

【原著】

急速減圧ラットにおける脳微小血管の組織化学的観察

野原 敦¹⁾ 井上 治²⁾ 砂川 昌秀²⁾ 上江洲 安之²⁾
鈴鹿医療科学大学医用工学部¹⁾
琉球大学医学部附属病院高気圧治療部²⁾

急速減圧後の脳では、臨床例で脳血流の低下が報告されている。本研究では、急速減圧暴露後のラット脳で、組織学及び組織化学的に微小血管に焦点をあて検討した。Wistar系ラットを用い、対照群と急速減圧群で比較を行った。急速減圧群では、動物用タンクを用いて6ATAまで加圧し、90分後に大気圧まで急速減圧を行った。血管透過性の観察には、Horseradish peroxidase (HRP) 投与後、Diaminobenzidine (DAB) 反応を行い、微小循環の観察には、墨汁を左心より注入し、微小血管の充盈状態をみた。また虚血部位をTriphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) の呈色反応で観察し、組織学的観察にはHE染色等を行った。肉眼的な観察と光顕的観察において、対照例では異常は見られなかったが、急速減圧例では、異常所見が得られた。墨汁注入例では、微小循環の障害を示す非充盈部分がみられ、HRP注入例では血管透過性を示す茶色に反応した血管がみられた。TTC例では、非呈色部位がみられたことにより、脳血流の低下が考えられ、血管内における赤血球凝集、血管内皮への白血球の接着などから、内皮障害が考えられた。急速減圧は、血液脳関門破綻による血管透過性亢進及び白血球、血小板、赤血球等の血管内皮細胞への接着・凝集による微小血管の狭小と閉塞等の所見から脳微小循環障害を引き起こす事が示唆された。

キーワード 減圧症, 脳微小循環, 血液脳関門, ラット脳組織, 白血球接着

【Original】

Histochemical Changes in Cerebral Microvessels in Rats Exposed to Rapid Decompression

Abstract

The decrease in cerebral blood flow following exposure to rapid decompression has been reported in some clinical cases. This study focuses on the histologic and histochemical changes in the brain microvasculature of rapidly-decompressed rats. The rats in the rapid decompression group were pressurized to 6ATA for 90 minutes, and then rapidly depressurized to 1 ATA in three minutes. The control group was not pressurized at all. To enable observation of the vascular permeability, the rats were injected with horseradish peroxidase (HRP). Visualization was obtained by the reaction of diaminobenzidine (DAB) on a frozen section. For evaluation of the blood microcirculation, the animals were injected with India ink via the left ventricle and the microvascular blood filling status was examined. The ischemic regions were represented by a negative color reaction with triphenyl tetrazolium chloride (TTC). Gross and microscopic examinations revealed no abnormal changes in the control group whereas unusual findings were observed in the rapid decompression group. Intravascular erythrocyte aggregates and leukocyte adherence to the vascular endothelium indicative of endothelial dysfunction were found. Filling defects indicative of a microcirculatory disturbance were noted in the rapidly decompressed animals by the India ink injection. Vascular hyperpermeability was also indicated by a brown coloration after the injection of HRP. The negative color reaction to TTC strongly suggested diminished cerebral blood flow. These histological findings support the clinical observations that cerebral microcirculations are impaired by rapid depressurization.

keywords Dysbarism, Cerebral microcirculation, Blood-Brain Barrier, Rat brain histology, Leukocyte adhesion

緒言

高気圧曝露後の急速減圧において、脳組織では、血管透過性の亢進や血流低下の報告がなされており¹⁾、微小循環の変化が示唆されている。臨床例においては、減圧症発生現場での一時的な意識消失や発語障害の報告もあり^{2, 3)}、脳血管における変性も報告されている⁴⁾。

減圧症の病態生理として、生体内での気泡形成を trigger として、血小板や赤血球凝集、血管内皮障害や凝固系などの変化から、循環障害を生じる。^{5, 6)}

障害を受けた血管内皮細胞と活性化された血小板、白血球の接着は更に高度な微小循環障害や炎症を招く可能性がある。⁷⁾

今回、我々は、急速減圧後の脳における微小循環状態をみる事を目的に、組織学及び組織化学的に微小血管に焦点をおいて検討した。

材料と方法

実験には体重200から350gのwistar系雄性ラット16匹(九動株式会社 熊本)を温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ で、湿度を50~60%、照明時間8:00~20:00とした条件下で固形試料(CE-2, 日本クレア)を与え、自由飲水とした環境で飼育し、以下の各群に分けた。

2, 3, 5-Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC, sigma T-8877) 群において急速減圧例3例と正常対照例1例、墨汁(Bokuteki, Kuretake) 注入群において急速減圧例3例と正常対照例2例、Horseradish peroxidase (HRP, sigma type II P-8250) 投与群において急速減圧例3例と正常対照例1例、一般染色及びToluidin Blue&Safranin染色に急速減圧例1例と正常対照例2例を用いた。

急速減圧例においては、動物用小型チャンバー(Barotec Hanyuda model P-4000)で、5分間で6気圧まで圧縮空気にて加圧し、90分間保圧した後、大気圧まで3分間で急速減圧を行った。正常対照例は、各群とも加圧および減圧を行わない無処置とした。脳取り出しの際のラットの麻酔には各群とも、ペントバルビタールナトリウム0.17mg/g (NEMBUTAL® 大日本住友製薬株式会社)を腹腔内投与した。

脳組織における微小血管の状態は、TTCによる呈

色反応と、墨汁を用いた注入状態、さらにDAB反応により観察を行った。TTC群では、減圧後の脳を取り出した後、約5mmの前額断にスライスし、2% TTC液に浸漬して還元による呈色反応を室温で10分間行い、生理食塩水で洗浄後、脳断面において肉眼的観察を行った。

血管網の状態を観察するために、墨汁注入例では、急速減圧後、開胸し生理食塩水および10%ホルマリン液にて左心室からの灌流固定に引き続き、約100cmH₂Oの灌流圧で墨汁原液150mlを注入し、150 μm の凍結脳切片を作成し、アルコール脱水後、キシレンで透徹し、光学顕微鏡下にて注入状態を観察した。

血管透過性の状態の観察には、酵素化学的な方法として、正常対照例及び急速減圧群に動物用チャンバー収容前にHRP125mg/kgを尾静脈から投与した。これらのラット脳では40 μm の凍結切片を作成後、0.05M Tris Bufferに溶解した発色基質である0.05% 3, 3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, sigmaD-5637)により室温で15分間の呈色反応⁵⁾を行い、ゼラチン・アルコールにてスライドガラスに貼り付け、光学顕微鏡により血管透過性を観察した。

組織学的な観察として、5 μm のパラフィン切片にHematoxylin&Eosin染色を行い、さらに2 μm の樹脂包埋準超薄切片にToluidin Blue&Safranin染色を行って、血管内および血管周辺組織を観察した。

本研究は、琉球大学動物実験委員会の許可を経て、倫理規定に則って行ったものである。

結果

急速減圧後にラットに現れる症状としては、減圧直後から体毛の逆立ち、活動低下、呼吸異常、四肢および尾への噛みつき等が観察された。

TTCによる虚血及び循環不全部位の観察の結果、急速減圧曝露により、大脳皮質の背側面の表層で呈色が見られない部位(Fig1B)や、大脳と海馬の間で、呈色反応の弱い部分(Fig1C)が観察された。対照例では、全体的に呈色し、呈色反応のみ見られない部位や弱い部分は観察できなかった(Fig1A)。

墨汁注入による微小循環の状態をみると対照

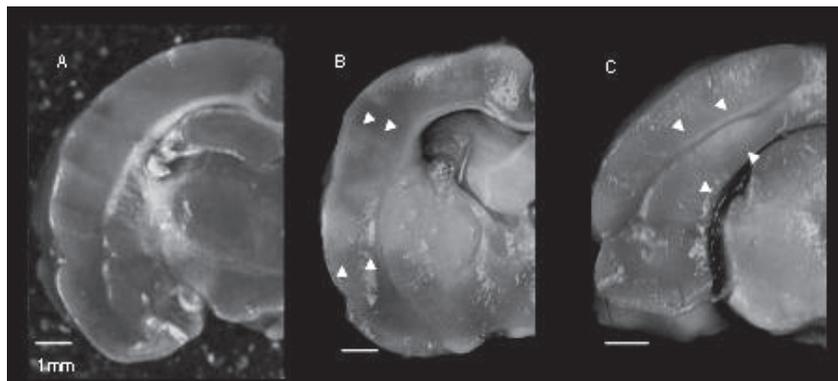


Fig. 1 TTC color reaction in rat brain.

(A) Normal color reaction in a control animal. (B) Negative color reaction in a rapidly-decompressed rat. Marked areas show no color reaction in the dorsal surface layer of the cerebral cortex. (C) Weak color reaction in a rapidly-decompressed rat between the cerebrum and hippocampus.

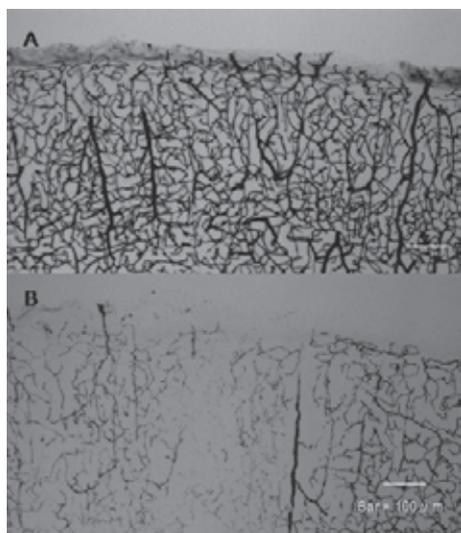


Fig. 2 Vasculature of cerebral cortex following injection of India ink
(A) Control rat: Blood vessels in layers I to IV of the cerebral cortex are well-filled with India ink and densely distributed. The capillary network can be seen clearly. (B) Rapidly-decompressed rat: Filled blood vessels are sparse and poorly-filled areas are observed.

Fig. 3 Vasculature in cerebral cortex at higher magnification
(A) Control rat: Blood vessels are well-filled with injected India ink. (B) Rapidly-decompressed rat: Narrowed and interrupted blood vessels are observed.

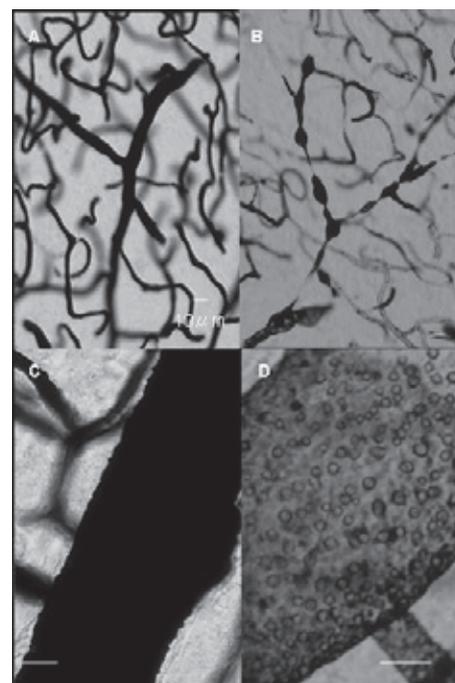
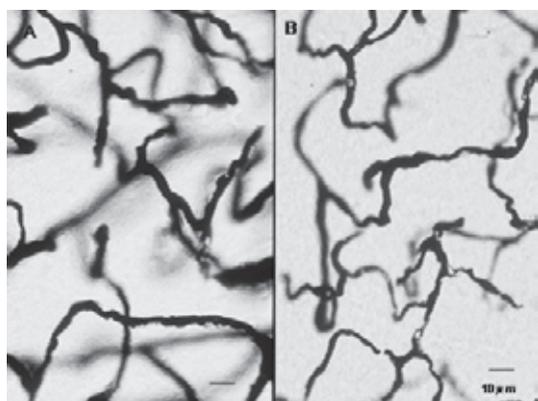


Fig. 4 Vascular changes in the thalamus of rats following India ink injection.

(A) Vasculature in a control rat. (B) Vasculature in a rapidly-decompressed rat: Blood vessels in the thalamus look moniliform with narrow sections caused by vasoconstriction. (C) Control rat: Vessels between the corpus callosum and caudate nucleus are well-filled with India ink. (D) Rapidly-decompressed rat: Numerous globular structures of about 5 μ m in diameter, possibly leukocytes, are observed adhering to the surface of the vascular inner wall.

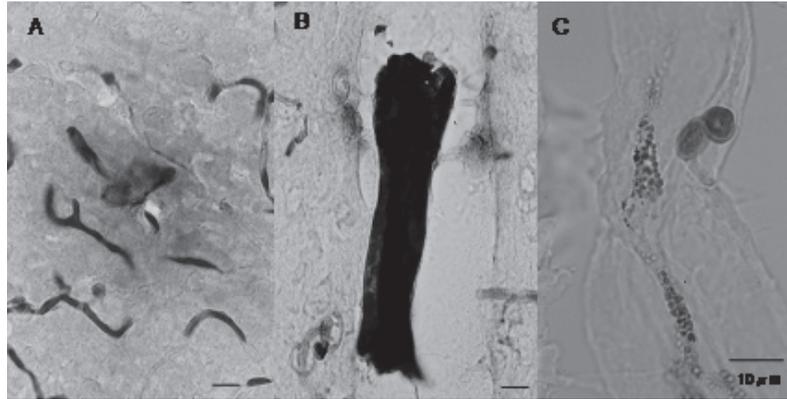


Fig. 5 Vascular changes following HRP injection in a rapidly-decompressed rat.

(A) A color reaction indicates vascular hyperpermeability and stained neuropil by DAB. (B) Blood vessels are intensely-stained and astrocyte glial processes (shown on both sides of the blood vessel) are lightly-stained, indicating a positive DAB reaction. (C) Platelets aggregate in the vascular lumen.

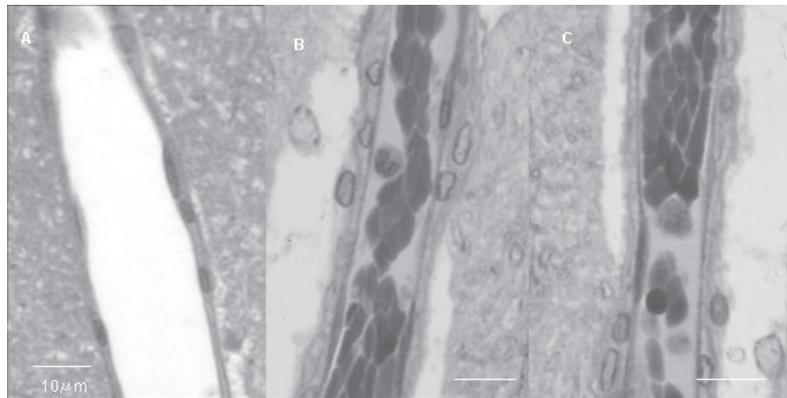


Fig. 6 Histologic observation of rat brain with toluidine blue and safranin staining : Longitudinal section of cerebral cortex blood vessel.

(A) Control rat : Vascular lumen and surrounding tissues are well-preserved. (B) Rapidly-decompressed rat : The lumen is narrowed by aggregated neutrophils on the surface of the vascular wall. (C) Rapidly-decompressed rat : The vascular lumen is filled with neutrophils and erythrocytes.

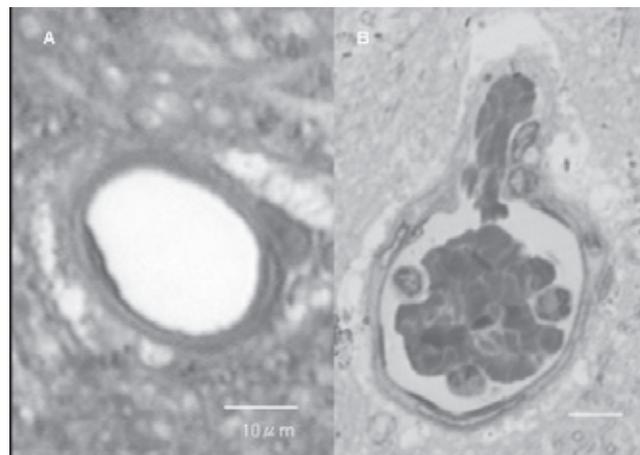


Fig. 7 Histologic observation of rat brain with toluidine blue and safranin staining : Cross-section of a blood vessel in the hippocampus.

(A) Control rat : The vascular lumen is well-preserved. (B) Rapidly-decompressed rat : The vascular lumen is filled with neutrophils and deformed red cell aggregates.

(Fig2A)では墨汁を注入すると大脳皮質のI層からIV層あたりまでの血管分布がよく描出され、その密度も高く、毛細血管まで網の目のようにみられた。しかし、急速減圧暴露 (Fig2B)では、血管もまばらで、注入状態の悪い部分がみられた。高倍率で観察すると、対照例 (Fig3A)では、約 $5\mu\text{m}$ ほどの墨汁がよく注入された状態の血管が観察される。しかし、一方、急速減圧暴露 (Fig3B)では、血管への注入状態が一樣ではなく細くなった部分や注入の途切れがちな注入状態不良な部位が観察された。

同様に、墨汁注入例の対照例 (Fig4A)で、視床の部分でみられた血管において対照例では良好な充盈状態だが、急速減圧例では、数珠状となっており、収縮して細くなっている部分が確認された (Fig4B)。さらに、脳梁と尾状核を穿通する血管では、対照例では墨汁が良好に充盈されている (Fig4C)が、急速減圧暴露例では、赤血球及び白血球と推察される $5\mu\text{m}$ ほどの無数の球状物質の血管内壁への接着が観察された (Fig4D)。

HRP注入による血管透過性の観察では、対照例の脳血管においては、赤血球がwash outされ、DABによる呈色反応はみられず、高倍でも組織や血管周囲での呈色反応は観察されなかった。しかし、急速減圧暴露例においては、大脳皮質の血管の大部分でDAB反応により、茶褐色に反応した血管がみられた。大脳皮質を高倍で観察した結果、neuropilがDABによって茶褐色に染まっていることが観察され (Fig5A)、血管周囲腔の拡大に加え、DAB反応により、濃く染まった血管と軽度に染まったastrocyte glia細胞の突起が認められた (Fig5B)。さらに赤血球や、血管を塞ぐ血小板とみられる $1\mu\text{m}$ 程度の顆粒の凝集も観察された (Fig5C)。

Toluidin Blue&Safranin染色による組織学的観察では、対照例では、血管内腔もよく灌流されており白血球の接着等はみられない (Fig6A, 7A)が、急速減圧暴露例では、大脳皮質の血管の縦断面で、血管壁の近傍に好中球がみられ、内腔を狭くしているのがわかる (Fig6B)。その周囲の血管壁においては、膨化したastrocyte gliaの突起がみられた。好中球が内腔をふさぎ、赤血球が詰まった状態 (Fig6C)や、海馬

の血管の横断面内腔には、変形した赤血球が凝集し、白血球も血管内皮に接着している (Fig7B)。

HE染色による急速減圧曝露例の大脳皮質の血管では、perivascular spaceの拡大と濃染した血管内皮細胞がみられた。

考察

急速減圧後の脳微小血管の観察に主眼をおいた今回の実験では、虚血及び循環不全部位と考えられるTTCの非呈色部、墨汁の非充盈部、さらに血液脳関門の破綻部がみられた。

TTCは、還元部位では赤色を呈し、虚血部位ではその呈色反応が見られないことを利用して、梗塞巣の観察や定量などに使われている。⁹⁾

今回のTTC反応での観察では、大脳皮質において赤色の呈色反応が見られない部位があり、血管の支配灌流領域の障害部から末梢部にかけて、急速減圧を要因とする虚血が原因で非呈色となったものと考えた。⁶⁾

墨汁注入を行った急速減圧例では、数珠状に収縮している血管が観察された。これらの所見は、明らかに血流不全及び微小循環障害を反映し、完全虚血および一過性虚血から再灌流障害ならびに組織障害を引き起こすものと考えられた。さらにこのような変化を示す部位が限られていたため、虚血及び低灌流からの低酸素に特有な脆弱性を潜在的に呈する可能性も示唆された。

一方、血管収縮は、酸素分圧の上昇でも生じるため、高圧下での影響を考慮し、今後、同圧まで加圧を行い緩徐な減圧を行った群との比較も必要とされる。

HRP注入例におけるneuropilのDABによる呈色や、astrocyte glia突起のDABへの反応から、急速減圧後の血管透過性の亢進が考えられた。

Hillsらは、Guinea pigの頸動脈からmicrobubbleを注入し、trypan blueで血管透過性の観察を行い、注入2時間後まで血液脳関門の破綻をみている。¹⁰⁾

Perssonらは、Evans Blueをprotein tracerとして用い、ラットにairを注入し、血管内皮細胞を電顕レベルで超微細構造を観察し、その結果、血液脳関門の破綻は空気塞栓によるsearing stressによる可能性

を示唆している。¹¹⁾

我々は、これまで、急速減圧後のラットの脳において、減圧性気泡が原因と考えられる血液脳関門の破綻と微小循環障害の出現を、EvansBlueや墨汁注入法により、経時的に検討し、加えてNissl, HE染色等による組織学的検討を行いdark neuronの出現や血管周囲腔の拡大などについて報告した^{12, 13)}。これらの変化は急速減圧から24時間後迄には、一旦みられなくなったが、48~72時間後に再び観察され、減圧性微小気泡発生からの一時的及び完全な血管閉塞後の虚血性変化や再灌流障害、そしてmaturation現象による影響を考えた。¹⁴⁾

Del Zoppoらは、Baboonの中大脳動脈を結紮後の再灌流時に多核白血球による毛細血管の閉塞を電顕で観察しており、この血管壁への接着が、いわゆるno-reflow現象において重要な役割を果たしているとして記している。¹⁵⁾

Levinら¹⁶⁾は、犬を用いた実験でsevereな減圧群において血液濃縮がみられ、頸動静脈で有意な透過性の亢進、さらに血管内皮に接着する白血球と血小板を走査電顕で観察しており、凝固機序の活性化を伴うと報告した。

Thorsenら¹⁷⁾は、減圧に関係する血小板活性化および誘導を窒素のmicrobubble表面において観察し、さらにTanoueら¹⁸⁾は、減圧後からの血小板数減少を走査電顕により経時的に観察し、Peknaら¹⁹⁾も、減圧後の補体でiC3とC3a等の有意な減少を経時的に観察している。

近年、血管内皮細胞への血小板および白血球等の接着因子の関与による接着、凝集ならびにサイトカイン類の放出は、再灌流後の二次的な微小循環障害や脳組織障害の一因とされている²⁰⁾。

我々の今回の準超薄切片や墨汁注入標本においても、好中球とみられる多核白血球が血管壁に多数接着し、微小循環を阻害する状態が見られており、この阻害がType II減圧症患者の脳血流低下などにも関連し、減圧症発生現場での一時的な意識消失や発語障害の一因として考えられた。

今回得られた所見の機序として高圧環境曝露からの急速減圧により、減圧性気泡の通過による血液脳

関門の破綻、血管の不規則な収縮、白血球、血小板、赤血球などの血管内皮細胞への接着・凝集による脳微小血管内腔の狭小と閉塞から虚血および血流障害、再灌流障害などの循環動態の変動が生じ、脳組織障害が増悪することが示唆された。

謝辞

組織標本作製及び観察におきまして、多大な御指導を賜りました平田幸男先生に心より謝意並びに敬意を表します。

参考文献

- 1) Adkisson GH, Macleod MA, Hodgson M, J, Sykes JJW, Smith F, et al: Cerebral perfusion deficits in dysbaric illness. *The Lancet* 1989; 15: 119-122.
- 2) 湯佐祐子: 琉球大学医学部附属病院における減圧症治療の現状と問題点. *日本高気圧環境医学会雑誌* 1988; 23: 165-171.
- 3) 井上治, 野原敦, 砂川昌秀: 沖縄県におけるII型およびIII型減圧症の易発現性と重症化の検討—職業ダイバーとレジャーダイバーとの比較—. *日本高気圧環境・潜水医学会雑誌* 2004; 39: 209-217.
- 4) Palmer AC, Calder IM, Yates PO: Cerebral vasculopathy in divers: *Appl Neurobiol* 1992; 18: 113-124.
- 5) 湯佐祐子: 減圧症. *最新医学* 1986; 41: 313-320.
- 6) Hallenbeck JM, Anderson JC: Pathogenesis of the decompression disorders. In: Bennett PB & Elliott DH ed. *The Physiology and Medicine of Diving*, 3rd ed. London: Bailliere Tindall, 1982; pp 335-460.
- 7) 岡嶋研二: 血管内皮細胞の機能とその破綻. In: 岡嶋研二(編). *血管内皮細胞障害—臨床へのアプローチ—*. 東京: 総合医学社 1998; pp1-6.
- 8) Leutosalo 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 NeuroPathologica* 1982; 7: 179-187.
- 9) 佐野豊: 組織学研究法. 東京: 南山堂. 2003; pp507-520.

- 10) Hills BA, James PB : Microbubble damage to the blood-brain barrier : relevance to decompression sickness. *Undersea Biomed Res* 1991 ; 18 : 111-116.
- 11) Persson LI, Johansson BB, Hansson HA : Ultrastructural studies on blood-brain barrier dysfunction after cerebral air embolism in the air. *Acta neuropathol* 1978 ; 44 : 53-56.
- 12) 野原敦, 湯佐祚子, 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. *日本高気圧環境医学会雑誌* 1990 ; 25 : 183-189.
- 13) 野原敦, 湯佐祚子, 平田幸男 : 急速減圧ラット脳の経時的変化. 一微小循環, 血液脳関門及び組織学的変化について. *日本高気圧環境医学会雑誌* 1992 ; 2 : 137-145.
- 14) Nohara A, Yusa T : Reversibility in blood-brain barrier, microcirculation, and histology in rat brain after decompression. *Undersea Hyperbaric Med* 1997 ; 24 : 15-21.
- 15) Del Zoppo GJ, Schmid-Schonbein GW, Etsuro M, Copeland BR, Chang CM : Polymorphonuclear leukocyte occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* 1991 ; 22 : 1276-1283.
- 16) Levin LL, Stewart GJ, Lynch PR, Bove AA : Blood and blood vessel wall changes induced by decompression sickness in dogs. *J Appl Physiol Respirat Environ Exercise Physiol* 1981 ; 50 : 944-949.
- 17) Thorsen T, Dalen H, Bjerkvig R, Holmsen H : Transmission and scanning electron microscopy of N₂microbubble-activated human platelets in vitro. *Undersea Biomedical Res* 1987 ; 14 : 45-58.
- 18) Tanoue K, Mano Y, Kuroiwa K, Suzuki H, Shibayama M, et al : Consumption of platelets in decompression sickness of rabbits . *J Appl Physiol* 1987 ; 62 : 1772-1779.
- 19) Pekna M, Ersson A : Complement system response to decompression. *Undersea Hyperbaric Med* 1996 ; 23 : 31-34.
- 20) Akopov S, Sercombe R, Seylaz J : Cerebrovascular Reactivity : Role of endothelium/platelet/leukocyte interaction. *Cerebrovascular and Brain Metabolism Reviews* 1996 ; 8 : 11-94.