

●原 著

急速減圧暴露によるラット脳の血液脳関門,
微小循環と組織学的変化野原 敦* 湯佐 祚子**
佐久田 治*** 平田 幸男****

空気にて1回又は2回, 6 ATAに加圧し, 60分又は90分間保圧後急速減圧したラット脳における血液脳関門, 微小循環及び組織学的な変化を検討した。

血液脳関門の破綻をみるため, 加圧前に2% Evans BlueをControl群(5匹)と実験群(20匹)に静脈内投与した。急速減圧15分後にラット脳を灌流・固定し, 肉眼的に色素の漏出を観察すると共に組織学的検討を行った。

微小循環は, 他のControl群(1匹)と1回加圧群(2匹)に灌流・固定後, 墨汁(直径0.6~0.8 μm の粒子)を投与して観察した。

実験群ではEvans Blueの漏出と墨汁の非充えい部が広範囲にみられ, 樹脂包埋脳切片の組織学的検査では浮腫状組織, 血管周囲腔の拡大及び神経細胞の変性がみられた。更に小血管内には赤血球が残存しており, 微小循環障害が示唆された。

これらの所見より, 急速減圧後の脳では血管内気泡の発生により, 早期に血液脳関門の破綻と微小循環障害が起こると考えられたが, 神経細胞の変性は, 組織内に直接発生した気泡による可能性が示唆された。

キーワード: 加圧-減圧, 気泡, 血液脳関門, 脳微小循環, ラット脳組織

Blood-brain barrier, microcirculation and histological changes in the rat brain by dysbaric exposure

Atsushi Nohara*, Toshiko Yusa*** Osamu Sakuta*** Yukio Hirata****

*Department of Hyperbaric Medicine, University of the Ryukyus, Faculty of Medicine

**Department of Anesthesiology, University of the Ryukyus, Faculty of Medicine

***Department of Neurosurgery, University of the Ryukyus, Faculty of Medicine

****Department of Anatomy, University of the Ryukyus, Faculty of Medicine

The brains of the rat subjected to single or

twice experimental compression to 6 ATA air for 60 or 90 min and subsequent rapid decompression were examined of the changes in the blood-brain barrier, microcirculation and the histology.

2% Evans blue solution was injected intravenously into 20 experimental and 5 control rats before hyperbaric exposure to reveal the disruption of the blood brain barrier. Fifteen min after rapid decompression, rats were perfusion-fixed for gross and histological examination. In one control and two experimental (single exposure groups) rats, perfusion-fixation was followed by the perfusion with Indian ink (particles 0.6-0.8 μm in diameter) to demonstrate the way of cerebral microcirculation.

Gross examination of the brains of experimental groups disclosed the presence of wide area stained with Evans blue and the regions of defective filling of vasculature with Indian ink. Light microscopic examination of plastic-embedded sections demonstrated the edematous brain tissue with enlarged perivascular space and degenera-

*琉球大学医学部附属病院高気圧治療部

**琉球大学医学部麻酔科学教室

***琉球大学医学部脳神経科学教室

****琉球大学医学部第一解剖学教室

tive nerve cells. In spite of perfusion done, some blood cells were found in the lumen of microvasculature, suggesting the defective perfusion through these areas.

These results indicate that after rapid decompression, blood-brain barrier and cerebral microcirculation are immediately derailed by intravascularly formed air bubbles. The neuronal tissue damages found were, however, suggested to be caused by a gas phase in tissue evolved in situ.

Keywords : _____

compression-decompression
air bubble
blood-brain barrier
cerebral microcirculation
rat brain histology

はじめに

減圧症の病因として Trigger となるのは気泡の発生であり、発生の部位、程度や気泡の二次的作用により様々な臨床的症狀がみられる。臨床的に重症度の高い Type II 減圧症では中枢神経系の障害が主体であるが頻度及び治療面より特に脊髄障害が問題となるため、多くの病理学的、病態生理学的研究は脊髄に焦点がおかれている。我々の400例を超える減圧症例中、Type II型の割合は約20%を占め、その内、脊髄障害の頻度は約75%でType II型の大部分を占め、脳障害は5%にも充たない¹⁾。

最近、Type II減圧症と診断され再圧治療を受けた症例において、再圧治療より1カ月以内に行った脳血流測定で脊髄型減圧症と診断されていたすべての患者に、脳血流障害がみられたことが報告され、運動知覚障害の一部が脳障害によるものであり得ることも示唆されている²⁾。更に、急性減圧症の剖検症例においても脳の組織学的所見が報告されている³⁾。

我々の臨床例でも、完全脊髄横断症状を示すような重症脊髄障害症例では一過性の意識消失など脳の症状が先行していることが多く、実際には脳障害がかなりの頻度で存在する可能性がある。しかし、減圧症における脳の病理学的、病態生理学的な研究としては血液脳関門の破壊^{4)~8)}について以外の報告がほとんど見出せない。

今回我々は、急速減圧ラット脳における減圧性気泡の血液脳関門及び微小循環に与える影響と共に組織学的所見について検討したので報告する。

方 法

1. 血液脳関門への影響

体重250から350gのWistar系ラットの雄28匹を用いた。これらの内25匹については、予め加圧20分前に2% Evans Blue液3.5ml/kgを静注した後、これを動物用小型チャンバー(羽生田鉄工所製)において、1.67kg/cm²/minの速度で6ATAまで圧縮空気により加圧し60分または90分間保圧の後に1.67kg/cm²/minの速度で急速減圧を行った。ラットは5匹ずつ次の5つの群に分けた。第I群がcontrol群、第II群が60分間保圧1回のみ群、第III群が60分間保圧し減圧後、10分間の間隔をおいたのち再度同様の加減圧を繰り返した群、第IV群が90分間保圧1回のみ群、第V群が90分間保圧後減圧し10分間の間隔の後再度同様の加減圧を繰り返した群とした。減圧後、ラットは15分間放置した後、0.17mg/g BWのネプタール®を腹腔内投与後開胸し、左心室よりヘパリンを加えた生理食塩水200mlと10% Formal saline 200mlにて90mmHgの圧力で灌流、固定した。尚、これら灌流の際は、右心耳を切開し放血させた。摘出した脳はそのまま及び断面を作り、肉眼的に観察しEvans Blueの漏出による組織の着色の有無をみた。

2. 急速減圧による脳微小循環の変化

前項の第I群、第II群、第IV群の各群について1例ずつEvans Blueの投与を行わず、灌流・固定後、粒子の直径0.6~0.8μmの墨汁を注入し、脳内毛細血管への墨汁の充えいの状態を肉眼的に観察した。

3. 組織学的検討

アルデヒドで灌流・固定後、組織を細切し、2%オスミウム酸で約2時間、後固定したのち、Epoxy樹脂に包埋した。その後2μmの切片を作成し、トルイジンブルー・サフラニンで染色し組織学的に検討した。

結 果

加減圧例では何れも生理食塩水で灌流中、切開した右心耳からの血液中には肉眼で気泡の存在が

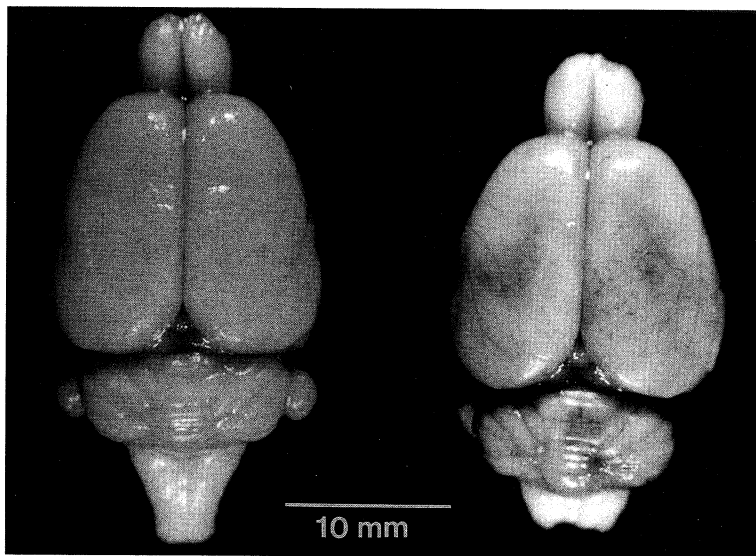


図1 脳背側面での Evans Blue 漏出

左側 Control 群, 右側60分1回群, 実験群に Evans Blue 漏出がみられる。

表1 各群における Evans Blue(EB)の漏出

(各群共6 ATA 加圧)

	条 件	n	EB 漏出
第I群	Control	5	0
第II群	60分保圧×1回	5	2
第III群	60分保圧×2回	5	3
第IV群	90分保圧×1回	5	4
第V群	90分保圧×2回	5	4
計		20	13

みられ, 又, 脳摘出時には脳表血管内に気泡が認められた。

1. 血液脳関門への影響

肉眼的観察で対照群では認められない部位への色素の漏出は加減圧施行群の20例中13例にみられた。各群別にみると第II群で5例中2例, 第III群で3例, IV群, V群で4例にみられた(表1)。実験群において, 大脳外側面と小脳とくに虫部の背側面に色素の漏出が観察されたが control 群では認められなかった。松果体及び正中隆起は control, 実験群共に染まっていた(図1)。実験群では大脳半球の吻尾軸の吻側2/3と尾側1/3の境界付近での前額断面でみると, 大脳皮質及び白質の一

部分と海馬及び視床の一部に control 群ではみられなかった色素の漏出が認められた(図2A)。

2. 墨汁注入例

急速減圧ラットでは明らかな非充えい部がみられた。control では脳梁を中心とした白質を除いて全体的に墨汁がはいっているが, 実験群では間脳の背側部分の他, Evans Blue で着色された部位とほぼ一致して, 非充えい部が広い範囲でみられた(図2B)。

3. 組織学的所見

急速減圧負荷群の大脳背側面の皮質と背側海馬で, 径約6.5~32.0 μ mの動静脈のVirchow-Robin腔ないし血管周囲腔の拡大がみられ, ときにこの腔内に繊維様の構造がみられた。一部ではこの腔内への出血もあった。又, 著しく濃染した細胞が血管周囲腔の拡大した部位の近くに存在した。ニューロピルは, しばしば空胞状, 海綿状を呈しており浮腫の存在を示していた。灌流を行っているにもかかわらず血管周囲腔の拡大した部位付近では血管内に赤血球の残存がみられた。色素漏出のみられた部位に一致して, とくに大脳皮質IV層, 海馬錐体細胞層において, 萎縮し濃染した変性しかかった神経細胞, いわゆるダークニューロンがしばしばみられ, 血管周囲腔の拡大がみられた。又, 極めて小さな血管(径約6.5 μ m)にも

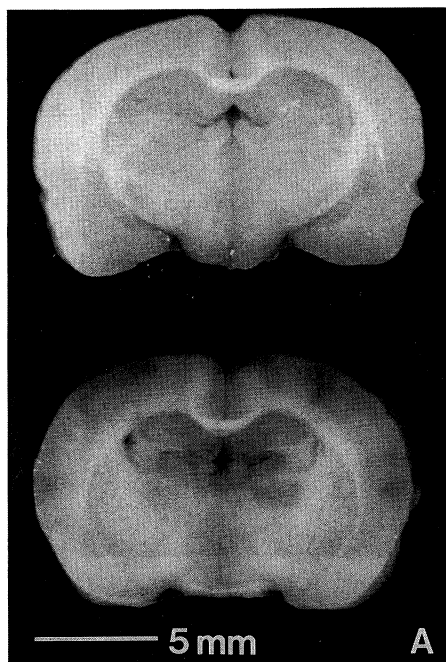
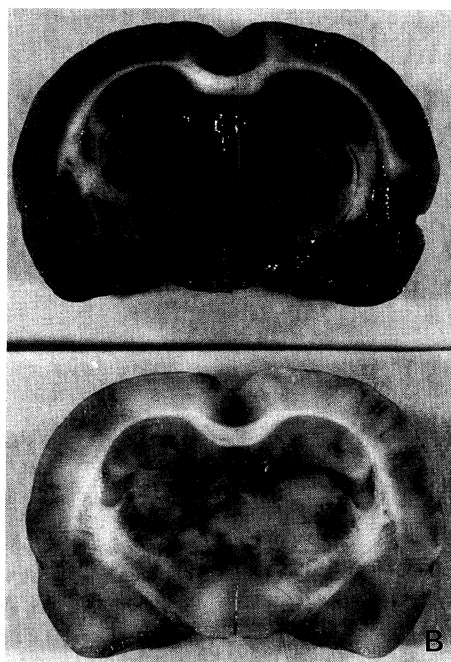


図2A：脳前額断での Evans Blue 漏出
上側 Control 群，下側60分1回群の前
額断。実験群に Evans Blue 漏出がみ
られる。



B：脳前額断での墨汁注入例
上側 Control 群，下側90分1回群，実験群
で明らかな非充えい部がみられる。

周囲腔の存在がみられた(図3A, 図3C)。又，大脳皮質の第I層の表層半は空胞状海綿状を呈し浮腫状の変化が強かった(図3B)。

考 察

病態生理学的にみると，減圧症では生体内に発生した気泡は局所で機械的に組織を圧迫すると共に，血管作動性物質，キニン，補体(C3)などを遊離活性化して毛細血管の透過性を増大させ，浮腫などの炎症性反応を起こす。血管内に発生した気泡は塞栓として流体力学的に血液粘性の増大を伴った末梢循環障害を起こす。更に血管内皮細胞の障害や血液-気泡相互作用による表面張力の変化により血液の蛋白構成に変化を及ぼし，血小板凝集，赤血球の clumping が起こると共に，XII因子を活性化して一連の凝固系の変化を起こすとされている⁹⁾。これらの変化は究極的には組織の hypoxia を生じ，これにより種々の症状を来すと考えられる。

今回の実験により急速減圧ラットにおいては減

圧後20分ですでに血液脳関門(BBB)の破綻とこれにほぼ一致した部位での微小循環の障害が示唆されると共に，後述するように血流障害即ち虚血性変化のみでは説明できない組織学的所見がみられた。

急速減圧時における脳血管透過性の変化については Trypan Blue(TB)，Evans Blue(EB)などの色素，Horseradish peroxidase(HRP)や Sodium fluorescein(NaFl)を tracer とし，種々の動物について各種の実験条件下で検討されている。Chryssanthou らは 90 psig, 12分の加圧後，急速減圧したウサギに TB を静注し，BBB 破綻を初めて報告した⁹⁾。Gruenau らはモルモットで EB を tracer とし 6.5 ATA 30分加圧で N₂, O₂混合気の比率を変化させ，N₂分圧が 2ATA 以上で漏出が起こると報告⁵⁾，Tervo らはラットを 5.1 bar に加圧し NaFl を tracer とし減圧後15分間の漏出を検討した結果，50分間加圧群では漏出はみられないが120分間加圧群では皮質への漏出があるとしている⁹⁾。Lehtosalo らはラットを 6.1

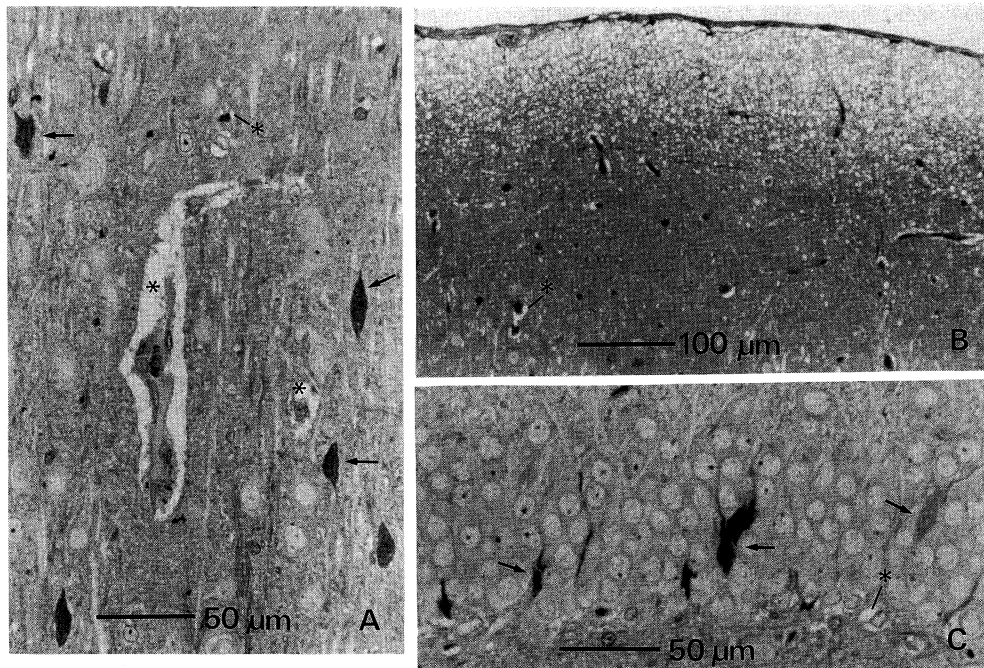


図3 A: 実験群 大脳皮質第IV層

ダークニューロン(矢印)と血管周囲腔の拡大(*)がみられる。

B: 実験群 大脳皮質第I層

浮腫状の空胞と、周囲腔の拡大した小血管がみられる。

C: 海馬錐体細胞層

ダークニューロン(矢印)と血管周囲腔の拡大(*)がみられる。

bar90分間加圧後減圧し、HRPを静注して漏出を認めると共に電顕による検討を行い、HRPの漏出は経内皮細胞、即ち Vesicular transport の増加であるとしている⁷⁾。我々の実験条件と同じくラットで6.1ATA90分加圧後減圧したKaakkolaら⁸⁾もEBの漏出を報告している。TracerとしてNaFlは蛋白と結合せずmicromolecular barrier tracerと考えられるが、我々が使用したEBは血清蛋白と結合が強くprotein tracerと考えられることはTB、HRPと同様であり¹⁰⁾ Control群では松果体及び正中隆起以外での漏出はみられなかった。

BBBは種々の化学的、物理的要因により影響を受けるが、減圧時のBBBの破綻に関係すると考えられるのは空気塞栓と、それによる虚血の影響である。虚血のみでは数時間以上にわたってもBBBは障害されないこと¹¹⁾¹²⁾、死後1時間迄はBBB破綻は起こらないこと¹³⁾が報告されている

のに対し、空気塞栓では極めて早期にBBBが破綻するとされている¹⁴⁾。我々の実験では急速減圧終了より固定までが約20分以内であり、脳虚血のみではBBB破綻はまだ生じていない筈である。今回、このような早期でBBBの破綻を示すEBの漏出がみられたことは血管内気泡による作用と考えられる。血管内気泡と血管透過性増加が密接に関係があることもすでに報告されており⁴⁾⁵⁾、我々の実験でも気泡形成が多いと考えられる条件(90分保圧群)下でEBの漏出が多かった。

我々と同じ実験条件(ラット、6ATA、90分加圧)での電顕観察によると⁷⁾⁸⁾、EB、TBの漏出は小動脈からが主体であること、内皮細胞には機械的障害がなく、junctionにもtracerが入っていないこと、HRPの漏出部位は内皮細胞に小胞が多数みられる領域と一致することなどより、減圧によるBBB破綻は経内皮細胞輸送の増加と考えている。我々の実験例では早期にBBB破綻と浮腫

が同時に見られたが、様々な要因による脳血管障害ではBBB破綻と浮腫は必ずしも結び付かないとされている¹³⁾。更に、墨汁注入例では、色素漏出部位とほぼ一致して広い範囲で非充えい部がみられ、微小循環の障害も示唆された。

減圧症による中枢神経系障害の病因のうち脊髄障害の主病因に関しては動脈内空気塞栓、静脈性循環障害が考えられてきた。しかし、最近 autochthonous bubble、即ち組織内での気泡発生が脊髄障害発生の重要因子であることが示唆されている¹⁵⁾¹⁶⁾。一方脳障害の場合は動脈性空気塞栓が主だとされている¹⁷⁾。我々が組織学的に認めたダークニューロンは、血管内気泡発生や、その二次的変化である微小循環障害としての虚血性変化としてみるには、その出現が時期的に早期であり、これらは autochthonous bubble による可能性があると考えられる。しかし、Francisら¹⁵⁾が認めたような染色されない space-occupying lesion は脳実質内に認めなかった。

減圧症では前述のように臨床的には脳症状はみられないことが多い。しかし、今回の実験結果より、症状がなくてもBBBの破綻や更に、BBB破綻による薬物の血管透過性の変化も生じている可能性があることから⁸⁾¹⁸⁾、減圧症患者への薬物投与の際には注意が必要であろう。

急速減圧時におけるBBB障害はEB漏出でみるかぎり可逆的であるとされている⁵⁾。一方、減圧症 Type II 患者の再圧治療後、1カ月以内で⁹⁹Tc^mを使用した single photon emission tomography による脳血流測定によると、全ての患者に血流障害が認められたという²⁾。兎を対象とした内頸動脈内 air 注入実験でも注入 air 量に関係なく脳血流量減少は起こるが脳機能障害は注入 air 量に相関することが報告されている¹⁹⁾。更に減圧症の剖検例でみられた脳実質の著名な浮腫、血管周囲の pallor spot や壊死³⁾は減圧による変化と共に死後の変化が重複している可能性がある。したがって、今回我々が認めた所見の時間的経過については更に検討する必要があると考えている。

結 論

急速減圧ラットの脳では、加圧前に注入した Evans Blue により脳組織が着色し、BBBの破綻

がうかがえた。又、墨汁注入例においては広範囲な部分での非充えい部が観察されたことから微小循環に大きな障害の起きていることが示唆された。組織学的観察からは浮腫の存在、血管周囲腔の拡大、小血管内での赤血球の残存、神経細胞の変性等が見出された。これらの組織学的所見は急速減圧直後の所見であることから、血管内での気泡発生を trigger として発生する微小循環の障害による虚血性変化とは考えにくく、BBB破綻による変化と共に組織内に直接発生した気泡による組織の障害である可能性が示唆された。

本研究の一部は沖縄県疾病研究財団助成金により行った。

【参 考 文 献】

- 1) 湯佐祚子：減圧症の治療と予防。日高圧医誌, 21: 1-8, 1986
- 2) Adkisson GH, Macleod MA, Hodgson M, Sykes JJW, Smith F, Strack C, Torok Z, Pearson RR: Cerebral perfusion deficits in dysbaric illness. *Lancet* 2: 119-122, 1989
- 3) Kitano M, Urago A, Hayashi K, Kawashima M, Funakoshi K, Yamada K, Tokufuji S: A pathological study on cerebral lesions in diver's decompression sickness (DCS). *South Pacific Study* 10: 275-285, 1990
- 4) Chryssanthou C, Springer M, Lipschitz S: Blood-brain and blood-lung barrier alteration by dysbaric exposure. *Undersea Biomed Res* 4: 117-129, 1977
- 5) Gruenau SP, Folker M, Rapoport SI: Blood-brain barrier opening after explosive decompression from hyperbaric N₂-O₂ mixture. *Exp Neurol* 66: 238-247, 1979
- 6) Tervo T, Lehtosalo J, Lehto V-P, Heino M, Kantola I, Laitinen LA: Permeability changes in cerebral, iridic, and retinal vessels during experimental decompression sickness in the rat. *Aviat Space Environ Med* 51: 137-141, 1980
- 7) Lehtosalo J, Panula P, Laitinen LA: The permeability alteration of brain and spinal cord vasculature to horseradish peroxidase during experimental decompression sickness as compared to the alteration in permeability induced by hyperosmolar solution. *Acta Neuropathol* 57: 179-187, 1982
- 8) Kaakkola S, Lehtosalo J, Laitinen LA: Changes in blood-brain barrier permeability to

- drugs in decompressed rats. *Undersea Biomed Res* 9: 233-240, 1982
- 9) Hallenbeck JM, Anderson JC: Pathogenesis of the decompression disorders. In Bennett PB, Elliott DH (eds): *The Physiology and Medicine of Diving*. 3rd Ed. London, Baillière Tindall, 1982, p. 435-460
 - 10) Wolman M, Klatzo I, Chui E, Wilmes F, Nishimoto K, Fujiwara K, Spatz M: Evaluation of the dyeprotein tracers in pathophysiology of the blood-brain barrier. *Acta Neuropathol* 54: 55-61, 1981
 - 11) O'Brien MD, Jordan MM, Waltz AG: Ischemic cerebral edema and the blood-brain barrier. *Arch Neurol* 30: 461-465, 1974
 - 12) Pulsinelli WA, Brierly JB, Plum F: Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 11: 491-498, 1982
 - 13) 佐々木富男, 椿 真一, 野口 信, 高倉公明, 城下博夫, Kassell NF: 脳血管障害と血液脳関門. *神経進歩*, 32: 985-995, 1988
 - 14) Dutka AJ: A review of the pathophysiology and potential application of experimental therapies for cerebral ischemia to the treatment of cerebral arterial gas embolism. *Undersea Biomed Res* 12: 403-421, 1985
 - 15) Francis TJR, Pezeshkpour GH, Dutka AJ, Hallenbeck JM, Flynn ET: Is there a role for the autochthonous bubble in the pathogenesis of spinal cord decompression sickness? *J Neuropathol Exp Neurol* 47: 475-487, 1988
 - 16) Francis TJR, Griffin JL, Homer LD, Pezeshkpour GH, Dutka AJ, Flynn ET: Bubble-induced dysfunction in acute spinal cord decompression sickness. *J Appl Physiol* 68: 1368-1375, 1990
 - 17) Francis TJR, Dutka AJ, Hallenbeck JM: Pathophysiology of decompression sickness. In Bove AA, Davis JC (eds): *Diving Medicine*, 2nd Ed. Tokyo, W.B.Saunders Company, 1990, p. 170-187
 - 18) Chryssanthou C, Graber B, Mendelson S, Goldstein G: Increased blood-brain barrier permeability to tetracycline in rabbits under dysbaric conditions. *Undersea Biomed Res* 6: 319-328, 1979
 - 19) Helps SC, Meyer-Witting M, Reilly PL, Gorman DF: Increasing doses of intracarotid air and cerebral blood flow in rabbits. *Stroke* 21: 1340-1345, 1990