

原 著

クモ膜下出血後のイヌ脳動脈神経ペプチドの変化
—脳血管攣縮との関連について—

京都大学医学部脳神経外科学教室（指導：菊池晴彦教授）

上 村 喜 彦

〔原稿受付：昭和62年8月7日〕

Changes of Neuropeptides in Cerebrovascular Nerve
Fibers after Experimental Subarachnoid Hemorrhage
in the Dog. with Special Reference
to Cerebral Vasospasm

YOSHIHIKO UEMURA

Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director: Prof. Dr. HARUHIKO KIKUCHI)

Abstract

Changes of vasoactive intestinal polypeptide (VIP), substance P (SP) and neuropeptide Y (NPY) in cerebrovascular nerve fibers were immunohistochemically examined in the dog after experimentally produced subarachnoid hemorrhage (SAH).

SAH was produced by a single injection of fresh autologous arterial blood (1 ml/kg body weight) into the cisterna magna. The dogs were allowed to survive for 1-63 days after SAH.

Cerebral angiography was performed consecutively during the pre- and post-SAH periods. Constriction of basilar artery was evident during 3-7 days after SAH, followed by relaxation over 2 weeks thereafter.

The density of immunoreactive perivascular nerve fibers in the large pial arteries was estimated by averaging numbers of immunoreactive nerve fibers per unit area. The density of VIP-, SP- and NPY-immunoreactive fibers was decreased to 5-40% of the normal value

Key words: Subarachnoid hemorrhage, Vasoactive intestinal polypeptide, Substance P, Neuropeptide Y, Dog cerebral artery.

索引語：クモ膜下出血，バソアクティブ インテスティナル ポリペプチド，サブスタンス P，ニューロペプチド Y，イヌ脳動脈。

Present address: Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, Kyoto 606, Japan.

immediately after SAH. The density of VIP- and SP-immunoreactive perivascular nerve fibers started to be re-increased 2 or 3 weeks after SAH and reached the normal values on the 63rd day after SAH. On the other hand, the density of NPY-immunoreactive perivascular nerve fibers was not recovered even on the 63rd day after SAH.

Immunoelectron microscope study revealed that VIP-, SP- and NPY-immunoreactive material disappeared from axon terminals of perivascular nerve fibers during the 1st week after SAH. Two weeks after SAH, VIP- and SP-immunoreactive material reappeared in axon terminals of perivascular nerve fibers, but no NPY-immunoreactive material was found. The results suggest that the two vasodilatory peptides, VIP and SP, are possibly involved in dynamic processes of cerebral vasospasm during post-SAH period.

結 言

クモ膜下出血 (SAH) 後のいわゆる脳血管攣縮は脳虚血を引き起こし、患者の予後を左右する重大な合併症の一つである。これまでにその成因をめぐる数多くの研究がなされてきたが、未だ明らかにされていない^{8,24,27,62)}。脳血管攣縮の原因として、1)クモ膜下腔の血腫に由来する血管収縮性物質^{3,45,46,63)}、2)脳動脈自体の形態学的変化^{40,54,55)} および機能的変化^{37,42,53,56)}、3)脳動脈を支配するニューロンの神経伝達物質、とくにノルアドレナリン (NA) の関与^{37,47,53,57)} などが報告されている。

従来、脳動脈にはノルアドレナリン (NA) を伝達物質とする adrenergic nerve とアセチルコリン (Ach) を伝達物質とする cholinergic nerve の支配があり、前者が収縮性、後者が拡張性に働いて脳動脈の緊張度 (tonus) を変化させ、脳血流量の調節に重要な役割を演じていると考えられてきた^{25,26,43)}。しかし、近年、免疫組織化学法により脳動脈には多くの脈管作動物質が存在することがわかった^{7,11,29)}。また、それらの物質の薬理学的性質の分析などによって、脳血管の神経性調節について多くの新発見が報告されている^{9,48)}。なかでも、neuropeptide Y (NPY) は NA 作動性ニューロン内で NA と共存しており、しかも NA よりも強力で、持続的な血管収縮作用を有することが知られている^{10,11,50)}。一方、vasoactive intestinal polypeptide (VIP) は脳動脈に対して強力な拡張作用を有し、Ach 作動性ニューロン内にも存在することが知られている^{21,29,38)}。脳動脈においては、Ach の拡張性神経伝達物質としての意味を否定する説もあり^{30,31)}、この場合には VIP が拡張性伝達物質の有力な候補として注目

されている^{5,32)}。また、substance P (SP) は三叉神経節由来の感覚神経線維内にあり、しかも血管拡張性を有し、VIP と並んで拡張性伝達物質として興味をもたれている^{7,12,41)}。本研究では、脳動脈壁に存在して血管の収縮・拡張に重要な働きを有すると考えられる三つの神経ペプチド (VIP, SP, NPY) をとりあげ、クモ膜下出血後の動態を免疫組織化学的に検索し、とくに脳血管攣縮との関連について検討を加えた。

実験材料および実験方法

実験には体重 4-8 kg の雑種犬36頭を用いた。ペントバルビタール (35 mg/kg) の腹腔内投与によって麻酔し、気管内挿管によって、調節呼吸を行なった。ついで大腿動脈より採取した自家血 (1 ml/kg 体重) を大槽内に経皮的に注入し、頭部を30分間低位に保持することによって実験的クモ膜下出血 (SAH) を作成した。SAH 犬は SAH 作成後 1, 3, 7, 14, 21, 42, 63日 にそれぞれ灌流固定した。sham 手術犬は SAH 犬作成と同様の方法を用いて、自家血の代わりに生理食塩水 (1 ml/kg 体重) を注入することにより作成し、7日後に灌流固定した。正常犬 (6頭) は無処置のまま灌流固定した。正常犬, SAH 犬, sham 手術犬はすべて過量のペントバルビタールにて麻酔後、左心室より生理食塩水 (1 liter) に続いて Zamboni 固定液 (1% ピクリン酸, 2% パラホルムアルデヒド含有リン酸緩衝液 pH 7.3: 1 liter/kg 体重) を灌流し固定した。固定後、脳動脈と、翼口蓋神経節、三叉神経節、上頸神経節を取りだし、0.9%生理食塩水含有 0.1 M リン酸緩衝液 (PBS: pH 7.3) 中にて充分洗浄し遊離固定液を除去した。脳動脈は脳底動脈 (BA) と中大動脈近位部 (M₁) (Fig. 1) をそれぞれ三等分した。これらの脳血管

片について、2% non-immune ヤギ血清含有 PBS で immuno-blocking を行なった後、1500倍希釈ウサギ抗-VIP 血清 (Immunonuclear), 6000 倍希釈ウサギ抗-SP 血清²³⁾, 3000倍希釈ウサギ抗-NPY 血清 (Amersham) と 4°C にて24時間 incubate した。次にビオチン化ヤギ抗-ウサギ IgG 抗体 (Vector) と、アビジン-ビオチン化過酸化酵素複合体 (Avidin-Biotinylated Peroxidase Complex, Vector) と、それぞれ24時間室温にて incubate した。その後、免疫標識された過酸化酵素を発色させるため、血管片を0.015%, ジアミノベンチジン含有 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) 中に浸漬し、さらに基質として H₂O₂ 0.002% を加え、5-10分間室温で反応した。また、神経節については20% ショ糖を含む PBS 中に飽和した後、50 μ m の厚さの凍結切片とし、脳動脈と同様に免疫染色を行なった。電子顕微鏡観察の試料として免疫染色後の脳動脈を1-2 mm の block にしてオスミウム酸で後固定した後、2.0% 酢酸ウランにより block stain し、エチルアルコールによる脱水後、エポン812に包埋した。超薄切片

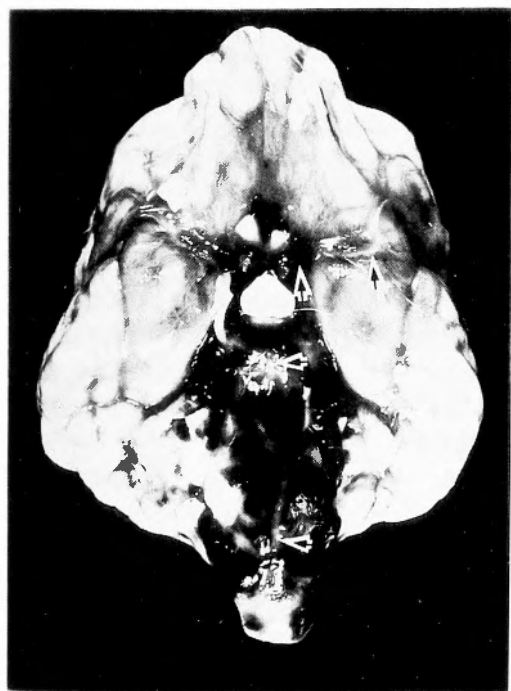


Fig. 1. Ventral aspect of a dog brain 1 day after injection of fresh autologous arterial blood into the cisterna magna. Arrows indicate the portions of the large pial arteries that were immunohistochemically examined.

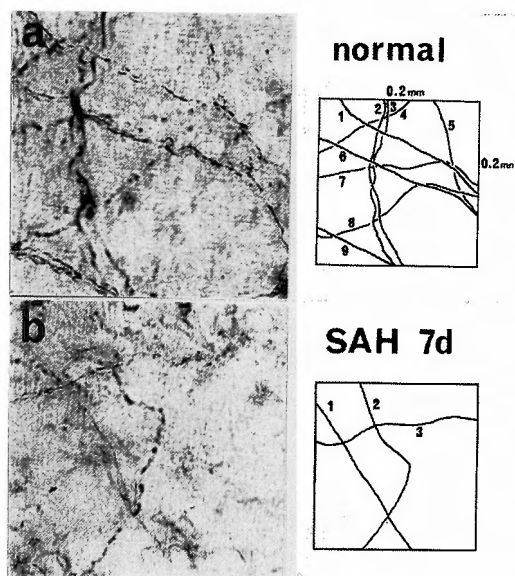


Fig. 2. Photomicrographs of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-immunoreactive perivascular nerve fibers in unit areas of the proximal portion of the middle cerebral artery (M₁) in a normal dog (a) and in an operated dog on the 7th day after subarachnoid hemorrhage (SAH) (b). Whole-mounts preparations, $\times 180$. The corresponding schematic orientation of nine (a) and three (b) immunoreactive nerve fibers counted in the unit area is shown to the right of each photograph.

はクエン酸鉛で電子染色した。

VIP, SP ないし NPY の希釈抗血清をそれぞれ 50 μ g/ml の VIP (Protein Research Foundation), SP (Protein Research Foundation) ないし NPY (Sigma) で吸収したところ、脳動脈や神経節の免疫活性は消失した。また免疫染色の過程において、各抗血清を省略した場合には、免疫活性が組織から消失することを確認した。

脳動脈 (BA, M₁) における免疫活性陽性線維の密度は、Fig. 2 で示すように、一辺が 0.2 mm の unit area に存在する陽性線維の本数で表わした。すなわち、一つの血管の segment あたり 5つの unit area を任意に選び、その密度の加算平均を平均密度とした。正常, SAH, sham 手術各群における線維密度の有意差検定は Student's t-test により行なった。

SAH 犬 (4頭), sham 手術犬 (2頭) について、術前1時間前、術後3, 7, 14, 21日に、椎骨動脈撮影を実施した。

結 果

自家血を注入したイヌにおいて、クモ膜下血腫は術後1, 3, 7日目には脳底部に認められたが (Fig. 1)、術後14日目では認められなくなった。血管撮影上、脳底動脈の狭小化は SAH 3日後と7日後にみられ (Fig. 3b, c), 14日, 21日後には認められなかった (Fig. 3d)。また sham 手術犬では脳底動脈の狭小化はみられなかった。

1) 正常犬

脳動脈において VIP, SP, および NPY の免疫陽性神経線維は varicose fiber の形態を示し、密に分布した (Fig. 4a, 5a, 6a)。

VIP, SP, および NPY の免疫活性陽性物質は、電子顕微鏡による観察で、脳動脈の外膜内の軸索やその終末内に存在することが認められた。また、これらの陽性物質はときには中膜筋細胞に近接する軸索終末内にもみられた (Fig. 7a)。

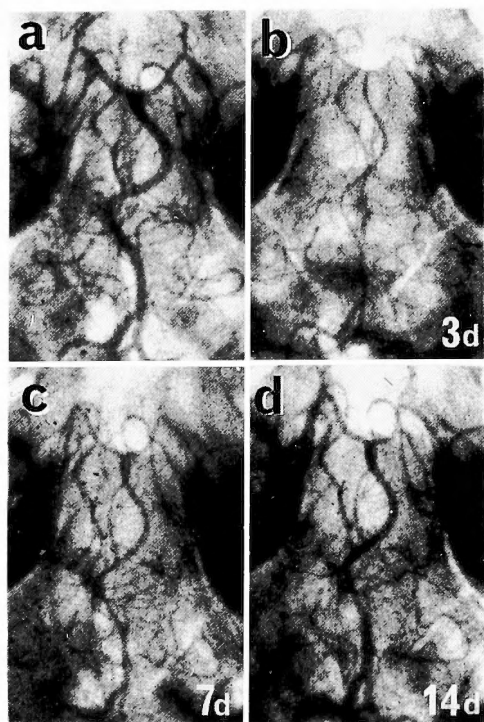


Fig. 3. Vertebral angiograms taken from a dog, before the injection of fresh autologous arterial blood into the cisterna magna (a), on the 3rd day (b), on the 7th day (c) and on the 14th day after SAH (d).

VIP および NPY の陽性神経線維の密度は BA より M_1 の方が高く、VIP 陽性線維は M_1 で $7.7 \pm 0.48 / 0.04 \text{ mm}^2$ (mean $\pm$ SEM), BA で $3.8 \pm 0.30 / 0.04 \text{ mm}^2$, NPY 陽性線維は M_1 で $7.8 \pm 0.1 / 0.04 \text{ mm}^2$, BA で $6.6 \pm 0.27 / 0.04 \text{ mm}^2$ であった。一方、SP 陽性神経線維の密度は低く、 M_1 で $3.2 \pm 0.1 / 0.04 \text{ mm}^2$, BA で $4.1 \pm 0.22 / 0.04 \text{ mm}^2$ であった (Table 1)。

翼口蓋神経節には VIP 陽性細胞、三叉神経節には SP 陽性細胞、上頸神経節には NPY 陽性細胞が多数みられた (Fig. 8a, b, c)。

2) sham 手術群

脳動脈における VIP, SP, および NPY 陽性神経線維と、神経節における VIP, SP, および NPY 陽性細胞を正常犬のそれと比べた場合、その密度や免疫活性について差異はなかった (Table 1) (Fig. 9a, b, c)。

3) SAH 群

SAH 後1週以内の脳動脈の VIP, SP, および NPY 免疫活性陽性神経線維は BA, M_1 で減少傾向を示した。とくに、VIP 陽性神経線維は SAH 後1週以内に著明に減少し (Fig. 4b), その線維密度は正常の5-40%の値を示した (Fig. 9a)。SP 陽性神経線維の密度は正常の20-60%に減少し (Fig. 5b, 9b), NPY 陽性神経線維の密度は正常の20-40%に低下した (Fig. 6b, 9c)。電子顕微鏡による観察でも VIP, SP, および NPY 陽性軸索終末の著しい減少が確認できた (Fig. 7b)。しかし、SAH 2週以後では VIP および SP 陽性線維は増加し始め (Fig. 4c, d, Fig. 5c, d), その線維密度は SAH 63日後にはほぼ正常と同じレベルに回復した (Fig. 9a, b, Table 1)。SAH 2週以後における VIP 陽性軸索終末の増加傾向は電子顕微鏡観察によっても確認できた (Fig. 7c)。一方、NPY 陽性神経線維は SAH 63日後でも減少したままであり (Fig. 6c, d), その線維密度は正常の約40%であった (Fig. 9c)。

翼口蓋神経節の VIP 陽性細胞、三叉神経節の SP 陽性細胞、上頸神経節の NPY 陽性細胞については、SAH 後もその数や免疫活性にとくに変化がなかった。

考 察

1) 脳動脈に分布する VIP, SP, および NPY 含有神経線維

脳動脈周囲に VIP, SP, および NPY を含む神経線維が豊富に存在することはすでに明らかにされている。本研究では、イヌについて、VIP 含有神経線維が Willis 輪後半より前半部で多く分布すること、また、

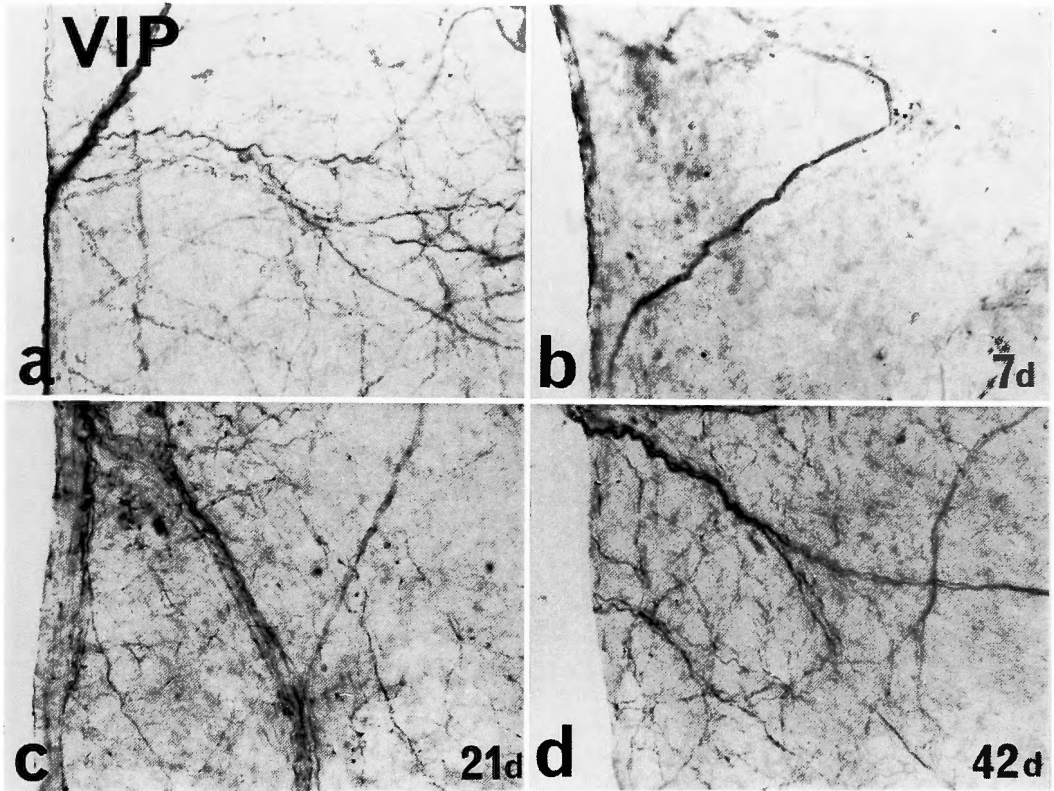


Fig. 4. Photomicrographs of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-immunostained middle cerebral arteries taken from a normal dog (a) and from SAH dogs that were allowed to survive for 7 days (b), 21 days (c) and 42 days after SAH (d). Whole-mounts preparations, $\times 100$.

Table 1. Number of immunoreactive perivascular nerve fibers in one unit area of the M_1 segment and of the BA

Animal group	VIP-immunoreactive		SP-immunoreactive		NPY-immunoreactive	
	M_1 Segment	BA	M_1 Segment	BA	M_1 Segment	BA
normal dogs	7.7 ± 0.48	3.8 ± 0.30	3.2 ± 0.10	4.1 ± 0.22	7.8 ± 0.10	6.6 ± 0.27
sham operated dogs						
Day 7	7.1 ± 0.41	4.0 ± 0.30	2.6 ± 0.15	3.3 ± 0.22	7.6 ± 0.24	6.3 ± 0.24
dogs with SAH						
Day 1	$3.0 \pm 0.36^+$	$1.3 \pm 0.29^+$	$1.3 \pm 0.20^+$	$1.0 \pm 0.20^+$	$2.4 \pm 0.62^+$	$2.1 \pm 1.50^+$
Day 3	$2.1 \pm 0.41^+$	$1.3 \pm 0.32^+$	$1.3 \pm 0.21^+$	$1.8 \pm 0.27^+$	$2.2 \pm 0.40^+$	$1.6 \pm 0.36^+$
Day 7	$2.5 \pm 0.29^{+*}$	$0.6 \pm 0.12^{+*}$	$1.8 \pm 0.31^{+!}$	$1.8 \pm 0.30^{+*}$	$2.8 \pm 0.44^{+*}$	$1.9 \pm 0.37^{+*}$
Day 14	$4.5 \pm 0.26^+$	$1.6 \pm 0.46^+$	$1.4 \pm 0.20^+$	$2.6 \pm 0.35^\#$	$1.8 \pm 0.24^+$	$2.1 \pm 0.30^+$
Day 21	$3.8 \pm 0.18^+$	$2.4 \pm 0.20^+$	$1.6 \pm 0.27^+$	$2.3 \pm 0.22^+$	$1.6 \pm 0.14^+$	$2.5 \pm 0.15^+$
Day 42	$5.3 \pm 0.20^+$	$2.9 \pm 0.18^\#$	$1.7 \pm 0.18^+$	$2.2 \pm 0.14^+$	$4.4 \pm 0.41^+$	$3.5 \pm 0.25^+$
Day 63	6.9 ± 0.24	4.3 ± 0.29	3.3 ± 0.41	4.2 ± 0.27	$3.2 \pm 0.24^+$	$2.2 \pm 0.33^+$

Values are means $\pm$ standard error of the means for 15 unit areas, each 0.2×0.2 sq mm in size.

VIP=vasoactive intestinal polypeptide; SP=substance P; NPY=neuropeptide Y, M_1 =proximal portion of the middle cerebral artery; BA=basilar artery; SAH=subarachnoid hemorrhage.

Significance of difference in data is presented for the normal dogs compared to the dogs undergoing SAH or sham operation ($^+=p<0.01$; $^\# = p<0.02$), and for the sham operated dogs versus the SAH dogs on the 7th day after the operation ($^{+*}=p<0.01$; $^{+!}=p<0.02$).

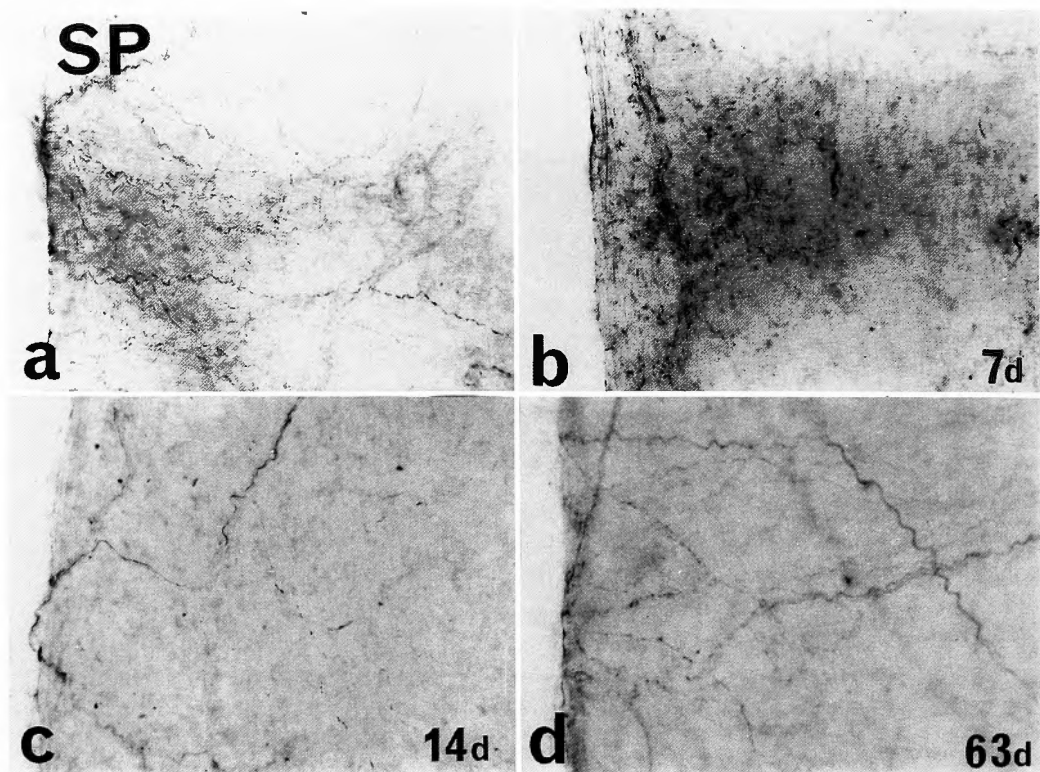


Fig. 5. Photomicrographs of substance P(SP)-immunostained middle cerebral arteries taken from a normal dog (a) and from SAH dogs that were allowed to survive for 7 days (b), 14 days (c) and 63 days (d) after SAH (d). Whole-mounts preparations, $\times 100$.

NPY 含有神経線維も同様の傾向を示すことが明らかになった。これらの所見は VIP 神経線維の分布に関するラット^{21,38)}, ネコ¹⁸⁾, ヒト¹³⁾ における所見, また, NPY 神経線維のヒト^{2,13)} についての所見とよく類似する。イヌの SP 含有神経線維は Willis 輪の前半部にも後半部にも分布していたが, この所見はラット⁶⁴⁾, ネコ⁴⁴⁾, ヒト¹³⁾ のそれと大差がない。

電子顕微鏡観察では, VIP, SP, および NPY を含む軸索や軸索終末が, ラット³⁹⁾ やネコ³³⁾ と同様, 脳動脈の外膜内に豊富に存在すること, また, このような軸索終末がときには中膜筋細胞に近接して存在することがわかった。神経刺激によって, これらの軸索終末内の神経ペプチドが放出されて脳動脈の緊張維持に影響を及ぼすことが推察される³⁾。

脳動脈に分布する神経ペプチド含有神経線維の起始について, VIP 神経線維は主として翼口蓋神経節に由来し, SP 神経線維は三叉神経節に由来し, NPY 神経線維は上頸神経節に由来することか, 神経節の摘出

実験や順行性ないし逆行性の軸索流を利用する標識法によって確かめられている^{4,10,21,28,34,41,50,60)}。

2) クモ膜下出血後に脳動脈の神経線維にみられた VIP, SP, NPY 免疫活性の変化

SAH 後 1 週以内では, 脳動脈周囲神経線維のそれぞれ VIP, SP, NPY に対する免疫活性は著明に低下した。sham 手術群(1 週間目)では変化がみられなかったことから, この低下はクモ膜下腔内の血液あるいは血腫によっておこったものと考えられる。

以下, SAH 後に脳動脈に分布する神経線維のペプチド免疫活性の低下をきたした要因を検討する。本実験結果から次の三点が指摘できる。(1)ペプチド含有神経線維の起始と考えられる神経節において細胞数や免疫活性に変化がなかった。(2)軸索輸送の停滞を示す例えば local damming のような形態変化が脳動脈壁の神経線維にみられなかった。(3)免疫陽性軸索終末が実際に減少していることが電子顕微鏡によって確認できた。これらの点からみて, SAH 後の急性期に神

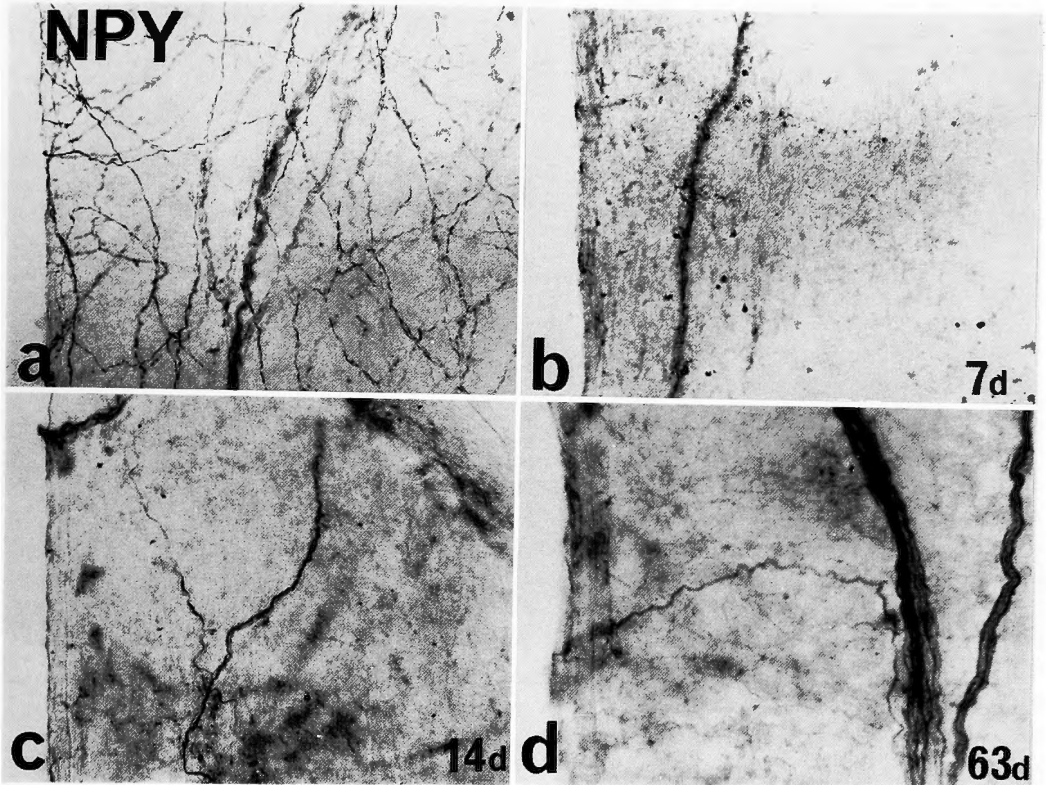


Fig. 6. Photomicrographs of neuropeptide Y (NPY)-immunostained middle cerebral arteries taken from a normal dog (a) and from SAH dogs that were allowed to survive for 7 days (b), 14 days (c) and 63 days (d) after SAH (d). Whole-mounts preparations, $\times 100$.

経ペプチドが軸索終末から異常に放出された結果、涸渇したのであろうと考えざるを得ない。しかし、SAH によってどのようなメカニズムで軸索終末からペプチドが異常放出されるのかは明らかでない。これについては、(1) SAH 後におこるクモ膜下腔のイオン環境の変化⁵²⁾、(2) 血液ないし血液から遊離する oxyhemoglobin の神経機能（神経活性物質の合成分解や re-uptake）に対する直接作用^{35,37,53)} などがこれまでに報告されている。SAH 2週以後では VIP, SP に対する免疫活性は回復したが、NPY に対する免疫活性は SAH 後63日目においても低下したままであった。一方、血管撮影では、脳底動脈の狭小化（脳血管攣縮）が SAH 3日後から7日後までみられ14日以降ではみられなかったが、これは SAH 後に脳動脈でみられた VIP 免疫活性や SP 免疫活性の消長とよく対応していた。このように、イヌの SAH モデルで確認できた脳血管攣縮の time course が、脳動脈神経ペプチド (VIP, SP, NPY) のうち、血管拡張性ペプタ

イド (VIP, SP) の変動と相関したことは注目に値する。

3) 脳血管攣縮に関わる神経性因子について

SAH 後の合併症としての脳血管攣縮は、(1) SAH 3-4日後から出現し (delayed)、(2) 数日間から数週間持続し (prolonged)、(3) その後回復し得る (reversible)、という特徴的な病像を呈する^{49,61)}。SAH 後におこる脳血管攣縮の原因は明らかでないが、少なくともクモ膜下腔に血液ないし血腫が存在することが脳血管攣縮の必要条件であることは確かである。CT scan を用いた研究によってクモ膜下血腫量と脳血管攣縮の発生頻度との間に相関のあることが示されている^{15,49)}。また、クモ膜下腔の血液に由来する血管収縮性物質の探究が行われており、溶血赤血球とくに oxyhemoglobin が脳血管攣縮発生の trigger として重要視されている^{19,20,45,46)}。一方、クモ膜下腔の血液に被われた脳動脈自体にも種々の形態学的変化^{40,54,55)} や、機能的変化^{6,36,37,42,53,56)} がみられるため、一般に、最近の見解

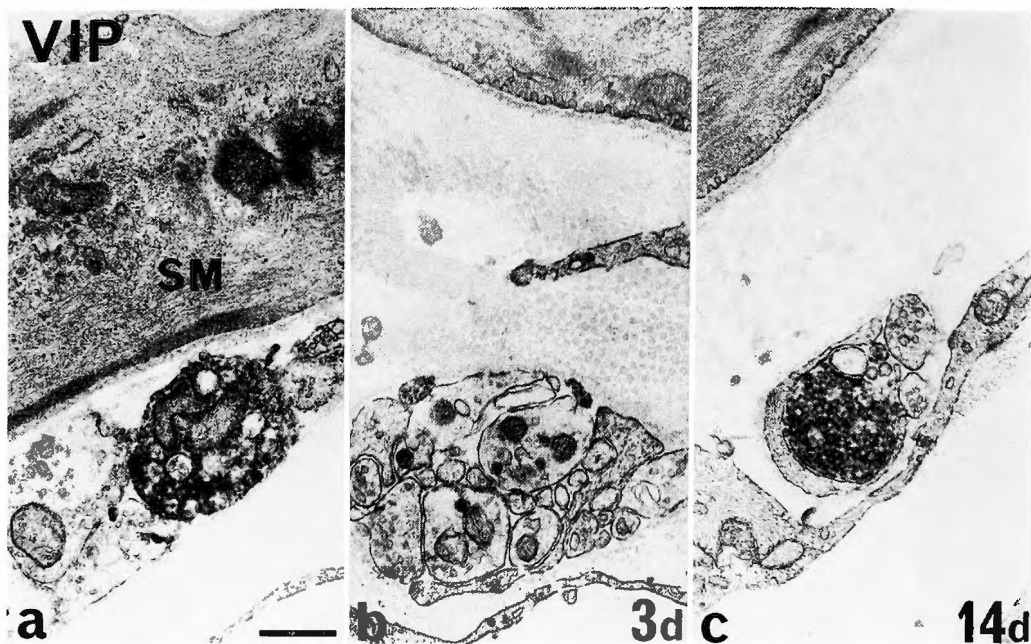


Fig. 7. Immunoelectron micrographs, showing vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-immunoreactive terminals in the basilar arteries taken from a normal dog (a) and from SAH dogs that were allowed to survive for 3 days (b) and 14 days after SAH (c). SM: smooth muscle cell. Bar=0.5 μ m.

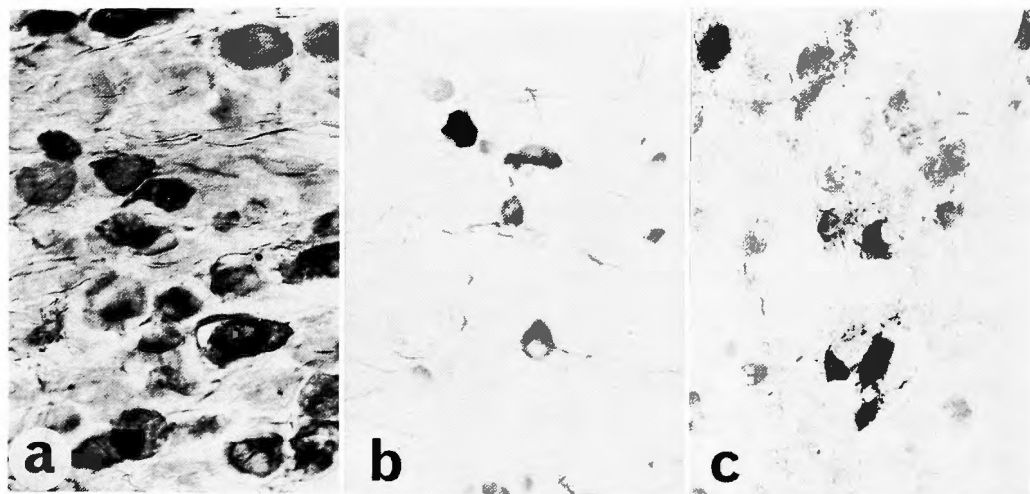


Fig. 8. Photomicrographs of sections through the sphenopalatine (a), trigeminal (b), and superior cervical ganglia (c) in normal dogs. The sections were immunostained respectively for vasoactive intestinal polypeptide (a, $\times 200$), substance P (b, $\times 125$), and neuropeptide Y (c, $\times 125$).

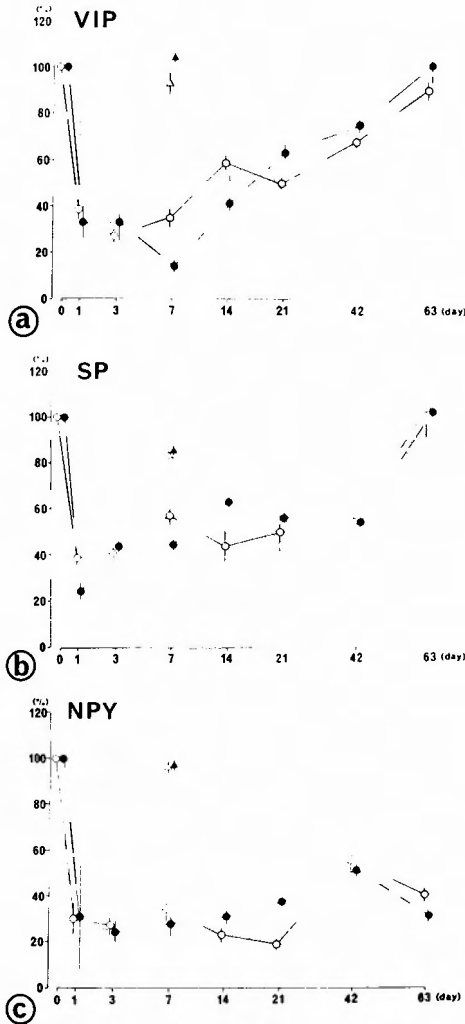


Fig. 9. Changes of the mean density of vasoactive intestinal polypeptide (VIP, a), substance P (SP, b) and neuropeptide Y (NPY, c) immunoreactive perivascular nerve fibers in the proximal portion of the middle cerebral artery (M₁, open circles) and the basilar artery (BA, filled circles) after SAH. The mean density of the immunoreactive fibers in the sham-operated dogs is also shown for the M₁ segment (open triangles) and for the BA (filled triangles). The vertical bars indicate 2 standard errors.

では、複数個の因子が脳血管攣縮の発生・維持に関与していると考えられている^{27,62)}

神経性因子を重視する考え方としては以下のようなものがある。まず、ノルアドレナリン (NA) の関与を

指摘したものである。すなわち、NA を大槽内に注入すると脳動脈が収縮し、その結果ヒトの脳血管攣縮での剖検例でよくみられる myonecrosis が起こることが組織学的に観察されている^{1,14,55,65)}。また、SAH 後の脳動脈でカテコールアミン蛍光線維が消失することから NA に対する denervation supersensitivity が脳血管攣縮の発生に関与するとする説^{36,37,53,57)} がある。前者については、確かに臨床的に SAH 後 NA は髄液中で高値を示すが、脳動脈を収縮させるほどの値には達しない⁵¹⁾。それ故、実験結果をそのままヒトにあてはめることはできない。後者については、SAH 後カテコールアミン蛍光が消失することは Peerless⁴⁷⁾ 以来報告されている^{53,66)}。しかし、この変化は SAH 後4-8 週まで正常化しない^{47,66)}とされており、本研究で示された NPY 含有線維の免疫活性が SAH 63日後でも正常の50%以下であったことと同様に、SAH 後の血管狭小化の time course とは合致しない。また、SAH 後の脳動脈は NA やセロトニン (5-HT) に対する反応性が亢進するため、上頸神経節の摘除後にみられる denervation supersensitivity と同様の機序が脳血管攣縮に関与するという説^{36,37,53,57)} がある。しかし、SAH 後の脳動脈では収縮性物質である NA, 5-HT, PGF₂ α , PGE₂, hemolysate などに対する反応性はむしろ低下するという報告も多く^{6,20,56)}、denervation supersensitivity の関与については現在のところ仮説の域を出ていない。一方、脳動脈における拡張性神経の SAH 後の変化に注目した報告は少ない^{22,47,58,59)}。本研究では、SAH 後の脳動脈において拡張性神経ペプチドである VIP と SP の免疫活性が脳血管攣縮の time course に相関して消長することが観察された。SAH 後、脳動脈に分布する軸索終末で拡張性伝達物質が涸渇し、そのために血管拡張性神経機能の低下が起こり、これが脳血管攣縮の増悪因子として働くことが考えられる。実際 Bevan ら⁶⁾ は SAH 後のネコ脳動脈では経壁電気刺激による収縮性反応も拡張性反応もともに低下したと報告している。また、近年明らかになった血管における内膜依存性の弛緩反応¹⁷⁾が、脳動脈では oxyhemoglobin によって抑制されること¹⁶⁾や、SAH 後の脳動脈では Ach による内膜依存性の弛緩反応が低下していること⁴²⁾なども、本研究の結果と並んで脳血管攣縮の増悪因子として脳動脈の拡張性機能の低下が重要であることを示している。

ま と め

1. イス脳動脈周囲には神経ペプチド VIP, SP, および NPY 含有神経線維が豊富に分布する。

2. イスに実験的クモ膜下出血 (SAH) を起こし、脳動脈神経における VIP, SP, および NPY の免疫活性の変化を免疫組織化学的に調べ、脳血管撮影による脳血管攣縮との相関を検討した。SAH 後1週以内では脳動脈の VIP, SP, NPY の免疫活性は低下した。この低下は SAH によって異常な刺激を受けた神経終末から神経ペプチドが過剰に放出され、涸渇したためと考えられる。SAH 2週以後では拡張性神経ペプチド (VIP, SP) の免疫活性は回復するのに対し、収縮性神経ペプチド (NPY) の免疫活性は低下したままであった。すなわち、拡張性神経ペプチドの消長と脳血管攣縮の time course との間には相関がみとめられた。

3. 以上のように、SAH により脳動脈神経終末内の拡張性神経ペプチドは涸渇するが、これは、脳動脈の拡張性神経の機能低下につながり、脳血管攣縮の増悪因子の一つになると考えられる。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました京都大学脳神経外科 菊池晴彦教授、並びに、京都大学名誉教授 半田肇 浜松労災病院長に感謝致します。また快く実験の場をお与え頂くとともに御指導、御鞭撻頂いた京都大学解剖学第一講座 水野昇教授、杉本哲夫講師、同講座の諸先生方に感謝致します。また終始、御指導、御討論頂いた京都大学脳神経外科 岡本新一郎助手に感謝致します。

文 献

- 1) Alksne JF, Greenhoot JH: Experimental catecholamine-induced chronic cerebral vasospasm. Myonecrosis in vessel wall. *J. Neurosurg* **41**: 440-445, 1974.
- 2) Allen JM, Schon F, Todd N, et al: Presence of neuropeptide Y in human circle of Willis and its possible role in cerebral vasospasm. *Lancet* **ii**: 550-552, 1984.
- 3) Allen GS, Henderson L.M., Chou SN, et al: Cerebral arterial spasm. 1. In vitro contractile activity of vasoactive agents on canine basilar and middle cerebral arteries. *J Neurosurg* **40**: 433-441, 1974.
- 4) Arbab MAR, Wiklund L, Svendgaard NA, et al: Origin and distribution of cerebral vascular innervation from superior cervical, trigeminal and spinal ganglia investigated with retrograde and anterograde WGA-HRP tracing in the rat. *Neuroscience* **19**: 695-708, 1986.
- 5) Bevan JA, Buga GM, Moskowitz MA, et al: In vitro evidence that vasoactive intestinal peptide is a transmitter of neuro-vasodilation in the head of the cat. *Neuroscience* **19**: 597-604, 1986.
- 6) Bevan JA, Bevan RD, Frazee JG, et al: Functional arterial changes in chronic cerebrovasospasm in monkeys: An in vitro assessment of the contribution to arterial narrowing. *Stroke* **18**: 472-481, 1987.
- 7) Chan-palay V: Innervation of cerebral blood vessels by norepinephrine, substance P and neurotensin fibers and the leptomeningeal indoleamine axons: Their roles in vasomotor activity and local alterations of brain blood composition. In *Neurogenic Control of the Brain Circulation*, edited by Owman C, Edvinsson L, Oxford, Pergamon Press, 1977, p. 39.
- 8) Echlin FA: Current concepts in the etiology and treatment of vasospasm. *Clin Neurosurg* **15**: 133-160, 1968.
- 9) Edvinsson L: Functional role of perivascular peptides in the control of cerebral circulation. *Trends Neurosci* **8**: 126-131, 1985.
- 10) Edvinsson L, Emson P, McCulloch J, et al: Neuropeptide Y: cerebrovascular innervation and vasomotor effects in the cat. *Neurosci Lett* **43**: 79-84, 1983.
- 11) Edvinsson L, Emson P, McCulloch J, et al: Neuropeptide Y: Immunocytochemical localization to and effect upon feline pial arteries and veins in vitro and in situ. *Acta Physiol Scand* **122**: 155-163, 1984.
- 12) Edvinsson L, McCulloch J, Uddman R, et al: Substance P: immunohistochemical localization and effect upon cat pial arteries in vitro and in situ. *J Physiol* **318**: 251-258, 1981.
- 13) Edvinsson L, Ekman R, Jansen I, et al: Peptide-containing nerve fibers in human cerebral arteries: Immunocytochemistry radioimmunoassay, and in vitro pharmacology. *Ann Neurol* **21**: 431-437, 1987.
- 14) Fein JM, Flor WJ, Cohan SL, et al: Sequential changes of vascular ultrastructure in experimental cerebral vasospasm. Myonecrosis of subarachnoid arteries. *J Neurosurg* **41**: 49-58, 1974.
- 15) Fisher CM, Kistler JP, Davis JM, et al: Relation of cerebral vasospasm to SAH visualized by computerized tomographic scanning. *Neurosurg* **6**: 1-9, 1980.
- 16) Fujiwara S, Kassell NF, Sasaki T, et al: Selective hemoglobin inhibition of endothelium dependent vasodilatation of rabbit basilar artery. *J Neuro-*

- surg **64**: 445-452, 1986.
- 17) Furchgott RF, Zawadzski JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**: 375-376, 1980.
 - 18) Gibbins IL, Brayden JE, Bevan JA, et al: Perivascular nerves with immunoreactivity to vasoactive intestinal polypeptide in cephalic arteries of the cat: Distribution, possible origins and functional implications. *Neuroscience* **13**, 1327-1346, 1984.
 - 19) 半田 肇: 脳血管攣縮の発生機転 脳卒中 **7**: 453-460, 1985.
 - 20) 半田 寛: 脳血管攣縮の発生機序に関する実験的研究—特に新鮮ヒト脳動脈の収縮性および、クモ膜下出血後の血管反応性の変化について—日外宝 **56**: 124-137, 1987.
 - 21) Hara H, Hamill GS, Jacobowitz DM: Orgins of cholinergic nerves to the rat major cerebral arteries: coexistence with vasoactive intestinal polypeptide. *Brain Res Bull* **14**: 179-188, 1985.
 - 22) Hara H, Nosko M, Weir B: Cerebral perivascular nerves in subarachnoid hemorrhage. A histochemical and immunohistochemical study. *J Neurosurg* **65**: 531-539, 1986.
 - 23) Hatanaka H, Amano T: A mouse neuroblastoma x rat glioma hybrid cell produces immunoreactive substance P-like material. *Brain Res* **215**: 305-316, 1981.
 - 24) Heros RC, Zervas NT, Varsos V: Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: an update. *Ann Neurol* **14**: 599-608, 1983.
 - 25) Iwayama T, Furness B, Burnstock G: Dual adrenergic and cholinergic innervation of the cerebral arteries of the rat. an ultrastructural study. *Circ Res* **26**: 635-646, 1970.
 - 26) Kajikawa H: Fluorescence histochemical studies on the distribution of adrenergic nerve fibers to intracranial blood vessels. *Arch Jap Chir* **37**: 473-484, 1968.
 - 27) Kassell NF, Sasaki T, Colohan ART, et al: Cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* **16**: 562-572, 1985.
 - 28) Keller JT, Beduck A, Saunders MC: Orgin of fibers innervating the basilar artery of the cat. *Neurosci Lett* **58**: 263-268, 1985.
 - 29) Larsson LI, Edvinsson L, Fahrenkrug J. et al: Immunohistochemical localization of a vasodilatory polypeptide (VIP) in cerebrovascular nerve. *Brain Res* **113**: 400-404, 1976.
 - 30) Lee TJ-F: Direct evidence against acetylcholine as the dilator transmitter in the cat cerebral artery. *Eur J Pharmacol* **68**: 393-394, 1980.
 - 31) Lee TJ-F: Cholinergic mechanism in the large cat cerebral artery. *Circ Res* **50**: 870-879, 1982.
 - 32) Lee TJ-F, Saito A, Berezin I: Vasoactive intestinal polypeptide-like substance: The potential transmitter for cerebral vasodilatation. *Science* **224**: 898-901, 1984.
 - 33) Liu-Chen L-Y, Liszczak TM, King JC, et al: Immunoelectron microscopic study of substance P-containing fibers in feline cerebral arteries. *Brain Res* **369**: 12-20, 1986.
 - 34) Liu-Chen L-Y, Mayberg M, Moskowitz MA, et al: Immunohistochemical evidence for a substance P-containing trigeminovascular pathway to pial arteries in cats. *Brain Res* **268**: 162-166, 1983.
 - 35) Linnik MD, Lee TJ-F: Oxyhemoglobin inhibition of acetylcholinesterase activity. *Neurosci Lett* **66**: 159-162, 1986.
 - 36) Lobato RP, Marin J, Salaices M, et al: Effect of experimental subarachnoid hemorrhage on the adrenergic innervation of cerebral arteries. *J Neurosurg* **53**: 477-479, 1980.
 - 37) Lobato RD, Marin J, Salaices M, et al: Cerebrovascular reactivity to noradrenaline and serotonin following experimental subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* **53**: 480-485, 1980.
 - 38) Matsuyama T, Shiosaka S, Matsumoto M, et al: Overall distribution of vasoactive intestinal polypeptide-containing nerves on the wall of cerebral arteries: an immunohistochemical study using whole mounts. *Neuroscience* **10**: 89-96, 1983.
 - 39) Matsuyama T, Shiosaka S, Wanaka A, et al: Fine structure of peptidergic and catecholaminergic nerve fibers in the anterior cerebral artery and their inter-relationship: an immunoelectron microscopic study. *J Comp Neurol* **235**: 268-276, 1985.
 - 40) Mayberg MR, Houser OW, Sundt TM Jr: Ultrastructural changes in feline arterial endothelium following subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* **48**: 49-57, 1978.
 - 41) Mayberg MR, Zervas NT, Moskowitz MA: trigeminal projections to supratentorial pial and dual blood vessels in cats demonstrated by horseradish peroxidase histochemistry. *J Comp Neurol* **223**: 46-56, 1984.
 - 42) Nakagomi T, Kassell NF, Sasaki T, et al: Impairment of endothelium-dependent vasodilation induced by acetylcholine and adenosine triphosphate following experimental subarachnoid hemorrhage. *Stroke* **18**: 482-489, 1987.
 - 43) Nielsen KC, Owman C: Adrenergic innervation of pial arteries related to the circle of Willis in the cat. *Brain Res* **6**: 773-776, 1967.
 - 44) Norregaard TV, Moskowitz MA: Substance P and the sensory innervation of intracranial and extracranial feline cephalic arteries. *Brain* **108**:

- 517-533, 1985.
- 45) Okamoto S, Handa H, Toda N: Role of intrinsic arachidonate metabolites in the vascular action of erythrocyte breakdown products. *Stroke* **15**: 60-64, 1984.
- 46) Osaka K: Prolonged vasospasm produced by the breakdown products of erythrocytes. *J Neurosurg* **47**: 403-411, 1977.
- 47) Peerless SJ, Kendall MJ. The significance of the perivascular innervation of the brain. In the *Cerebral Vessel Wall* edited by Cervos-Navarro, et al, New York, Raven Press, 1976, p. 175.
- 48) 齊藤亜紀良: 脳血管の神経性調節 血管 **9**: 79-88, 1986.
- 49) Saito I, Sano K: Vasospasm following rupture of cerebral aneurysm. *Neurol Medico Chir (Tokyo)* **19**: 103-107, 1979.
- 50) Schon F, Allen JM, Yeats JC, et al: Neuropeptide Y innervation of the rodent pineal gland and cerebral blood vessels. *Neurosci Lett* **57**: 65-71, 1985.
- 51) Shigeno T: Norepinephrine in cerebrospinal fluid of patients with cerebral vasospasm. *J Neurosurg* **56**: 344-349, 1982.
- 52) 志熊道夫・クモ膜下出血時にみられる脳血管周囲イオン環境の経時的変化 特にクモ膜下血腫内カリウムイオンについて *神経外科* **22**: 805-812, 1982.
- 53) Svendgaard NA, Edvinsson L: On the pathophysiology of cerebral vasospasm: Transmitter changes in perivascular sympathetic nerves, and increased pial artery sensitivity to norepinephrine and serotonin. In *Neurogenic Control of the Brain Circulation*, edited by Owman C, and Edvinsson L, Oxford, Pergamon Press, 1977, p. 143.
- 54) Tanabe Y, Sakamoto K, Yamada H, et al: Cerebral vasospasm and ultrastructural changes in cerebral arterial wall. An experimental study. *J Neurosurg* **49**: 229-238, 1978.
- 55) Tani E, Yamagata S, Ito Y: Intercellular granules and vesicles in prolonged cerebral vasospasm. *J Neurosurg* **48**: 179-189, 1978.
- 56) Toda N, Ozaki T, Ohta T: Cerebrovascular sensitivity to vasoconstricting agents induced by SAH and vasospasm in dogs. *J Neurosurg* **46**: 296-303, 1977.
- 57) Tsukahara T, Taniguchi T, Fujiwara M, et al: Alterations in alpha adrenergic receptors in human cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage. *Stroke* **16**: 53-58, 1985.
- 58) Uemura Y, Sugimoto T, Okamoto S, et al: Changes of vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity in cerebrovascular nerve fibers after subarachnoid hemorrhage: an experimental study in the dog. *Neurosci Lett* **71**: 137-141, 1986.
- 59) Uemura Y, Sugimoto T, Okamoto S, et al: Changes of neuropeptide immunoreactivity in cerebrovascular nerve fibers after experimentally produced SAH. Immunohistochemical study in the dog *J Neurosurg* **66**: 741-747, 1987.
- 60) Walters BB, Gillespie BS, Moskowitz MA: Cerebrovascular projections from the sphenopalatine and otic ganglia to the middle cerebral artery of the cat. *Stroke* **17**: 488-494, 1986.
- 61) Weir B, Grace M, Hansen J, et al: Time course of vasospasm in man. *J Neurosurg* **48**: 173-178, 1978.
- 62) Wellum GR, Peterson JW, Zervas NT: The relevance of in vitro smooth muscle experiments to cerebral vasospasm. *Stroke* **16**: 573-581, 1985.
- 63) White RP, Hagen AA, Morgan H, et al: Experimental study on the genesis of cerebral vasospasm. *Stroke* **6**: 52-57, 1975.
- 64) Yamamoto K, Matsuyama T, Shiosaka S, et al: Overall distribution of substance P-containing nerves in the wall of the cerebral arteries of the guinea pig and its origins. *J Comp Neurol* **215**: 421-426, 1983.
- 65) Yamashita T, Yamamoto S: Cerebral arterial pathology in experimental subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* **58**: 843-850, 1983.
- 66) Yoshioka J, Clower BR, Smith RR: The angiopathy of subarachnoid hemorrhage. I. Role of vessel wall catecholamines. *Stroke* **15**: 288-294, 1984.