

脳血管攣縮とその治療に関する基礎的研究

課題番号 01480138

平成2年度科学研究費補助金(一般研究B)研究成果報告書

平成3年3月

研究代表者 戸田 昇

(滋賀医科大学医学部教授)

目 的

クモ膜下出血後の脳血管攣縮を如何に予防し治療するかは、現在なお患者の予後を決定する極めて重要な問題である。脳血管攣縮の機序について未だ納得のいく説明が得られていないのは、系統だった実験的解析が行われていないことに加えて、従来のイヌのデータが必ずしもヒトに適用出来ない為と思われる。今回の研究では、生体位および摘出した状態で攣縮をおこさせたイヌおよびサルの大脳動脈の機能異常を、血管収縮性および拡張性生体内物質の反応と血管壁における活性物質の代謝の面から総合的に検討し、血管攣縮の機序を明らかにしたい。また、攣縮機序を基盤に、合理的な薬物治療の方策を見出したい。

研究組織

- 研究代表者：戸田 昇（滋賀医科大学・医学部・教授）
研究分担者：岡村 富夫（滋賀医科大学・医学部・助教授）
研究分担者：吉田 一秀（滋賀医科大学・医学部・助手）
研究分担者：安屋 敷和秀（滋賀医科大学・医学部・助手）

研究経費

平成元年度	4,000 千円
平成2年度	2,100 千円
計	6,100 千円

滋賀医科大学附属図書館



1990025125

研究発表

I. 学会誌発表

1. Onoue, H., Nakamura, N. and Toda, N. Prolonged exposure to oxy-hemoglobin modifies the response of isolated dog middle cerebral arteries to vasoactive substances. *Stroke* 20(5): 657–663, 1989.
2. Bian, K. and Toda, N. Vasodilator actions of flunarizine in isolated dog cerebral and extracerebral arteries. *Japan. J. Pharmacol.* 49(1): 83–94, 1989.
3. 川上雅久, 卞卡, 戸田昇. 新しいCa²⁺拮抗薬Felodipineの血管作用. *日薬理誌*. 94 (4) : 251–256, 1989.
4. Toda, N. and Bian, K. Modification by magnesium of dog cerebroarterial contraction. *J. Vasc. Med. Biol.* 1(6): 354–360, 1989.
5. Toda, N. Mechanisms of contracting action of oxyhemoglobin in isolated monkey and dog cerebral arteries. *Am. J. Physiol.* 258(1): H57–H63, 1990.
6. Toda, N. Mechanism underlying responses to histamine of isolated monkey and human cerebral arteries. *Am. J. Physiol.* 258(2): H311–H317, 1990.
7. Toda, N., Ayajiki, K. and Okamura, T. Modifications by endogenous prostaglandins of angiotensin II-induced contractions in dog and monkey cerebral and mesenteric arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 252(1): 374–379, 1990.
8. Toda, N., Kawakami, M. and Yoshida, K. Constrictor action of oxyhemoglobin in monkey and dog basilar arteries in vivo and in vitro. *Am. J. Physiol.* in press, 1991.
9. Kawakami, M., Kodama, N. and Toda, N. Suppression of the cerebral vasospastic actions of oxyhemoglobin by ascorbic acid. *Neurosurgery* 18(1): 33–40, 1991.
10. Saito, A., Handa, H. and Toda, N. Reactivity to vasoactive agents of canine basilar arteries exposed to experimental subarachnoid hemorrhage. *Surg. Neurol.* in press, 1991.
11. Toda, N., Kawakami, M., Yamazaki, M. and Okamura, T. Comparison of endothelium-dependent responses of monkey cerebral and temporal arteries. *Br. J. Pharmacol.* in press, 1991.
12. Toda, N., Kawakami, M. and Kodama, N. Prevention by nicardipine of dog basilar artery spasm caused by oxyhemoglobin in vivo and in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* in press, 1991.

II. 口頭発表

1. Toda, N. Endothelium-dependent contraction in monkey and dog cerebral arteries — possible mechanism underlying cerebral vasospasm. First Intern. Symposium on Endothelium-Derived Vasoactive Factors. Philadelphia, Pennsylvania, 平成元年 5 月 1 日～ 3 日。
2. 岡村富夫, 安屋敷和秀, 戸田 昇。脳動脈における angiotensin II の内皮依存性収縮について。第12回日本高血圧学会総会。平成元年 9 月13日～15日。
3. 川上雅久, 児玉南海雄, 戸田 昇。脳血管攣縮に関連すると考えられる oxyhemoglobin 作用のアスコルビン酸処置による抑制。第48回日本脳神経外科学会総会。平成元年 9 月 27 日～ 29 日。
4. 川上雅久, 岡村富夫, 戸田 昇。Oxyhemoglobin の収縮作用機序に関する研究。第19回日本脈管作動物質学会。平成 2 年 2 月 9 日。
5. 川上雅久, 安屋敷和秀, 岡村富夫, 戸田 昇。摘出脳動脈における Oxyhemoglobin 作用とその修飾。第63回日本薬理学会総会。平成 2 年 3 月 25 日～ 28 日。
6. Onoue, H., Nakamura, N., Toda, N. Modification by prolonged exposure to oxyhemoglobin of responses of isolated dog middle cerebral arteries to vasoactive substances. International Conference on Cerebral Vasospasm-1990. Tokyo, 平成 2 年 5 月 15 日～ 18 日。
7. Kawakami, M., Kodama, N., Toda, N. Suppression by ascorbic acid of oxyhemoglobin-induced cerebroarterial contraction. International Conference on Cerebral Vasospasm-1990. Tokyo, 平成 2 年 5 月 15 日～ 18 日。
8. 安屋敷和秀, 山崎正昭, 吉田一秀, 岡村富夫, 戸田 昇。摘出イヌ脳動脈収縮に対する Mg^{++} の影響。第77回日本薬理学会近畿部会。平成 2 年 6 月 15 日。

Ⅲ. 出版 物

1. 戸田 昇。血管内皮由来弛緩因子と血管機能。代謝。27 (1) : 13 ~ 21, 1990.
2. Toda, N. Endothelium-dependent contraction in monkey and dog cerebral arteries—possible mechanism underlying cerebral vasospasm. In: Endothelium-Derived Vasoactive Factors. Edited by Rubanyi, G. M. and Vanhoutte, P. M. Karger, Basel. pp. 44—49, 1990.
3. 戸田 昇。オキシヘモグロビンと脳血管攣縮。Clinical Neuroscience 8 (11) : 1284—1285, 1990.

研究成果

〈方法〉

摘出大脳動脈を用いた実験

イヌおよび日本ザルより麻酔下で摘出した大脳動脈を内皮を損傷しない様に注意しつつラセン状に切開し、条片標本を作成した。標本は 37℃ Ringer-Locke 液中に懸垂し、その等尺性張力変化を記録した。一部の実験では、イヌのクモ膜下腔に自家血（7 ml と 2 日後に更に 3 ml）を注入し、実験的に攣縮をひきおこした脳底動脈を摘出し、その薬物反応性を観察した。

静止時張力下に得られる各種作用薬の収縮作用は $K^+30\text{mM}$ による収縮に対する相対値で表した。弛緩反応を観察する場合には、標本をプロスタグランディン (PG) $F_{2\alpha}$ で予め軽度収縮させ、安定したところで薬物を適用した。弛緩反応はパパベリン 10^{-4}M による最大弛緩に対する相対値で表示した。

一部の標本では、内膜面を綿花で軽く擦過し、内皮細胞を除去した。同一動物より摘出した動脈より内皮保存および内皮除去標本を作成し、両者の反応性を比較することで内皮の役割を推論した。

生体位動物を用いた実験

麻酔下のイヌおよび日本ザルの大槽内(クモ膜下腔)にオキシヘモグロビン (oxyHb) または自家血を注入し、注入前と注入後の時間経過における脳底動脈径を、造影剤注入による血管造影によって径測した。薬物の静脈内処置は、oxyHb 投与 1 時間前より始めて 5 時間持続した。全身血圧は大腿動脈に挿入したカテーテルより測定した。

プロスタグランディン (PG) の定量

イヌおよび日本ザルより摘出した大脳動脈（内皮正常および除去）を栄養液に浸漬し、15 分間に液中に遊離される PGE_2 、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ および 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ の量を放射性免疫測定法により定量した。動脈は oxyHb で刺激され、同刺激に対するインドメタシンの効果を検討した。

〈実験成績と考察〉

1. オキシヘモグロビン (oxyHb) の作用

oxyHb はクモ膜下出血後 1 週間前後にひきおこされる脳血管攣縮 (スパズム) の主な原因物質と考えられている。

(a) 摘出大脳動脈に対する作用

oxyHb は用量に応じてイヌおよびサルの大脳動脈を収縮した。その程度はサルの動脈で明らかに著しかった (論文 5)。また、イヌ、サルともに oxyHb は脳以外の部位の動脈 (冠、腸間膜、腎および大腿) を殆ど収縮しなかった。oxyHb は大脳動脈を選択的に強く収縮するといえる。同様の特徴は、赤血球を溶血させた際の上清液 (hemolysate; oxyHb を始め赤血球中の水溶性物質を含む) においても観察された (出版物 2, 3)。oxyHb と hemolysate による収縮は動脈の内皮を除去すると著しく抑制されたことより、これらの物質は内皮より血管収縮物質を遊離して大脳動脈を収縮させると考えられる。

oxyHb と hemolysate の収縮作用はアスピリン、インドメタシンなどシクロオキシゲナーゼ阻害薬処置によって強く抑制された。このことは、アラキドン酸より合成される PG やトロンボキサン ($\text{Tx})_A_2$ が関与することを示している。事実、PG や Tx_A_2 の収縮作用を遮断する拮抗薬 ONO 3704 や DPP (diphloretin pho-

sphate) は、oxyHbとhemolysateの収縮を抑制した。しかし、TxA₂の合成阻害薬はこれらの収縮を抑制しなかった。放射性免疫測定法において、oxyHbはイヌとサルの大脳動脈からのPGの遊離を促進し、その遊離はインドメタシン処置によって遮断されることが認められた(論文5)。

以上の成績と、PGF_{2α}およびPGE₂が大脳動脈を強く収縮することから、oxyHbとhemolysateは主として血管内皮よりPGF_{2α}、PGE₂などを遊離して大脳動脈を収縮させることが結論される。

oxyHbを予めアスコルビン酸と50分間incubateしたのちアスコルビン酸のみを除いた液は、もはやoxyHb様の強い大脳動脈収縮を示さなかった(論文9)。クモ膜下出血患者の脳室をアスコルビン酸入りの人工脳脊髄液で灌流すると脳血管攣縮が防止されるが、その理由は、oxyHbがアスコルビン酸処理によって変性し、大脳動脈収縮と弛緩反応抑制の効果が著しく減弱したことによると結論される。

(b) 生体位イヌおよびサル脳底動脈に対する作用

麻酔イヌおよびサルのクモ膜下腔にoxyHb(2g/dl, 5ml)を注入すると、脳底動脈の収縮が漸次進行し、2~3時間後に最大約50%の動脈径の減少を認めた。PGF_{2α}およびPGE₂クモ膜下腔注入も又一過性の強い脳底動脈収縮をひきおこした。アスピリンの持続注入はoxyHbによる血管攣縮をほぼ完全に阻止した(文献8)。アスコルビン酸で処理したoxyHbは脳底動脈攣縮をひきおこさなかった(論文9)。

以上の成果から、oxyHbは自家血に比べて早期に攣縮を誘発するが、血液と同程度の強い動脈収縮をひきおこすこと、この収縮には動脈壁からのPGの遊離が関与することが示唆される。本研究はin vivoにおいても、先に述べたin vitroの成績と極めて類似の結果が得られることを始めて証明した。oxyHbによる脳底動脈攣縮のモデルは、攣縮誘発の機序を更に詳しく追究するのに有用であろう。

2. 実験的に攣縮をひきおこした脳底動脈の薬物反応性

麻酔イヌのクモ膜下腔に自家血を2回(初日に7ml, 3日目に3ml)にわたって注入すると、初回の注入より1週後に最も著しい脳底動脈の攣縮が観察された。攣縮極期の同動脈を摘出し、攣縮開始早期、攣縮緩解後および無処置(対照)のイヌより摘出した脳底動脈と、各種化学物質に対する反応性を比較した。K⁺30mMによる収縮には差が見られなかった。PGF_{2α}、セロトニン、ノルアドレナリンおよびoxyHbの収縮作用は攣縮脳底動脈で強かった。一方、サブスタンスP、PGI₂、アラキドン酸などの弛緩作用は攣縮動脈で減弱した(論文10)。血管収縮性物質に対する反応の増強と拡張性物質に対する反応の減弱が、脳底動脈の持続性収縮をひきおこす一因子であると考えられる。

麻酔イヌより摘出した大脳動脈を、24時間oxyHbを含む栄養液と含まない液(対照)に浸漬し、両者の反応性を比較した。oxyHb処置は収縮作用を有意に変化しなかったが、サブスタンスP、K⁺(5mM)、PGI₂などの弛緩物質の作用を抑制した(論文1)。生体位で血液を処置した場合に比べ、in vitroでoxyHbを処置した場合の変化は軽度であった。

3. 大脳動脈収縮性生体内物質の作用

ヒスタミンは、ヒトおよびイヌより摘出した太い大脳動脈を用量に応じて収縮した。この収縮には平滑筋細胞のH₁受容体が関与するようである。他方、ヒトの遠位部大脳動脈はヒスタミンにより弛緩した。サルの動脈でも同様であった。これらの弛緩作用は内皮除去によって収縮に転じた(論文6)。ヒスタミンによる収縮がヒト大脳動脈で強力であり、内皮の損傷によって収縮が増強することから、肥満細胞由来のヒスタミンが血管攣縮に関与する可能性が考えられる。この際、H₁受容体拮抗薬が有効である。ただし、クモ膜下出

血と血管周辺の肥満細胞の動き、同細胞からのヒスタミン遊離の関係などについて更に検討の必要があろう。

アンジオテンシンⅡのイヌおよびサル大脳動脈収縮作用は、末梢の他の動脈に比べて軽度であった。大脳動脈収縮は内皮を除去すると著しく減弱し、アスピリンやインドメタシンの前処置によって消失した。しかし Tx A_2 合成阻害薬の影響を受けなかった。したがって、大脳動脈では、アンジオテンシンⅡの収縮に、内皮からの PG の遊離が重要な役割を果たすと考えられる（論文 7）。この機序は腸間膜や大腿動脈のそれと著しく異っている。

4. 内皮依存性弛緩反応

イヌの大脳動脈条片標本では、サブスタンス P、バゾプレッシン、カルシウム イオノフォア (A 23187) などは内皮依存性の弛緩をひきおこし、oxyHb やメチレンブルーの前処置はこれらの弛緩作用を消失することから、内皮由来弛緩因子 (EDRF) を介する反応であると考えられる（出版物 1）。サルの脳動脈におけるヒスタミン、ADP および A23187 の弛緩作用もまた EDRF を介するものである（論文 11）。oxyHb や hemolysate は EDRF を介する弛緩反応を消失させ、血管の収縮傾向をたかめる為に、これら赤血球関連物質の大脳血管への作用はこの点でも動脈に攣縮をもたらす可能性がある。

5. カルシウム拮抗薬と大脳動脈収縮

カルシウム拮抗作用を示すフルナリジン（論文 2）とフェロジピン（論文 3）は、従来のカルシウム拮抗薬と同様、大脳動脈収縮を末梢動脈収縮以上に強く抑制した。oxyHb の大脳動脈収縮を強く抑制するニカルジピンの用量は、in vivo においても oxyHb による脳底動脈攣縮を防止した（論文 12）。この時ニカルジピンは全身血圧を低下しなかった。これらの事実は、カルシウム拮抗薬が大脳動脈に比較的選択的に働き、脳血管攣縮を予防することを示唆している。

血中マグネシウムの低下は大脳および冠動脈の攣縮を誘発し易くするという。マグネシウムは生体にあるカルシウム拮抗薬との考えもあるが、摘出イヌ大脳動脈を用いた今回の実験ではカルシウム拮抗薬の作用との明らかな相違が認められた。主な相違は、マグネシウムは電位依存性カルシウムチャンネルを選択的に遮断しないこと、細胞内貯蔵部より遊離されるカルシウムの作用を抑制することにあった。作用機序は異っても、脳血管攣縮防止作用が期待される点では、マグネシウムもカルシウム拮抗薬と同様である（論文 4）。

〈ま と め〉

クモ膜下出血後にみられる遅発性脳血管攣縮には、大脳動脈をとりまく大量の凝固血液が重要な役割を果たすと考えられる。血液成分の中で、出血後 1 週間前後に強い動脈収縮をひきおこす物質として oxyHb が有力である。本実験では、摘出および生体位のイヌとサルの大脳動脈を用いて oxyHb の収縮に内皮からのプロスタグランディン (PG) の遊離が重要であることを始めて証明した。血管攣縮には oxyHb の収縮作用に加えて、大脳動脈拡張因子 (PGI_2 , EDRF, ナトリウムポンプ, 血管拡張神経など) の遮断も極めて重要である（印刷物 3）。この様にして誘発される血管攣縮は、カルシウム拮抗薬、シクロオキシゲナーゼ阻害薬、マグネシウム、ヒスタミン H_1 拮抗薬などの他に、クモ膜下腔のアスコルビン酸を含む溶液による灌流によって防止される可能性が、今回の動物実験の結果から強く示唆される。