

1 . 研究課題名 :

ラット体性感覚野における血流量、血流速度、及び血液量の関係

2 . 研究機関 :

秋田県立脳血管研究センター

3 . 研究者名と所属 :

柏倉健一 (科学技術振興事業団秋田研究室)

4 . 研究協力者名と所属 :

関千江 (科学技術振興事業団秋田研究室)

松浦哲也 (科学技術振興事業団秋田研究室)

藤田英明 (科学技術振興事業団秋田研究室)

菅野巖 (秋田県立脳血管研究センター)

5 . 研究期間 :

1996 年 1997 年

6 . 要約

PaCO₂ 変動負荷時の脳血流量変化に対し、血球速度及び血管容積のいずれが寄与するかをレーザー・ドップラー血流計 (LDF) を用いて検討した。6 匹の雄 Sprague-Dawley ラットを開頭し、体性感覚野上で測定を行った。換気量を 4 分間隔で変化させ、各中間時点で採血 (18 回/個体) し、PaCO₂, PaO₂, pH を求めた。一方、採血を挟んだ 1 分間の Flux (血流量)、Velocity (血球速度)、CMBC (血球濃度) の平均値を各々の初期値で基準化し、同様に基準化した PaCO₂ 値との回帰を求めた。この結果、得られた回帰直線は Flux が $y = 0.90x + 0.26$ ($r = 0.95$)、Velocity が $y = 0.60x + 0.55$ ($r = 0.95$)、CMBC が $y = 0.14x + 0.86$ ($r = 0.72$) であった。一方、Flux と Velocity との回帰は $y = 0.65x + 0.40$ ($r = 0.97$)、また、Flux と CMBC 間は、 $y = 0.17x + 0.80$ ($r = 0.83$) であった。この結果、PaCO₂ 変動負荷時の脳血流量変化は血球速度の寄与分が大きいことが確認された。

7 . 研究目的

過去、PaCO₂ 変動負荷時の血流速度及び血管容積の増加に関する測定は様々な手法を用いて試みられて来た。トレーサを用いた方法で脳血流量、脳血液量、平均通過時間 (Mean Transit Time、MTT) の関係の評価しようとした報告 [1~3]、光電あるいは光学的手法を用いて評価を行おうとした報告 [4、5]、さらに、レーザー・ドップラー血流計 [6~8] (Laser Doppler Flowmetry、LDF) 及びこれを他の方法とを組み合わせ評価しよう試みた報告 [9] などがあった。ところが、トレーサを用いた方法では、脳血流量の変化を赤血球速度と血管容積の成分に完全に分離することはできず、また、光学的手法を用いた方法では測定対象が軟膜動脈に限定されてしまう場合が多かつ

た。一方、LDF に関しては、機器の改良により、当初得られなかった血流量 (=blood flow、Flux)、赤血球速度 (red blood cell velocity、Velocity)、赤血球濃度 (concentration of moving red blood cells、CMBC)、全反射量 (total back scatter、TB) 等の測定が可能になった。本研究では LDF の特徴を生かすことにより、PaCO₂ 変動負荷時の脳血流量変化に対して、赤血球速度及び血管容積 (以下 LDF 用語に従い赤血球濃度と記す) のいずれの要因が強く関与しているかを毛細管レベルで測定し、解明することを目的とした。

8 . 材料と方法

1) ラット処置

6 匹の雄 Sprague-Dawley ラット (Charles River、270- 320g) を用いた。導入時に N₂O / O₂ (70 / 30 %) の混合気体と 4 % のハロセン麻酔を用いた。その後、N₂O / O₂ (70 / 30 %) と 1.5 % のハロセンで麻酔の維持を行いながら、右側大腿動脈及び尾静脈を確保した。気管切開の後、 α -chloralose (80 mg/kg)、ミオブロック (0.2 mg/rat) を静注した。この後、人工呼吸に切り替え、N₂O / O₂ 及びハロセンの吸入を停止した。実験中の麻酔維持及び体動抑制のため α -chloralose (15 mg/kg/h) 及びミオブロック (2 mg/kg/h) を静注した。平均動脈血圧、心拍数、呼気 CO₂ 濃度は経時的にマックラブ・システム (MacLab/8e、ADInstruments、東京) を用いて収集した。また、ヘマトクリットは負荷前、中、後の 3 回測定を行い、大きな変動がないことを確認した。ラット直腸温は 37.5 \pm 0.5 に保った。

ラットはステレオ台 (SR-5N、成茂、東京) に固定後、歯科用ドリルを用いて開頭を行った。頭頂骨を直径約 1 cm の大きさで除去し、硬膜は残した。直径 1 mm のニードル型プローブ (PF403、Perimed、Stockholm、Sweden) はステレオ台上に固定されたマニピュレータ (SM-11、成茂) で保持した。細動脈及び細静脈の影響を避ける目的で、ニードル型プローブの先端を実体顕微鏡下で確認しながら位置を設定した。同時に LDF (PeriFlux 4000、Perimed) モニター上で血流量を確認し、得られた値が最も小さくなるような部位を探した。

血流量の単位は P.U. (Perfusion Unit : 信号強度を表す無名単位) で表され、最大値 1000 P.U. は装置からの出力電圧 10V に相当し、100P.U. は出力電圧 1V に相当する。LDF 値が 100 P.U. 未満を示すことを確認[10]し、その硬膜上に軽く接する状態で脳表と直角にプローブを固定した。

2) LDF の設定

LDF は少なくとも測定開始 1 時間前に電源を投入し、機器の安定を待った。この後、付属の校正用乳剤で実験ごとにキャリブレーションを行った。キャリブレーション終了後に再び校正用乳剤を測定し、血流量が 250 \pm 3 P.U.、赤血球速度が 60 \pm 2 P.U.、赤血球濃度が 400 \pm 5 P.U. 以内であることを確認した。なお、本装置で使用している

レーザー光波長は 780 nm、プローブ先端出力は 1 mW 以下である。LDF で得られた血流量、赤血球速度、赤血球濃度、TB の各値を平均動脈血圧等と同時にマックラブ・システムに収集した（図 1）。血流量と赤血球速度はサンプリングタイムを 0.03 秒に設定した。ただし、赤血球濃度に関しては 5 秒の固定である。照明は外光を遮断した上で室内蛍光灯を使用した。また、室内蛍光灯が LDF 値に影響を与えないことは事前に確認した。振動はきわめて大きなアーチファクトを生ずるために、実験中は細心の注意を払った。

3) 実験プロトコル

実験開始前、換気量（酸素：大気 = 1.1 : 2.5）は 6 ml/min に固定した。呼吸回数は毎分 60 回とした。この状態で 8 分間の血流量、赤血球速度、赤血球濃度の測定を行い、各値が安定していることを確認した。また、この間 2 回の血液ガス分析（2 分後と 6 分後）を行い、PaCO₂ 値に大きな変動がないことを確認した。血液ガス分析器は ABL-300-Acid-base-Laboratory（Radiometer、Copenhagen、Denmark）を用いた。PaCO₂ の調節は人工呼吸器の換気量を 4 分ごとに増減させる方法で行った。換気量は当初の 6 ml から次の 4 分間で 10 ml に増加させた。その後 1 ml 単位で減少させ、3 ml まで減少させた。3 ml の状態で 8 分間おいた後、再度、増加させ、10 ml まで増やした後、初期値の 6 ml にもどし終了した。このようにして 1 個体につき 18 回の負荷を行った。換気量を変化させた 2 分後に大腿動脈より約 100 μ l の採血を行い、PaCO₂、PaO₂、pH を求めた。また、この間 PaO₂ がほぼ一定値を維持するように O₂ 量を調節した。全測定はほぼ 90 分で終了した。各血液サンプルの採取中間時点をマックラブ上にマーキングし、データ解析時にこのマーキングを挟んだ 1 分間の平均値を得た。これにより各採血時の PaCO₂ 濃度とこれに対応した血流量、赤血球速度、赤血球濃度値を得た。

4) データ処理

各測定値の処理はマックラブ付属のソフトウェア「チャート」を用いて行った。血流量、赤血球速度、赤血球濃度は各々初期値の 2 データの平均を 1 とし、以降の値を相対値で表示した。PaCO₂ は初期値で基準化したデータ及び絶対値を用いたデータの 2 種類を作成し、LDF 値との相関を比較した。

9 . 結果

表 1 に生理学的諸データを示す。MABP、Hematocrit は負荷前と中間時、負荷後の 3 値を示した。また、PaCO₂ は負荷前（初期値）、最低値、最高値、負荷後の 4 値を示した。さらに pH については、全採血データ（21~22 回）の平均値と標準偏差を示した。図 2 に測定結果の 1 例（表 1 の D 例）を示す。

PaCO₂ の初期値は 26.1~46.8 mmHg（36.6 \pm 7.2 : mean \pm S.D.）であった。一方、

負荷時には 13.1~116.2 mmHg となった。個体毎にそれぞれの初期値で基準化を行った血流量、赤血球速度、赤血球濃度はそれぞれ 0.77~4.49、0.82~2.95、0.79~1.60 であった。また、同様に基準化を行った PaCO₂ と各 LDF 値との回帰直線は、血流量が $y = 0.90x + 0.26$ ($r = 0.95$)、赤血球速度が $y = 0.60x + 0.55$ ($r = 0.95$)、赤血球濃度が $y = 0.14x + 0.86$ ($r = 0.72$) であった。一方、図 3 は絶対値表示した PaCO₂ と各 LDF 値との回帰直線を示す。血流量が $y = 0.023x + 0.28$ ($r = 0.83$)、赤血球速度が $y = 0.017x + 0.49$ ($r = 0.90$)、赤血球濃度が $y = 0.003x + 0.89$ ($r = 0.52$) であった。図 4 に基準化した血流量と赤血球速度間の回帰曲線を示す。 $y = 0.65x + 0.40$ ($r = 0.97$)、血流量と赤血球濃度間には $y = 0.17x + 0.80$ ($r = 0.83$) であった。

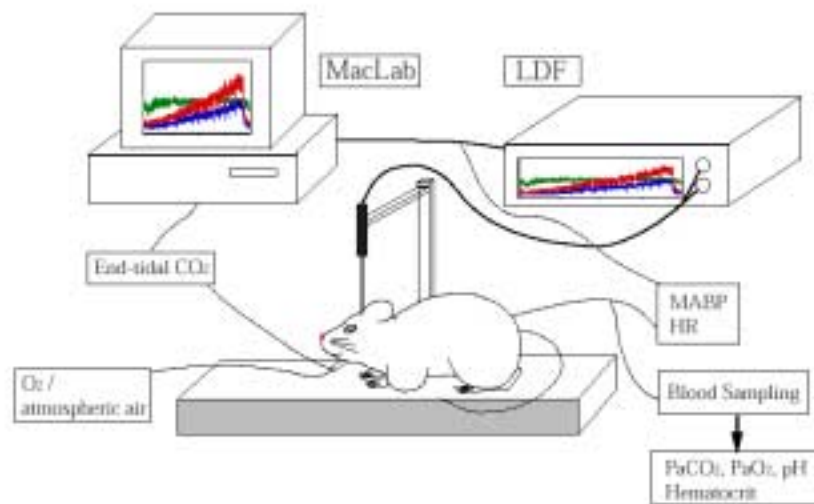


図 1：実験のセット・アップ

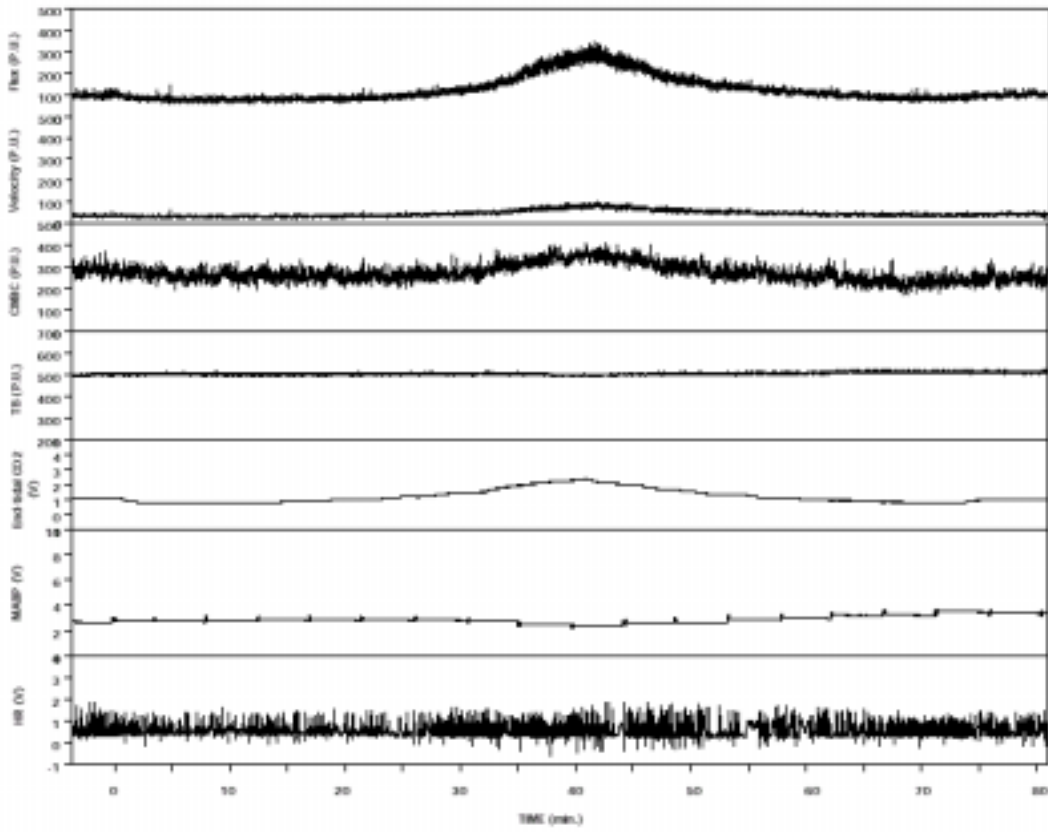


図 2 : 測定結果例

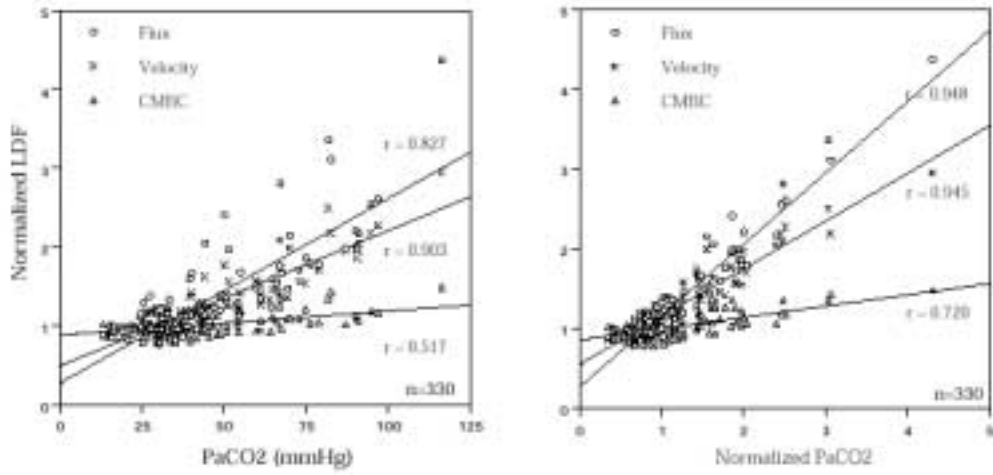


図 3 : PaCO_2 と各 LDF 値との回帰直線

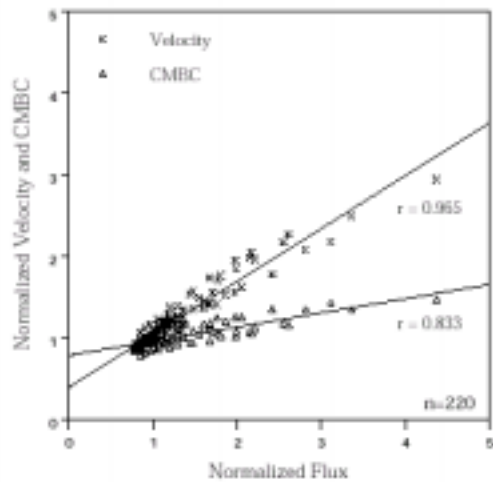


図 4 : 血流量と赤血球速度間の回帰曲線

表 1 : 生理学的諸データ

rat	MABP(mmHg)			Hematocrit(%)			PaCO ₂ (mmHg)				**pH
	*pre	*middle	*post	pre	middle	post	pre	lowest	highest	post	
A	85	91	81	40	38	34	34.1	17.5	90.9	37.3	7.41±0.12
B	75	68	72	38	34	32	32.6	13.1	74.8	22.4	7.45±0.17
C	110	98	107	38	38	34	26.1	15.3	116.2	30.6	7.38±0.18
D	100	93	109	38	40	39	39.3	30.2	96.9	41.5	7.36±0.13
E	94	79	95	39	36	34	40.8	27.2	90.7	39.9	7.38±0.13
F	112	110	119	41	38	39	40.8	29.1	90.1	38.1	7.37±0.11

*Pre, middle, and post indicate pre-examination, middle of the examination, and post-examination, respectively.

**Values of pH are mean±SD

表 2 : 基準化 vs.非基準化 PaCO₂

rat	Flux		Velocity		CMBC	
	*Absol. PaCO ₂	**Norm. PaCO ₂	Absol. PaCO ₂	Norm. PaCO ₂	Absol. PaCO ₂	Norm. PaCO ₂
A	0.016	0.624	0.014	0.348	0.003	0.047
B	0.017	0.658	0.013	0.441	0.004	0.163
C	0.007	0.989	0.022	0.580	0.006	0.135
D	0.026	1.004	0.020	0.754	0.004	0.173
E	0.016	0.700	0.015	0.716	0.003	0.042
F	0.024	1.066	0.019	0.874	0.003	0.128
mean	0.023	0.852	0.017	0.652	0.003	0.118
S.D.	0.008	0.192	0.004	0.158	0.002	0.059
***C.V.	0.363	0.225	0.229	0.242	0.613	0.499

*Absol. : Absolute

**Norm. : Normalized

***C.V. : Coefficient of Variation

10 . 考察

LDF は、レーザー光が動いている赤血球と衝突する際、ドップラー効果により周波数変化をおこす現象を利用し測定を行っている。平均シフト周波数は平均血球速度 (Velocity) に比例し、振幅は血球濃度 (CMBC) に比例する。また、この両者の積

が血流量 (Flux) になる。実際にはドップラー偏位は広い周波数域にわたるため、血流量に相当する信号出力 (V_{out}) は、

$$V_{out} = \int \omega P(\omega) d\omega$$

によって求められる[7]。ここで、 ω は角周波数、 $P(\omega)$ はパワースペクトル密度関数である。また、本装置では赤血球速度 = 血流量/赤血球濃度によって血球速度を求めている[11]。

LDF を用いることにより、きわめて狭い領域の組織における微小循環動態を経時的、非接触的、かつ簡便に測定することが可能となる。今回我々はこの特徴を生かし、各個体ごとに血流量、赤血球速度、赤血球濃度の変化を確認しつつ、 $PaCO_2$ 変動負荷量を変えることにより合計 18 回のデータサンプリングを行った。このように 1 個体で繰り返し測定を行え、しかも数種類の測定・計算値を同時に得られることが本測定法の最大の利点といえる。

LDF を用いた測定において最も問題となるのが測定容積である。一般には測定容積はほぼ 1 mm^3 程度と考えられている[8、12]。ただし、この値は、光源の強度、分布、波長、対象物の色に影響される。本実験においても、測定容積中に細動脈や細静脈を含んでいる可能性を否定はできない。ただし、今回使用したニードル型プローブは、その発光部と受光部との距離から考え、測定面積は 1 mm^2 を上回らないこと、また、位置決め時に LDF でモニターをしながら、最小値を示したポイントで計測を行ったことから、測定値に含まれる動静脈の影響を最小にした[10]と考える。

全反射量 (TB) は、組織中で反射し、受光部に戻った光の総量を示す。全反射量は LDF 装置の出力、アライメント、焦点、プローブの種類、及び測定容積中に含まれる赤血球濃度によって変化する。ただし、赤血球濃度に関し、図 2 に示した測定例において赤血球濃度と全反射量の変動係数を比較したところ 14.3 % 及び 1.1 % とその違いは大きかった。従って、赤血球濃度の変動測定に関し全反射量の感度は赤血球濃度と比べきわめて低いものと思われた。

今回の実験では、負荷開始前の換気量を一定にしていたため、個体差によって $PaCO_2$ の初期値にばらつきが生じた。すなわち、等量の換気量に対応する $PaCO_2$ レベルは個体によって違いがあり、この違いは、換気量変化をさらに増大させた時、相乗的な変化を示したと考えられる。従って、 $PaCO_2$ を初期値に基準化することにより、個体ごとのばらつきは小さくなり、データ解析上合理的であることが示された(表 2)。

次に、 $PaCO_2$ の変化による血流量増加の要因として、赤血球速度成分が赤血球濃度成分よりも優位であることが示された。すなわち血流量の増加率に占める赤血球濃度の増加率の寄与は約 17 % であった。過去トレーサを用いた実験では、100 % の脳血流量増加に対し 30 % の脳血液量増加 (Grubb [1])、27 % の増加 (Smith [2])、14 % の増加 (Risberg [13]) が報告されている。我々の LDF の結果は、これらトレーサによる脳組織血流量と脳組織血液量の関係とほぼ同等の値を示した。

ただし、 CO_2 負荷時には全身動脈圧は軽度ながら上昇をする。特に $PaCO_2$ が 60~70mmHg 以上になると動脈圧の増加は無視できなくなる。従って、 CO_2 高負荷時

の赤血球速度の増加には、血圧上昇の関与も考慮する必要があると思われる。

脳血流量の増加の原因として、以前より「毛細管の血管径の拡張」、及び「血液導通のなかった毛細管への新たな流入」の2つの可能性が指摘されている。本実験からは、 PaCO_2 変動における血流量増加の主要因は平均流速の増加と考えられ、この意味で毛細管の開閉モデル[14]に対し、血流速度の高い毛細管に流速が揃うことによる平均速度上昇モデル[15、16]に近い解釈が可能と考えられた。

12 . 参考文献

- [1] Grubb RL, Raichle ME, Eichling JO and Ter-Pogossian MM (1974) The effects of changes in PaCO_2 on cerebral blood volume, blood flow, and vascular mean transit time. *Stroke* **5**, 630- 639
- [2] Smith AL, Neufeld GR, Ominsky AJ and Wollman H (1971) Effect of arterial CO_2 tension on cerebral blood flow, mean transit time, and vascular volume. *J. Appl. Physiol.* **31**, 701- 707
- [3] James IM, Millar RA and Purves MJ (1969) Observations on the extrinsic neural control of cerebral blood flow in the baboon. *Circulation Res.* **25**, 77-93
- [4] Tomita M, Gotoh F, Sato T, Amano T, Tanahashi N, Tanaka K and Yamamoto M (1978) Photoelectric method for estimating hemodynamic changes in regional cerebral tissue. *Am. J. Physiol.* **235**, H56-H63
- [5] Kobari M, Gotoh F, Fukuuchi Y, Tanaka K, Suzuki N and Uematsu D (1987) Quantitative measurement of blood flow velocity in feline pial arteries during hemorrhagic hypotension and hypercapnia. *Stroke* **18**, 457-463
- [6] Stern MD (1975) In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering. *Nature* **254**, 56-58
- [7] Nilsson GE, Tenland T and Öberg PÅ (1980) A new instrument for continuous measurement of tissue blood flow by light beating spectroscopy. *IEEE Trans Biomed. Eng.* **BME-27**, 12-19
- [8] Nilsson GE, Tenland T and Öberg PÅ (1980) Evaluation of a laser Doppler flowmeter for measurement of tissue blood flow. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **BME-27**, 597-604
- [9] Busija DW, Heistad DD and Marcus ML (1981) Continuous measurement of cerebral blood flow in anesthetized cats and dogs. *Am. J. Physiol.* **241**, H228-234
- [10] Iadecola C and Reis DJ (1990) Continuous monitoring of cerebrocortical blood flow during stimulation of the cerebellar fastigial nucleus: a study by laser-Doppler flowmetry. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **10**, 608-617
- [11] Nilsson GE (1984) Signal processor for laser Doppler tissue flowmeters. *Med.*

- Biol. Eng. Comput. **22**, 343-348
- [12] Fukuda O, Endo S, Kuwayama N, Harada J and Takaku A (1995) The characteristics of laser-Doppler flowmetry for the measurement of regional cerebral blood flow. *Neurosurgery* **36**, 358-364
- [13] Risberg J and Ingvar DH (1968) Regional changes in cerebral blood volume during mental activity. *Exp. Brain Res.* **5**, 72-78
- [14] Weiss HR (1988) Measurement of cerebral capillary perfusion with a fluorescent label. *Microvasc. Res.* **36**, 172-180
- [15] Klein B, Kuschinsky W, Schröck H and Vetterlein F (1986) Interdependency of local capillary density, blood flow, and metabolism in rat brains. *Am. J. Physiol.* **251**, H1333-H1340
- [16] Vogel J and Kuschinsky W (1996) Decreased heterogeneity of capillary plasma flow in the rat Whisker-Barrel cortex during functional hyperemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **16**, 1300-1306

13 . 研究業績

13-1 . 原著論文 :

- [1] 柏倉健一、関千江、松浦哲也、藤田英明、菅野巖 : 「 PaCO₂ 変動負荷による脳血流量の変化と血球速度及び血球濃度との関係 - レーザードップラー血流計を用いたラット脳表微小循環測定 」、日本脳循環代謝学会誌 10 : 168-175、1998

13-2 . 総説など : なし

13-3 . 国際学会発表 :

- [1] K. Kashikura, C. Seki, T. Matsuura, H. Fujita, I. Kanno: Effect of CBF changes on the velocity and CMBC determined by laser Doppler flowmetry under hypo and hypercapnia in rats. *Brain* 97, 18th International Symposium on Cerebral Blood Flow and Metabolism, June 15-19,1997, Baltimore Convention Center, Baltimore, Maryland, USA

13-4 . 国内学会発表 :

- [1] 柏倉健一、関千江、菅野巖 : 「 レーザー・ドップラー血流計の特性評価 」、日本放射線技術学会大 53 回総会学術大会

14 . Relationship between CBF Changes and Velocity and CMBC Changes under varying PaCO₂: Measurements of Brain Microcirculation using Laser Doppler Flowmetry in Rats

15 . Akita Research Institute of Brain and Blood Vessels

16 . Kenichi Kashikura (JST Akita)

17 . Chie Seki (JST Akita)

Tetsuya Matsuura (JST Akita)

Hideaki Fujita (JST Akita)

Iwao Kanno (Akita Research Institute of Brain and Blood Vessels)

18 . 1996-1997

19 . Abstract

The aim of this study was to estimate the effect of cerebral blood flow (CBF), or Flux, changes on red blood cell velocity (V) and concentration of moving red blood cells (CMBC) using Laser Doppler Flowmetry (LDF) under hypo- and hypercapnic conditions in rats.

Six male Sprague-Dawley rats under ventilation by a volume respirator with O₂/atmospheric air were used. Parietal bone was partly removed (1 cm²). An optode of LDF (1 mm²) was carefully positioned on the dura mater. PaCO₂ was varied every 4 minutes by changing the ventilation volume. Arterial blood samples were withdrawn 2 minutes after changing the ventilation and analyzed for PaCO₂, PaO₂, and pH. CBF, V, and CMBC were normalized with respect to the initial value. PaCO₂ was also normalized with respect to the initial value.

Results showed that the initial PaCO₂ varied between 27.0 and 47.0 mm Hg (38.9 ± 7.0 : mean \pm S.D.). PaCO₂ varied from 13.1 to 116.2 mmHg when induced by the hypo- and hypercapnic conditions. Normalized CBF, V, and CMBC varied from 0.77 to 4.49, 0.82 to 2.95, and 0.79 to 1.60, respectively. The computed linear regression lines and correlation coefficients were as follows: $y = 0.90x + 0.26$, $r = 0.95$ (CBF), $y = 0.60x + 0.55$, $r = 0.95$ (V), and $y = 0.14x + 0.86$, $r = 0.72$ (CMBC). These data suggest that the CBF changes induced by hypo- and hypercapnia are dominated by the V changes of microcirculation, as compared with CMBC.