

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

岡山大学医学部麻酔・蘇生学教室 (指導: 小坂二度見教授)

武 田 吉 正

(平成 2 年12月21日受稿)

Key words : SMA-SOD, 神経学的予後, 血液脳関門, 遅発性脳血流減少, イヌ

緒 言

近年, 神経細胞は虚血自体には強い抵抗性があることが指摘され¹⁾, さらに脳血流の再開のみでは脳組織の完全回復は望めないという研究結果^{2),3)}が報告されるにいたり, 虚血性脳障害は虚血による以外に, 脳血流再開後のさまざまな障害因子により大きく影響されることが知られるようになった⁴⁾.

1977年の Demopoulos ら⁵⁾の報告以来, フリーラジカル (FR) もそれらの因子の一つとして大きく注目されている. しかし方法論上の問題から in vivo の実験系で FR を直接検出することが困難であることから, 現時点においても虚血性脳障害が FR によって惹起されるという確証は得られていない.

そこで, 間接的に FR 反応と虚血性脳障害との関係を明らかにする目的で, 各種ラジカル・スカベンジャーの脳保護効果が検討されているが⁶⁾⁻⁹⁾, それらの研究では克服しなくてはならないいくつかの研究上の問題点を有する. すなわち, FR 反応は虚血後の再灌流に伴って惹起され得ることから¹⁰⁾, 正確な実験結果を得るためには完全脳虚血モデルを使用することが重要となる. また, 生体内には FR による障害を免れるための豊富な内因性防御機構が備わっていることから, それらの脳保護効果を判定するための指標の選択に慎重であることが望まれる. さらに, 脳保護の究極の目的は再灌流後の神経機能の改善であることから, 再灌流後の長期的な神経機能を観察することが必要と思われる.

そこで, 著者は FR と虚血性脳障害の関係を解明する目的で, イヌの18分間の完全全脳虚血モデルを用いて, 再灌流7時間後までの循環系の各種パラメータ, 再灌流早期のエバンスブルーに対する血液脳関門の透過性の変化および再灌流後7日までの神経学的予後を指標として, フリーラジカルスカベンジャーの一つである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)¹¹⁾の脳保護効果を検討した.

材 料 と 方 法

1. 対象および麻酔法

体重7-10kgの雑種成犬37頭を用い, SMA-SOD 投与の有無で SMA-SOD 群 (n=17), コントロール群 (n=20) の2群に分け, 各群で急性実験 I (各群 n=6), II (各群 n=3) および慢性実験 (SMA-SOD 投与群 n=8, コントロール群 n=11) を行った. 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5.0ml/kg/h を投与した. パンクロニウム0.2mg/kgで筋弛緩を得た後, 気管内挿管を行い, 人工呼吸器 (アコマ AR-300) に装着して PaCO₂ を30~35mmHg に保つように調節呼吸を行った. 麻酔維持はハロセン1.5%で行い, 虚血作製あるいは各種パラメータの虚血前値測定の20分前に中止した. 体温は食道温を持続モニターし, 36.5-37.5℃に維持した. なお, 脳虚血作製法は, 上行大動脈遮断と大動脈・右房・大腿静脈間バイ

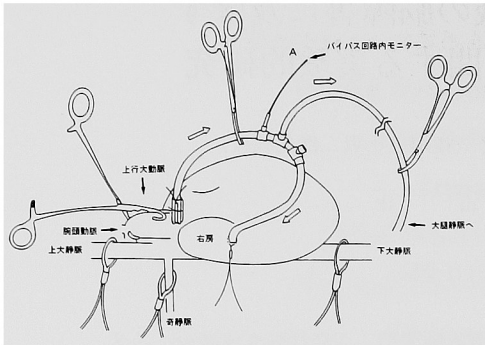


図1 上行大動脈遮断と大動脈・右房・大静脈間バイパス法(文献12)より引用

下大静脈, 上大静脈, 奇静脈の順に血流を遮断し, 同時に上行大動脈の遮断を行うことで完全全脳虚血を作製した。上行大動脈遮断中は, バイパス回路により心肺循環を作製することで, 脳虚血中の心機能を良好に保持することが可能となる。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を行った。なお, 図中の矢印は上行大動脈遮断中のバイパス内血流方向を示す。

パス法¹²⁾で行った(図1)。

2. SMA-SOD

SMA-SODはbovineの赤血球のCu, Zn-SODにスチレンマレイン酸(SMA, 分子量: 1600)を付加したものを熊本大学医学部第二生化学教室の井上正康助教授より御提供いただき使用した。SMA-SOD(10mg/kg)は10%生理的食塩水溶液として, 脳血流の再開と同時に脳循環に到達するように, 虚血解除直前にバイパス回路内(A点)より250mg/minで投与した。

3. 測定項目および測定法

1) 急性実験 I

再灌流後7時間までの心拍数, 動脈圧, 心係数, 脳血流量, 脳圧, 動脈血ガス分析, ヘマトクリット値(Ht), 血糖値の経時的測定を行い, SMA-SOD群では同時に血清中SOD活性を測定した。

動脈圧は大腿動脈より下大動脈に挿入したカットダウンチューブ(日本メディカル・サブライ社製, ID 1.0mm)により測定し, Radiometer Copenhagen社製 ABL-2で動脈血ガス分析を行った。また, 心係数は右大腿静脈より5Fの

Swan-Ganzカテーテル(Goodtec社製)を挿入し, 日本光電社製Cardiac Output Computerで測定した心拍出量より算出した。脳血流量はUnique Medical社製Digital U-H Meterを使用して水素クリアランス法で頭頂部皮質血流量を測定し, 虚血前値に対する%変化で表した。脳圧はCamino社製Model 420を使用して頭頂部クモ膜下腔に挿入した脳圧測定用カテーテル(Camino社製Model 110-4G)より測定した。血清中SOD活性はNBT還元法(和光純薬工業社製SODテストワコー)を用いて測定した。

2) 急性実験 II

a) エバンスブルー(EB)投与方法および脳組織灌流固定法

再灌流15分後にバイパス回路(図1のA点)より5%EB(100mg/kg)を2.5ml/minで投与し, 再灌流30分後に脳組織を灌流固定した。

灌流固定は, 黒田¹³⁾の方法と同様に上・下大静脈からの自然脱血と, あらかじめ再灌流25分後に腹部大動脈より逆行性に大動脈弓部にまで挿入した18Fの送液カニューレによる灌流により行った。まず上・下大動脈離断と同時に人工心肺用ポンプ(泉工医科工業社製MPS-15-K)を用いて生理的食塩水を2.2L/minで80秒間灌流し, ついで4%中性緩衝ホルマリン溶液を同様に2.2L/minで80秒間灌流し脳組織を固定した。

b) 血液脳関門の透過性評価法

血液脳関門の透過性はEBの血管外漏出の有無で評価した。脳組織を採取した後, 厚さ5mmで大脳を冠状断し, 各切片におけるEB漏出度を肉眼的に観察した。

3) 慢性実験

虚血操作はすべて清潔に行った。再灌流後24時間の人工呼吸管理の後に人工呼吸器より離脱し, Safarら¹⁴⁾の神経学的評価法(表1)に従って再灌流後7日までの神経機能を観察した。この評価法では, 正常が0, 死亡あるいは重度昏睡状態が100となる。

4. 統計学的処理

測定値は平均値±標準誤差で示した。神経学的評価は, Wilcoxon-U testを用い, その他はnon-paired t testにて群間の有意差検定を行った。P<0.05をもって有意差ありと判定した。

表1 神経学的評価法 (文献14) より引用)

意識状態, 反射・運動機能, 呼吸状態, その他の4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, 昏睡あるいは死亡が100となる。

Neurologic Deficit Scoring for Dogs	
1. Level of Consciousness	Normal= 0 ; clouded= 2 ; delirium= 4 ; stupor= 6 ; coma= 8
2. Reflexes and Moter 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 (gaspig, irregular)= 4
c. Tracheal reflex	: present= 0 ; absent= 4
100 : coma or death 0 : normal score	

表2 再灌流後7時間までの心拍数, 平均動脈圧, 心係数, Ht, 血糖値の変化

	虚血前値	再灌流後時間									
		10	20	40(分)	1	2	3	4	5	6	7(時間)
心拍数	control 群 135±14	182±37*	189±31*	172±26*	159±20*	131±23*	125±22	141±25	148±29	149±23	165±16
(beat/min)	SMA-SOD 群 129±19	192±29*	189±15*	189±13*	179±10*	149±23	150±22	147±24	160±20	162±14*	162±16
平均動脈圧	control 群 120±13	199±42*	179±24*	134±26*	124±17	141±20	151±24	152±28	137±20	135±30	131±21
(mmHg)	SMA-SOD 群 110±17	167±18*	143±17*	123±23	125±20	134±24	139±26	145±19*	140±13*	138±13	124±26
心係数	control 群 3.6±0.5	5.0±1.3	4.2±0.6	4.0±0.4	3.6±1.1	2.5±0.9	2.7±1.4	2.2±0.6*	2.4±0.6	2.3±0.9*	2.3±0.7*
(L/min/m ²)	SMA-SOD 群 3.8±1.1	4.8±1.0	4.9±0.7	3.4±0.3	3.1±0.3	2.7±0.5	2.6±0.7*	2.5±0.7*	2.3±0.5	2.4±0.5	2.4±0.7
Ht	control 群 32.8±2.7	38.6±2.6*	39.3±1.8*	38.8±4.2*	38.1±2.4*	37.7±3.1	35.5±2.4	33.7±4.4	34.2±3.6	34.2±2.1	35.4±2.5
(%)	SMA-SOD 群 37.2±3.6	40.3±3.9*	39.8±3.4*	40.2±3.2*	41.2±3.7*	40.7±3.4	41.0±3.8	40.5±3.9	40.0±4.2	39.8±4.3	39.7±4.9
血糖値	control 群 131±20	208±27*	156±33	139±35	132±45	97±20	92±27	94±24	92±15*	86±16*	99±20
(mg/dl)	SMA-SOD 群 126±13	211±17*	188±16*	157±29	151±18	147±38	130±37	152±61	152±56	153±42	152±49

*: 虚血前値に対して有意差あり (P<0.05)

結 果

1. 急性実験 I

1) 心拍数, 平均動脈圧, 心係数, Ht, 血糖値 (表2)

心拍数, 平均動脈圧, 心係数, Ht および血糖

値の虚血前値および虚血解除後7時間までの変化には両群間に有意差は認められなかった。

(1) 心拍数

SMA-SOD 群およびコントロール群の虚血前値はそれぞれ129.2±18.9, 135.0±14.3であり, 両群ともに再灌流1時間後まで虚血前値の

140~150%までの有意の増加がみられた。以後、再灌流6時間後に SMA-SOD 群で虚血前値の120~130%までの有意の増加がみられた以外は両群ともに虚血前値前後で推移した。

(2) 平均動脈圧

SMA-SOD 群およびコントロール群の虚血前値はそれぞれ110.2±17.1mmHg, 119.7±13.1mmHg であり, SMA-SOD 群では再灌流後の20分間および4~5時間後にそれぞれ虚血前値の150%および120%前後の上昇がみられ, コントロール群では再灌流後の40分間に虚血前値の170%前後の上昇がみられた。

(3) 心係数

SMA-SOD 群およびコントロール群の虚血前値はそれぞれ3.38±1.13 L/min, 3.58±0.46 L/min であり, SMA-SOD 群では再灌流3~4時間後に, コントロール群では再灌流4時間および6~7時間後にそれぞれ虚血前値に対して75%, 60%までの有意の低下が認められた以外, 全経過を通じてほぼ虚血前値前後で推移した。

(4) Ht, 血糖値

a) Ht

SMA-SOD 群およびコントロール群の虚血前値はそれぞれ37.2±3.6%, 32.8±2.7%であり, 両群ともに再灌流1時間後までは虚血前値に対して有意に上昇し, SMA-SOD 群では虚血前値の120%, コントロール群では虚血前値の140%までの上昇がみられた。以後は両群ともにほぼ虚血前値前後で推移した。

b) 血糖値

SMA-SOD 群およびコントロール群の虚血前値はそれぞれ126.3±13.1mg/dl, 130.8±20.6mg/dlであった。SMA-SOD 群では再灌流10~20分後に虚血前値の170%前後の有意の上昇がみられたが, 以後はほぼ虚血前値前後で推移した。コ

ントロール群では再灌流10分後に虚血前値の160%前後の有意の上昇がみられ, 以後は虚血前値前後で推移したが, 再灌流5~6時間後に虚血前値の60~70%の有意の低下が認められた。

2) 脳血流量, 脳圧 (表3)

(1) 脳血流量

両群ともに再灌流10分後には虚血前値に対して有意に増加し, 再灌流40分後より虚血前値を下回る傾向が認められた。すなわち, 再灌流10分後には SMA-SOD 群では虚血前値の270~528%, コントロール群では189~307%までの増加がみられ, SMA-SOD 群の脳血流量はコントロール群より有意の増加であった。以後 SMA-SOD 群では再灌流40分後より虚血前値の70~90%となり, 再灌流1~2時間, 4時間, 7時間後には虚血前値に対する有意の減少が認められた。コントロール群では再灌流40分後より虚血前値に対して有意に減少し, 虚血前値の40~50%で推移した。なお, 再灌流2時間以後の脳血流量の低下はコントロール群では SMA-SOD 群と比較して有意であった。

(2) 脳 圧

SMA-SOD 群およびコントロール群の虚血前値はそれぞれ6.7±2.7mmHg, 7.3±4.2mmHg であり, 群間に有意差は認められなかった。再灌流に伴い両群において脳圧の上昇傾向がみられ, SMA-SOD 群では再灌流10~20分後および2~3時間後に虚血前値の190~220%の有意の上昇が認められた。一方, コントロール群では再灌流6~7時間後に虚血前値の170~190%の有意の上昇が認められた。なお, 再灌流後は脳圧の上昇に群間に有意差は認められなかった。

3) 血清中 SOD 濃度

SMA-SOD 投与前の血清中の SOD 活性は4.4U/mlであったが, 投与10分後には78.9U/ml

表3 再灌流7時間後までの脳血流量, 脳圧の変化

虚血前値	再 灌 流 後 時 間										
	10	20	40(分)	1	2	3	4	5	6	7(時間)	
脳血流量 control 群	100±0	251±40**	177±60	79±16*	54±20*	49±11**	45±8**	40±6**	41±7**	41±9**	43±6**
(%) SMA-SOD 群	100±0	365±98*	188±70	80±13	66±17*	76±13*	100±38*	81±12*	89±16	81±16	86±14*
脳圧 control 群	7.3±4.2	16.8±10.8	10.7±3.1	9.2±4.4	8.7±3.6	9.8±5.0	11.7±7.0	12.7±7.8	12.8±5.5	13.7±5.5*	12.8±6.4*
(mmHg) SMA-SOD 群	6.7±2.7	14.8±11.9*	14.3±7.2*	10.5±4.9	9.8±5.0	12.7±6.8*	13.0±6.8*	13.2±6.5	13.7±6.1	13.3±5.1	12.3±5.2

* : 虚血前値に対して有意差あり (P<0.05)

** : control 群と SMA-SOD 群の間に有意差あり (P<0.05)

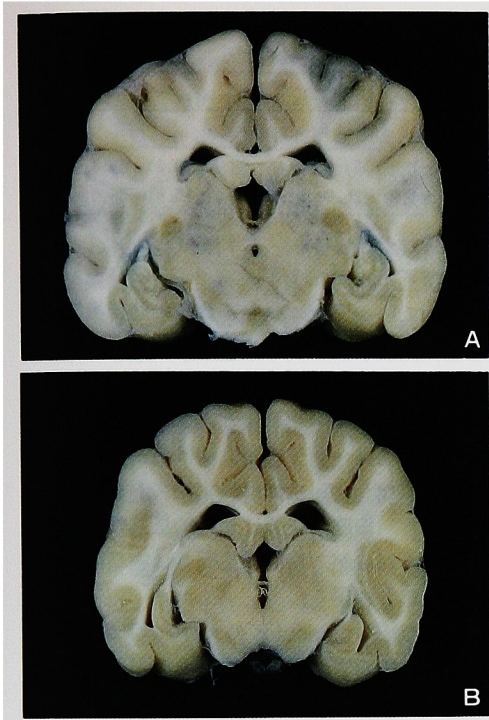


写真1 エバンスブルー (EB) に対する血液脳関門の透過性変化 (A: コントロール群, B: SMA-SOD 群) コントロール群では頭頂部および側頭部の大脳皮質, 視床, 視床下部に EB の漏出は全く認められない。

にまで上昇し, 4 時間後には 33.5U/ml に下降した。

2. 急性実験II (写真1)

写真上がコントロール群で, 下が SMA-SOD 群である。コントロール群では大脳皮質, 視床, 視床下部のいずれの領域にも EB の漏出がみられたのに対し, SMA-SOD 群ではまったく認められなかった。

3. 慢性実験

再灌流後24時間以内に死亡したものは各群で1頭ずつであり, それらの死因は術後出血であったため手術死とみなし対象から除外した。その結果, 評価の対象は SMA-SOD 群7頭, コントロール群10頭となった。

対象の17頭が人工呼吸器からの離脱に要した時間は平均2時間であり, 離脱後の呼吸循環動態は安定していた。Safar らのスコアで評価した神経機能の経時的変化は表3のようであった。再灌流後1日目のスコアは SMA-SOD 群 31.7 ± 6.45 , コントロール群 49.7 ± 5.31 であり, SMA-SOD 群の神経機能はコントロール群より良好であった。また, 再灌流後3日目を除き, SMA-SOD 群の神経機能はコントロール群より有意に良好であった。

すなわち, コントロール群は疼痛刺激および音刺激にのみ反応がみられる典型的な植物状態

表4 再灌流7日後までの神経学的予後

再灌流1日後から7日後までの control 群, SMA-SOD 群における個々のイヌの経時的な神経機能の変化を示す。表中の100は死亡例である。

control 群							
日							
1	2	3	4	5	6	7	
56	34	34	32	30	28	28	
48	36	36	30	30	34	32	
38	36	40	40	34	34	34	
42	40	40	40	40	40	40	
50	34	30	32	32	46	50	
46	32	32	42	42	100	100	
40	38	38	40	40	100	100	
48	48	50	50	100	100	100	
42	34	24	32	100	100	100	
40	40	40	42	100	100	100	

SMA-SOD 群							
日							
1	2	3	4	5	6	7	
18	6	6	6	6	0	0	
30	30	30	26	26	26	26	
34	28	28	28	26	26	26	
34	26	22	22	24	24	30	
36	36	42	40	34	34	34	
40	38	38	38	38	40	40	
30	28	26	30	34	100	100	

表5 再灌流7日後までの神経学的予後

		再 灌 流 後(日)						
		1	2	3	4	5	6	7
NDS	control 群	45.0±1.7*	37.2±1.4*	36.4±2.1	38.0±1.9*	54.8±9.4*	68.2±10.1*	68.4±10.1*
	SEM-SOD 群	31.7±2.4	27.4±3.7	27.4±4.1	27.1±4.0	26.9±3.7	35.7±10.8	36.6±10.7

*: control 群と SMA-SOD 群の間に背意差あり (P<0.05)

であり、四肢は過緊張状態で横たわったまま走
るような動作が頻回にみられ、典型例では周期的
に後弓反張を呈した。全例が経口摂取不能の
ため、再灌流後2日目より中心静脈栄養を余儀
なくされた。また、コントロール群の生存率は
再灌流後4日目までが100%、5日目が70%、6
日目以後が50%であった。

それに対し SMA-SOD 群では、再灌流1日
目より疼痛刺激および音刺激に対する反応が良
好であり、音刺激に対しては音の方向に首を動
かす動作がみられ、四肢の過緊張はみられず、
下肢に中等度の運動麻痺が認められる程度であ
った。再灌流後2日目には7頭のうち4頭では
立ち上がる動作がみられ、その中の1頭は歩行
可能であった。また、全例が再灌流後1日目よ
り経口摂取が可能であり、再灌流後5日目まで
の生存率は100%であり、6日目以降に1頭が死
亡したのみであった。

なお、コントロール群において再灌流5日
目に3頭、6日目に2頭が死亡したがこれらはい
ずれも長期の中心静脈カテーテル留置による
と思われる敗血症と考えられた。また、SMA-SOD
群において再灌流後6日目に1頭が死亡したが
死亡原因としては誤嚥性肺炎が疑われた。

考 察

好氣的代謝を営む生物はフリーラジカル(FR)
からの組織障害を免れるために豊富な内因性防
御機構が備わっている。すなわち、特異的なも
のとして、 O_2^- (スーパーオキシドアニオン)に
は SOD (スーパーオキシドジスムターゼ)、 H_2
 O_2 (ヒドロゲンパーオキシド)にはカタラ
ーゼがあり、非特異的なものとして脂溶性の α -
トコフェロール、ユビキノンや水溶性のアスコ
ルビン酸、GSH (還元型グルタチオン)などが

知られている¹⁵⁾。しかし、それらの防御機構のほ
とんどは細胞膜を含む細胞内空間に存在し、血
漿を主体とする細胞外空間にはきわめて少量の
セルロプラスミンや細胞外 SOD が存在するの
みで、カタラーゼや GSH はほとんど存在しな
い¹¹⁾。したがって、生体に酸化的ストレスが加わ
ったとき、細胞内空間は比較的抵抗性を有する
と考えられるが、細胞外空間では容易に FR 反
応が惹起され得る。

1977年、Demopoulos のグループ²⁾が、虚血性
脳障害は膜脂質の過酸化により惹起されると報
告して以来、FR と虚血性脳障害に関する研究が
数多くなされている。それらの研究結果をまと
めると、以下のようである。不完全脳虚血のよ
うに虚血中に多少でも血流が残存する場合は FR
反応は虚血中にすでに惹起され得るが、完全脳
虚血の場合は再灌流に伴って FR 反応が惹起さ
れ得る。また、それらの FR 発生源は遊離アラ
キドン酸の酵素的 (アラキドン酸カスケード)
あるいは非酵素的 (自動酸化) な過酸化過程¹⁶⁾、
キサンチン・キサンチンオキシダーゼ系¹⁷⁾および
ミトコンドリアの電子伝達系¹⁸⁾が想定されて
いる¹⁰⁾。しかし、方法論上の問題から、in vivo の
実験系で FR 反応を直接検出することが困難で
あるため、現時点においても FR 反応により虚
血性脳障害が惹起されるという確証は得られて
いない。

本研究で使用した脳虚血法¹²⁾では完全全脳虚
血モデルが得られ、18分間の脳虚血で植物状態
を作製することが可能である。また、再灌流後
のモデルの長期生存が可能であるという特徴を
有することから、とくに本研究のように再灌流
後の神経学的予後を指標として薬物の脳保護効
果を検討するのに適しているものと考えられる¹⁹⁾。
また、今回使用した SMA-SOD は、先述のよ

うに O_2^- に対する特異的スカベンジャーであり、SOD に側鎖として付加した SMA の作用で、生理的状态で自己のアルブミンと複合体を形成することで見かけの分子サイズを増大 (分子量約10万) することで、糸球体濾過や網内系に補足されることなく長時間血中を循環するため、一般の SOD (半減期: 4 ~ 5 分) に比較して有意に半減期が長く、また pH の低下した局所での組織移行性が良好である特徴を有する¹¹⁾。本研究結果からも、その血中半減期は 4 時間前後であった。

今回、体循環系の各種パラメーターに群間の有意差はみられなかったにもかかわらず、SMA-SOD 群において反応性充血期の脳内流量が有意に増加した。一般に、反応性充血は虚血中に自己調節機能が障害され、最大限に拡張した脳血管に血流が再開されるために生じるとされることより、反応性充血に伴う脳圧亢進は脳血液量の増加が主因と考えられている。しかし、今回、黒田の報告¹³⁾と同様に、コントロール群において再灌流早期のエバンスブルー (EB) に対する血液脳関門の透過性が亢進することが確認されたことから、この時期に血管原性脳浮腫が発生したことが推測できる。したがって、反応性充血期の脳圧亢進には脳血液量の増加に伴う脳血液量の増大以外に血管原性脳浮腫が関与していることがうかがえた。しかし、どの程度脳圧亢進に寄与しているかは不明である。一方、SMA-SOD によりその透過性の亢進が阻止されたことから、再灌流早期の血液脳関門の透過性亢進には FR が関与しているものと考えられた。したがって、反応性充血期のように脳内コンプライアンスが低下している状況下では、SMA-SOD により脳浮腫が阻止された結果、SMA-SOD 群の脳血液量がコントロール群以上に増加したものと考えられる。また、SMA-SOD 群において脳血液量の増加による脳血液量の増大が SMA-SOD の抗脳浮腫作用に伴う脳圧の下降を打ち消した結果、両群の脳圧亢進の程度に差を生じなかったと思われる。

また、SMA-SOD により遅発性脳血流減少が軽減された。遅発性脳血流減少はカルシウム拮抗薬以外に明確な改善効果が認められないこと

から、カルシウムイオンの血管内皮細胞内への過剰流入による脳血管の異常収縮が主因とされるが²⁰⁾、先述のように脳浮腫の関与も否定できない。また、ヘパリン・ウロキナーゼ併用療法²¹⁾あるいは SOD と Deferoxamine などのラジカルスカベンジャーにより改善されるとする報告⁷⁾から、遅発性脳血流減少の発現に関与する因子は単一ではなく、カルシウムの代謝異常、血液性状の異常、FR 反応などの多くの要因が関与している可能性が示唆された。

以上のように、FR 反応は再灌流早期の血液脳関門の透過性変化と遅発性脳血流減少発現に関与し得る可能性が考えられた。先述のように細胞内空間には SOD をはじめ豊富な内因性防御機構が備わっていることから、たとえ SMA-SOD が細胞内に移行したとしても細胞保護的な意味は少ないものと考えられる。一方、細胞外空間にはそのような防御機構がきわめて少なく、さらに脳内毛細血管のキサンチンオキシターゼは脳実質の 3.7 倍とされ²²⁾、虚血によりキサンチンデヒドロゲナーゼがキサンチンオキシターゼに転換されるとする報告^{17), 23)}や、脳内血管のミトコンドリアは骨格筋の 5 ~ 6 倍あること、また再灌流時に最初に高濃度の酸素さらされる場が血管内皮細胞であることから、血管内皮細胞は細胞内外からの FR 反応により容易に組織障害を被り易いことが考えられる。したがって、本研究結果から、脳虚血後の再灌流により、少なくとも血管内皮細胞周辺では FR 反応が惹起され得ると考えられた。また、SMA-SOD の作用は血管内細胞周辺で発揮され、それにより再灌流早期の血液脳関門の保護および遅発性脳血流減少の改善がもたらされた結果、神経学的予後の改善が得られたものとする。

結 論

1. SMA-SOD の血中半減期は約 4 時間であり、10mg/kg の投与量で心拍数、平均動脈圧、心係数に影響はみられなかった。

2. コントロール群において、再灌流早期にエバンスブルーに対する血液脳関門の透過性亢進がみられたことより、再灌流早期には血管原性脳浮腫が発生したことが考えられた。

3. O_2^- の特異的スカベンジャーである SMA-SOD により、再灌流早期のエバンスブルーに対する血液脳関門の透過性亢進が阻止されたことから、この時期の血液脳関門の透過性亢進にフリーラジカル反応が関与していることが示唆された。

4. SMA-SOD により反応性充血期の脳血流量が増加したことより、反応性充血期の脳圧亢進は脳血液量の増大による以外に血管原性脳浮腫も関与していることがうかがえた。

5. SMA-SOD により遅発性脳血流減少が改善されたことより、フリーラジカル反応が遅発

性脳血流減少の再生に関与していることが示唆された。

6. SMA-SOD によりフリーラジカル反応が阻止された結果、神経機能の改善が得られたものと考えられた。

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・蘇生学教室小坂二度見教授、実験にご協力いただいた熊本大学医学部第二生化学教室井上正康助教授、岡山大学医学部麻酔・蘇生学教室橋本秀則講師、八塚彦彦助手、ならびに教室員各位に心から感謝いたします。

文 献

- 1) Hossmann KA, and Sato K: Recovery of neuronal function after prolonged cerebral ischemia. *Science* (1970) **168**, 375-376.
- 2) Kirino T: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* (1982) **239**, 57-69.
- 3) Pulsinelli WA, Brierly JB, and Plum F: Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* (1982) **11**, 491-498.
- 4) 橋本秀則, 小坂二度見: 脳蘇生法の基礎. *臨麻* (1989) **13**, 1051-1060.
- 5) Demopoulos H, Flamm E, Seligmann M, Power R, Pietronigro D, and Ransohoff J: Molecular pathology of lipids in CNS membranes. In: *Oxygen and physiological Function* (ed. by Jobsis FF) Professional Information Library, Dallas (1977), pp 491-508.
- 6) Itoh T, Kawasaki M, Yamauchi Y, Shimizu S, and Nakamura M: Effect of allopurinol on ischemia and reperfusion-induced cerebral injury in spontaneously hypertensive rats. *Stroke* (1986) **17**, 1284-1287.
- 7) Cerchiari EL, Hoel TM, Safar P, and Scialabassi RJ: Protective effects of combined superoxide dismutase and deferoxamine on recovery of cerebral blood flow and function after cardiac arrest in dogs. *Stroke* (1987) **18**, 869-878.
- 8) Abe K, Yuki S and Kogure K: Strong attenuation of ischemic and postischemic brain edema in rats by a novel free radical scavenger. *Stroke* (1988) **19**, 480-485.
- 9) Forsman M, Fleischer JE, Milde JH, Steen PA, and Michenfelder JD: Superoxide dismutase and catalase failed to improve neurologic outcome after complete cerebral ischemia in the dog. *Acta Anesthesiol Scand* (1988) **32**, 152-155.
- 10) 吉田伸一, 浅野孝雄: 脳虚血病態におけるフリーラジカルの役割. *日臨* (1988) **46**, 69-73.
- 11) 井上正康, 荻野哲也, 安東由喜雄, 広田昌彦, 渡辺信和, 森野能昌: 病巣指向型 SOD 誘導体の開発と生体酸素毒性の制御. *フリーラジカルの臨床* (1987) **2**, 83-91.
- 12) 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法による完全全脳虚血法に関する研究. *麻酔* (1989) **38**, 859-867.
- 13) 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**, (印刷中).
- 14) Safar P, Stezoski W, and Nemoto EM: Amelioration of brain damage after 12 minutes cardiac

- arrest in dogs. Arch Neurol (1976) **33**, 91-95.
- 15) 橋本秀則, 武田吉正, 八塚秀彦, 塩飽善友, 小坂二度見: 脳虚血病態とフリーラジカル. BIOMedica (1990) **5**, 48-53.
 - 16) 浅野孝雄: 脳虚血病態とフリーラジカル—特にアラキドン酸カスケードとの関連について. フリーラジカルの臨床 (1988) **3**, 97-105.
 - 17) Nihei H, Kamemitsu H, Tamura A, Oka H, and Sano K: Cerebral uric acid, xanthine, and hypoxanthine after ischemia: The effect of allopurinol. Neurosurg (1989) **25**, 613-617.
 - 18) 藤田雄三: 脳ミトコンドリアにみられるラジカル種. フリーラジカルの臨床 (1987) **2**, 39-49.
 - 19) 近藤正得: イヌの脳虚血時間と神経学的予後に関する実験的研究. 麻酔 (1991) **40**, 印刷中.
 - 20) 橋本秀則, 小坂二度見: 心停止蘇生後の脳障害. 医学のあゆみ (1989) **149**, 751-754.
 - 21) 森本直樹: 完全全脳虚血後の脳障害に及ぼすヘパリン・ウロキナーゼ併用療法の効果に関する実験的研究. 岡山医誌 (1991) **103**, 印刷中.
 - 22) Betz AL: Identification of hypoxanthine transport and xanthine oxidase activity in brain capillaries. J Neurochem (1985) **44**, 574-579.
 - 23) Kinuta Y, Kimura M, Itokawa Y, Ishikawa M, and Kiuchi H: Changes in xanthine oxidase in ischemic rat brain. J Neurosurg (1989) **71**, 417-420.

**The effects of SMA-SOD on brain damage induced by
complete global brain ischemia in dogs**

Yoshimasa TAKEDA

Department of Anesthesiology and Resuscitology,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. F. Kosaka)

The effects of styrene maleinic acid butyl ester superoxide dismutase (SMA-SOD) on the brain damage induced by ischemia were studied in dogs. Eighteen minutes of cerebral ischemia was produced by clamping the ascending aorta with aorto-atrial and aorto-femoral vein bypass circuit. SMA-SOD (10mg/kg) was administered just after the initiation of recirculation. Dogs were divided into, control group and SMA-SOD group. In each group, cerebral blood flow (CBF) and intracranial pressure (ICP) were measured for 7 hours after ischemia, and neurologic outcome was evaluated up to 7 days after ischemia. Furthermore, extravasation of Evans blue dye (EB, 100mg/kg) were observed 30 minutes after ischemia. SMA-SOD increased CBF during the hyperemia, and improved both delayed post-ischemic hypoperfusion (DHP) and neurologic outcomes. Extravasation of EB were recognized in the control group, but not in the SMA-SOD group.

In conclusion, vasogenic edema might play a role in the elevation of ICP besides the hyperemia, and SMA-SOD improved neurologic outcome by prevention of edema, and improvement of DHP. Furthermore, free radicals might play a role in the appearance of ischemic brain damage.