

●原 著

急速減圧ラット脳の経時的变化 —微小循環、血液脳関門及び組織学的変化について—

野原 敦* 湯佐 祚子** 平田 幸男***

6 ATA に空気加圧し、90分間保圧の後、急速減圧を行ったラット62匹において、減圧後0:25, 0.5, 1, 3, 6, 12, 24時間後の群に分けて血液脳関門、脳微小循環、組織学的変化を検討した。

血液脳関門の破綻はラット30匹を用い、Evans blue の漏出により評価した。脳微小循環の観察については、他のラット32匹で同上の各群において灌流固定後に墨汁（直径0.6~0.8 μ m）を注入し、その充えい状態で検討した。肉眼的、組織学的観察はラットを急速減圧後、灌流・固定の後に行った。

減圧15分後には以前の報告と同様 Evans blue の漏出と墨汁の非充えい部が広範囲にみられ、経時的観察ではこれらの変化は約3時間で見られなくなった。又、組織学的変化でも以前の実験と同様、浮腫状の脳組織、血管周囲腔の拡大、濃染した神経細胞が減圧直後において観察され、1時間以内には対照群と区別できなくなった。

これらの可逆的变化は血管内微小気泡あるいは脳組織内発生氣泡による物理・化学的影響によると考えられた。

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

Reversibility of acute dysbaric changes in blood-brain barrier, microcirculation and histology of the rat brain

Atsushi NOHARA* Toshiko YUSA*** Yukio HIRATA***

* Department of Hyperbaric Medicine

** Department of Anesthesiology

*** Department of Anatomy

University of the Ryukyus, Faculty of Medicine

The brains of 62 rats exposed to experimental compression to 6 ATA air for 90 min. and subsequent rapid decompression were examined for the changes in blood-brain barrier, cerebral microcirculation and histology at 0.25, 0.5, 1, 3, 6, 12 and 24 hrs after decompression.

The disruption of the blood-brain barrier was evaluated in 30 rats by Evans blue extravasation. The way of cerebral microcirculation was demon-

strated by the perfusion with Indian ink (particles 0.6-0.8 μ m in diameter) after perfusion-fixation in the another 32 rats. For gross and histological examination, rats were perfusion-fixed at each observation period after rapid decompression.

The presence of wide area stained with Evans blue and the regions of defective filling of vasculature with Indian ink that were observed immediately after decompression as reported previously decreased as the time elapsed after decompression and were almost undetectable 3 hrs after decompression. The edematous brain tissue with enlarged perivascular space and darkly stained nerve cells same as those observed in previous experiment immediately after decompression also decreased with time and the presence of dark neurons was indistinguishable from the control within one hour.

These reversible derangements were interpreted to be the physiochemical effects of intravascularly formed microbubbles or a gas phase evolved in situ on the brain tissue.

*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

***琉球大学医学部第一解剖学教室

Keywords :

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

はじめに

最近、タイプII減圧症と診断され、再圧治療を受けた患者の脳において血流低下の報告¹⁾がなされており、本症においてかなりの頻度で脳障害が発生している可能性がある。我々も臨床例で減圧症発生現場での一時的な意識消失や発語障害の発生を報告²⁾したが、更に動物実験で急速減圧直後のラット脳では減圧直後に血液脳関門の破綻により血管透過性の亢進がみられること、脳の広い範囲で微小循環障害が起きている可能性が示唆されること、更に組織学的検討により神経細胞の変性と、大小の血管に周囲腔の拡大がみられることを報告³⁾した。今回、急速減圧後の血液脳関門破綻の可逆性、また微小循環障害、組織学的所見の経時的変化について検討したので報告する。

方 法

Wistar系ラットの雄250gから300g62匹を用い、血液脳関門への影響をみるためEvans blueを血管内に投与したEB投与群(30匹)と脳微小循環の変化をみるため墨汁を注入した墨汁注入群(32匹)に分けた。急速減圧ラットの作成は、前回と同様、羽生田鉄工所製動物用小型チャンバーを用いて3分で6 ATAまで圧縮空気により加圧し、90分間保圧の後に1.67kg/cm²/minの速度で急速減圧を行った。

急速減圧後15分、30分、1、3、6、12、24時間で経過観察を行った。減圧直後大部分のラットで、体毛の逆立ち、活動低下、呼吸の異常、苦悶等の症状がみられた。減圧直後、呼吸不全によると思われる死亡は15分以内に起こり、15匹にみられたが検討の対象外とした。両群とも、各時間に3～5匹ずつ固定し、減圧を行わない5匹を対照群とした。

1. 血液脳関門への影響

Evans blue投与群はラット30匹で、灌流固定の

10分から15分前に2% Evans blue水溶液3.5cc/kgを尾静脈より静注した。各時間ごとに0.17mg/gのネプタール®を腹腔内投与後、開胸を行い、左心室よりヘパリンを加えた生理食塩水200ml、引き続き10% Formalin液200mlで90mmHgの圧力で灌流・固定した。摘出した脳は大脳背側面および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について肉眼的に色素による組織の着色の有無を観察した。

2. 脳微小循環の変化

墨汁注入群においても前群と同様の経過時間毎に10% Formalin液で灌流・固定した後、直径0.6～0.8μmの墨汁50ccを左心室より注入し、脳摘出後、注入した墨汁の充えい状態を肉眼的に大脳背側面及び前群で行ったと同様の断面で観察した。

3. 組織学的検討

Evans blue投与ラット及び墨汁注入ラットを、肉眼観察の後セロイジン包埋を行い、30μmで薄切し連続切片を作成し、これらの切片について0.1%チオニンによりニスル染色を行った。又、別に組織を細切後、1%オスミウム酸で後固定したのちEpoxy樹脂に包埋し、2μmに薄切した。切片はトルイジンブルー・サフラニン染色を施し、組織学的に検討した。なお、脳取り出しの際の挫滅によるアーチファクトの影響をできるだけ抑えるため、灌流・固定後一晚頭部を固定液に浸漬したのち、取り出しを行った。

結 果

EB投与群および墨汁注入群ではじめの3匹で連続してEBの漏出及び墨汁の非充えい部がみられなかった観察時間の検討はn=3でネガティブとした。

1. 血液脳関門への影響

対照群では肉眼的レベルでのEvans blueの漏出は、松果体及び正中隆起でわずかに認められるが、それ以外の大脳背側面や断面ではみられなかった。実験群では減圧後15分で4例、30分後で2例で対照群では認められなかった部位、すなわち大脳半球後頭極の松果体周辺部と小脳の背側面の一部に色素の漏出による青色が見られたが、これ以降の群では対照群との違いは認められなかった(表1, 図1)。

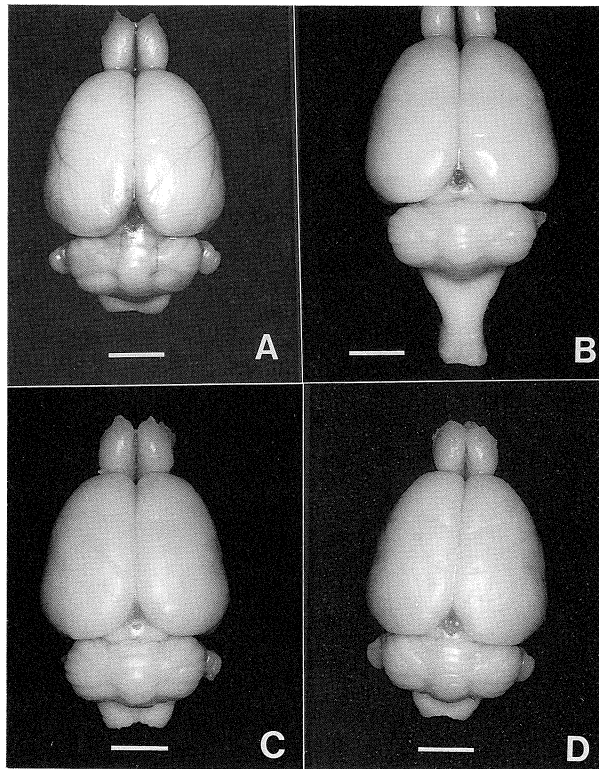


図1 Evans blue 注入群の経時的変化
 A：減圧15分後，B：1時間後，C：3時間後，D：6時間後，Bar=5 mm
 Evans blue 漏出はA（大脳皮質の松果体周辺と背側及び小脳の背側）にみられるがB，C，Dにはみられない。

2. 墨汁注入例の充えい状態

対照群では充えい状態が良好であり，非充えい部はみられなかった。実験群では，15分後で4例，30分後で4例，1時間後で4例に非充えい部がみられ，それ以後の時間では対照群と同様非充えい部はみられなかった(表1)。前額断面で比較観察すると，減圧後15分では背側面大脳皮質，視床後半部の広範囲にわたり墨汁の非充えい部が見られ，30分後でも大脳皮質，海馬，視床と広範囲にみられた。しかし1時間後では皮質の一部のみとなり，その後の時間では見られなくなった(図2)。

3. 組織学的所見

Evans blue 投与群と墨汁注入群の結果より血管透過性と血流障害の経時的変化が示唆されたのでその背景となっているであろう形態学的変化を探るため組織学的な検討を行った。

表1 Evans blue(EB)の漏出と墨汁非充えい部の時間的経過

経過時間	EB 漏出		墨汁の非充えい部	
	有	無	有	無
対 照 群	0例	5例	0例	5例
15 分 後	4	1	4	1
30 分 後	2	3	4	1
1 時間 後	0	3	4	1
3 "	0	3	0	3
6 "	0	3	0	3
12 "	0	3	0	3
24 "	0	3	0	3

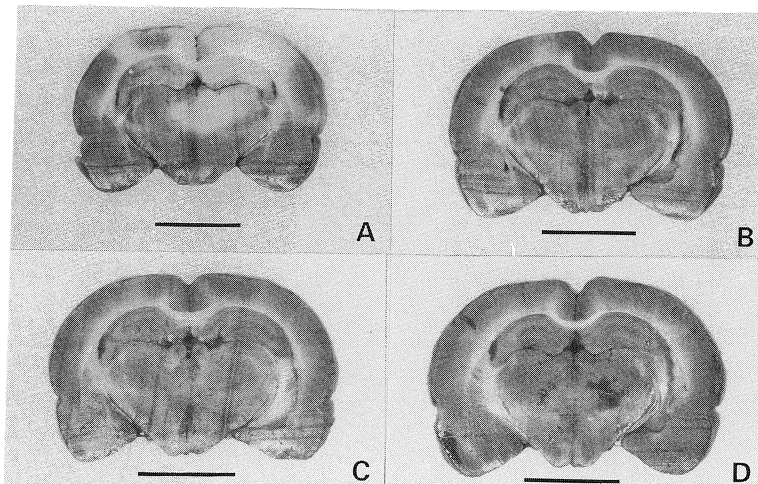


図2 墨汁注入群の経時的変化

A：減圧15分後，B：1時間後，C：6時間後，D：12時間後

Bar=5 mm

非充えい部はAでは皮質と視床，Bでは大脳皮質にみられるがC，Dではみられない。

減圧後15分から6時間後までは大脳皮質の第I層からII層が海綿状変化を呈していたが，12時間後にはそのような変化が見られなくなった(図3)。

減圧後15分後と1時間後においては血管周囲腔の拡大(約 $2\sim 15\mu\text{m}$)した皮質動静脈(径 $6\sim 30\mu\text{m}$)がかなりの頻度でみられたが，3時間後では周囲腔の確認できない血管が多くなり，6時間後では血管周囲腔の拡大は見られなくなった(図4)。又，血管周囲腔の拡大した部位付近では，灌流しているにもかかわらず赤血球の残存している血管があった。

ニッスル染色切片を観察すると，減圧直後群の大脳皮質では，萎縮し濃染した細胞が多数みられ，これら濃染した細胞の細胞質内には空胞の形成もみられた(図5)。これらはいわゆるダークニューロンと呼ばれる細胞であると考えられる。このような変化は，大脳皮質第II層から第IV層にかけて主に錐体細胞に生じており，このようなダークニューロンは，正常なニューロンと混在してみられた(図6)。ダークニューロンは，対照群においても等皮質及び海馬中に小数はあるがみられる。ダークニューロンが最も多くみられた15分後の例

でみると大脳皮質第II層から第IV層にかけての皮質組織 $30\text{万}\mu\text{m}^3$ 中には，正常な神経細胞平均30個に対してダークニューロンは平均3個存在した。実験群と対照群とについて，ダークニューロンの分布の違いを知るため， $30\mu\text{m}$ 連続切片3枚中に観察されたダークニューロンを加算して一枚の模式図上に描いて経時的に比較した(図7)。図でみるように減圧後からの時間経過と共に大脳皮質でのダークニューロン数は減少し，1時間以後は対照群と区別出来なくなった。

考 察

今回の我々の急速減圧ラット脳の経時的変化の検討の結果，急速減圧15分後にみられる Evans blue に対する血液脳関門(BBB)の破綻，微小循環障害を示す墨汁の非充えい部の範囲，微小血管周囲腔の拡大，ダークニューロンの出現，以上の何れの変化も減圧後の時間経過と共に減少していった。

急速減圧時の脳血管透過性の変化については Protein tracer と考えられる我々が使用した Evans blue の他，Trypan blue, Horse-radish peroxidase や micromolecular barrier tracer と

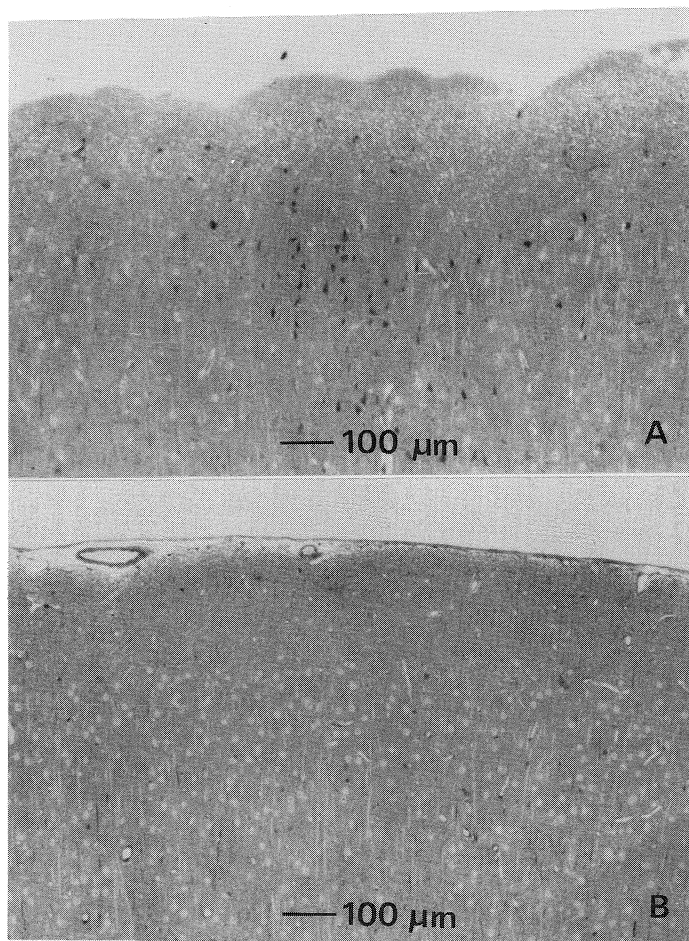


図3 大脳皮質第I層から第II層の組織学的変化

A：減圧15分後，B：減圧24時間後

Aでは大脳皮質表層に海綿状変化及び第II～III層にダークニューロンがみられたがBではみられない。

考えられる Sodium fluorescein を使用し、ラット、ウサギ、モルモットを実験動物として種々の実験条件で検討され、我々と同様に減圧後早期に透過性が増加することが報告されていることを前回報告したが³⁾、時間的経過もしくは可逆性についての詳細な報告はない。Gruenau⁴⁾らはモルモットで種々の N_2-O_2 混合気 (0.5~6.5ATA pO_2 , 6.0~0 ATA pN_2) を使用して3.5~6.5ATA 加圧30分後に減圧して実験し、EB の漏出は少なくとも pN_2 が 2 ATA である高気圧条件よりの減圧で24時間後にみられるが、48時間後には漏出がみられないとしている。我々が行った空気加圧と

ほぼ同じと考えられる条件下では、24時間で漏出があるとしているが24時間以内については不明である。我々の実験では1時間後には漏出はみられなくなった。

中枢神経系が障害される Type II 減圧症では脊髄障害が問題で、その主病因に関しては動脈内空気塞栓、静脈性循環障害と組織内 in situ での気泡発生即ち autochthonous bubble が考えられているが、減圧症での脳症状は動脈内空気塞栓が主体とされている⁵⁾。

急速減圧時の BBB の破綻に関係する要因としてはこの血管内気泡による影響と空気塞栓に起因

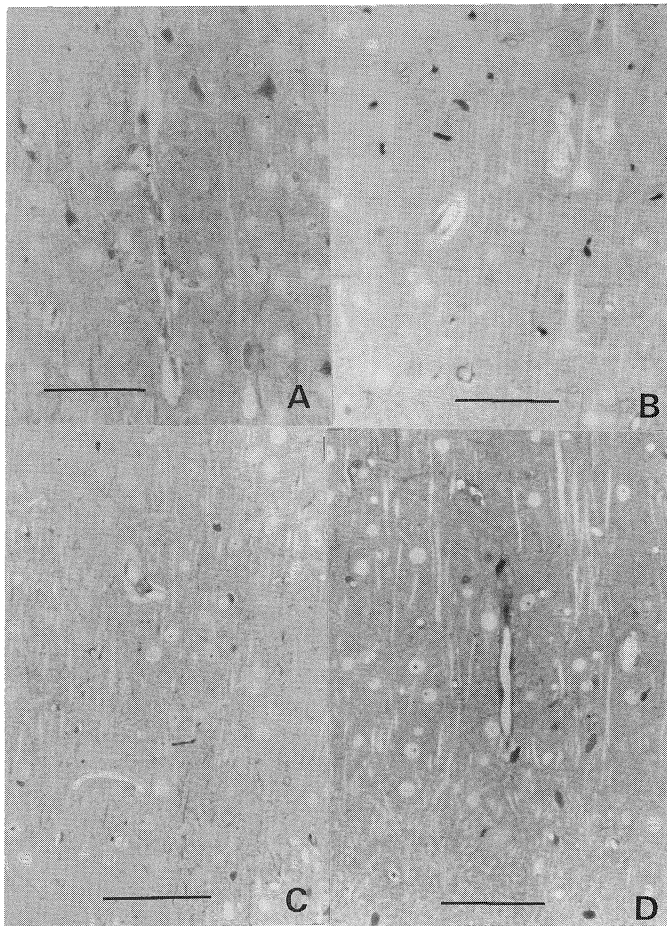


図4 血管周囲腔の経時的変化

A : 減圧15分後, B : 1時間後, C : 3時間後, D : 6時間後
Bar=50 μ m

A, Bでは血管周囲腔の拡大がかなりの頻度で見られるがCでは少なくなり, Dではみられなくなる。

する虚血が考えられる。しかし脳空気塞栓時のBBBの破綻は数秒以内に起こる⁶⁾とされるのに対し、虚血のみでは数時間まではBBBは障害されないと報告⁷⁾されていることから、BBB破綻は血管内気泡による作用と考えられる。

脳循環中で塞栓を起こさない微小気泡によるBBBへの影響に関して最近 Hillsら⁸⁾はモルモットに直径15 μ mの微小気泡を頸動脈に注入した実験を行い、Trypan blueの漏出により血管透過性を検討している。その結果、注入後2時間迄は漏出がみられたが3時間後には漏出はみられず

BBB破綻は可逆性であると報告しており、我々の実験結果と時間的にはほぼ一致している。ラットでの同様の実験は見当たらないが、BBB破綻の発生時間及び可逆性であることを考慮すると、脳血管透過性の増加は少なくとも6分間血管内にとどまった気泡⁹⁾による血管内皮への障害¹⁰⁾、ヒスタミン、セロトニン、ブラジキニンなどの影響¹¹⁾や補体活性化による影響¹²⁾などが考えられる。

微小環境障害を示す墨汁(直径0.6~0.8 μ m)の非充えい部も Evans blue 漏出部位や組織学的に海綿状変化がみられた部位と一致してみられた

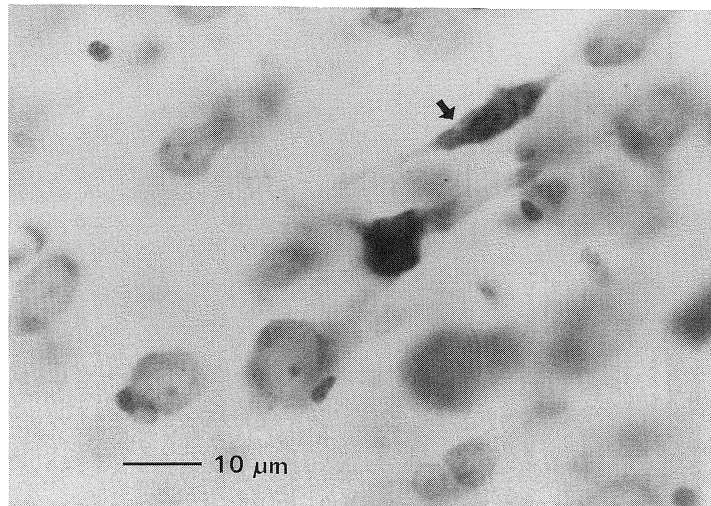


図5 減圧15分後の大脳皮質での神経細胞の変化
ニッスル染色により濃染する細胞（細胞内に空胞形成←もみられる）が多数みられる。

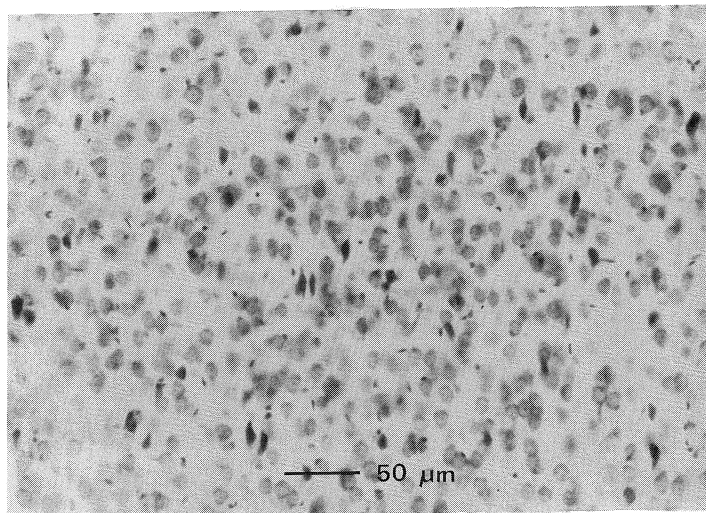


図6 大脳皮質でのダークニューロンの分布

が、減圧3時間後には非充えい部はみられず、やはりこの変化も可逆性であった。空気塞栓による脳循環に関して Helps ら¹³⁾はウサギに塞栓を起こす最小限と考えられていた量の空気を頸動脈に注入し、水素クリアランスによる脳血流測定と皮質での体性感覚誘発電位の変化を検討している。注入された空気は血管内に trap されることなく血管を通過するが、気泡通過後90分にわたる細動脈の著明な拡大を認め、更に脳血流減少と誘発電

位の減弱は、3時間連続くことを報告している。この脳血流減少の継続時間は我々が墨汁の非充えい部としてみとめた微小循環障害と時間的に一致している。

微小循環障害の原因としては従来考えられて来た様に血管内気泡が流体力学的に血液粘性を増大させ、血液-気泡相互作用による血小板凝集、赤血球の Clumping、一連の凝固系変化などの結果としての血管閉塞も考えられる³⁾。しかし微小循

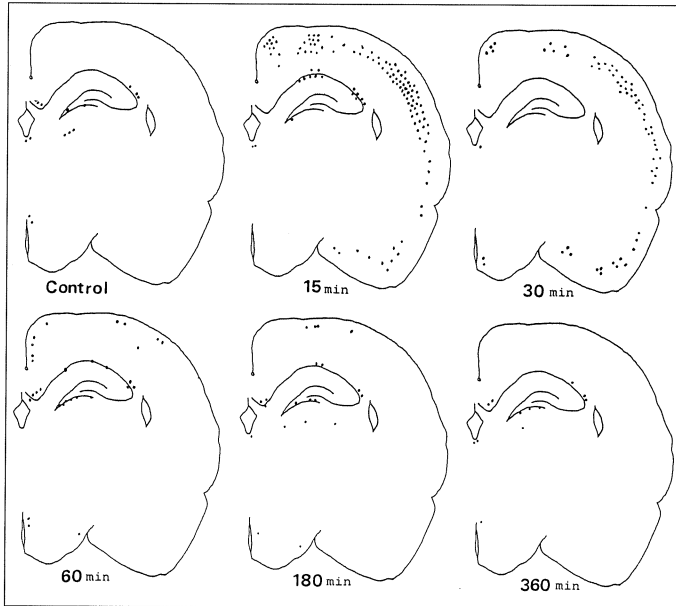


図7 ダークニューロンの経時的变化

各群共、30 μ m切片連続3枚中にみられたダークニューロン1個を1点として表した。

環障害も Evans blue の漏出と同様に減圧後早期に発生し可逆性であることから、血管透過性の増加により起こる浮腫、または組織内 in situ に発生した autochthonous bubble による影響が考えられる。同様に微小血管周囲腔の拡大も血管透過性増加による浮腫の発生または autochthonous bubble の可能性が考えられる。この血管周囲腔の拡大も経過時間と共に減少し、減圧6時間後にはみられなくなっている。

ダークニューロン出現も減圧1時間以後は対照群と差がなくなり他の変化と同様に可逆性であった。いわゆるダークニューロンに関しては従来、細胞の不可逆性器質障害の他、固定不良の際や組織保存状態不良の際などの artifact として発生するとされている¹⁴⁾。しかし前回の実験⁹⁾で気泡形成が多いと考えられる条件で多く見られ、更に今回の実験で皮質では減圧後の時間経過と共に減少し可逆性であること及び灌流・固定後一晚浸漬した後に取り出した脳での所見であることから artifact とは考えられない。更に微小循環障害による虚血性変化として細胞の器質的障害としては、その出現が減圧後15分と早期であることや可

逆性であることから考えにくい。最近、急速減圧後の脊髄障害発生の因子として組織学的に autochthonous bubble が重要因子であると報告されていることから¹⁵⁾¹⁶⁾、脳でもダークニューロンの出現は脳組織内 in situ で発生した気泡により神経細胞の細胞質に一過性の化学的変化が起こった結果と推察される。減圧実験による脳内ダークニューロンの出現更にその可逆性についての報告は見あたらないが、Evans blue 漏出のみられた部分と一致した部位でみられ、この減圧後早期にみられる可逆性のダークニューロンの出現は減圧症に特有の変化を示している可能性がある。

今回の急速減圧ラット脳でみられた以上の諸変化が可逆性であることは、我々が臨床的に Type II 減圧症患者で脊髄障害に先立ち早期にみられる意識障害が一過性であることを説明すると考える。しかし減圧症 Type II 患者の再圧治療後1ヵ月以内にみられる脳血流障害¹⁾や虚血一再灌流後に海馬 CA-1 細胞に遅発性神経細胞壊死が実験動物で虚血時間により異なるが48~72時間以降にみられ¹⁷⁾¹⁸⁾、更に BBB 破綻にも maturation 現象が起こることが報告¹⁹⁾されていることから、24時間

以降の観察も今後必要と考える。最近、虚血一再灌流後にみられる小脳プルキンエ細胞でのダークニューロンの可逆性も報告²⁰⁾されており非器質的変化としてのダークニューロンの可逆性及び血管周囲腔の本態に関しても今後電顕などによる詳細な検討が必要と考えている。

結 論

急速減圧ラットにおける中枢神経系の経時的変化としては、1) 急速減圧後の血液脳関門の破綻は可逆的で、早期に回復した。2) 血管周囲腔の拡大を伴う脳の微小循環障害も可逆的であったが血液脳関門の正常化後もしばらく継続した。3) 大脳皮質における減圧15分後よりみられたダークニューロンは経時的に減少し、時間経過とともにみられなくなった。

以上の結果より急速減圧後にみられるラット脳での変化は、血管内発生微小気泡又は、組織内発生気泡による物理・化学的影響と考えられた。

〔参 考 文 献〕

- 1) 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
- 2) 湯佐祥子: 減圧症の治療と予防. *日高压医誌*, 21: 1-8, 1986
- 3) 野原 敦, 湯佐祥子, 佐久田 治, 平田幸男: 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. *日高压医誌*, 25: 191-197, 1990
- 4) Gruenau SP, Folker M, Rapoport SI: Blood-brain barrier opening after explosive decompression from hyperbaric N₂-O₂ mixture. *Exp Neurol* 66: 238-247, 1979
- 5) Francis TJR, Dutka AJ, Hallenbeck JM: Pathophysiology of decompression sickness. In Bove AA, Davis JC (eds): *Diving Medicine*, 2nd Ed. Tokyo, W.B.Saunders, 1990, p. 170-187
- 6) Persson LI, Johansson BB, Hansson HA: Ultrastructural studies on blood-brain barrier dysfunction after cerebral air embolism in the rat. *Acta Neuropathol* 44: 53-56, 1978
- 7) O'Brien MD, Jordan MM, Waltz AG: Ischemic cerebral edema and the blood-brain barrier. *Arch Neurol* 30: 461-465, 1974
- 8) Hills BA, James PB: Microbubble damage to the blood-brain barrier: relevance to decompression sickness. *Undersea Biomed Res* 18: 111-116, 1991
- 9) Broman T, Branmark PI, Johansson B, Steinwall O: Intravital and postmortem studies on air embolism damage of the blood-brain barrier tested with trypan blue. *Acta Neurol Scand* 42: 146-152, 1966
- 10) Levin LL, Stewart GJ, Lynch PR, Bove AA: Blood and blood vessel wall changes induced by decompression sickness in dogs. *J Appl Physiol* 50: 944-949, 1981
- 11) Dux E, Joo F: Effects of histamine on brain capillaries. *Exp Brain Res* 47: 252-258, 1982
- 12) Ward CA, McCullough D, Yee D, Stanga D, Fraser WD: Complement activation involvement in decompression sickness of rabbits. *Undersea Biomed Res* 17: 51-66, 1990
- 13) Helps SC, Parsons DW, Reilly PL, Gorman DF: The effect of gas emboli on rabbit cerebral blood flow. *Stroke* 21: 94-99, 1990
- 14) Cammermeyer J: An evaluation of the significance of the "dark" neuron. *Ergebn Anat Entwickl.-gscht* 36: 1-61, 1962
- 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) Kirino T: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 239: 57-69, 1982
- 18) Deshpande J, Bergstedt K, Linden T, Kalimo H, Wieloch T: Ultrastructural changes in the hippocampal CA1 region following transient cerebral ischemia: evidence against programmed cell death. *Exp Brain Res* 88: 91-105, 1992
- 19) Ito U, Ohno K, Nakamura R, Suganuma F, Inaba Y: Brain edema during ischemia and after restoration of blood flow. Measurement of water, sodium, potassium content and plasma protein permeability. *Stroke* 10: 542-547, 1979
- 20) Kirino T, Nakagomi T, Tamura A: Reversibility of damage to rat cerebellar Purkinje cells following ischemia. In Ito U, Kirino T, Kuroiwa T, Klatzo I (eds): *Maturation Phenomenon in Cerebral Ischemia*, Berlin Springer-Verlag, 1992, p.49-56