細胞の脱分極が先行し、これが細動脈の口径変化(約数秒遅れて観察された)に続いて、あるいは毛細血管で plasma skimming、または赤血球 sieving 現象により赤血球の毛細血管への流入が阻止され、赤血球の消失が起こると考えられる。しかし CSD の場合の赤血球の消失は一過性であり、その回復は明らかな組織障害を起こすことなく組織が正常状態に戻る。またカリウムによる CSD の誘発の際に、その開始が2 - 3箇所から起こることは多焦点の異常放電のてんかん発作の開始と類似していた。また赤血球の消失時間は、CSD の場合はほんの数秒間という短時間である。これは CSD の緩徐な伝播の持続時間、すなわち field potential の陰性波の持続時間の約 1.5 分、組織光透過性あるいは反射光変化の分単位の持続時間とは一致しない。CSD の広がりを見ると、綺麗に輪状に波紋を描いて広がるが、これは血管樹の広がりとは無関係である。また神経線維の連絡網の繋がりとも無関係である。隣接する神経細胞の脳幹部からの統制による“秩序ある”興奮 - 抑制のメカニズムによる可能性が高いと考えられる。いずれにしても血管起源説 (vascular origin) を否定するものである。こ

れら所見を演繹すると、片頭痛における前兆が CSD によるものという前提に立てば、その症状は神経細胞の脱分極による機能障害によるものであることであり、血管、血流変化は数秒遅れの二次的続発的なものであることとなる。おそらくは脱分極神経細胞の直接的な毛細血管への作用による一過性の赤血球に消失から組織に急激な anoxia がもたらされ、anoxia に対する複雑な血管系の炎症反応も含む異常反応が惹起されたと考えられる。これは CSD に引き続いて起こる片頭痛発作の発生機序にある示唆を与えるものである。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 15 件)

- (1) Tomita M, Osada T, Schiszler I, Tomita Y, Unekawa M, Toriumi H, Tanahashi N, Suzuki N, *Automated method for tracking vast numbers of FITC-labeled RBCs in microvessels of rat brain in vivo using a high-speed confocal microscope system. Microcirculation*, **15**(2):163-174, 2008 (査読有)
- (2) Tomita M, Osada T, Schiszler I, Tomita Y, Unekawa M, Toriumi H, Tanahashi N, Suzuki N, *Automated method for tracking vast numbers of FITC-labeled RBCs in microvessels of rat brain in vivo using a high-speed confocal microscope system. Microcirculation*, **15**(2):163-174., 2008 (査読有)
- (3) Unekawa M, Tomita M, Osada T, Tomita Y, Toriumi H, Tatarishvili J, Suzuki N, *Frequency distribution function of red blood cell velocities in single capillaries of the rat cerebral cortex using intravital laser scanning confocal microscopy with high-speed camera. Asian Biomed.*, **2**(3):203-218, 2008 (査読有)
- (4) Osada T, Tomita M, Tomita Y, Unekawa M, Toriumi H, Suzuki N, *Effect of Gosha-jinki-gan, a Kampo medicine, on cortical blood flow of rat brain as observed by hemodilution technique and high-speed confocal microscopy. Microvasc. Rev. Commun.* **1**:16-19, 2007 (査読有)
- (5) Unekawa M, Tomita M, Osada T, Tomita Y, Toriumi H, Suzuki N, *Sampling rate-dependent RBC velocity in intraparenchymal single capillaries of rat cerebral cortex. Microvasc. Rev. Commun.* **1**:12-15, 2007 (査読有)
- (6) Osada T, Tomita M, Suzuki N, *Spindle shaped constriction and propagated dilation of arterioles during cortical spreading depression. Neuroreport*, **17**(12):1365-1368, 2006 (査読有)
- (7) Osada T, Tomita M, Tanahashi N, Takeda H, Nagai T, Suzuki N, *Astroglial swelling for removed rat brain enlargement incubated in deoxygenated mock cerebrospinal fluid. Clin. Hemorheol. Microcirc.* **34**(1-2):223-226, 2006 (査読有)
- (8) Tomita M, Suzuki N *Flow effect impacts NIRS, jeopardizing quantification of tissue hemoglobin. Neuroimage*, **33**:13-16, 2006 (査読有)
- (9) Tomita M, Ohtomo M, Suzuki N, *Contribution of the flow effect caused by shear-dependent RBC aggregation to NIRS spectroscopic signals. Neuroimage*, **33**:1-10, 2006 (査読有)
- (10) Tomita M, Tanahashi N, Takeda H, Schiszler I, Osada T, Unekawa M, Suzuki N, *Capillary-venous flow in the brain: significance of intravascular RBC aggregation for venous flow regulation. Clin.*

Hemorheol. Microcirc.

34(1-2):51-57, 2006 (査読有)

- (11) Abe T, Takahashi S, Suzuki N:
Oxidative metabolism in cultured rat astroglia: effects of reducing the glucose concentration in the culture medium and of D-aspartate or potassium stimulation. **J Cereb Blood Flow Metab** 26: 153-160, 2006. (査読有)
- (12) Tanahashi N, Takeda H, Osada T, Oki K, Unekawa M, Tomita M, Suzuki N, *Intramicrovascular behavior of platelets in rat brain observed by high speed laser confocal fluorescent microscopy. Microcirculation Annual. 21*:43-44, 2005 (査読有)
- (13) Tomita M, Schiszler I, Tomita Y, Tanahashi N, Takeda H, Osada T, Suzuki N, *Initial oligemia with capillary flow stop followed by hyperemia during K⁺-induced cortical spreading depression in rats. J. Cereb. Blood Flow Metab. 25*(6):742-747, 2005. (査読有)
- (14) Tomita M, Tanahashi N, Takeda H, Osada T, Suzuki N, *Protective mechanism against excessive contraction of human brain microvascular endothelial cells in response to oxygen stimulus. Microcirculation Annual. 21*:13-14, 2005 (査読有)
- (15) Unekawa M, Tomita M, Tanahashi N, Takeda H, Osada T, Suzuki N, *RBC velocity in intraparenchymal capillaries of the rat brain and its fluctuation. Microcirculation Annual. 21*:85-86, 2005 (査読有)

〔学会発表〕(計4件)

- (1) 富田稔, Tatarishvili J, 鳥海春樹, 富田裕, 畝川美悠紀, 服部英典, 鈴木則宏, 脳虚血周辺部微小血管の血管新生 経時的形態的变化と赤血球

流速よりみたアプローチ. 2009. 第34回日本卒中学会総会 (2009.3.19, 島根)

- (2) Tomita M, Tomita Y, Osada T, Unekawa M, Toriumi T, Tatarishvili J, Suzuki N, *Periodic disappearance of RBC from focal capillary network during K⁺-induced cortical spreading depression in rodents. J. Vasc. Res.*, 2008. **45**(supple 2):49. 25th Conference of the European Society for Microcirculation (2008.9.22, Budapest)
- (3) Tomita M, Tomita Y, Osada T, Unekawa M, Toriumi H, Tatarishvili J, Suzuki N, *Facilitation of FITC-labeled RBC movement along single capillaries: role of glia?* 2008. Gordon Conference, Brain Energy Metabolism and Blood Flow (2008.7.21, New Hampshire, USA)
- (4) Schiszler I, Takeda H, Tomita M, Tomita Y, Osada T, Unekawa M, Tanahashi N, Suzuki N, *Software (KEIO-IS2) for automatically tracking red blood cells (RBCs) with calculation of individual RBC velocities in single capillaries of rat brain. J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2005. **25**:S541. 22nd International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism & Function (2005.6.5, Amsterdam)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 片頭痛の診断マーカーとその利用

発明者: 永田栄一郎、鈴木則宏

権利者: 同上

種類: 特許

番号: PCT/JP2006/318244

出願年月日: 2006年9月14日

国内外の別: 国内・国外

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://web.sc.itc.keio.ac.jp/medicine/neurology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 則宏 (SUZUKI NORIHIRO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：10158975

(2) 研究分担者

高橋 慎一 (TAKAHASHI SHINICHI)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：20236285

伊藤 義彰 (ITO YOSHIAKI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：90265786

伊東 大介 (ITO DAISUKE)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80286450

富田 裕 (TOMITA YUTAKA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60276251

(3) 連携研究者

長田 高志 (OSADA TAKASHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30348635