

学位論文（博士）

Impact of Intracranial Hypertension
and Cerebral Perfusion Pressure on Spreading Depolarization
(Spreading depolarization に対する
頭蓋内圧亢進と脳灌流圧の影響)

氏名 西本 拓真

所属 山口大学大学院医学系研究科
医学専攻 脳神経外科学講座

令和6年10月

目 次

1. 要旨	1
2. 研究の背景と目的	2
3. 方法	3
4. 結果	7
5. 考察	8
6. 結語	9
7. 参考文献	11
8. 図表	9
9. 補足図表	9

要旨

Spreading depolarization (SD) は脳卒中や外傷性脳損傷後に発生し、2 次的脳損傷を引き起こす可能性がある。脳卒中や外傷性脳損傷は頭蓋内亢進を伴うことがあるが、頭蓋内圧 (intracranial pressure; ICP) が SD に与える影響についてはほとんど分かっていない。そこで今回、ラットを用いて SD の血行動態反応及び代謝反応に対する頭蓋内圧亢進の影響について研究した。

異なる ICP 及び脳灌流圧 (cerebral perfusion pressures; CPP) の条件下に SD を誘発した。局所脳血流 (regional cerebral blood flow; rCBF)、脳組織酸素分圧 (partial pressure of brain tissue oxygen; PbtO₂)、脳細胞外グルコース濃度および脳細胞外乳酸濃度を記録した。皮質の神経細胞損傷を定量化するために Fluoro-Jade 染色を行った。

正常条件下で SD を誘発した場合、rCBF や PbtO₂ は単相性に上昇した。一方で、high ICP (50 mmHg) かつ low CPP (30 mmHg) の条件下で SD を誘発すると、rCBF や PbtO₂ は単相性に低下した。また、high ICP かつ low CPP の条件下では、神経細胞死は両側半球で増加したが、SD が誘発された半球側で、より多くの神経細胞死を認めた。High ICP (50 mmHg) であっても normal CPP (70 mmHg) の条件下で SD を誘発した場合、SD 中に起こる血行動態反応及び代謝反応は正常条件下と変わらず、神経細胞死は SD 誘発側であっても増加しなかった。

今回の結果は、ICP が 50 mmHg と高値でも CPP を 70 mmHg の正常値に維持することで、SD 発生時の脳血流や脳代謝の反応が正常に保たれ、神経細胞変性を防ぐ可能性があることを示唆している。

研究の背景と目的

Spreading depolarization (SD) とは、神経細胞及びグリア細胞の脱分極波であり、灰白質を緩徐に自己拡散していく現象である¹。SD はイオンの恒常性や膜電位に対して一時的に大きな変動を引き起こし、脳血流や脳代謝を大きく変化させる²⁻⁴。大きく変動したイオンの恒常性は膜貫通型 ATPase イオンポンプの活性化によって回復する。そのため、イオン恒常性の回復は ATP 産生促進のために十分なエネルギー供給が得られるか否かに依存している。通常 SD が発生した場合、十分なエネルギー供給を得るために hyperemic response が生じる⁵。しかし、障害された脳組織において、血流供給が不十分な領域に SD が発生した場合、通常生じうる hyperemic response はむしろ反転し、血流供給が更に悪化することで2次的脳損傷を来す⁶。そのため、脳梗塞や脳内出血、くも膜下出血などの脳血管障害や外傷性脳損傷によって障害された脳組織を有する患者における SD は、2 次的脳損傷を来し予後不良に至る可能性が示唆されている⁶⁻⁹。脳灌流圧 (cerebral perfusion pressure; CPP) は、血液が脳血管床を通る際の圧であり、臨床診療においては平均動脈圧 (mean arterial pressure; MAP) と頭蓋内圧 (intracranial pressure; ICP) の圧較差として規定される¹⁰。CPP は脳への血流供給に重要な影響を与えるため、SD 回復に関する重要な因子として報告されている^{11, 12}。脳血管障害や頭部外傷の患者では、脳浮腫や頭蓋内出血によって ICP が亢進することがあり、更にこの ICP 亢進は臨床転帰に悪影響を及ぼす。実際、臨床診療において、22 mmHg を超える ICP 上昇は、外傷性脳損傷における転帰予後不良の重要な要因として報告されている^{13, 14}。ICP 上昇自体によって生じる神経細胞損傷に加えて¹⁵⁻¹⁹、ICP 上昇によって惹起された SD が病変拡大を来しうることも基礎研究並びに臨床研究の双方で報告されている²⁰。

ICP 上昇時に SD が発生した場合、ICP 上昇あるいは ICP 上昇による CPP 低下が、SD における血行動態反応及び代謝反応を変化させ、2 次的脳損傷を来す可能性があるかと仮定できる。しかし、ICP 上昇や ICP 上昇による CPP 低下が SD に与える影響についてはほとんど分かっていない。そこで今回、ラットを用いて SD の血行動態反応及び代謝反応に対する ICP と CPP の影響について研究した。

方法

動物

本研究は、山口大学動物使用委員会の承認を得て（承認番号: 51-001）、実験動物の管理と使用に関する指針（NIH Publication No. 85-23, 1996）に準じて行われた。動物実験は、ARRIVE（動物実験: in vivo 実験の報告）ガイドラインに従って実施された。オス Sprague-Dawley ラット（9-11 週齢, 300-350g, n=95）は、日本エスエルシー株式会社（Hamamatsu, Japan）から入手した。

麻酔と手術準備

50%亜酸化窒素と 50%酸素の混合ガス中に 4%イソフルランを含んだボックス内でラットに麻酔をかけた。その後 PE-205 カテーテルで気管挿管した。70%亜酸化窒素と 30%酸素の混合ガス中に 2%イソフルランを含ませた麻酔下に人工呼吸器管理を行った。換気は人工呼吸器（SAR-830; CWE Inc, PA, USA）を用いた。人工呼吸器管理によって動脈血の pH、酸素分圧（partial pressure of oxygen; PaO₂）、そして、二酸化炭素分圧（partial pressure of carbon dioxide; PaCO₂）を正常範囲内に維持した（Table 1）。直腸温を 36.0-37.0°C に維持するために、ラットを加温パッド（ACT-402; UNIQUE MEDICAL, Tokyo, Japan）上に置いた。大腿動脈にカテーテル（PE-50）を挿入し、持続的な動脈血圧モニタリングと血液ガス分析（ABL 9; Radiometer Inc, CA, USA）用の動脈血サンプル採取を行った。大腿静脈にカテーテル（PE-50）を挿入し、ドパミン静脈内投与による MAP 調節を行った。ラットを脳定位固定装置（SN-2N; Narishige, Tokyo, Japan）に固定し、生理食塩水で冷却しながら穿頭した。出血と乾燥を防ぎながら硬膜を丁寧に除去した。1M 塩化カリウム（potassium chloride; KCl）を綿球に浸し脳表に局所的に塗布して SD を誘発した。

ICP の操作と記録

頭皮を正中切開後、環椎後頭間膜を露出した。カテーテル（PE-50）を介して血圧増幅器（FE117; ADInstruments, Dunedin, New Zealand）に接続した穿刺針で脳槽に穿刺した。人工脳脊髄液（artificial cerebrospinal fluid; ACSF）の液面の高さを調整することで ICP を操作した。ICP を連続的に記録した。

電気生理学的記録

154 mM 塩化ナトリウム（sodium chloride; NaCl）で満たしたガラス製マイクロピペット（先端径: 10 μ m）を脳表から深部に向けて 600 μ m 挿入した。細胞外定常直流（direct current; DC）電位と皮質脳波（electrocorticograms; ECoG）を連続的に記録した（EX1 differential amplifier; Dagan Corporation, MN, USA）（PowerLab 8/30、ADInstruments）。基準電極として、銀/塩化銀（silver/silver chloride; Ag/AgCl）電極を頸部皮下組織に挿入した。

脳血流記録

局所脳血流（regional cerebral blood flow; rCBF）はレーザードップラー血流計（laser

Doppler flowmetry; LDF) (ALF21; ADVANCE, Tokyo, Japan) を用いて記録した。DC 電位記録用の電極に隣接した頭蓋骨をドリルで薄くした。薄くした頭蓋骨上に LDF プローブ (先端直径: 0.2 mm) を固定した。ICP 並びに MAP 操作前の 5 分間に rCBF 値を測定し、基準値 (100%に設定) とした。

脳組織酸素分圧記録

酸素センサー (先端径: 0.4 mm、Type UOE-04T; UNIQUE MEDICAL) を用いて、ポーラログラフ法により脳組織酸素分圧 (partial pressure of brain tissue oxygen; PbtO₂) を測定した^{21,22}。この酸素センサーは、酸素透過性を有するテフロンチューブで構成され、白金線、基準電極の Ag 線、温度補正用のサーミスタが内蔵されている。穿頭後、酸素センサーを脳表から深部に向けて 0.3 mm 挿入した。専用モニター (POG-301; UNIQUE MEDICAL) で連続的に記録した。各実験の前後に酸素センサーを 37°C で校正し、酸素センサーから得られた信号を mmHg に変換した。記録の精度を維持するために、各酸素センサーの使用回数は 5 回までに制限した。

グルコースと乳酸の記録

細胞外脳グルコース濃度 (extracellular brain glucose; [Glc]b) と細胞外脳乳酸濃度 (extracellular brain lactate; [Lac]b) は白金酵素結合電極 (7005-Glucose-C and 7005-Lactate-C; Pinnacle Technology Inc., KS, USA) を用いて記録した^{23,24}。このバイオセンサー (先端径: 180 μ m) は白金/イリジウム線で構成され、AgCl 基準電極が同心円状に巻かれている。バイオセンサー先端から 1 mm までの間にグルコース酸素酵素または乳酸酸素酵素が塗布されている。この酵素は、対象分析物を酸化し、過酸化水素を放出する。この過酸化水素が電極の酸化電流として検出記録される²⁵。穿頭後、バイオセンサーを脳表から深部に向けて 0.3 mm 挿入した。本実験前に、in vitro で各バイオセンサーを以下の通りに校正した。In vitro で 0.1M リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) 中のグルコース濃度と乳酸濃度に対する線形応答を評価し、選択度と感度を確認した。また、温度と酸素濃度に対する依存性を測定した。そして、in vivo で得られたシグナルを in vitro の実験結果を元に補正した。本研究においては、PbtO₂ 測定時に得られた温度や酸素濃度の結果を元に、実際の [Glc]b と [Lac]b を推定した。バイオセンサーは実験中に感度の低下が起こりうるため²⁶、実験後にも線形応答を評価し、線形減衰分析を行った。初期校正と実験後校正の感度差を時間的に積分し、感度低下勾配を求めた。減衰が時間的に線形であると仮定し、初期校正と感度低下勾配に基づいて、特定の時間におけるバイオセンサーの感度を推定した。バイオセンサーの精度を保証するため、各バイオセンサーの使用回数は 2 回までに制限した。バイオセンサーからの信号は、4 チャンネルラットプリアンプ (8407-SE2-2BIO; Pinnacle Technology Inc.) で増幅され、4 チャンネルアナログアダプター (8442-K; Pinnacle Technology Inc.) を介して、アナログデジタル変換器 (16-bit PowerLab 8/30; ADInstruments) に入力された。LabChart 8 software (ADInstruments) を使用して記録した。LDF プローブ、酸素センサー、そして、バイオセンサーの信号は、それぞれ 1 秒毎に平均化した。

実験 1. SD 形態と rCBF 反応の測定

右側の頭蓋骨に 3 つの穿頭を設けた。2 つの穿頭部（ブレグマから 3 mm 前方と 3 mm 後方、それぞれ 3 mm 外側）は DC 電位を記録するために使用し、残り 1 つの穿頭部（ブレグマから 6 mm 後方、3 mm 外側）は SD 誘発に使用した。LDF プローブはブレグマから 3 mm 後方の穿頭部に近接した位置に設けた。ICP と MAP を調整することで以下の 5 つの異なる実験条件を設定し、ラット（n=25）を無作為に割り付けた（5 匹/群）：

- (1) 正常 ICP (10 mmHg) / 正常 CPP (70 mmHg) (ICP10/ CPP70) (コントロール群)
- (2) 中等度高 ICP (30 mmHg) / 中等度低 CPP (50 mmHg) (ICP30/ CPP50)
- (3) 重度高 ICP (50 mmHg) / 重度低 CPP (30 mmHg) (ICP50/ CPP30)
- (4) 中等度高 ICP (30 mmHg) / 正常 CPP (70 mmHg) (ICP30/ CPP70)
- (5) 重度高 ICP (50 mmHg) / 正常 CPP (70 mmHg) (ICP50/ CPP70)。

ICP を上昇させるため、カテーテルを介して脳槽に接続された ACSF リザーバーを調整した。ICP リザーバーを上昇させると、クッシング現象により MAP 上昇を来すことがある。クッシング現象が生じた場合には、脱血することで MAP を低下させ、CPP を調整した（補足図 1）。一方で、MAP 上昇を維持させるために、ドパミンをシリンジポンプを用いて 12-65 $\mu\text{g/kg/min}$ の範囲で静脈内投与した。各実験条件下に ICP と CPP を 15 分間維持した後、1M KCl に浸した綿球を後頭葉皮質に置き、10 分毎に計 1 時間交換した。DC 電位の連続記録において、ECoG に基づく自発活動の抑制と関連した振幅 5 mV 以上の変化を認めた場合に SD としてカウントした²⁷。伝搬速度、振幅、持続時間などの SD 要素を記録した。伝搬速度は、潜時と 2 つの DC 電位記録電極間の距離に基づいて計算した²⁸。SD 発生時の rCBF 変化に関しては、以下の deflection points を定量評価した：SD 発生の 30 秒前、SD 発生直前、hypoperfusion (first trough)、hyperemia (peak)、oligemia (second trough)、oligemia 発生 1-2 分後の plateau。各実験条件下での各 deflection point における rCBF の振幅を測定し、平均値±標準偏差で提示した。更に、rCBF 変化の時間経過を正確に示すため、hypoperfusion 時の first trough、hyperemia 時の peak、そして、oligemia 時の second trough の潜時も測定した¹¹。初回に発生した SD と 2 回目以降に発生した SD で血行動態反応が異なると報告されている^{12,29,30}。そのため、初回 SD と 2 回目以降の SD における rCBF 変化を別々に評価した。

実験 2. 代謝反応の測定

右側の頭蓋骨に 3 つの穿頭を設けた。1 つ目の穿頭部（ブレグマから 3 mm 後方、2 mm 外側）は DC 電位を記録するために使用し、2 つ目の穿頭部（ブレグマから 3 mm 後方、4 mm 外側）は PbtO₂、[Glc]b、並びに、[Lac]b の測定に用いた。3 つ目の穿頭部（ブレグマから 6 mm 後方、3 mm 外側）は SD 誘発に使用した。実験 1 と同様に LDF プローブは DC 電位記録電極の穿頭部に近接した位置に設置した。実験 1 と同様に ICP と MAP を調整することで以下の 3 つの異なる実験条件を設定し、ラット（n=54）を無作為に割り付けた（6 匹/群）：

- (1) ICP10/ CPP70 (コントロール群)

(2) ICP50/ CPP30

(3) ICP50/ CPP70。

各実験条件下に ICP と CPP を 15 分間維持した後、1M KCl に浸した綿球を用いて各ラットにつき SD を 1 回誘発し、直ぐに生理食塩水で洗浄した。PbtO₂、[Glc]b、並びに、[Lac]b の変化を SD 発生から 10 分間記録した。脳酸素消費 (cerebral metabolic rate of oxygen; CMRO₂) は、PbtO₂ と rCBF の同時記録に基づいて、以下の式を用いて秒単位で計算した^{31,32}。

$$P_{bt}O_2 = P_{50} \cdot h \sqrt{\frac{2 \cdot Ca \cdot rCBF}{CMRO_2} - 1} - \frac{CMRO_2}{2 \cdot L}$$

ヘモグロビン半飽和濃度 (P50=34 mmHg) とヒル係数 (h=2.7) に関しては標準値を使用した³³。実験中の動脈酸素は 7.3 μmol/mL であった。イソフルラン麻酔における過去の報告から、rCBF と CMRO₂ の関係 (それぞれ 135 mL/100 g/min と 357 μmol/100 g/min) を元に、脳組織における酸素の有効拡散係数 (L=5.1 μmol/100 g/min/ mmHg) を求めた。更に DC 電位記録を用いて、SD の振幅と持続時間も測定した (補足表 1)。

実験 3. SD 後の組織障害評価

ICP 上昇自体が脳損傷を引き起こすか否かと、SD がこの脳損傷を悪化させるかどうかを評価するために、コホート研究を追加した。

右側の頭蓋骨に 2 つの穿頭を設けた。1 つ目の穿頭部 (ブレグマから 3 mm 後方、3 mm 外側) は DC 電位を記録するために使用し、2 つ目の穿頭部 (ブレグマから 6 mm 後方、3 mm 外側) は SD 誘発に用いた。実験 2 と同様に、ICP と MAP を調整することで以下の 3 つの異なる実験条件を設定し、ラット (n=16) を無作為に割り付けた (5 匹/群) :

(1) ICP10/ CPP70 (コントロール群)

(2) ICP50/ CPP30

(3) ICP50/ CPP70。

ICP50/ CPP30 群の実験中に 1 匹が抜管後死亡したため、本検討から除外した (5 匹/群)。各実験条件に ICP と CPP を 15 分間維持した後、1M KCl に浸した綿球を用いて最初の SD を誘発し、直ぐに生理食塩水で洗浄した。その後、10 分毎に同様の SD 誘発を行い、計 1 時間記録した。実験後に抜管し、温度制御されたインキュベーターで管理し、餌と水を自由に摂取できるようにした。SD 誘発開始から 24 時間後に、ラットをイソフルランで麻酔し、予め 4 °C に冷却しておいた 0.9% 生理食塩水と 4% パラホルムアルデヒド (FUJIFILM Wako Chemical, Osaka, Japan) を用いて心内灌流を行った。脳標本を取り出し、4% パラホルムアルデヒドに 24 時間浸漬し、パラフィンに包埋した。ブレグマから 3.5 mm 後方の冠状脳切片を 5 μm 厚に切り出した。

神経細胞変性を評価するため、脳組織を Fluoro-Jade C (FJC; Biosensis, South Australia, Australia) で染色した。スライドを 70% エタノール (FUJIFILM Wako Chemical) で 2 分間洗浄した後、蒸留水に 2 分間浸した。0.06% 過マンガン酸カリウムで 10 分間インキュベートした後、蒸留水で 2 分間洗浄し、0.1% 酢酸 (FUJIFILM

Wako Chemical) に溶解した 0.0001%FJC 溶液に 10 分間浸した。その後、蒸留水で 1 分間ずつ 3 回洗浄し、50℃のスライドインキュベーターで 5 分間乾燥した。最後に DAPI 混合 VECTASHIELD HardSet Mounting Medium (H-1500; Vector Laboratories, CA, USA) を使用してカバーガラスで保護した。オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X800, KEYENCE, Osaka, Japan) を用いて、脳切片を可視化した。関心領域 (regions of interest: ROI) は正方形 (500 × 500 μm) に設定した。ROI は各大脳半球において、皮質から 500 μm の深さで、正中から 2.5 mm、3.0 mm、そして、3.5 mm の位置に 3箇所ずつ設けた (図 3)。細胞の大きさと輝度は、フィルター (GFP-BP and DAPI-BP, wavelength: 470 and 360 nm, KEYENCE) を用いて自動解析した。倍率 20 倍の各 ROI 内 (BZ-H1C, Dynamic Cell Count Module, KEYENCE) において FJC 陽性神経細胞を自動的にカウントした。なお、以下の条件に合致する細胞を FJC 陽性細胞と定義した: 輝度閾値 10 以上 (閾値範囲: 0-255)、細胞サイズ 10 μm 以上、DAPI 陽性細胞と一致した緑色励起光線。非 SD 誘発側と SD 誘発側のそれぞれの大脳皮質において、FJC 陽性細胞数 (細胞数/0.25 mm²) をカウントし、3 つの異なる ICP/ CPP 条件の 3 群間比較を行った。更に、SD による神経細胞障害の有無も評価するため、同 ICP/ CPP 群において、非 SD 誘発側と SD 誘発側の 2 群間比較を行った。更に、DC 電位記録を用いて、SD の振幅、持続時間などの SD 要素を記録した (表 3)。

統計解析

データの統計量は平均値±標準偏差または中央値 (四分位範囲) で提示した。分布は箱ひげ図 (whisker: 最小値～最大値; box: 四分位範囲; line: 中央値; +記号: 平均値)、又は、個別のデータ点として示した。各データの解析には、Wilcoxon 符号付順位和検定、一元配置分散分析、繰り返しのある二元配置分散分析、Kruskal-Wallis 検定、多重比較 (Tukey 多重比較検定、Dunn 多重比較検定)、Spearman 順位相関係数に対する検定を用いた (Prism 9; GraphPad Software, CA, USA)。全ての P 値は両側検定で行い、P<0.05 を有意とした。

結果

各 ICP と CPP の条件における生理学的パラメータの結果を表 1 に示す。ICP と CPP 操作後で KCl 塗布による SD 誘発前の観察期間中に、自発的な SD が検出されることはなかった。

SD の電気生理学と感受性

SD の持続時間は CPP と逆相関していた（代表的な DC 電位図を補足図 2 を示す）。実験 1 における SD 要素の結果を表 2 に示す。正常な生理学的状態（コントロール群、ICP10/ CPP70）と比較して、ICP50/ CPP30 群では、SD の持続時間が約 2 倍に延長した（ 17.3 ± 0.8 versus 38.7 ± 9.9 s; $p < 0.0001$ ）。ICP 上昇（30 mmHg 又は 50 mmHg）に関係なく、CPP を正常（70 mmHg）に維持した場合、SD の持続時間は正常であった。統計学的に有意な差はなかったものの、CPP を正常に維持した条件と比較して低 CPP の条件では SD の発生頻度が低かった。SD の伝搬速度と振幅に有意差は認めなかった。

SD の血行動態反応の影響

コントロール群（ICP10/ CPP70 群）と比較して、ICP50/ CPP30 群では、SD 誘発前の安静時 rCBF がほぼ半分まで有意に低下していた（ $48.1 \pm 7.9\%$; $p = 0.0029$ ）。一方で、ICP30/ CPP50 群では、安静時 rCBF は変化していなかった（図 1 A）。また、ICP や MAP が高くても（ICP 30 mmHg かつ MAP 100 mmHg 或いは ICP 50 mmHg かつ MAP 120 mmHg）、CPP を正常（70 mmHg）に維持した場合、安静時 CBF の変化は見られなかった（図 1 A）。

SD における rCBF の変化に関して、ICP10/ CPP70 群では、最初に短時間の小さな hypoperfusion（first trough: $94.8 \pm 11.6\%$; 潜時: 6.4 ± 2.3 s）が生じ、その後に、大きな単相性の hyperemia（peak: $146.8 \pm 24.8\%$; 潜時: 36.0 ± 3.3 s）が見られた。その後、長時間持続する oligemia（second trough: $69.9 \pm 8.9\%$ ）を認めた（図 1 A）。ICP 上昇によって CPP が低下すると（ICP30/ CPP50 群または ICP50/ CPP30 群）、最初の hypoperfusion が増悪し、その後の hyperemic response が軽度となった。rCBF の振幅に関しては、ICP50/ CPP30 群でのみ有意差を認めた（first trough: $32.2 \pm 7.3\%$; $p = 0.0024$, peak: $58.4 \pm 14.3\%$; $p = 0.0005$, 図 1 A）。また、低 CPP 群では各 deflection point の潜時延長を認めた。コントロール群と比較して、ICP30/ CPP50 群では、peak（ 59.6 ± 17.0 s; $p = 0.038$ ）と second trough（ 241 ± 24.5 s; $p = 0.002$ ）の 2 点で潜時が有意に延長していた。ICP50/ CPP30 群では、first trough（ 26.0 ± 10.4 s; $p = 0.0067$ ）、peak（ 83.4 ± 15.9 s; $p < 0.0001$ ）、そして、second trough（ 213 ± 80.2 s; $p = 0.017$ ）の 3 点で潜時が有意に延長していた（図 1 A）。対照的に、ICP や MAP が高くても（ICP 30 mmHg かつ MAP 100 mmHg 或いは ICP 50 mmHg かつ MAP 120 mmHg）、CPP を正常（70 mmHg）に維持した場合、SD に対する血行動態反応は正常なパターンを示した（図 1 A）。

2 回目以降の SD に関しては、過去の報告と同様に¹²、最初の hypoperfusion（first trough）は全群でほとんど見られなかった（図 1 B）。初回の SD と同様に、ICP50/ CPP30 群では、hyperemic response の程度が有意に軽減し（ $65.3 \pm 16.3\%$; $p < 0.0001$ ）、peak（ 97.9

± 17.2 s; $p=0.0001$) と second trough (237.0 ± 23.5 s; $p=0.0001$) の 2 点で潜時が有意に延長した (図 1 B)。ICP30/ CPP50 群を含むその他の群では、ICP/30CPP50 群で second trough の潜時が遅延していた以外は、コントロール群と同様の血行動態反応を示した (図 1 B)。

SD の代謝反応の影響

SD の血行動態反応や代謝反応に対する ICP と CPP の影響を図 2 に示す。コントロール群と比較して、ICP50/ CPP30 群では、SD 誘発前の rCBF (104.4 ± 12.8 versus $54.9 \pm 8.3\%$; $p<0.0001$)、PbtO₂ (28.0 ± 4.4 versus 17.6 ± 2.6 mmHg; $p<0.0001$)、CMRO₂ (333.5 ± 6.6 versus 290.3 ± 25.4 $\mu\text{mol}/100$ g/min; $p<0.0001$)、そして、[Glc]b (1.70 ± 0.13 versus 0.87 ± 0.20 mM, $p<0.001$) が有意に低値であった。一方で、[Lac]b に関しては有意差を認めなかった。対照的に、ICP が著明に高値 (ICP 50 mmHg) であっても、CPP を正常値 (70 mmHg) に維持した場合、PbtO₂ を除く全ての値は正常であった。PbtO₂ に関しては、コントロール群と比較して、ICP50/ CPP70 群では有意に低値 (28.0 ± 4.4 versus 20.9 ± 5.7 mmHg; $p=0.009$) であった。

SD が発生すると、PbtO₂ はコントロール群で 28.0 ± 4.4 mmHg から 31.6 ± 6.6 mmHg ($+15.6 \pm 14.0$ percentage points [p.p.]) へと一過性単相性に上昇した。一方で、ICP50/ CPP30 群では 17.6 ± 2.6 mmHg から 16.2 ± 2.6 mmHg (-8.8 ± 6.4 p.p.) へと一過性単相性の低下を認めた。CMRO₂ に関しては、コントロール群では 333.5 ± 6.6 $\mu\text{mol}/100$ g/min から 371.1 ± 25.4 $\mu\text{mol}/100$ g/min ($+14.6 \pm 11.5$ p.p.) へと一過性単相性に増加したが、ICP50/ CPP30 群では 290.3 ± 10.7 $\mu\text{mol}/100$ g/min から 254.8 ± 21.2 $\mu\text{mol}/100$ g/min (-13.4 ± 0.4 p.p.) へと一過性単相性の減少を認めた。対照的に、ICP が高くても CPP を正常に維持した場合 (ICP50/ CPP70)、PbtO₂ の変化はコントロール群と同様で、一過性単相性に上昇した ($+14.1 \pm 10.7$ p.p.)。CMRO₂ の変化に関してもコントロール群と比較して有意差はなく、SD 誘発後に一過性単相性の増加 ($+8.0 \pm 6.4$ p.p.) を示した。

[Glc]b に関しては、コントロール群において、SD 発生後最初の 2 分間で 1.70 ± 0.13 mM から 1.21 ± 0.28 mM (-28.6 ± 15.2 p.p.) に低下し、その後、元の値から -20 p.p. 程度低下した状態が長く続いた。コントロール群と比較して、ICP50/ CPP30 群では、[Glc]b の絶対値が常に有意に低下していた。しかし、コントロール群と同様に、SD 発生後 [Glc]b は一過性単相性に低下した。

[Lac]b に関しては、コントロール群において、SD 発生の約 5 分後に最大となる、 0.33 ± 0.06 mM から 0.48 ± 0.11 mM ($+57.8 \pm 15.7$ p.p.) への単相性上昇が長時間持続した。対照的に、ICP50/ CPP30 群において SD を発生させると、[Lac]b は二相性の変化を示した。SD 発生直後から、[Lac]b は一過性に 0.31 ± 0.1 mM から 0.24 ± 0.12 mM (-33.5 ± 16.4 p.p.) まで低下し、その後 0.40 ± 0.11 mM ($+38.9 \pm 24.1$ p.p.) まで緩徐に増加した。

ICP が著しく高くても CPP を正常に維持した場合 (ICP50/ CPP70)、[Glc]b 並びに [Lac]b は正常範囲内に維持された。[Glc]b と [Lac]b の変化については、コントロール群と ICP50/ CPP70 群の間に有意差は認めなかった。

SD 後の組織損傷

FJC 染色の結果を図 3 に示す。コントロール群と比較して ICP50/ CPP30 群では、皮質における FJC 陽性細胞数が、非 SD 誘発側 (5 [1.5-10.5] versus 60 [32.5-88.5]; $p=0.028$) と SD 誘発側 (10 [2.5-25.0] versus 126 [93.0-201.5]; $p=0.039$) 共に約 12 倍増加していた (図 3 D)。更に、ICP50/ CPP30 群において、非 SD 誘発側と比較して SD 誘発側では FJC 陽性細胞数の有意な増加を認めた ($p<0.001$) (図 3 D)。

対照的に、ICP が著しく高くても CPP を正常に維持した場合 (ICP50/ CPP70)、SD が発生したとしても、FJC 陽性細胞数はコントロール群と比較して増加しなかった。

表 3 は実験 3 において 60 分間に発生した SD の回数、SD の平均持続時間、全ての SD の累積持続時間、そして、振幅を示している。コントロール群と比較して、ICP50/ CPP30 群では、SD の平均持続時間 (16.5 ± 3.5 versus 37.2 ± 11.9 s; $p<0.001$) と累積持続時間 (92.4 ± 3.5 versus 178.6 ± 23.5 s; $p<0.001$) が共に約 2 倍延長していた。ICP50/ CPP30 群において、SD の累積時間と FJC 陽性細胞数との間に有意な相関は認めなかった ($r=0.41$, $p=0.13$)。

考察

本研究では、健常な非損傷大脳皮質において KCl 投与により SD を誘発し、ICP 上昇が SD の電気生理学的特性、血行動態反応、代謝反応、そして、病理組織学的結果にどのような影響を及ぼすかを検討した。その結果、SD は CPP に依存することが明らかとなった。ICP の高度上昇によって CPP が著しく低下すると、SD 発生後に必要な血行動態反応や代謝反応が生じず、結果として脳虚血や脳組織障害を来す。一方、ICP が高度に上昇しても CPP が正常な生理学的状態に維持できれば、SD における反応は正常となり、ICP 上昇や SD に伴う組織障害は軽減される。

1、SD の電気生理学的特性と血行動態反応

正常な生理学的状況で SD が発生すると、ほとんどの種で著明な hyperemic response を引き起こす。この hyperemic response は、SD によって大きく変動した膜貫通イオン勾配の回復に必要なエネルギーの需要が亢進することで生じると推測されている^{35, 36}。SD の回復時間と血行動態反応を決定する主な因子は灌流圧であると考えられている^{11, 35, 37}。血圧低下や頸動脈結紮によって脳組織への血流供給を低下させると、SD の持続時間が延長し、血行動態反応が単相性の hyperemia から hypoperfusion へ変化すると報告されている^{11, 12, 37}。これと同様に、くも膜下出血^{38, 39}や脳梗塞^{40, 41}、外傷性脳損傷⁴²などの病的条件下でも、hypoperfusion response

(inverse hemodynamic response) が観察される。この inverse hemodynamic response は SD からのエネルギーに依存した回復の遅延を来し、病変拡大を引き起こす可能性がある^{6, 38, 40}。本研究の rCBF 変化に関する検討からは、正常な生理学的状態において、短時間の hypoperfusion の後、~47 p.p.まで rCBF が上昇する hyperemic response を認めた。しかし、ICP 上昇によって CPP が低下すると、先行する hypoperfusion が増悪し、その後の hyperemic response は軽度となり、更に hyperemia における peak の潜時が延長した。この結果は、血圧を操作することで CPP を変化させた先行研究と一致していた。先行研究では、正常血圧ラットと比較して、血圧低値ラット (MAP 42-46 mmHg) では、先行する hypoperfusion が増悪し、hyperemic response が軽度となり、そして、hyperemia における peak の潜時が延長していた^{11, 37, 43}。特に、著明な CPP 低下 (30 mmHg) は、初回の SD における血行動態反応をほぼ単相性の hypoperfusion に変えていた。同様の inverse hemodynamic response は、全脳虚血または局所脳虚血ペナンプラ領域でも観察されている^{12, 40}。脱分極によって生じたイオン勾配を回復させるためには十分なエネルギー基質を必要とするため、SD 回復は血流供給に大きく依存する。以前の報告と同様に^{11, 37}、ICP50/CPP30 の条件では、SD 持続時間の延長が観察された。一方で、ICP30/CPP50 の条件では、ICP が臨床的には十分に病的高値であるにも拘らず、SD の血行動態反応に大きな影響は生じなかった。このことから、ICP30/CPP50 の条件は、エネルギー需要を満たす能力がまだ十分にあることを示唆していた。ICP に拘らず CPP が正常範囲内に維持されれば、血行動態反応や SD の持続時間は正常パターンを示した。このことは、ICP 自体が SD の血行動態反応にほとんど影響を及ぼさないことを示唆している。更に、ICP 上昇は SD の発生頻度に影響を与えなかった。この結果は、一過性

の急激な ICP 上昇が虚血ペナンプラにおいて SD を引き起こすのに対して、持続的な ICP 上昇は SD の発生頻度を増加させないというこれまでの知見を裏付けるものとなる²⁰。

2、SD の代謝反応

SD によって生じる [Glc]b の低下と、PbtO₂、CMRO₂、及び、[Lac]b の単相性増加は、正常脳における好氣的解糖の活性化を示唆している⁴⁴。SD に対する PbtO₂ 変化については 2 つの異なる報告がある^{32, 44}。Pilgaard と Lauritzen は、短時間の上昇に続いて長時間の低下が起こるという PbtO₂ の二相性パターンを報告しているが、この結果は我々の結果と異なっている⁴²。一方で、Balance らは、一過性の PbtO₂ 上昇パターンを報告しており、これは我々の結果と非常に近似している⁴⁴。これらの結果の違いは、麻酔の違いに一因があると考えられる。麻酔薬の違いは安静時 rCBF 対して異なる影響を及ぼし、SD の血行動態反応も変化させることが知られている^{12, 45}。本研究で用いた麻酔薬はイソフルランで、血管拡張作用や安静時 rCBF 増加効果を有しており、O₂ 供給が促進されている可能性がある。Balance らの研究では、我々の研究と同様にイソフルランを使用していた。また、PbtO₂ の変化は異なるものの、我々が示した CMRO₂ の一過性増加という CMRO₂ 変化は過去の報告と同様であった^{32, 44}。

SD による [Glc]b と [Lac]b の変化は、さまざまな手法を用いて報告されている。変化の程度や時間経過は報告によって異なるものの、本研究で示したように、全ての報告で [Glc]b の一過性減少と [Lac]b の一過性上昇が示されている^{3, 4, 44, 46-48}。研究間のばらつきは、測定方法や、使用したセンサーの厚さ、センサーを挿入した際の深さ、研究で用いた動物種の違いなどによるものと考えられる。SD に対する代謝反応は十分に理解されないが、神経細胞やグリア細胞の再分極に必要なエネルギーを維持するために、グルコースの消費と乳酸の放出が関与していると考えられている^{3, 44, 47, 49}。

本研究において、ICP が 50 mmHg まで著しく上昇し CPP が 30 mmHg まで著明に低下した場合、PbtO₂ と CMRO₂ の絶対値は共に有意に低下した。更に、SD が発生すると PbtO₂ と CMRO₂ は共に単相性の減少を来した。これは正常な生理的条件下で観察された PbtO₂ と CMRO₂ 双方の一過性上昇とは対照的な反応であった。これらの結果は上述した *inverse hemodynamic response* による rCBF 低下が要因と考えられる。CPP が著しく低下した状態での SD 発生が灌流障害を悪化させる可能性が示唆された。

驚くべきことに、CPP が低下した場合、[Lac]b は最初に短時間減少し（～30 p.p.）、その後長時間に渡って緩徐に増加する（～25 p.p.）という二相性パターンを示した。ラットモデルを用いた過去の報告でも、同様の二相性変化が報告されている⁴⁴。しかし、その報告では SD 中の rCBF や CMRO₂ は一過性増加を示しており、我々の研究と異なり、実験条件は虚血状態ではないことが示唆された⁴⁴。Hopwood らは、微小透析法を用いて、猫における脳梗塞周囲の脱分極に関連した皮質のグルコースと乳酸の濃度変化を研究している⁵⁰。その研究では、乳酸値は単相性に緩徐

に上昇することが示されている。しかし、測定された領域での rCBF がどの程度低下していたかは不明である。脳梗塞や脳内出血、頭部外傷などの損傷脳を用いた過去の研究では、SD によって乳酸値は上昇するという、本研究とは異なる結果が報告されている^{51, 52}。しかし、これらの研究では乳酸を測定した領域における rCBF や ICP、CPP が特定されていないため、我々のモデルとの類似性は不明である。過去の研究では、虚血状態で発生した SD が更なるアシドーシスを惹起することが示されている。この研究では、アシドーシスの進行は乳酸産生の増加が要因ではないかと推測している⁵³。我々の実験方法では、一時的な乳酸濃度の低下が、乳酸産生障害によるものなのか、乳酸消費量の増加によるものなのか、或いは血流へのクリアランス促進によるものなのかを判定することはできなかった。そのため、本研究において [Lac]b が二相性パターンを示した理由は不明である。我々が実験で用いた ICP50/CPP30 という実験条件は、rCBF、PbtO₂、[Glc]b の全てが低下しており、臨界虚血状態であったと考えられることから、脳内に放出された乳酸は、SD によって変動したイオン勾配を回復するためのエネルギー基質として利用された可能性があるかと推測される^{3, 54}。脳虚血状態における SD 発生後のグルコース濃度や乳酸濃度の変化はまだ十分に検討されておらず、更なる研究が必要である。

ICP が著しく上昇した状態（50 mmHg）でも、CPP を正常範囲（70 mmHg）に維持した場合、PbtO₂ の絶対値はコントロール群と比較し低かったものの、CMRO₂ の基礎値も SD における代謝反応も正常であった。過去の報告では、少なくとも ICP を 30 mmHg まで上昇させると、CMRO₂ が低下するという報告がある¹⁵。我々の結果とは異なる結果であり、その理由は不明である。しかし、CPP に注目すると、我々の報告（70 mmHg）と比較して、過去の報告（50-60 mmHg）はより低値であり、この CPP の違いが関係している可能性がある。興味深いことに、CPP が生理的範囲内に維持された場合、SD に対するグルコースや乳酸の代謝反応は正常なパターンを示した。これらの結果は、ICP が著明に高値でも CPP を正常範囲内に維持できれば、正常な血行動態反応や代謝反応を維持できる可能性を示唆している。

3、SD の組織学的結果

健常な大脳皮質では、SD によって組織学的損傷が生じることはない⁵⁵。一方で、病的状況下では、SD によって神経細胞損傷の拡大が生じることがよく知られている^{35, 36, 56}。例えば、局所虚血ペナンプラに発生した SD によって spreading ischemia³⁹ としても知られる inverse hemodynamic response が生じると、虚血病変の拡大が引き起こされる^{40, 57, 58}。本研究では、ICP 上昇によって CPP が著しく低下すると、非 SD 誘発側においても神経細胞死を認めた。更に SD 誘発側では、局所虚血ペナンプラにおける spreading ischemia と同様の inverse hemodynamic response が生じ、神経細胞死が増えるという結果が得られた。前述したように、CPP が ICP 上昇によって著明に低下すると、非 SD 誘発側であっても神経細胞死を来す。これは、CPP 低下が虚血を誘発したためと考えられる。MAP 低下によって生じる CPP 低下と比較して、ICP 上昇によって生じる CPP 低下は組織低酸素や脳浮腫を誘発するため、より有害であることが報告されている¹⁶。更に、ICP 上昇自体が神経細胞障害

に繋がることをいくつかの研究が報告している^{15,17-19}。Dai らは、健常ラットにおいて、ICP 上昇自体が、正常な毛細血管血流を異常な微小血管シャント血流に変換し、その結果、組織低酸素や脳浮腫が惹起され、神経細胞障害を引き起こすことを報告した¹⁵。また、外傷性脳損傷のラットモデルにおいて、ICP 高値は神経細胞の細胞膜障害を悪化させ、結果として神経細胞変性に繋がることも報告されている¹⁹。これらの機序もまた、SD によって誘発される神経細胞障害に影響を及ぼす可能性がある。しかし、過去に報告された ICP 上昇に起因する神経細胞障害が CPP 非依存的であったという点で、過去の報告と我々の結果に大きな違いが生じている。過去の研究では、CPP を維持しても神経細胞障害は防げないことが示されている^{15,19}。一方、我々のモデルでは、CPP を 70 mmHg に維持している限り、ICP を 50 mmHg に上昇させても、非 SD 誘発側だけでなく、大きなエネルギー消費が生じる SD 誘発側においても、神経細胞死が回避された。これらの結果は、ICP 高値よりも CPP 低値が神経細胞障害に大きな影響を与えることを示唆している。このような研究間の相違の理由は不明であるが、CPP の違い（過去の研究：50-60 mmHg と我々の研究：70 mmHg）¹⁵や実験時間の違い（過去の研究：6 時間と我々の研究：1 時間）¹⁹が影響した可能性がある。

4、限界

本研究にはいくつかの限界が存在する。第一に、本研究の実験時間は 1 時間までであった。このため、ICP 高値かつ CPP 正常の状態における神経保護効果が、1 時間を超えてどの程度まで有効かは不明である。その理由の 1 つは、大量の輸液や昇圧剤の使用によって CPP を維持することは、急性肺損傷の重大なリスクを伴うからである^{59,60}。本研究では、CPP を維持するために MAP を上昇させる昇圧剤を投与しても、呼吸不全を来したラットはいなかった。しかし、これは 1 時間の実験であったため、それ以上の実験時間でも同様の結果が得られたかどうかは不明である。第二に、本研究では健常な脳を用いて ICP 上昇の研究を行ったが、通常は損傷された脳において ICP が亢進する。脳梗塞や脳内出血、くも膜下出血などの脳血管障害や外傷性脳損傷によって障害された脳組織を有する患者では、自己調節能が障害されることが知られている⁶¹⁻⁶³。このような自己調節能が障害された状況では、最適な CPP は患者自身の自己調節能に依存する可能性がある¹³。第三に、本研究で示したように、虚血条件下での SD 発生は神経細胞障害の要因になると考えられてきたが、近年この見解に反する結果が報告されている^{36,56,64}。より侵襲度の低い方法で局所脳虚血下に SD を誘発した場合、虚血病変の拡大は生じなかったと報告した研究がある⁶⁴。この侵襲度の低い方法を用いれば、ICP50/CPP30 群で神経細胞障害を増加させることはなかった可能性がある。本研究で用いられた方法は、以前の研究と多くの点（例えば、動物種、ICP 値、全脳虚血か局所脳虚血か）で異なっており、更なる検討が必要である。第四に、本研究では、SD による代謝反応や神経細胞損傷は、コントロール群、ICP50/CPP30 群、ICP50/CPP70 群の 3 条件のみで検討した。従って、神経細胞障害を回避できる ICP と CPP の閾値は不明である。

結語

脳灌流を維持し2次的脳損傷を回避するために、急性期脳損傷患者に対してICPとCPPをモニタリングし管理することは広く推奨されている。しかしながら、エビデンス不足により、CPPの最適値は未だ不明のままである。今回の結果から、ICPが50 mmHgと著しく高い状態であっても、MAPを管理し、CPPを70 mmHgの正常値に維持することで、神経活動の正常な代謝を維持し、神経細胞変性を防ぐことができると推測された。過度に上昇したICPに対する根本的な治療は、内科的及び外科的管理によってICPを低下させることである。このICP低下が得られるまでの間、適切なCPPを維持することは、2次的脳損傷を最小限に抑えることに寄与する可能性が示唆される。

参考文献

1. Leao AAP. SPREADING DEPRESSION OF ACTIVITY IN THE CEREBRAL CORTEX. *Journal of Neurophysiology* 1944; 7: 359-390. DOI: 10.1152/jn.1944.7.6.359.
2. Ayata C, Shin HK, Salomone S, et al. Pronounced hypoperfusion during spreading depression in mouse cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; 24: 1172-1182. 2004/11/06. DOI: 10.1097/01.WCB.0000137057.92786.F3.
3. Feuerstein D, Backes H, Gramer M, et al. Regulation of cerebral metabolism during cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab* 2016; 36: 1965-1977. 2016/11/03. DOI: 10.1177/0271678X15612779.
4. Hashemi P, Bhatia R, Nakamura H, et al. Persisting depletion of brain glucose following cortical spreading depression, despite apparent hyperaemia: evidence for risk of an adverse effect of Leao's spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009; 29: 166-175. 2008/09/25. DOI: 10.1038/jcbfm.2008.108.
5. Lauritzen M, Hansen AJ, Kronborg D, et al. Cortical spreading depression is associated with arachidonic acid accumulation and preservation of energy charge. *J Cereb Blood Flow Metab* 1990; 10: 115-122. 1990/01/01. DOI: 10.1038/jcbfm.1990.14.
6. Dreier JP. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat Med* 2011; 17: 439-447. 2011/04/09. DOI: 10.1038/nm.2333.
7. Lauritzen M, Dreier JP, Fabricius M, et al. Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011; 31: 17-35. 2010/11/04. DOI: 10.1038/jcbfm.2010.191.
8. Dreier JP, Woitzik J, Fabricius M, et al. Delayed ischaemic neurological deficits after subarachnoid haemorrhage are associated with clusters of spreading depolarizations. *Brain* 2006; 129: 3224-3237. 2006/10/28. DOI: 10.1093/brain/awl297.
9. Hartings JA, Bullock MR, Okonkwo DO, et al. Spreading depolarisations and outcome after traumatic brain injury: a prospective observational study. *Lancet Neurol* 2011; 10: 1058-1064. 2011/11/08. DOI: 10.1016/S1474-4422(11)70243-5.
10. Smith M. Cerebral perfusion pressure. *Br J Anaesth* 2015; 115: 488-490. 2015/07/19. DOI: 10.1093/bja/aev230.
11. Sukhotinsky I, Yaseen MA, Sakadzic S, et al. Perfusion pressure-dependent recovery of cortical spreading depression is independent of tissue oxygenation over a wide physiologic range. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010; 30: 1168-1177. 2010/01/21. DOI: 10.1038/jcbfm.2009.285.
12. Feuerstein D, Takagaki M, Gramer M, et al. Detecting tissue deterioration after brain injury: regional blood flow level versus capacity to raise blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014; 34: 1117-1127. 2014/04/03. DOI: 10.1038/jcbfm.2014.53.
13. Carney N, Totten AM, O'Reilly C, et al. Guidelines for the Management of Severe Traumatic Brain Injury, Fourth Edition. *Neurosurgery* 2017; 80: 6-15. 2016/09/23. DOI:

10.1227/NEU.0000000000001432.

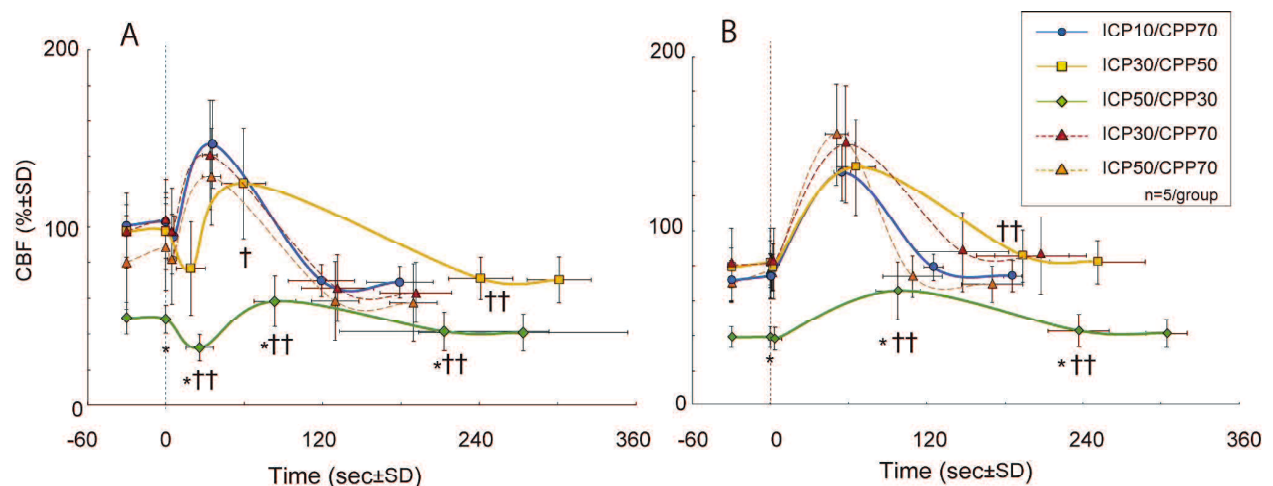
14. Sorrentino E, Diedler J, Kasprowitz M, et al. Critical thresholds for cerebrovascular reactivity after traumatic brain injury. *Neurocrit Care* 2012; 16: 258-266. 2011/10/04. DOI: 10.1007/s12028-011-9630-8.
15. Dai X, Bragina O, Zhang T, et al. High Intracranial Pressure Induced Injury in the Healthy Rat Brain. *Crit Care Med* 2016; 44: e633-638. 2016/03/15. DOI: 10.1097/CCM.0000000000001625.
16. Bragin DE, Bush RC, Muller WS, et al. High intracranial pressure effects on cerebral cortical microvascular flow in rats. *J Neurotrauma* 2011; 28: 775-785. 2011/03/15. DOI: 10.1089/neu.2010.1692.
17. Bragin DE, Bush RC and Nemoto EM. Effect of cerebral perfusion pressure on cerebral cortical microvascular shunting at high intracranial pressure in rats. *Stroke* 2013; 44: 177-181. 2012/12/04. DOI: 10.1161/STROKEAHA.112.668293.
18. Bragin DE, Statom GL, Yonas H, et al. Critical cerebral perfusion pressure at high intracranial pressure measured by induced cerebrovascular and intracranial pressure reactivity. *Crit Care Med* 2014; 42: 2582-2590. 2014/10/08. DOI: 10.1097/CCM.0000000000000655.
19. Lafrenaye AD, McGinn MJ and Povlishock JT. Increased intracranial pressure after diffuse traumatic brain injury exacerbates neuronal somatic membrane poration but not axonal injury: evidence for primary intracranial pressure-induced neuronal perturbation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; 32: 1919-1932. 2012/07/12. DOI: 10.1038/jcbfm.2012.95.
20. Oka F, Sadeghian H, Yaseen MA, et al. Intracranial pressure spikes trigger spreading depolarizations. *Brain* 2022; 145: 194-207. 2021/07/11. DOI: 10.1093/brain/awab256.
21. Takasu A, Iwamoto S, Ando S, et al. Effects of various concentrations of inhaled oxygen on tissue dysoxia, oxidative stress, and survival in a rat hemorrhagic shock model. *Resuscitation* 2009; 80: 826-831. 2009/05/05. DOI: 10.1016/j.resuscitation.2009.03.018.
22. Ohtaki H, Dohi K, Yofu S, et al. Effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38 (PACAP38) on tissue oxygen content--treatment in central nervous system of mice. *Regul Pept* 2004; 123: 61-67. 2004/11/03. DOI: 10.1016/j.regpep.2004.05.013.
23. Wilson GS and Gifford R. Biosensors for real-time in vivo measurements. *Biosens Bioelectron* 2005; 20: 2388-2403. 2005/04/28. DOI: 10.1016/j.bios.2004.12.003.
24. Li B and Freeman RD. Neurometabolic coupling between neural activity, glucose, and lactate in activated visual cortex. *J Neurochem* 2015; 135: 742-754. 2015/05/02. DOI: 10.1111/jnc.13143.
25. Hu Y and Wilson GS. Rapid changes in local extracellular rat brain glucose observed with an in vivo glucose sensor. *J Neurochem* 1997; 68: 1745-1752. 1997/04/01. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1997.68041745.x.
26. Hu Y, Mitchell KM, Albahadily FN, et al. Direct measurement of glutamate release in the brain using a dual enzyme-based electrochemical sensor. *Brain Res* 1994; 659: 117-125. 1994/10/03. DOI: 10.1016/0006-8993(94)90870-2.

27. Dreier JP, Fabricius M, Ayata C, et al. Recording, analysis, and interpretation of spreading depolarizations in neurointensive care: Review and recommendations of the COSBID research group. *J Cereb Blood Flow Metab* 2017; 37: 1595-1625. 2016/06/19. DOI: 10.1177/0271678X16654496.
28. Chen SP, Ay I, Lopes de Moraes A, et al. Vagus nerve stimulation inhibits cortical spreading depression. *Pain* 2016; 157: 797-805. 2015/12/10. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000000437.
29. Bari F, Paprika D, Jancso G, et al. Capsaicin-sensitive mechanisms are involved in cortical spreading depression-associated cerebral blood flow changes in rats. *Neurosci Lett* 2000; 292: 17-20. 2000/09/21. DOI: 10.1016/s0304-3940(00)01424-5.
30. Shimizu K, Miller AW, Erdos B, et al. Role of endothelium in hyperemia during cortical spreading depression (CSD) in the rat. *Brain Res* 2002; 928: 40-49. 2002/02/15. DOI: 10.1016/s0006-8993(01)03352-2.
31. Gjedde A, Johannsen P, Cold GE, et al. Cerebral metabolic response to low blood flow: possible role of cytochrome oxidase inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25: 1183-1196. 2005/04/09. DOI: 10.1038/sj.jcbfm.9600113.
32. Piilgaard H and Lauritzen M. Persistent increase in oxygen consumption and impaired neurovascular coupling after spreading depression in rat neocortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009; 29: 1517-1527. 2009/06/11. DOI: 10.1038/jcbfm.2009.73.
33. Grocott HP, Bart RD, Sheng H, et al. Effects of a synthetic allosteric modifier of hemoglobin oxygen affinity on outcome from global cerebral ischemia in the rat. *Stroke* 1998; 29: 1650-1655. 1998/08/26. DOI: 10.1161/01.str.29.8.1650.
34. Baughman VL, Hoffman WE, Thomas C, et al. Comparison of methohexital and isoflurane on neurologic outcome and histopathology following incomplete ischemia in rats. *Anesthesiology* 1990; 72: 85-94. 1990/01/01. DOI: 10.1097/00000542-199001000-00016.
35. Ayata C. Spreading depression and neurovascular coupling. *Stroke* 2013; 44: S87-89. 2013/06/05. DOI: 10.1161/STROKEAHA.112.680264.
36. Dreier JP and Reiffurth C. The stroke-migraine depolarization continuum. *Neuron* 2015; 86: 902-922. 2015/05/23. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.04.004.
37. Sukhotinsky I, Dilekoz E, Moskowitz MA, et al. Hypoxia and hypotension transform the blood flow response to cortical spreading depression from hyperemia into hypoperfusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; 28: 1369-1376. 2008/05/01. DOI: 10.1038/jcbfm.2008.35.
38. Dreier JP, Major S, Manning A, et al. Cortical spreading ischaemia is a novel process involved in ischaemic damage in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Brain* 2009; 132: 1866-1881. 2009/05/08. DOI: 10.1093/brain/awp102.
39. Dreier JP, Korner K, Ebert N, et al. Nitric oxide scavenging by hemoglobin or nitric oxide synthase inhibition by N-nitro-L-arginine induces cortical spreading ischemia when K⁺ is increased in the subarachnoid space. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18: 978-990. 1998/09/18. DOI: 10.1097/00004647-199809000-00007.

40. Shin HK, Dunn AK, Jones PB, et al. Vasoconstrictive neurovascular coupling during focal ischemic depolarizations. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26: 1018-1030. 2005/12/13. DOI: 10.1038/sj.jcbfm.9600252.
41. Strong AJ, Anderson PJ, Watts HR, et al. Peri-infarct depolarizations lead to loss of perfusion in ischaemic gyrencephalic cerebral cortex. *Brain* 2007; 130: 995-1008. 2007/04/18. DOI: 10.1093/brain/awl392.
42. Hinzman JM, Andaluz N, Shutter LA, et al. Inverse neurovascular coupling to cortical spreading depolarizations in severe brain trauma. *Brain* 2014; 137: 2960-2972. 2014/08/27. DOI: 10.1093/brain/awu241.
43. Balint AR, Puskas T, Menyhart A, et al. Aging Impairs Cerebrovascular Reactivity at Preserved Resting Cerebral Arteriolar Tone and Vascular Density in the Laboratory Rat. *Front Aging Neurosci* 2019; 11: 301. 2019/11/30. DOI: 10.3389/fnagi.2019.00301.
44. Balanca B, Meiller A, Bezin L, et al. Altered hypermetabolic response to cortical spreading depolarizations after traumatic brain injury in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2017; 37: 1670-1686. 2016/07/01. DOI: 10.1177/0271678X16657571.
45. Fabricius M, Akgoren N and Lauritzen M. Arginine-nitric oxide pathway and cerebrovascular regulation in cortical spreading depression. *Am J Physiol* 1995; 269: H23-29. 1995/07/01. DOI: 10.1152/ajpheart.1995.269.1.H23.
46. Adachi K, Cruz NF, Sokoloff L, et al. Labeling of metabolic pools by [6-14C]glucose during K(+)-induced stimulation of glucose utilization in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; 15: 97-110. 1995/01/01. DOI: 10.1038/jcbfm.1995.11.
47. Chatard C, Sabac A, Moreno-Velasquez L, et al. Minimally Invasive Microelectrode Biosensors Based on Platinized Carbon Fibers for in Vivo Brain Monitoring. *ACS Cent Sci* 2018; 4: 1751-1760. 2019/01/17. DOI: 10.1021/acscentsci.8b00797.
48. Scheller D, Kolb J and Tegtmeier F. Lactate and pH change in close correlation in the extracellular space of the rat brain during cortical spreading depression. *Neurosci Lett* 1992; 135: 83-86. 1992/01/20. DOI: 10.1016/0304-3940(92)90141-s.
49. Rogers ML, Feuerstein D, Leong CL, et al. Continuous online microdialysis using microfluidic sensors: dynamic neurometabolic changes during spreading depolarization. *ACS Chem Neurosci* 2013; 4: 799-807. 2013/04/12. DOI: 10.1021/cn400047x.
50. Hopwood SE, Parkin MC, Bezzina EL, et al. Transient changes in cortical glucose and lactate levels associated with peri-infarct depolarisations, studied with rapid-sampling microdialysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25: 391-401. 2005/02/18. DOI: 10.1038/sj.jcbfm.9600050.
51. Selman WR, Lust WD, Pundik S, et al. Compromised metabolic recovery following spontaneous spreading depression in the penumbra. *Brain Res* 2004; 999: 167-174. 2004/02/05. DOI: 10.1016/j.brainres.2003.11.016.
52. Rogers ML, Leong CL, Gowers SA, et al. Simultaneous monitoring of potassium, glucose and lactate during spreading depolarization in the injured human brain - Proof of principle of a novel real-time neurochemical analysis system, continuous online

- microdialysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 2017; 37: 1883-1895. 2016/11/01. DOI: 10.1177/0271678X16674486.
53. Menyhart A, Zolei-Szenasi D, Puskas T, et al. Spreading depolarization remarkably exacerbates ischemia-induced tissue acidosis in the young and aged rat brain. *Sci Rep* 2017; 7: 1154. 2017/04/27. DOI: 10.1038/s41598-017-01284-4.
 54. Wyss MT, Jolivet R, Buck A, et al. In vivo evidence for lactate as a neuronal energy source. *J Neurosci* 2011; 31: 7477-7485. 2011/05/20. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0415-11.2011.
 55. Nedergaard M and Hansen AJ. Spreading depression is not associated with neuronal injury in the normal brain. *Brain Res* 1988; 449: 395-398. 1988/05/24. DOI: 10.1016/0006-8993(88)91062-1.
 56. Hartings JA, Shuttleworth CW, Kirov SA, et al. The continuum of spreading depolarizations in acute cortical lesion development: Examining Leao's legacy. *J Cereb Blood Flow Metab* 2017; 37: 1571-1594. 2016/06/23. DOI: 10.1177/0271678X16654495.
 57. von Bornstadt D, Houben T, Seidel JL, et al. Supply-demand mismatch transients in susceptible peri-infarct hot zones explain the origins of spreading injury depolarizations. *Neuron* 2015; 85: 1117-1131. 2015/03/06. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.02.007.
 58. Andrew RD, Hartings JA, Ayata C, et al. The Critical Role of Spreading Depolarizations in Early Brain Injury: Consensus and Contention. *Neurocrit Care* 2022; 37: 83-101. 2022/03/09. DOI: 10.1007/s12028-021-01431-w.
 59. Contant CF, Valadka AB, Gopinath SP, et al. Adult respiratory distress syndrome: a complication of induced hypertension after severe head injury. *J Neurosurg* 2001; 95: 560-568. 2001/10/13. DOI: 10.3171/jns.2001.95.4.0560.
 60. Robertson CS, Valadka AB, Hannay HJ, et al. Prevention of secondary ischemic insults after severe head injury. *Crit Care Med* 1999; 27: 2086-2095. 1999/11/05. DOI: 10.1097/00003246-199910000-00002.
 61. Donnelly J, Aries MJ and Czosnyka M. Further understanding of cerebral autoregulation at the bedside: possible implications for future therapy. *Expert Rev Neurother* 2015; 15: 169-185. 2015/01/24. DOI: 10.1586/14737175.2015.996552.
 62. Al-Kawaz M, Cho SM, Gottesman RF, et al. Impact of Cerebral Autoregulation Monitoring in Cerebrovascular Disease: A Systematic Review. *Neurocrit Care* 2022; 36: 1053-1070. 2022/04/06. DOI: 10.1007/s12028-022-01484-5.
 63. Svedung Wettervik T, Fahlstrom M, Enblad P, et al. Cerebral Pressure Autoregulation in Brain Injury and Disorders-A Review on Monitoring, Management, and Future Directions. *World Neurosurg* 2022; 158: 118-131. 2021/11/15. DOI: 10.1016/j.wneu.2021.11.027.
 64. Sugimoto K, Yang J, Fischer P, et al. Optogenetic Spreading Depolarizations Do Not Worsen Acute Ischemic Stroke Outcome. *Stroke* 2023; 54: 1110-1119. 2023/03/07. DOI: 10.1161/STROKEAHA.122.041351.

図 1



異なる ICP/CPP 条件下 (n=5/群) での、初回 SD (A) と 2 回目以降の SD (B) における rCBF の経時的変化。縦棒は、測定された rCBF の各 deflection points における振幅の標準偏差を反映している。横棒は、rCBF 変化開始からの時間経過において、hypoperfusion 時の first trough、hyperemia 時の peak、そして、oligemia 時の second trough における潜時の標準偏差を反映している。(A) ICP50/CPP30 群でのみ、SD 直前の安静時 rCBF がほぼ半分に低下していた。ICP 上昇により CPP 低下を来した群 (ICP30/CPP50 または ICP50/CPP30) では、最初の hypoperfusion が助長され、その後の hyperemic response が軽度となった。また、それぞれの deflection point における潜時が延長していた。CPP を生理的状态 (70 mmHg) に維持した場合、SD の血行動態反応は正常であった。(B) 初回 SD と同様に、ICP50/CPP30 群では、hyperemic response が軽度となり、hyperemia 時の peak や oligemia 時の second trough における潜時が延長していた。その他の群では、ICP30/CPP50 群を含めて、コントロール群と同様の血行動態反応を示した。

* コントロール群と比較して振幅に関して $p < 0.01$ の有意差を示した

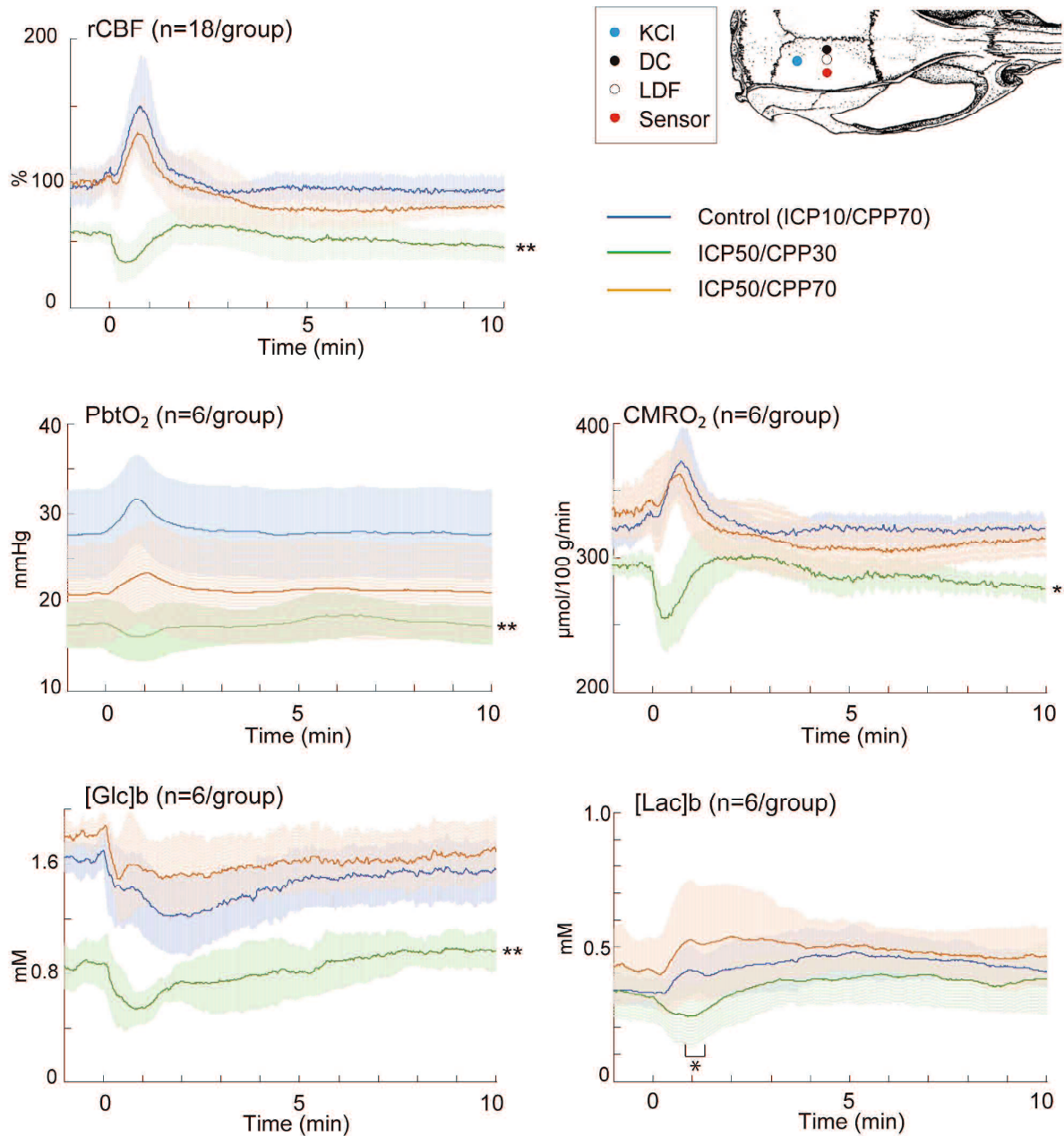
† コントロール群と比較して潜時に関して $p < 0.05$ の有意差を示した

†† コントロール群と比較して潜時に関して $p < 0.01$ の有意差を示した

全ての統計解析は一元配置分散分析に続いて Tukey 多重比較検定を用いた

CPP: cerebral perfusion pressure; ICP: intracranial pressure; rCBF: regional cerebral blood flow; SD: spreading depolarization

図 2



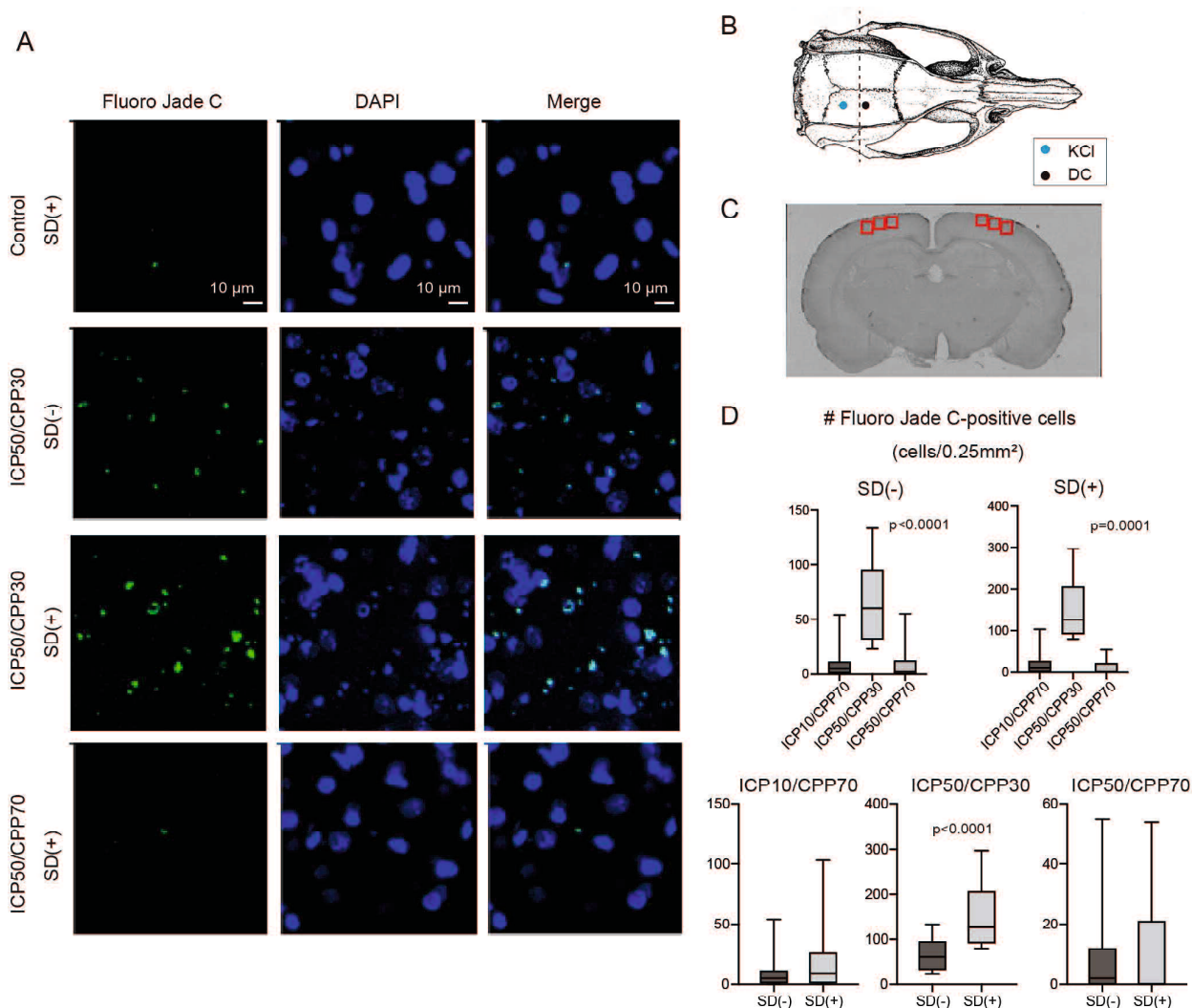
単回 SD 発生後 10 分間の rCBF、PbtO₂、CMRO₂、[Glc]b、[Lac]b の代謝変化。実験のセットアップを右上図に示している。後頭葉皮質（ブレグマから 3 mm 後方、3 mm 外側）（青丸）に 1M KCl を塗布することで SD を誘発した。ブレグマから 3 mm 後方、2 mm 外側（黒印）に DC 電位測定用の電極を挿入した。DC 電極近傍（白丸）に LDF プローブを設置した。DC 電極挿入部より 2 mm 外側（赤印）にセンサーを挿入した。単回 SD における rCBF (n=18/群)、PbtO₂ (n=6/群)、CMRO₂ (n=6/群)、[Glc]b (n=6/群)、そして、[Lac]b (n=6/群) の代謝変化に関する時間経過を平均値±標準偏差（誤差棒）で示した。ICP50/ CPP30 群では、rCBF、PbtO₂ 及び CMRO₂ において、基礎値の有意な低下と、SD 発生によって生じる一過性の減少が観察された。[Glc]b に関しては、ICP50/ CPP30 群で基礎値の有意な低下が見られた。[Glc]b に関しては、他の観察パラメータと異なり、SD 発生によって他の群と同様に一過性の低下が観察

された。[Lac]b に関しては、コントロール群とは対照的に、ICP50/ CPP30 群で SD 発生時に一時的な低下を認めた。一方で CPP を正常状態 (ICP50/ CPP70) に保った場合、SD に対する血行動態反応や代謝反応は正常パターンを示した。

* コントロール群と比較して $p < 0.05$ の有意差を示した。統計解析は繰り返しのある二元配置分散分析に続いて Tukey 多重比較検定を用いた

** コントロール群と比較して $p < 0.005$ の有意差を示した。統計解析は繰り返しのある二元配置分散分析に続いて Tukey 多重比較検定を用いた

CMRO₂: cerebral metabolic rate of oxygen; CPP: cerebral perfusion pressure; DC: direct current; [Glc]b: extracellular brain levels of glucose; ICP: intracranial pressure; [Lac]b: extracellular brain levels of lactate; LDF: laser Doppler flowmetry; PbtO₂: partial pressure of brain tissue oxygen; rCBF: regional cerebral blood flow; SD: spreading depolarization



変性神経細胞の定量評価。(A) Fluoro-Jade C 染色による代表的な画像。ICP50/CPP30 群では、SD 発生の有無に拘らず変性した神経細胞が存在するのに対して、CPP を正常に維持した場合は、変性した神経細胞がほとんど存在しないことを示している。

(B) 実験のセットアップ。後頭葉皮質（ブレグマから 3 mm 後方、3 mm 外側）（青丸）に 1M KCl を塗布することで SD を誘発した。KCl 塗布部の 3 mm 前方（黒印）に直流電位測定用の電極を挿入した。ブレグマから 3.5 mm 後方（破線）の冠状脳切片を 5 μ m 厚に切り出した。(C) 関心領域 (ROI) は正方形 (500 $\times$ 500 μ m) に設定した。各大脳皮質において 3 つの ROI を、大脳皮質から 500 μ m の深さで、正中から 2.5 mm、3.0 mm、そして 3.5 mm の位置に設けた。(D) コントロール群と比較して、ICP50/CPP30 群における皮質の Fluoro-Jade C 陽性細胞数は、非 SD 誘発側（左上パネル）及び SD 誘発側（右上パネル）双方で有意に増加していた（統計解析は Kruskal-Wallis 検定に続いて Dunn 多重比較検定を用いた）。非 SD 誘発側と比較して SD 誘発側で陽性細胞数の有意な上昇が見られたのは、ICP50/CPP30 群のみであった（中央下パネル）（統計解析は Wilcoxon 符号付順位和検定を用いた）。

CPP: cerebral perfusion pressure; ICP: intracranial pressure; SD; spreading depolarization; ROI: regions of interest

表 1. 生理学的パラメータ

	N	Mean arterial Pressure (mmHg)	Intracranial pressure (mmHg)	Cerebral perfusion pressure (mmHg)	pH	PaO ₂ (torr)	PaCO ₂ (torr)	Base Excess (mM/l)	Hemoglobin (g/dl)	Glucose (mg/dl)
ICP 10/ CPP 70	28	82.8 ± 4.7	10.2 ± 1.7	72.5 ± 4.1	7.42 ± 0.02	126 ± 10	39 ± 1	0.5 ± 0.5	11.2 ± 1.8	246.0 ± 41.5
ICP 30/ CPP 50	5	80.4 ± 1.7	30.1 ± 0.7**	50.3 ± 1.4*	7.40 ± 0.01	134 ± 16	38 ± 1	-0.6 ± 0.8	10.5 ± 1.0	261.0 ± 33.7
ICP 50/ CPP 30	29	79.1 ± 2.0	49.8 ± 0.9**	29.3 ± 1.5*	7.41 ± 0.01	116 ± 12	38 ± 2	-0.6 ± 0.8	12.1 ± 0.3	281.2 ± 53.5
ICP 30/ CPP 70	5	102.9 ± 5.7*	30.8 ± 1.8**	72.2 ± 4.1	7.41 ± 0.01	132 ± 22	38 ± 1	-1.0 ± 1.5	12.1 ± 1.4	304.6 ± 33.3
ICP 50/ CPP 70	28	119.8 ± 4.7*	50.6 ± 1.3**	69.1 ± 4.3	7.41 ± 0.01	119 ± 10	38 ± 2	-0.5 ± 1.0	13.1 ± 1.4	301.0 ± 40.0

* 他の群と比較して $p < 0.0001$ の有意差を示した

** 他の ICP 群と比較して $p < 0.001$ の有意差を示した

統計解析は一元配置分散分析に続いて Tukey 多重比較検定を用いた

表 2. 実験 1 における spreading depolarization の電気生理学的特性

	N	Total # of SDs	Duration (sec)	Speed (mm/min)	Amplitude (mV)	Frequency (/h)
ICP 10/ CPP 70	5	35	17.3 ± 0.8	2.7 ± 0.2	36.0 ± 5.0	7.0 ± 2.5
ICP 30/ CPP 50	5	28	20.3 ± 0.9	2.7 ± 0.2	31.1 ± 8.9	5.6 ± 1.1
ICP 50/ CPP 30	5	26	38.7 ± 9.9*	2.5 ± 0.4	35.7 ± 7.1	5.2 ± 1.3
ICP 30/ CPP 70	5	35	16.6 ± 1.1	2.8 ± 0.3	35.9 ± 8.7	7.0 ± 1.7
ICP 50/ CPP 70	5	35	21.3 ± 2.1	2.6 ± 0.2	40.9 ± 6.2	7.0 ± 0.7

* 他の群と比較して $p < 0.0001$ の有意差を示した

統計解析は一元配置分散分析に続いて Tukey 多重比較検定を用いた

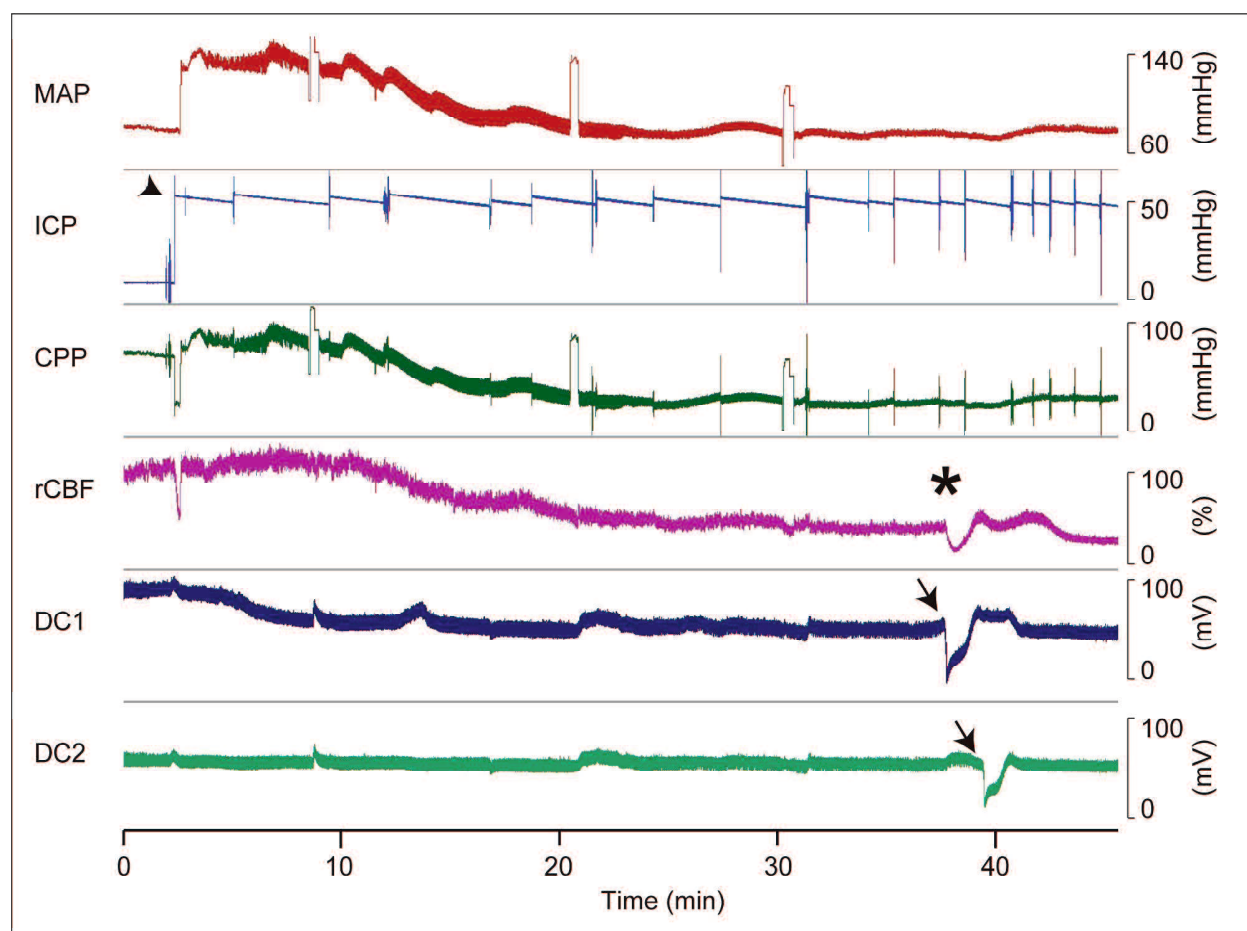
表 3. 実験 3 における spreading depolarization の電気生理学的特性

	N	Total # of SDs	Duration (sec)	Cumulative duration (sec)	Amplitude (mV)
ICP 10/ CPP 70	5	28	16.5 ± 3.5	92.4 ± 3.5	36.4 ± 18.1
ICP 50/ CPP 30	5	24	37.2 ± 11.9*	178.6 ± 23.5*	35.9 ± 9.4
ICP 50/ CPP 70	5	27	19.4 ± 6.7	108.8 ± 22.8	39.0 ± 8.4

* 他の群と比較して $p < 0.001$ の有意差を示した

統計解析は一元配置分散分析に続いて Tukey 多重比較検定を用いた

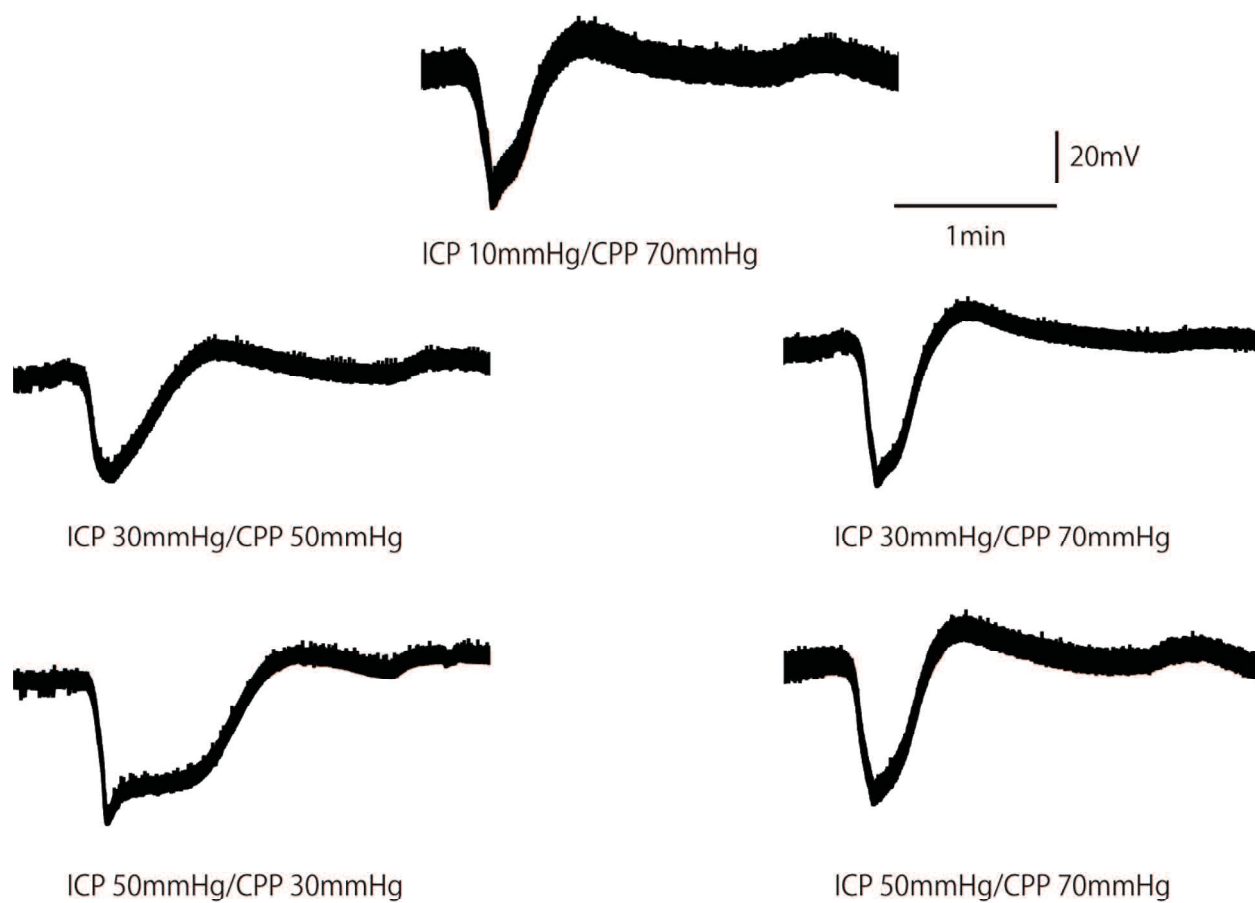
補足図 1



実験における MAP、ICP、CPP、rCBF、そして、DC 電位の典型的な記録。ICP が 50 mmHg まで上昇し（矢頭）、その後クッシング現象により MAP が上昇した。脱血して MAP を低下させ、CPP を調整した。ICP と CPP を 15 分間維持した後、SD を誘発した（矢印）。このラットでは SD の血行動態反応として spreading ischemia（*）が確認された。

CPP: cerebral perfusion pressure; DC: direct current; ICP: intracranial pressure; MAP: mean arterial pressure; rCBF: regional cerebral blood flow; SD: spreading depolarization

補足図 2



SD の代表的な DC 電位図。ICP 上昇により CPP が低下すると SD 持続時間が延長した（左列）。一方、ICP 上昇（30 mmHg または 50 mmHg）に拘らず、CPP を正常（70 mmHg）に維持すると、持続時間は正常であった。

CPP: cerebral perfusion pressure; DC: direct current; ICP: intracranial pressure; SD: spreading depolarization

補足表 1. 実験 2 における spreading depolarization の電気生理学的特性

	N	Total # of SD	Duration (sec)	Amplitude (mV)
ICP 10/ CPP 70	18	18	18.8 ± 2.5	39.1 ± 7.7
ICP 50/ CPP 30	18	18	41.6 ± 6.8*	38.9 ± 7.5
ICP 50/ CPP 70	18	18	20.6 ± 3.4	40.0 ± 7.5

* 他の群と比較して $p < 0.001$ の有意差を示した

統計解析は一元配置分散分析に続いて Tukey 多重比較検定を用いた