

第 53 回日本神経学会総会 (2012 年)

大会長講演

脳血管疾患病態の多様性と神経伝達物質機能の解明を目指して

鈴木 則宏

(臨床神経 2012;52:819-824)

Key words : 脳血管の神経支配, 三叉神経, 副交感神経, 片頭痛, 皮質拡張性抑制

「(前略)…僕の視野のうちに妙なものを見つけ出した。妙なものを?—と云ふのは絶えずまはつてゐる半透明の菌車だつた。僕はかう云ふ経験を前にも何度か持ち合せてゐた。菌車は次第に数を殖やし、半は僕の視野を塞いでしまふ。が、それも長いことではない、暫らくの後は消え失せる代りに今度は頭痛を感じはじめる、—それはいつも同じことだつた。…(後略)」芥川龍之介『菌車』(1927.4.7)[遺稿](岩波文庫 1957 刊)

1. はじめに

脳の活動は神経細胞およびグリア細胞が主役を演じているが、それらが十二分に機能を発揮するためには、細胞のみでは不可能であり、酸素とグルコースの供給が必要である。その供給は専ら脳血管を経路とする脳血流によってまかなわれている。私の研究の最大テーマはこの脳血管と脳血流の調節機序および脳血管自体の病的状態の解明にある。脳血流の調節は、脳組織の代謝を反映する炭酸ガス分圧の変化に対応して稼働する化学的調節と、脳灌流圧変動などの中枢神経外環境変化に応じて稼働する脳血管に分布する多くの種類の神経線維による神経性調節によりおこなわれている。驚くべきことに神経性調節は 1970 年代まではその存在が否定的であった。しかし、カテコラミン染色同定法の Falck-Hillarp 法やグリオキシル酸法そしてアセチルコリンエステラーゼ法などの組織化学手法の進歩により脳血管壁に交感神経と副交感神経の存在が証明され、さらに臨床的に脱交感神経モデルともいえる Shy Drager 症候群での脳循環自動調節能廃絶にともなう起立性低血圧による失神時の脳循環測定から、神経性調節の重要性が証明された。本会長講演では、私が携わってきた研究のうち、脳血管の神経支配の証明から、各神経線維の分布と起源の同定、各神経の機能、そして脳血管の異常反応が症状の主座を占める片頭痛の病態解明研究の現状までを概説する。

2. 脳血管の神経支配

研究の端緒は電子顕微鏡による脳血管壁の超微形態の分析

であり、分布する交感神経終末と副交感神経終末内の小胞を定量解析してその動的な変化を確認した。さらに、脳血管に分布する神経系の機能を明らかにするために、げっ歯類、霊長類を対象として、SP, CGRP, VIP, NPY 含有神経を免疫組織化学的に同定し、神経切断実験および逆行性軸索トレーサーによる解析により、脳血管壁の感覚神経は三叉神経節に起源を發し鼻毛様体神経を介して脳血管に分布することを (Fig. 1, 2)、また副交感神経は翼口蓋神経節から眼窩枝を経由して脳血管に分布することを証明した。

3. 神経原性脳血管拡張現象

脳血管の拡張現象は専ら、血管内血流の灌流圧の低下(脳血管自動調節反応)および灌流組織内の pH の低下、すなわち二酸化炭素分圧の上昇によって生じるとされてきた。しかし、灌流圧にも二酸化炭素分圧にも依存しない、脳血管に分布する血管拡張性神経刺激による血管拡張現象、すなわち神経原性

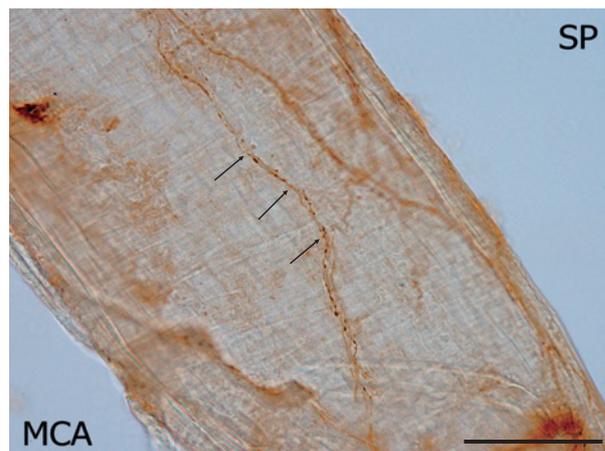


Fig. 1 Appearance of substance-P positive nerve fibers in the middle cerebral artery in the rat. Immunostaining of whole mount preparation. Delicate varicose nerve fibers run longitudinally along the blood vessel (arrows). Scale bar = 50 μ m.

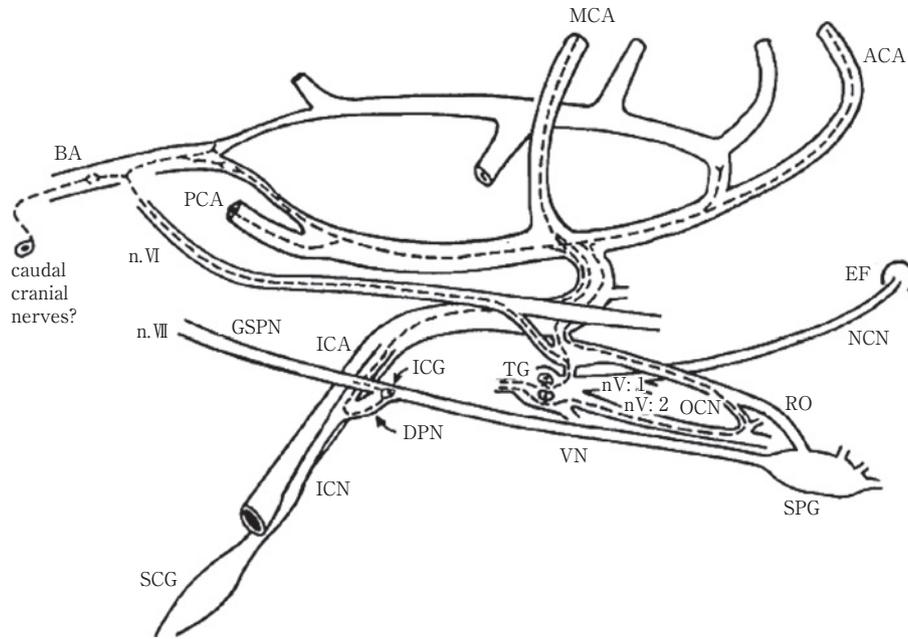


Fig. 2 An overview of the probable origins and pathways of sensory nerve fibers to the intracranial segment of the internal carotid artery (ICA) and the cerebral artery in man. The assumptions are based both on the findings in man and monkey. ACA: anterior cerebral artery, BA: basilar artery, CG: cavernous ganglion, DPN: deep perusal nerve, RF: ethmoidal foramen, GSPN: greater superficial petrosal nerve, ICG: internal carotid ganglion, ICN: internal carotid nerve, LSPN: lesser superficial petrosal nerve, MCA: middle cerebral artery, NCN: nasociliary nerve, nV: 1: ophthalmic nerve, nV: 2: maxillary nerve, OTG: otic ganglion, PCA: posterior cerebral artery, RO: rami orbitales, SCG: superior cervical ganglion, SPG: sphenopalatine ganglion, TG: trigeminal ganglion, VN: vidian (pterygoid) nerve.

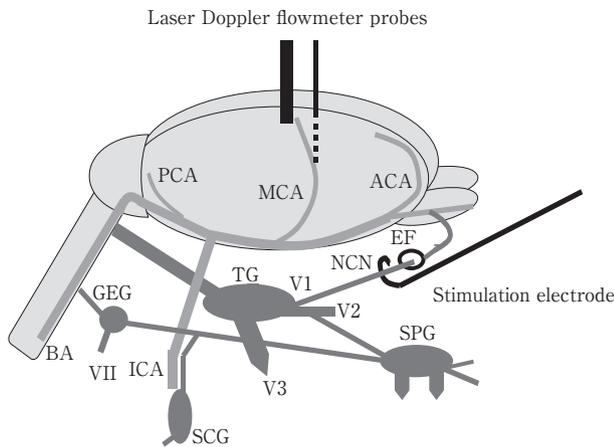


Fig. 3 Schematic representation of measurement of cerebral blood flow through electrical stimulation of the nasociliary nerve (NCN). The cerebral cortical blood flow (ipsilateral side) and the thalamic blood flow (contralateral side) are measured continuously by laser Doppler flowmetry. The nasociliary nerve is electrically stimulated outside of the ethmoidal foramen (EF). ACA: anterior cerebral artery, BA: basilar artery, GEG: geniculate ganglion, ICA: internal carotid artery, SCG: superior cervical ganglion, SPG: sphenopalatine ganglion, TG: trigeminal ganglion, V1: ophthalmic nerve, V2: maxillary nerve, V3: mandibular nerve, VII: facial nerve.

血管拡張現象が想定されていた。そこで、げっ歯類(ラット)で証明した副交感神経の翼口蓋神経由来の脳血管枝あるいは三叉神経脳血管枝(鼻毛様体神経)をラットにおいて単独電気刺激してその脳血流へおよぼす影響をしらべた(Fig. 3)。電気刺激(5V, 0.5msec, 10Hz, 30秒)により全身血圧の変化や血中二酸化炭素分圧の変化をとみなわない約10~40%の脳表血流の増加を認めた。すなわち、神経原性脳血管拡張現象を *in vivo* で証明した。

4. 片頭痛の病態研究への発展

4-1. 三叉神経終末とセロトニンとの関係の解明

一方、1990年代になり脳血管の異常反応を示す代表的疾患である片頭痛ではセロトニン(5-HT)の機能低下がその基本的病態として知られており、5-HT_{1B/1D}受容体アゴニスト(トリプタン)は脳血管の病的状態を即座に是正させることが明らかとなった。この病態の解明を目指して、脳血管壁での感覚神経と5-HT受容体との関係を解明するために、動物で鼻毛様体神経電気刺激による片頭痛発作時の脳血管モデルを作成し、SPおよびCGRP拮抗薬(h-CGRP 8-37)とトリプタンを使用してその関係を分析した。その結果、トリプタンはCGRPを直接抑制する際と同等に、脳血管の反応性を是正することを明らかにした(Fig. 4)。Fig. 5に、脳血管と三叉神経終末、

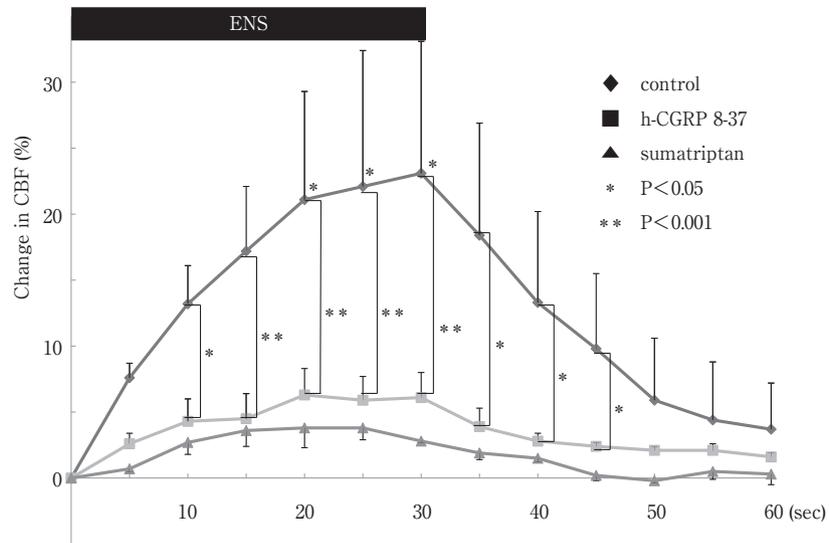


Fig. 4 Change of cerebral cortical blood flow upon electrical stimulation (ENS) of the nassociliary nerve (5V, 10Hz, 0.5msec impulse duration as a continuous stimulation for 30sec). Comparison with flow after administration of h-CGRP 8-37 (60µg/kg) or sumatriptan. Values are means and SEM of 10 animals. The cortical blood flow increases significantly upon electrical stimulation of NCN. This flow increase is attenuated by sumatriptan of CGRP antagonist, h-CGRP 8-37.

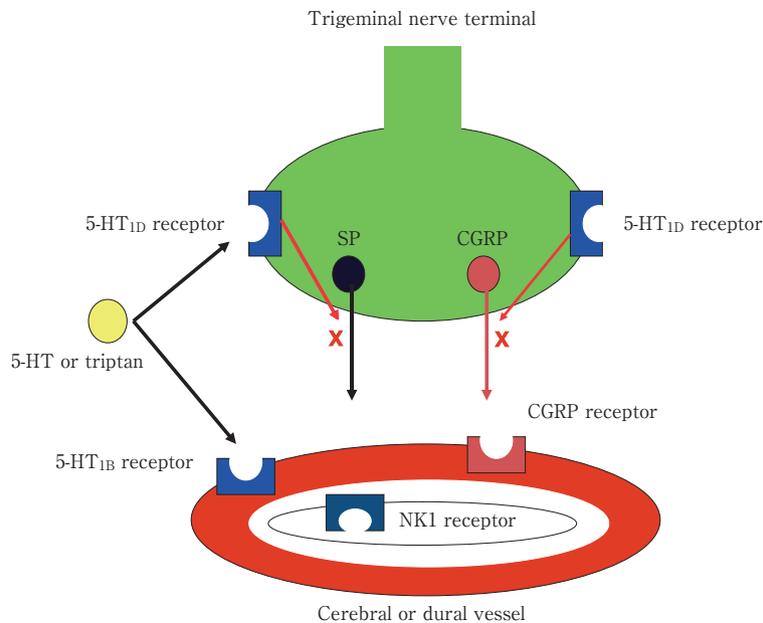


Fig. 5 The schematic illustration of the cerebral blood vessel and innervated trigeminal nerve terminal with 5-hydroxytryptamine (5-HT), calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P (SP) receptors and action sites of 5-HT and sumatriptan.

および各々に分布する受容体と5-HT, トリプタンの作用点を示す。

4-2. 片頭痛前兆としての皮質拡延性抑制と脳微小循環

さらに、脳実質内の血流調節機構を明らかにするために、片頭痛前兆の機序とされている皮質拡延性抑制に着目し、共焦点レーザー顕微鏡をもちいて、脳微小循環動態の解析を独自に開発した微小脳血流解析ソフトおよび血管内血球運動解析

ソフトをもちいて研究を進めている。ウサギの大脳皮質表面を局所的にカリウム (K⁺) 溶液で刺激すると、刺激点に生じた脱分極が同心円状に約2~3mm/分の速度で伝播し、それともななって脳波上の抑制が経時的に観察される。この現象は1944年 Leãoによって cortical spreading depression (皮質拡延性抑制:CSD) と命名され報告された。報告後、CSDは長きにわたり等閑視されていたが、1990年代になり片頭痛前兆

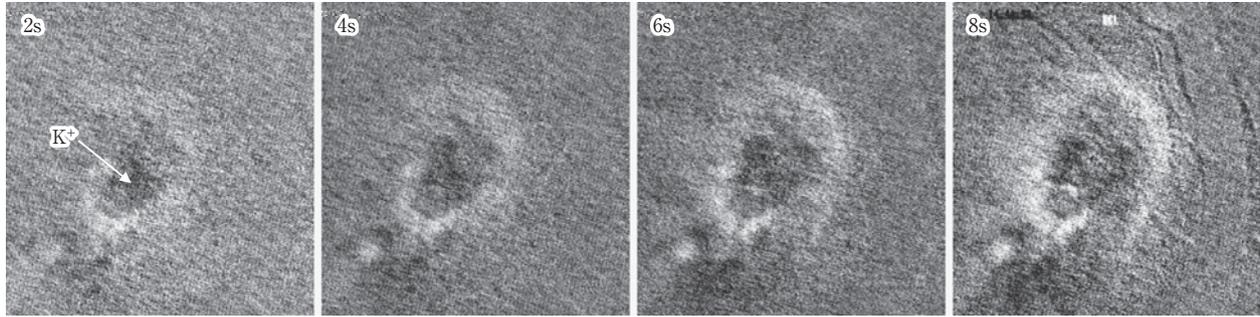


Fig. 6 Cortical spread depression (CSD) demonstrated by micro-application of KCl (K^+) onto surface of the cerebral cortex. Images (subtraction images) are observed by a photoelectric technique for continuous measurement of cerebral blood volume. CSD propagates in a speed of 3mm/min and the change in diameter of small blood vessels is recognized at 8 second (8s) after K^+ application.

の病態研究において、脳血流の減少が後頭葉から前方に向かって約2~3mm/分の速度で伝播する現象が報告され、spreading oligemia (拡張性乏血)として報告されるや、CSDとの関連がにわかになら注目され始めた。片頭痛の視覚前兆のもっとも如実な表現は、文豪芥川龍之介により、主人公「僕」の独白に現実性をもって著わされており、著者龍之介自身の「前兆のある片頭痛」の有病が示唆される(本稿冒頭)。

現在、片頭痛の病態にはCSDがもっとも重要な現象とされ、盛んに研究が進められており、片頭痛の治療薬のターゲットとなっている。しかし、CSDは片頭痛のみでなく、脳虚血、外傷、てんかんなどの中枢神経系の疾患においても病態の進展にかかわっていることが注目されてきている。片頭痛と脳虚血の両者にかかわる病態としてのCSDとそれとともなう脳微小循環変化に着目して研究を進めてきた。

4-2-1. 光透過法

ヘモグロビンの等吸収点である波長550nmの光を照射すると、脳血流量の増加にともなって透過光が減弱することを利用して、微小領域における脳血流量を測定することができる。 α -クロラロース-ウレタンで麻酔したラットまたはネコの側頭・頭頂部に直径3mmの頭窓を作成し、2×2mmの関心領域(ROI)の直下の灰白質にガラスファイバーを後方から挿入して固定した。キセノンランプにて光照射し、脳表から撮影した動画から経時的にサブトラクションすることによって透過光量、すなわち脳血流量の変化を算出した。ROI中心部にマイクロピペットをもちいて0.5M KCl溶液を脳表実質内に微量投与してCSDを誘発したところ、血流量の一過性低下および増加領域が2.3mm/minの速度で血管走行に無関係に同心円状に伝播した(Fig. 6)。また、血液希釈法を利用したMatlab応用自家製ソフトウェアKEIO-IS1をもちい、非拡散性トレーサー投与後の平均通過時間から微小領域における脳血流量を可視化することができる。KEIO-IS1では生理的食塩水あるいはカーボンブラック溶液を外頸動脈枝から内頸動脈に挿入したカテーテルを通してボーラス投与した際の平均通過時間から脳血流量を算出する。一般的に使われるレーザードップラー血流計にくらべて約500倍の解像度を有し、毛細

血管からなる微小領域の血流を測定することができる。その結果CSD誘発後微小領域の血流は一過性に低下(32%)し、続いて増加(215%)する現象が観察される。

4-2-2. dual illumination technique (透過光・反射光二重照射による血流測定法)

脳表血管の挙動を観察するため、dual illumination technique (trans- and epi-illumination technique)をもちいた。 α -クロラロース-ウレタンで麻酔したネコの左側頭・後頭部に直径1cmの頭窓を作成し、ガラスファイバーを後方からROI中心部で脳表から深さ3mmの位置に挿入し、ハロゲンランプによって光照射して透過光を測定した(trans-illumination)。同時にdouble-beam cold lightによって脳表に落射し、バンドパスフィルタ($\lambda=550\text{nm}$)を通してdigital video-cameraにて動画撮影し、経時的にサブトラクションをおこなった(epi-illumination)。0.3M KCl溶液を脳表に微量投与することによりCSDを誘発した。投与部位から血流増加領域(暗部)続いて血流低下領域(明部)がくりかえし出現し、約3mm/sで遠位方向に向かって帯状に伝播した。明部では直径15~50 μm の比較的細い小動脈の口径変化が認められた。脳表血管は、CSDの通過にともなって大口徑動脈は変化しなかったが、小動脈ではCSD初期に収縮(55%)続いて1分以内に拡張(155%)し、二相性変化を示した。動脈は一様に収縮するわけではなく、分節状の収縮部分が移動しながら血管全体が収縮する。この反応はKCl溶液の直接滴下によって再現されたことより、細胞外液の K^+ 濃度の上昇による直接作用が想定される。

4-2-3. 直接観察による血管口径の測定

血管をさらに鮮明に可視化するため、血管内皮細胞に特異的に蛍光を有するTie2-GFPマウスにおいて、ウレタン麻酔下で左側頭・後頭葉に直径3mmの頭窓を作成し、近接部位でDC電位およびレーザードップラー血流計による脳血流を記録しながら蛍光顕微鏡下で動画撮影し、画像解析ソフトImageProをもちいて血管口径を測定した。後方に作成した小頭窓に1M KCl溶液を滴下するとDC電位の一過性低下、すなわちCSDが発生し、軟膜動脈の著しい収縮(63%)、続いて

て拡張(112%)が認められ、近位部から遠位部への移動が観察される。この収縮反応は脳血流の一過性低下と時系列で一致し、CSD通過後、脳血流は低下し(post-CSD oligemia)、軽微な血管収縮が認められる。蛍光物質 FITC でラベルした赤血球懸濁液を静脈内投与して実質血管内の赤血球の挙動を観察すると、CSD通過時、しばしば一部の動脈吻合間で赤血球の逆流が認められる。

4-2-4. 毛細血管内赤血球速度の測定

FITC でラベルした赤血球懸濁液を静脈内投与し、高速度カメラ(~500frames/sec)共焦点レーザー顕微鏡および Matlab を利用した教室で開発したソフトウェア KEIO-IS2 をもちいて、頭窓内大脳皮質第 I 層における赤血球速度を自動解析し、毛細血管内を通過する赤血球のみを抽出して解析する手法を確立した。ウレタンで麻酔したラットに頭窓を作成して硬膜を除去し、ROI 近傍に KCl 溶液を微量投与することによって CSD を誘発し、毛細血管に富む微小領域における毛細血管内赤血球速度を算出すると、KCl 投与から数秒後、平均 3.3 秒間にわたって移動する赤血球が検出不能な、すなわち赤血球の毛細血管内への流入停止あるいは血管内での流速停止が観察される。ROI を蛍光顕微鏡下で撮影し、画像のサブトラクションによって相対的な神経活動レベルを推定すると、background darkness が一過性に上昇、すなわち神経活動レベルの上昇時、毛細血管内の赤血球は低速化し、その後回復する。この反応はくりかえし出現し、ピーク時の background darkness と赤血球速度との間には負の相関関係があった、すなわち神経活動亢進時は赤血球速度が低下することが明らかになった。このとき、毛細血管口径は変化せず、あたかも血液粘度が高まっている血管内を微速度で通過する赤血球が観察される。

さらに、イソフルランで麻酔したラットに頭窓を作成して硬膜を除去し、頭窓の尾側および鼻側端にて DC 電位、その中間部にて組織内酸素分圧 (PO_2)、レーザードップラー血流計による脳血流を測定しながら同時に赤血球速度を測定した。後方の小頭窓に 1M の KCl 溶液を滴下すると CSD が誘発され、CSD の通過に同期して PO_2 の低下およびやや緩徐で著しい脳血流の増大反応がおり、CSD は遠位側に伝播した。CSD 通過時、赤血球速度は低速を示す例が著増したが、高速を示す例も多く検出された。この傾向は CSD 通過後も維持され、投与から約 1 時間後、CSD が発生しなくなる頃には回復傾向を示し、個々の毛細血管について通過する赤血球速度を追跡すると、変化は一様ではなく、現象の多様性が示された。

5. おわりに

脳血管の神経支配の証明から、各神経線維の分布と起源の同定、各神経の機能の証明を経て、脳血管の異常反応が症状の主座を占める片頭痛の病態解明研究の現状を述べた。CSD は脳微小循環に特異的な変化をもたらす、CSD にともなう特異的な脳微小循環変化が疾患の病態の進展にかかわっていると考えられた。これらの基礎的結果を基に、脳血管疾患の予防

や治療に発展させたい。

謝辞：本研究の一部は、文部科学省科学研究助成費 平成 17~20 年度基盤研究 B 「脳虚血初期および片頭痛前兆にみられる大脳皮質拡張性抑制と毛細血管血流変化」(#17390255 研究代表者：鈴木則宏)および平成 22~25 年度基盤研究 B 「片頭痛前兆大脳皮質拡張性抑制が神経障害性疼痛を惹起する脳可塑性と疼痛制御系の解明」(#22390182 研究代表者：鈴木則宏)により遂行された。本研究の第一歩からご指導いただいた後藤文男先生(慶應義塾大学医学部名誉教授)、福内靖男先生(福内ペインクリニック院長)、厚東篤生先生(よみうりランド慶友病院院長)、故富田 稔先生(前富田病院院長)また、留学中にお世話になった Christer Owman 先生(スウェーデンルンド大学名誉教授)、Jan Erik Hardebo 先生(同准教授)および慶應義塾大学医学部神経内科教室員に深謝する。

※本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体はいずれも有りません。

文 献

- 1) Suzuki N, Hardebo JE, Owman C. Origins and pathways of cerebrovascular nerves storing substance P and calcitonin gene-related peptide in rat. *Neuroscience* 1989;31:427-438.
- 2) Suzuki N, Hardebo JE, Owman C. Origins and pathways of choline acetyltransferase-positive parasympathetic nerve fibers to cerebral vessels in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1990;10:399-408.
- 3) Suzuki N, Hardebo JE, Kahrstrom J, et al. Effect on cortical flow of electrical stimulation of sensory trigeminal cerebrovascular nerve fibres in the rat. *Acta Physiol Scand* 1990;138:307-315.
- 4) Suzuki N, Hardebo JE, Kahrstrom J, et al. Selective electrical stimulation of postganglionic cerebrovascular parasympathetic nerve fibers originating from the sphenopalatine ganglion enhances cortical blood flow in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1990;10:383-391.
- 5) Hardebo JE, Arbab MAR, Suzuki N, et al. Pathways of parasympathetic and sensory cerebrovascular nerves in monkeys. *Stroke* 1991;22:331-342.
- 6) Suzuki N, Gotoh F, Gotoh J, et al. Evidence for in vivo cerebrovascular neurogenic vasodilatation in the rat. *Clin Auton Res* 1991;1:23-26.
- 7) Tomita M, Schiszler I, Tomita Y, et al. Initial oligemia with capillary flow stop followed by hyperemia during K⁺-induced cortical spreading depression in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25:742-747.
- 8) Osada T, Tomita M, Suzuki N. Spindle-shaped constriction and propagated dilation of arterioles during cortical spreading depression. *NeuroReport* 2006;17:1365-1368.
- 9) Tomita M, Tomita Y, Unekawa M, et al. Oscillating neuro-capillary coupling during cortical spreading de-

pression as observed by tracking of FITC-labeled RBCs in single capillaries. *NeuroImage* 2011;56:1001-1010.

10) Unekawa M, Tomita M, Tomita Y, et al. Sustained decrease and remarkable increase in red blood cell velocity

in intraparenchymal capillaries associated with potassium-induced cortical spreading depression. *Microcirculation* 2012;19:166-174.

Abstract

Roles of cerebrovascular innervations and their neurotransmitters in various pathological conditions of central nervous system

Norihiro Suzuki, M.D., Ph.D.

Department of Neurology, Keio University School of Medicine

The concept of neurogenic control of the cerebral circulation began to develop only as recent as the middle of the 20th century, when it was elucidated that the cerebral blood vessels are supplied by a very dense plexus of adrenergic nerves innervating the vascular bed. After then, already in the course of several decades, more than ten types of neurotransmitters including acetylcholine, serotonin, substance P, and calcitonin gene-related peptide, etc., have been observed in these nerves. To determine the origins and pathways of cerebrovascular parasympathetic nerves and sensory nerves, retrograde axonal tracing with immunohistochemistry has been studied. The cerebrovascular parasympathetic nerves originated 1) in the sphenopalatine ganglion (SPG), and 2) from the internal carotid ganglion, and also 3) from the otic ganglion. While the cerebrovascular sensory nerves originated 1) in the trigeminal ganglion (TG), and 2) from the internal carotid ganglion, and also 3) from the upper cervical dorsal root ganglia. The neurogenic cerebrovascular vasodilatation was demonstrated in vivo, by the electrical stimulation of the cerebrovascular branches of TG or SPG. This vasodilatation was attenuated not by anticholinergic agents but triptans as well as anti-CGRP agents. This implicates the mechanism of pathological neurogenic inflammation and vasodilatation during the migraine attacks.

(*Clin Neurol* 2012;52:819-824)

Key words: innervations of cerebral blood vessels, trigeminal nerve, parasympathetic nerve, migraine, cortical spreading depression
