

イヌの18分間完全全脳虚血後の血液脳関門の 経時的透過性変化に関する実験的研究

岡山大学医学部麻酔・蘇生学教室 (指導: 平川方久教授)

下 田 豊

(平成5年9月6日受稿)

Key words: 完全全脳虚血, 血液脳関門, HRP

緒 言

近年, 脳虚血後において血液脳関門の透過性は虚血再灌流直後に一過性に亢進したのちに元に戻り, 48-72時間後に再び亢進するという2相性の透過性亢進が生じることが報告されるようになった^{1,2)}。しかし, これらの報告は, 不完全脳虚血モデルを用いた実験結果であり, 完全全脳虚血後の報告は少ない。イヌの完全全脳虚血後, 虚血再灌流15分後のエバンスブルーの血管外漏出を認めた黒田の報告³⁾があるが, 再灌流後の血液脳関門の透過性を虚血再灌流後長期にわたり経時的に電子顕微鏡的に観察した報告はみられない。

そこで本研究では, 臨床上遭遇する機会が多く, 治療に難渋するヒトの心停止蘇生後脳障害の血液脳関門の透過性を検討する目的で, イヌを用いて18分間完全全脳虚血モデル^{4,5)}を作製し, horseradish peroxidase を指標として大脳皮質・小脳・海馬における血液脳関門の透過性の有無および血管内皮細胞の形態を経時的に電子顕微鏡にて観察した。

材 料 と 方 法

1. 対象および麻酔法

体重5-10kgの雑種成犬19頭を用い, 非虚血対照群 (sham 群) 3頭, 虚血再灌流群16頭に分けた。さらに, 虚血再灌流群を虚血解除から脳組織灌流固定開始までの時間で30分群4頭, 3時間群3頭, 6時間群3頭, 24時間群3頭, 48時間群3頭の5群に分けた。麻酔導入は, 塩酸

ケタミン20mg/kg, 硫酸アトロピン0.05mg/kgの筋注で行った。双極誘導の心電図を装着した後, 左前肢静脈に輸液路を確保し, 乳酸加リンゲル液を5.0ml/kg/hで投与した。パンクロニウム0.05mg/kgで筋弛緩を得た後, 気管内挿管を行い人工呼吸器 (IGARASHI Respirator Model B2) に装着し, PaCO₂ を30-35mmHgに保つように調節呼吸を行った。麻酔維持はハロタン1.5%で行い, 虚血開始の20分前に中止した。動脈圧は左大腿動脈に挿入した8Fのクールナンカテテル (Cordis 社製) より測定し, 適時動脈血ガス分析をABL2 (Radio meter 社製) で行った。体温は食道温を持続モニターし, 36.5-37.5℃に維持した。

2. 脳虚血作製法および神経機能評価法

脳虚血作製は, 上行大動脈遮断と大動脈・右房・大腿静脈間バイパス法 (図1) で行い, 虚血時間は18分とした。虚血再灌流群では, 再灌流直後に1.5mEq/kgの重曹を投与し, 必要に応じて追加投与した。また, パンクロニウム0.06mg/kg/hを持続投与して人工呼吸器 (Benett MA1) に装着し, 40%酸素で調節呼吸を行い PaO₂ を150-180mmHg, PaCO₂ を30-35mmHgに保った。

48時間群においては, 再灌流24時間後と48時間後に Safar ら⁶⁾の神経学的評価法 (表1) に従って, 神経機能評価を行った。

3. horseradish peroxidase (HRP) 投与法および脳灌流固定法

5%エバンスブルー (東京化成社製, 100mg/kg) に溶解した HRP (Sigma 社製 type II, 100

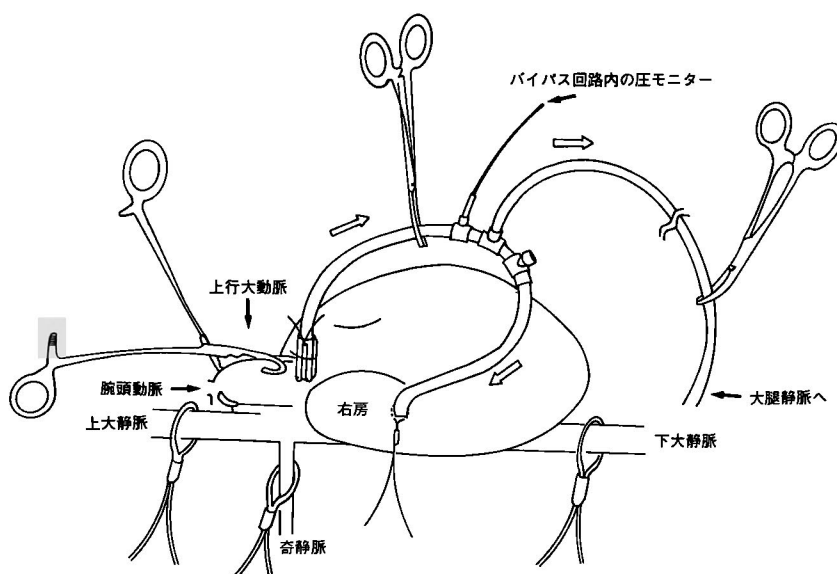


図1 上行大動脈遮断と大動脈・右房・大腿動脈間バイパス法 (文献4より引用)

下大静脈, 上大静脈, 奇静脈の順に血流を遮断した後, 上行大動脈の遮断と同時にバイパス回路を解放した。上行大動脈遮断中は, バイパス回路で心肺循環を作製することで完全全脳虚血中の心機能を良好に保持した。遮断解除は上大静脈, 上行大動脈, 下大静脈, 奇静脈の順で行い, バイパス回路の遮断は上行大動脈の遮断解除と同時に行った。なお, white arrow は上行大動脈遮断中のバイパス内血流方向を示す。

表1 神経学的評価法 (文献6より引用)

意識状態, 反射・運動機能, 呼吸状態, その他の項目で採点し, それらの総合点で神経機能を評価する。この評価法では正常が0, 重度の昏睡または死亡が100となる。

Neurologic Deficit Scoring for Dogs (Safar)

1. Level of Consciousness
Normal=0; clouded=2; delirium=4; stupor=6; coma=8
2. Reflexes and Motor Function
 - a. Pupil size: normal=0; abnormal mild=2; abnormal severe=4
 - b. Lid reflex: normal=0; sluggish=2; absent=4
 - c. Corneal reflex: normal=0; sluggish=2; absent=4
 - d. Reaction to light: normal=0; sluggish=2; absent=4
 - e. Response to pain (pinch toes): normal=0; abnormal=2; absent=4
 - f. Muscle tone: normal=0; abnormal=2; absent=4
 - g. Paralysis: absent=0; mild=2; severe=4
3. Miscellaneous
 - a. Swallowing and gagging: normal=0; absent=4
 - b. Response to noise: normal=0; abnormal=2; absent=4
 - c. Ability to sit: good=0; poor=2; none=4
 - d. Ability to stand: good=0; poor=2; none=4
 - e. Ability to drink: good=0; poor=2; none=4
 - f. Ataxia: none=0; mild=2; severe=4
4. Respiration
 - a. Rate: normal=0; abnormal=2; apnea=4
 - b. Pattern: normal=0; abnormal (gasping, irregular)=4
 - c. Tracheal reflex: present=0; absent=4

100: coma or death 0: normal score

mg/kg) を、灌流固定開始15分前に2.5ml/minの速度で、右大腿動脈より投与した。再灌流24時間以内の群では1.5%ハロタン麻酔下で、また再灌流48時間の群では虚血作製時と同様の麻酔導入維持で以下の手術操作を行った。腹部正中切開を行い、18Fの送液カニューレ(泉工医科製)を腹部大動脈より約15cm逆行性に挿入して、カテーテル先端を胸部大動脈部に固定した。HRP投与開始15分後に、上・下大静脈を離断して自然脱血を行い、同時に送液カニューレより人工心肺用ポンプ(泉工医科製 MERA MPS-15-K)を用いて生理食塩水を80秒間灌流し、次に0.25%グルタルアルデヒド含有中性緩衝ホルマリン液(ホルムアルデヒド含有4%, pH7.4)で80秒間灌流固定した。なおポンプ流量は1.8—2.0 l/minとし、上行大動脈圧または右鎖骨下動脈圧を持続モニターし、灌流圧が80—100mmHgとなるよう調節した。

4. 組織学的評価法

灌流固定後、脳組織を慎重に取り出した。試料採取部位は大腦皮質・小脳・海馬とし、エバンスブルー漏出が肉眼的に認められるものでは漏出部位より、エバンスブルー漏出が肉眼的に認められないものでは帯状回・小脳虫部・背側海馬よりマイクロスライサー(DSK社製 DK-300W)を用いて厚さ50 μ mの試料を作製した。ただちに0.1Mカコジル酸緩衝液・3%グルタルアルデヒド・1%パラホルムアルデヒド溶液にて4℃で浸潤固定し、2時間後にこれらの試料を0.1Mカコジル酸緩衝液で2時間4℃で洗浄した。その後、Graham and Karnovskyの方法⁷⁾に基づき、0.05Mトリス緩衝液(pH7.6)・0.05% diaminobenzidine tetrahydrochloride 溶液に15分間浸潤し、続いて同液に0.01% H₂O₂を加えた溶液に30分間室温で浸潤した。冷蒸留水で3回水洗したのち、1時間2%四酸化オスミウム液で後固定を行った。アルコールによる脱水を行ったのち、プロピレンオキサイドに置換しエボン812に包埋した。超薄切片を作製し、酢酸ウラニールとクエン酸鉛による二重染色を行い、電子顕微鏡(日本電子製 JEM-2000EX)にて直接倍率4,000—25,000倍で観察した。

結 果

1. 実験犬の反応性充血期の平均動脈圧の最高値、HRP投与時の平均動脈圧、HRPの血管外漏出の有無・その部位

実験犬の血糖値、ヘマトクリット値、ヘモグロビン値は、それぞれ115 $\pm$ 7.7mg/dl, 34 $\pm$ 1.3%, 11.0 $\pm$ 0.3 g/dl (平均値 $\pm$ 標準誤差)であった。

再灌流後15分以内の平均動脈圧の最高値は、30分群190 $\pm$ 13.4mmHg, 3時間群181 $\pm$ 11.6mmHg

表2 実験犬の反応性充血期の最高平均動脈圧、HRP投与時の平均動脈圧、HRPの血管外漏出の有無・その部位

	Hyperemia (mean $\pm$ SE)	HRP-mAP (mean $\pm$ SE)	BBB opening
Sham	—	107	—
Sham	—	112	—
Sham	—	132	—
		117 $\pm$ 3.4	
30m	230	162	小脳+
30m	189	120	—
30m	155	110	—
30m	184	109	—
	190 $\pm$ 13.4	125 $\pm$ 6.8	
3h	179	111	—
3h	206	123	—
3h	157	110	—
	181 $\pm$ 11.6	115 $\pm$ 1.9	
6h	233	121	—
6h	174	133	—
6h	231	122	—
	213 $\pm$ 15.8	125 $\pm$ 1.7	
24h	190	111	—
24h	216	112	—
24h	190	118	—
	199 $\pm$ 7.1	114 $\pm$ 1.0	
48h	250	104	大脳皮質+
48h	186	108	大脳皮質+
48h	190	90	大脳皮質+
	209 $\pm$ 16.9	101 $\pm$ 2.4	

Hyperemia: 反応性充血期の最高平均動脈圧

HRP-mAP: HRP投与時の平均動脈圧

Hg, 6時間群 213 ± 15.8 mmHg, 24時間群 199 ± 7.1 mmHg, 48時間群 209 ± 16.9 mmHg(平均値 $\pm$ 標準誤差)であった。HRP 投与時の平均動脈圧は, sham 群 117 ± 3.4 mmHg, 30分群 125 ± 6.8 mmHg, 3時間群 115 ± 1.9 mmHg, 6時間群 125 ± 1.7 mmHg, 24時間群 114 ± 1.0 , 48時間群 101 ± 2.4 mmHg(平均値 $\pm$ 標準誤差)であった。HRP 血管外漏出は, 30分群の1例の小脳と48時間群の全例の大脳皮質において認められた。(表2)

2. 神経学的評価

Safar らの神経学的評価法に従って採点した再灌流24時間および48時間後のスコアはそれぞれ 50 ± 1.15 , 44.7 ± 1.76 (平均値 $\pm$ 標準誤差)であった。神経学的には, 全例とも疼痛刺激および音刺激のみに反応がみられる典型的植物状態であった。四肢は過緊張状態で, 横たわったまま走のような動作が頻回にみられた。(表3)

3. 組織学的評価

1) 非虚血対照群(図2A)

全例で HRP の血管外漏出は認められなかった。HRP を含んだ pinocytotic vesicle が少数観察されたが, 基底膜への HRP 集積は認められなかった。血管内皮細胞には, 核の濃縮・ミトコンドリアの膨化・細胞膜の破壊などの形態学的変化は認められなかった。

2) 30分群(図2B, C, D)

4例中1例の小脳において HRP の血管外漏出が認められた。HRP を含んだ pinocytotic vesicle の数は, 非虚血対照群より増加していた。また基底膜には HRP が集積しているのが観察された。血管内皮細胞の核の濃縮・ミトコンドリアの膨化・細胞膜の破壊などの形態学的変化は認められなかった。

表3 48時間群の24時間, 48時間後の神経学的評価

	虚血解除後(時間)	
	24	48
	52	48
	48	44
	50	42
平均値 $\pm$ 標準誤差	50 ± 1.15	44.7 ± 1.76

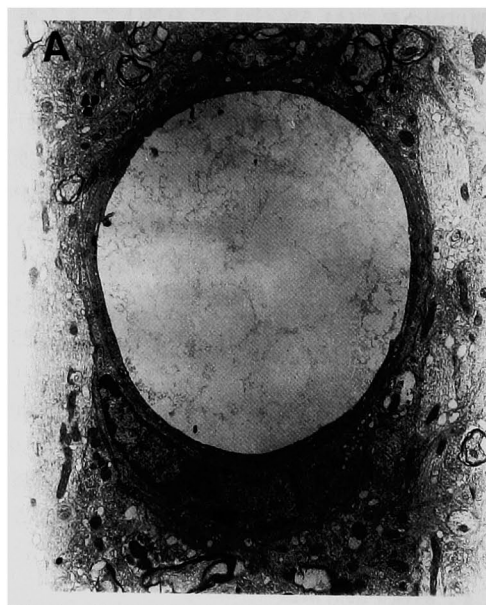


図2A 非虚血対照群の小脳の毛細血管, HRP の血管外漏出は認められないが, HRP を含んだ pinocytotic vesicle が少数認められる。(×5,000)



図2B 30分群の小脳の毛細血管, HRP の血管外漏出と基底膜への集積が認められる。(×5,500)



図 2 C 30分群の小脳の毛細血管. HRP を含んだ pinocytotic vesicle の増加が認められる. ($\times 8,000$)



図 2 E 24時間群の海馬 CA1 の毛細血管. HRP の血管外漏出は認められない. また HRP を含んだ pinocytotic vesicle はほとんど認められない. ($\times 7,000$)



図 2 D C の拡大像. tight junction には異常は認められない. ($\times 21,000$)



図 2 F 48分群の大脳皮質の毛細血管. HRP の血管外漏出と基底膜への集積が認められるが, HRP を含んだ pinocytotic vesicle の増加は認められない. ($\times 8,000$)



図2 G Fの拡大像, tight junction と考えられる間隙に HRP が認められ, 基底膜に集積した HRP と連続している。また血管内皮細胞形質膜の膨化が認められる。(×26,500)

3) 3時間群・6時間群・24時間群 (図2 E)

全例に HRP の血管外漏出は認められなかった。HRP を含んだ pinocytotic vesicle は少数観察されたが、基底膜への HRP の集積は認められなかった。血管内皮細胞には、核の濃縮・ミトコンドリアの膨化・細胞膜の破壊などの形態学的変化は認められなかった。

4) 48時間群 (図2 F, G)

全例で大脳皮質における HRP の血管外漏出が認められた。tight junction と考えられる間隙に HRP が認められ基底膜に集積した HRP と連続しているのが観察された。HRP を含んだ pinocytotic vesicle は少数観察された。大脳皮質毛細血管腔に、血管内皮細胞形質膜が変性・破壊したと考えられる箇所がときに観察されたが、血管内皮細胞核の濃縮・ミトコンドリアの膨化は認められなかった。

考 察

血液脳関門という概念は、血漿蛋白と結合する酸性色素エバンスブルーを動物に静注すると

多くの臓器は青色に染まるのに対し、脳では染まらないという Ehrlich の観察結果⁸⁾やトリパンブルーを家兎に静注すると脳実質は染まらないのに、脳実質内に注入すると脳は染まるという Goldman の観察結果⁹⁾に端を発している。また彼らの観察結果に基づき血液脳関門という用語を最初に用いたのは, Sterns と Gautier である¹⁰⁾。

一般に、最後野・松果体・下垂体などを除く脳の血管内皮細胞では、tight junction が存在し、pinocytotic transport が極めて少なく、fenestrae が欠如していることから、正常な状態では大分子の物質の血管外漏出は起きないとされている。また、血液脳関門の実態は、脳の血管内皮細胞そのもの、形態学的には主として血管内皮細胞間の tight junction であることが示されるようになり、主として大分子の物質に対する関門の役割を担うとされる¹¹⁻¹⁴⁾。

血液脳関門の透過性亢進が生じる病態としては、虚血^{1,2,14)}、高血圧^{15,16)}、癲癇^{17,18)}、空気栓塞¹⁹⁾、cold injury²⁰⁾、紫外線照射²¹⁾、水銀中毒²²⁾、ビタミン B1 欠乏²³⁾、門脈・大静脈短絡²⁴⁾などが報告されている。その中で脳虚血病態において、Westergaard らは、HRP を指標としてスナネズミの左総頸動脈閉塞モデルで再灌流1時間後には血管内皮細胞にはほとんど変化がみられないにもかかわらず、pinocytosis の亢進により血液脳関門の透過性亢進が惹起されることを報告した¹⁴⁾。また Suzuki らは、スナネズミの前脳虚血再灌流モデルで、エバンスブルーと HRP を指標として、再灌流直後と48時間以降に血液脳関門の透過性亢進を2相性に認めたことを報告した¹⁾。また、Kuroiwa らはネコの中大脳動脈閉塞再灌流モデルで、エバンスブルーと immunohistochemical peroxidase-antiperoxidase method を指標として、再灌流直後と72時間後に2相性の血液脳関門の透過性亢進を認めたことを報告している²⁾。彼らは、虚血再灌流直後の血液脳関門の透過性亢進は、反応性充血による pinocytotic transport の亢進のためであるとしている。また48—72時間後の血液脳関門の透過性亢進は、時期的に遅発性神経細胞壊死が生じる時期であること、Westergaard らの研究結果より、虚血により障害を受けた神経細胞から、

pinocytotic activity を高める物質が放出されたためとしている。HRP は分子量 40,000、直径 60 Å とされ¹⁴⁾、血漿アルブミンと結合した状態で分子量 70,000、直径 75 Å のエバンスブルーと同様、正常では血液脳関門を通過しがたいとされる。

本研究結果では、再灌流 30 分後には、4 例中 1 例で小脳に HRP 血管外漏出が認められ、HRP を含んだ pinocytotic vesicle の増加が認められた。しかし、血管内皮細胞の形態学的変化は認められなかった。この時期は反応性充血期であったこと、また人為的高血圧^{15,16)}や癲癇^{17,18)}により pinocytotic transport の亢進が惹起され、血液脳関門の透過性が亢進するという報告や、反応性充血を防止することで再灌流早期の血液脳関門の透過性亢進を防止できるとした報告²⁵⁾からも、脳灌流圧増加により pinocytotic transport が亢進した結果、HRP の血管外漏出が生じたことが示唆された。本研究においても漏出例での HRP 投与時の平均動脈圧は 162 mmHg であるのに対し、非漏出例では 120, 110, 109 mmHg であった。また、イヌの 18 分間完全全脳虚血モデルにおいて、スチレンマレイン酸ブチルエステルスーパーオキシドジスムターゼ (SMA-SOD, 10 mg/kg) で、虚血解除 30 分後のエバンスブルーの血管外漏出が抑制されたとする報告²⁶⁾から、フリーラジカルによる pinocytotic transport の助長が再灌流直後の血液脳関門の透過性亢進に関与している可能性も否定できない。さらに、cyclic AMP、セロトニンなどの物質が pinocytotic transport を増加させるという報告^{27,28)}より、それらの物質が虚血再灌流後に増加したため血液脳関門の透過性が亢進した可能性も考えられる。

本研究では、再灌流 30 分後の HRP 血管外漏出は小脳にのみ認められ、大脳皮質・海馬には認められなかった。これは、再灌流早期のエバンスブルーの血液脳関門の易透過性と領域別易漏出性は、一般に指摘されるような神経細胞の虚血に対する脆弱性とは必ずしも一致しないという黒田の研究結果⁹⁾と一致していた。小脳のみには HRP 血管外漏出が認められた原因は、小脳・脳幹において点状出血を合併する頻度が高かったことより、椎骨動脈優位の部位 (テント下) ではテント上の部位より虚血再灌流直後の灌流

圧の影響を受け易い可能性が考えられた。

3 時間、6 時間、24 時間後では HRP の血管外漏出は認められなかった。この時期の HRP を含む pinocytotic vesicle は少数であり、血管内皮細胞に形態学的変化は認められなかった。この時期は反応性充血は終わり、脳灌流圧が低下し、遅発性脳血流減少が生じる時期であるので⁶⁾、pinocytotic transport が減少ないし元に復したことが考えられた。

48 時間後に、大脳皮質において HRP の血管外漏出を認めた。HRP が tight junction と考えられる間隙に認められ、基底膜に集積した HRP と交通していた。この間隙は、血管内皮細胞と pericyte との境界である可能性も完全には否定できないが、30 分後と異なり HRP を含む pinocytotic vesicle は少数であったことから、HRP の血管外漏出は、pinocytotic transport の亢進によるものではなく、tight junction の開離により惹起されたものと考えられた。また血管内皮細胞において核やミトコンドリアなどの細胞内小器官に異常はみられなかったが、細胞膜に変性・破壊像を確認したことより、従来虚血に強い抵抗性を有するとされる血管内皮細胞も、完全全脳虚血後 48 時間には、虚血自体による侵襲・フリーラジカル反応・蛋白合成障害・反応性充血による血管内皮細胞の over stretch などにより器質的障害を受けることが示唆された。また、小脳・海馬では HRP の血管外漏出は認められなかったが、時間がさらに経過すれば大脳皮質と同様の変化が生じると考えられた。

イヌの 18 分間完全全脳虚血後では、虚血再灌流 30 分後と 48 時間後に、2 相性に血液脳関門透過性亢進が生じることが明らかになった。その時期は、Suzuki ら¹¹⁾と Kuroiwa ら²¹⁾の報告した不完全脳虚血実験とほぼ同じであった。虚血再灌流後 30 分後の血液脳関門の透過性亢進の原因は、反応性充血による pinocytotic transport の亢進と考えられ、不完全脳虚血実験で考案された原因と同じであった。3 時間・6 時間・24 時間後での血液脳関門の機能が復元した原因は、反応性充血は終わり、脳灌流圧が低下し、遅発性脳血流減少が生じる時期であるので、pinocytotic transport が減少ないし元に復した

ことによると考えられ、不完全脳虚血実験で考案された原因と同じであった。しかし、48時間後の血液脳関門の透過性亢進は、不完全脳虚血では虚血により障害を受けた主として神経細胞から pinocytotic activity を高める物質が放出されたため生じたとしているのに対し、本研究では血管内皮細胞が器質的障害を受け tight junction が開離したため生じたと考えられ異なっていた。これは、本研究の方が虚血侵襲が著しく大きいことによると考えられた。

48時間群の神経学的評価は、イヌの18分間完全全脳虚血後は全例疼痛反応および音刺激のみに反応する、いわゆる植物状態となるという報告⁵⁾と一致していた。

臨床的には心停止蘇生後のような完全全脳虚血後の治療においては、蘇生直後の反応性充血期には、正常では血液脳関門透過性のない神経細胞保護効果を持つ薬物でも、反応性充血により亢進した pinocytotic transport により脳内に移行する可能性があるが、蘇生目的に使用した薬物も同様の経路で脳内に移行するため予想外の反応が生じる可能性もある。しかし、遅発性脳血流減少期には、血液脳関門の機能は復元しているため、血液脳関門透過性のない薬物の治療効果は期待できない。48時間以降は血管内皮細胞の器質的障害により、血液脳関門の透過性は亢進しており、薬物の脳内移行性は期待できるが、すでに神経細胞障害は完成している^{29,30)}

ため治療効果は期待できないと考えられた。

結 論

1. イヌの18分間の完全全脳虚血実験において、HRP の血管外漏出は、再灌流30分後と48時間後に認められ、3時間・6時間・24時間後には認められなかった。

2. 再灌流30分後では、反応性充血による脳灌流圧増加により pinocytotic transport が亢進したことにより HRP の血管外漏出が生じたと考えられた。

3. 再灌流3時間後・6時間後・24時間後では、遅発性脳血流減少により pinocytotic transport が抑制されたため HRP の血管外漏出は生じなかったと考えられた。

4. 再灌流48時間後では、血管内皮細胞が器質的障害を受けたため HRP の血管外漏出が生じたと考えられた。

5. 反応性充血期には、pinocytotic transport が亢進しているため、正常状態では血液脳関門透過性のない薬物でも脳内へ移行する可能性がある。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜った岡山大学医学部麻酔・蘇生学教室平川方久教授、小坂二度見名誉教授、また、実験にご協力いただいた橋本秀則博士ならびに教室員各位に心から感謝いたします。

文 献

- 1) Suzuki R, Yamaguti T, Kirino T, Orzi F and Klazo I: The effect of 5 minutes ischemia in Mongolian Gerbils: 1 Blood brain barrier, cerebral blood flow and local cerebral glucose utilization change. *Acta Neuropathol* (1983) **60**, 207—216.
- 2) Kuroiwa T, Ting P, Martinez H and Klazo I: The biphasic opening of the blood brain barrier to proteins following temporary middle cerebral artery occlusion. *Acta Neuropathol* (1985) **68**, 122—129.
- 3) 黒田友則: イヌの完全全脳虚血後の血液脳関門の透過性に関する研究. *岡山医誌* (1991) **103**, 199—207.
- 4) 橋本秀則: 上行大動脈遮断と大動脈・右房・大腿静脈間バイパスによる完全全脳虚血法に関する研究. *麻酔* (1989) **38**, 859—867.
- 5) 近藤正得: イヌの虚血時間と神経学的予後に関する実験的研究. *麻酔* (1991) **40**, 1228—1241.
- 6) Safar P, Stezoski W and Nemoto EM: Amerioration of brain damage after 12 minutes cardiac arrest in dogs. *Arch Neurol* (1976) **33**, 91—95.

- 7) Graham JRRC and Karnovsky MJ : The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by new technique. *J Histochem Cytochem* (1966) **14**, 291—302.
- 8) Ehrlich P : Das sauerstoff bedurfnis des organismus ; in *Eine farbenanalytische Studie*, Hirschwald, Berlin (1885) pp 69—75.
- 9) Goldmann EE : Vitalfärbung am zentralnervensystem ; in *Beitrag zur Physiopathologie des Plexus Choriodeus und der Hirnhäute*, Berlin (1913).
- 10) Stern L und Gautier R : Recherches sur le liquide cephalo-rachidien. I. Les rapports entre le liquide cephalo-rachidien et la circulation sanguine. *Arch Int Physiol* (1921) **17**, 138—192.
- 11) Goldstein GW and Betz L : Recent advances in understanding brain capillary function. *Ann Neurol* (1983) **14**, 389—395.
- 12) 伊藤梅男 : 血液脳関門の機能と発生. *神経進歩* (1984) **28**, 539—554.
- 13) Pollay M and Roberts PA : Blood-brain barrier: A definition of normal and altered function. *Neurosurgery* (1980) **6**, 675—685.
- 14) Westergaard E, Go KG, Klazo I and Spatz M : Increased permeability of cerebral vessels to horseradish peroxidase induced by ischemia in mongolian gerbils. *Acta Neuropathol* (1976) **35**, 307—325.
- 15) Westergaard E, van Deurs B and Brøndsted HE : Increased vesicular transfer of horseradish peroxidase across cerebral endothelium, evoked by acute hypertension. *Acta Neuropathol* (1977) **37**, 141—152.
- 16) Nazy Z, Mathieson G and Huttner I : Opening of tight junctions in cerebral endothelium. Effects of pressure-pulse induced acute arterial hypertension. *Acta Neuropathol* (1979) **48**, 45—53.
- 17) Petit CK, Schaefer JA and Plum F : Ultrastructural characteristic of the brain and blood-brain barrier in experimental seizures. *Brain Res* (1977) **27**, 251—267.
- 18) Westergaard E, Hertz MM and Bolwing TG : Increased permeability to horseradish peroxidase across cerebral vessels, evoked by electrically induced seizures in the rat. *Acta Neuropathol* (1978) **41**, 73—80.
- 19) Peasson LI, Johansson BB and Hansson HA : Ultrastructural studies on blood-brain barrier dysfunction after cerebral air embolism in the rat. *Acta Neuropathol* (1978) **44**, 53—56.
- 20) Baker PN, Cacilla PA, Pollocks PS and Frommes SP : The movement of exogenous protein in experimental cerebral edema. *J Neuropathol & Exp Neurol* (1971) **30**, 668—679.
- 21) Fernest R, Cervós-Navarro J, Sasaki S, Neu S and Brock M : Vesicular transport through endothelial cells in focal brain edema. *Adv Neurol* (1978) **20**, 293—301.
- 22) Ware RA, Chang LW and Burkholder PM : An ultrastructural study on the blood-brain barrier dysfunction following mercury intoxication. *Acta Neuropathol* (1974) **30**, 211—224.
- 23) Manz HJ and Robertson DM : Vascular permeability to horseradish peroxidase in brainstem lesions of thiamine-deficient rats. *Am J Pathol* (1972) **66**, 565—576.
- 24) Laursen H and Westergaard E : Enhanced permeability to horseradish peroxidase across cerebral vessels in the rat after portocaval anastomosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* (1977) **3**, 29—43.
- 25) Ting P, Masaoka H, Kuroiwa T, Wagner HG, Fenton I and Klatzo I : Influence of blood-brain barrier opening to on development of post-ischemic brain injury. *Neurol Res* (1986) **8**, 146—151.
- 26) 武田吉正 : イヌの完全全脳虚血後の脳障害に及ぼす SMA-SOD の効果に関する実験的研究. *岡山医誌* (1991) **103**, 257—266.

- 27) Joó F : Significance of adenylate cyclase in the regulation of the permeability of brain capillaries; in Patho-physiology of Cerebral Energy Metabolism, Mrsulja BB Rakic LjM, Klatzo I and Spatz M eds, Plenum Press, New York, London (1979) pp 211—237.
- 28) Edvinsson L, Hardebo JE and Owman C : Pharmacological analysis of 5-hydroxy-tryptamine receptors in isolated intracranial and extracranial vessels of cat and man. *Circ Res* (1978) **42**, 143—151.
- 29) Sato M, Hashimoto H and Kosaka F : Histological changes of neuronal damage in vegetative dogs induced by an 18 minutes of complete global brain ischemia. Two phase damage of Purkinje cells and hippocampal CA1 pyramidal cells. *Acta Neuropathol* (1990) **80**, 527—534.
- 30) 岡本隆行 : 18分完全全脳虚血犬の脳組織障害に関する実験的研究。岡山医誌 (1989) **101**, 887—899.

**Biphasic opening of the blood-brain
barrier to horseradish peroxidase after
18 minutes of complete global brain ischemia in dogs**

Yutaka SHIMODA

Department of Anesthesiology and Resuscitology,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. M. Hirakawa)

The ability of horseradish peroxidase (HRP) to cross the blood-brain barrier (BBB) was studied in dogs by electron microscopy after 18 minutes of complete global brain ischemia (CGBI). The first BBB opening occurred 30 minutes after the recirculation was established ; This was associated with the increase of HRP-containing pinocytotic vesicles (HRP-PV), but there was no endothelial cell damage. There was no BBB opening 3,6, and 24 hours after the recirculation ; This was determined by absence of increase in HRP-PV and lack of endothelial cell damage. The second BBB opening occurred 48 hours after the recirculation ; This was associated with disruption of the tight junction of the endothelial cell, lack of increased HRP-PV and destruction of the endothelial cell membrane. These results suggest that the first BBB opening is due to increased pinocytotic transport by reactive hyperemia and the second BBB opening is due to endothelial cell damage by CGBI itself.