

クモ膜下出血後の脳血管攣縮における
知覚神経の関与

塩川芳昭

クモ膜下出血後の脳血管攣縮における

知覚神経の関与

塩川 芳昭

a. 研究目的、研究の背景

(1) はじめに

脳血管攣縮とは、主として脳動脈瘤の破裂によるクモ膜下出血(SAH)後4日から二週目頃に見られる、頭蓋内血管が広範囲かつ持続性に狭細化する現象を言う。脳動脈瘤破裂によるSAHの発生頻度は人口10万人あたり年間10数人と言われており^{41, 80}、死亡あるいは後遺症を残す三大要因として、(1)SAHによる一次的脳損傷、(2)脳動脈瘤の再破裂、および(3)脳血管攣縮が知られている。診断機器、手術技術の長足の進歩と、急性期動脈瘤手術の普及による再破裂の予防が可能となった現在、患者の最大の予後不良因子は脳血管攣縮であることが明らかとなり⁴¹、その確実な対策が急務となっている^{37, 68}。疾患の発生頻度を考慮すれば、本邦でも年間一人を超えるSAH患者が脳血管攣縮による障害をうけていることになり、脳卒中対策に占める脳血管攣縮の意義は非常に大きい。

脳血管攣縮の現象自身は1940年代末より剖検及びこの項から実用化した脳血管造影により知られていたが、その本態は未だ解明されておらず、現在もなお確実な治療手段を欠いている^{41, 96, 99}。脳血管攣縮は、脳動脈瘤破裂によるSAHの他にも頭部外傷⁶⁶や視床下部一下垂体近傍の手術後⁵⁶、下垂体卒中⁸、髄膜炎⁴⁹、蝶形骨洞の副鼻腔炎⁹⁵、偏頭痛⁹、三叉神経領域の帯状疱疹³⁴などの病態に伴って発生することが報告されており、これらに共通した因子として、(1)脳主幹動脈が集中する脳底槽に血液が貯溜すること、(2)視床下部損傷、(3)神経性循環調節の関与、などが指摘されてきた。かねてより脳血管攣縮の病因解明は、収縮原因物質の同定と血管反応性の変化を主に薬理学的手法を用いて検索されてきたが、現在では脳血管攣縮は血管平滑筋の生理的な収縮・弛緩機構だけで説明することは困難な多因子性の現象という考え方が支配的となっている^{49, 97}。本研究では、近年、脳循環調節への関与が注目されている脳血管の知覚神経が、SAH後の脳血管攣縮の発生とどのようにかかわりあっているかについて考察を加える。

(2) 脳血管攣縮の病像

(i) 脳血管攣縮の臨床像

SAH患者に脳血管造影上の血管狭窄が生ずる頻度は一般的には40~70%と考えられているが、脳血管造影あるいは最近広まった非侵襲的なTranscranial doppler法によれば、ほぼ100%に血管狭窄の所見を得ることができる。時間経過が特徴的で、SAH後の数日間は見られず、4日から16日、特に7日目頃に最も強い血管狭窄がみられる⁷²。狭窄部は経時的に近位主幹血管より末梢部へ移動する所見がしばしばみられ、発症3、4週後にはほ

元の口径に戻る。血管撮影上の狭窄は、頭蓋内のクモ膜下腔内に位置する近位(心臓側)主幹動脈に顕著であり、特にクモ膜下血腫の多い部位に好発するため、発生機序は明確ではないものの、脳血管周囲の血腫の存在が脳血管攣縮発生に重要な役割を果たしていることに異論は少ない。これはCTスキャンの血腫分布が臨床上有力な予後判定因子となっていることから確かめられる^{23, 73}。脳血管攣縮による遅発性脳虚血症状(delayed ischemic neurological deficits; DIND)はSAH患者の20~30%に生じ、国際共同研究の結果では脳血管攣縮のない患者群の死亡率は9%であるのに対して血管撮影上の脳血管攣縮が局所的な場合には死亡率は16%、広範な脳血管攣縮がみられる場合には22%と報告されている⁴²。DINDの時間経過は脳血管攣縮の病態を考える上で重要な点で、SAHそのものによる頭蓋内圧亢進、脳血流低下、交感神経緊張、脳酸素代謝の低下などが一旦は克服されたSAH数日後に意識障害、麻痺が徐々に進行してくるものである。

(ii) 攣縮血管の病理

血管撮影上の狭窄がSAH3~4週後には元の口径に回復する事実はこの収縮が可逆的なものであることを示唆するが、病理学的には多様な変化が攣縮脳血管におこっている⁴¹。攣縮早期には、血管内皮の変形を伴う内弾性板の皺縮、内膜の浮腫性変化、内膜での血栓形成、炎症細胞の外膜への浸潤が認められている。SAH2週目には内膜の肥厚、中膜平滑筋の壊死、外膜の結合組織増殖がおこり以後約2ヶ月にわたりこれらの増殖性変化は進行する。脳には他臓器にみられない特徴として血液脳関門が存在することが知られているが、実験SAHでは脳血管透過性が早期から亢進している⁷⁸。これは臨牀的にもCTスキャンにて脳底槽の造影剤による造強効果が強い場合、高率に脳血管攣縮が生じる事実と符合する。

(iii) 脳血管攣縮の病態生理

脳血管攣縮の時期には脳血流、代謝ともに低下する。血管狭窄が強度の場合は血管撮影所見と脳血流低下が相関することが知られている。SAHの程度が強いほど、この血流低下は大きい、脳代謝(酸素消費量)の低下は更に強く、血流と代謝の不均衡がSAHにより生じることが明らかとなっている³⁰。また、このような循環代謝上の変化に加え、脳血管攣縮の時期には脳血液量が増加しており、末梢の抵抗血管の拡張が同時におこっていることも考えられている。CO₂に対する反応性や、脳血管に特徴的な自動調節能(全身血圧の変化によらず脳血流を一定に保つ)もSAHにより障害を受け、頭蓋内圧亢進による灌流圧の低下が直ちに脳血流低下を惹起することもある。これらの諸因子を考慮すると、血管撮影上の狭窄が脳虚血(症状)を呈して梗塞が完成するか否かは、基本的には脳血管攣縮の起因为物質であるクモ膜下腔の血液が脳血管に接触している量及び期間が重要であるが、血圧、頭蓋内圧、血液粘稠度、側副血行動態などの多くの因子が関与して決定されることになる⁴¹。

(3) 脳血管攣縮の機序

(i) 脳血管攣縮研究の推移

脳血管攣縮の病因解明に向けた研究は、主として収縮原因物質の同定とSAH後の血管反応性の変化を検索する手法がとられてきた。脳血管は末梢血管と比べてヘモグロビンあるいは血液成分に対する反応性が高いほか、収縮に際して細胞外カルシウムへの依存性が高いなどの特徴を有している。しかし、血液あるいは血液由来物質について多くの研究が行われてきたにもかかわらず、現在にいたるまで脳血管攣縮の起因物質として単離されたものはない⁹⁷。また、近年その重要性が認識されてきた内皮依存性の収縮・弛緩機構がSAH後に障害を受けること、種々の血管拡張薬による治療の不成功、あるいは後述するカルシウム拮抗剤によっても攣縮血管は拡張しないことなどから、脳血管攣縮で起きている血管の狭窄は生理的な血管収縮機序によるものではない点で大方の見解は一致している。先に述べた病理変化を重視して、脳血管攣縮を炎症あるいは免疫機序に基く肥厚性血管炎とみなす立場からの治療も試みられてきたが、現在に至るまで、本質的にその病態の進行を阻止する治療法は得られていない。このように脳血管攣縮の研究と治療が困難であることの大きな理由として、脳血管反応性の動物種による大きな違いと、臨床像に近い実験モデルの作成が難しいことが挙げられる。

(ii) 脳循環の神経性調節

1970年代末より免疫学的手法などの進歩により脳循環の神経性調節に関する知見が増加した。これは形態的には中枢神経内にnetworkを形成するintrinsic systemと、末梢神経系すなわち交感、副交感および知覚神経からなるextrinsic systemにより構築されている⁶⁴。⁷⁰。これらの個々の生理的役割については未だ不明な点も少なくないが、循環調節の面からは、脳幹(孤束核)や視床下部に位置する中枢性ノルアドレナリン系の細胞群が血管運動中枢の一つと想定されている。末梢神経系のうち交感および副交感神経の一部は遠心性に脳血管を支配し循環調節に関与している。血管拡張に際して内皮依存性血管弛緩因子(EDRF)であるNitric Oxide (NO)の重要性が明らかとされているが²⁷、脳血管においてはNOは副交感神経系の神経節に存在しており⁸³、機能的にも脳血管拡張に関与しているとする報告がある⁸⁸。

脳血管からの知覚神経は求心性に脳幹内の血管運動中枢と連絡を有しており、吻側頭蓋内血管を支配する知覚神経線維は同側の三叉神経節由来である^{1, 3, 54, 57, 71, 81}。この神経節や脳血管周囲の知覚神経には substance P (SP)、 calcitonin gene related peptide (CGRP)、 neurokinin A や cholestykinin などの含有が報告されており、これらは血管拡張性の作用も有している^{17, 19, 20, 65}。脳血管の知覚神経は、一般の知覚神経と同様に痛覚受容

nociceptive と血管運動 vasomotor の二つの機能を持っている^{48, 69, 74, 92}。三叉神経の血管運動への関与については、脳への酸素供給が障害された際に脳血管を拡張させ皮質血流を増加させることが報告されている^{61, 74}。

(iii) 脳循環の神経性調節と脳血管攣縮

SAHの際には動脈瘤破裂による著明な頭蓋内圧亢進や(動脈瘤が好発する脳底槽に近い)視床下部の損傷を伴うことから、脳血管攣縮の発生に神経の循環調節機構が関与するとした見解が最近注目されている。脳血管攣縮に際して内皮依存性弛緩機構の障害が薬理学的手法により示されている⁴³。その機序として、攣縮脳血管においてはEDRFの放出は保たれており、cyclic GMP産生能の低下による血管平滑筋の反応性低下が推測されている⁴⁴。

交感神経系が脳血管攣縮に関与している事実は、以前より実験SAHや臨床で明らかにされている^{25, 47, 85}。重症脳血管攣縮の患者では、末梢血液中のcatecholamine (CA)あるいはその代謝産物が増加しており^{11, 60}。またSAH後の脳血管周囲の交感神経線維の減少と髄液中のCAの増加はノルアドレナリン代謝の亢進を示唆している^{18, 67, 99}。ノルアドレナリン細胞群は主として橋、延髄に存在し、広範に皮質、海馬および視床下部に投射していることが知られている。これらに対して6-OHDA注入による選択的破壊を行なった実験から、ラットにおける脳血管攣縮は脳幹のノルアドレナリン細胞核、なかでも延髄背側の孤束核近傍の細胞群(A2核、Dahlstromより¹²)が重要で、同部の両側性の破壊によりSAH後のCAの増加を阻止し、同時に脳血管攣縮を予防することが示されている^{84, 85}。延髄A2からの上行路(ventral noradrenergic bundle)は視床下部に密に投射しており、視床下部正中隆起の電気凝固によりラットSAHモデルにおける脳血管攣縮が防止されることも明らかとなっている^{84, 86}。正中隆起は、他の視床下部の諸核から受けた神経ペプチドを血液や髄液あるいは下垂体へ放出する臓器である^{6, 46}。脳血管攣縮のうちSAH直後に生じるacute spasm(血液注入10分後)が下垂体後葉から分泌されるvasopressinの拮抗剤や抗血清でその発生を防げること、およびvasopressinを先天的に欠損するBlattleboro ratではみられないことから、視床下部の神経性、内分泌性あるいはその両者が、中枢性ノルアドレナリン系を介して発生する脳血管攣縮に関与していることが強く示唆される^{13, 86}。

知覚神経系と脳血管攣縮の関与については、その伝達物質であるSPとCGRPが、CAと同様に、SAH後に三叉神経節内と外頸静脈中で増加することが近年見いだされた。またSPについては血管周囲の知覚神経におけるturnoverの亢進が示されている⁵²。実験的には、ノルアドレナリン細胞群で用いたのと同じラットSAHモデルで、SP含有線維を選択的に破壊するcapsaicinやSPの拮抗剤であるspantideの投与により、その脳血管攣縮が防止され

ることが明らかとされた¹⁴。知覚神経系と中枢性ノルアドレナリン系細胞群とは、解剖学的にも三叉神経の中樞側が脳幹内の諸核、とりわけ延髄血管運動中枢(A2)、孤束核、迷走神経核などと密接な連絡があることが知られている^{2,70}。中大脳動脈周囲に塗付したトレーサーが、逆行性にGasserian ganglionを経て脳幹の三叉神経核や孤束核に分布することは、その機能的連系の存在を示唆するものと言える^{1,2,3}。

このラットSAHモデルで得られた知見をまとめると、知覚神経、中枢性ノルアドレナリン系、視床下部一下垂体系が脳血管攣縮発生における神経性調節に関与する機構として想定できる。このなかで知覚神経は、中枢性ノルアドレナリン系、視床下部一下垂体系に対して少なくともSAHという侵害刺激の入力路として機能していると考えることができる^{84, 85, 86}。

(4) 本研究の目的

知覚神経と中枢性ノルアドレナリン系の両者が脳血管攣縮発生に深く関与しているという仮説に立ったとき、知覚神経伝達物質であるSPとCGRPはともに強力な血管拡張作用を有しており、強力かつ持続的な血管収縮が発生する脳血管攣縮におけるこれら拡張性伝達物質の役割は不明確のままであった。知覚神経にはSAHのような侵害性刺激を順行性に中枢へ伝導する機能があると同時に、別の軸索側枝にそって逆行性にも興奮を伝導し、その末梢側軸索末端より受容器近傍に伝達物質の放出を起こす機能があり、これは軸索反射として知られている⁵¹。このような軸索反射は、皮膚の侵害性刺激や汗腺・気道などの自律神経繊維にも認められ、炎症・喘息といった病的反応を惹起しているが、SAH後のSPとCGRPの増加の少なくとも一部はこの軸索反射によると想定するのが合理的である。

本研究では、知覚神経伝達物質であるSPとCGRPが、それぞれ脳血管攣縮に際して血管収縮の方向で増悪的に作用するのか、それとも血管拡張の方向で阻力的に作用しているのかを明らかにするため、最近確立された霊長類のSAHモデルを用いて以下の実験を行なった。すなわち各伝達物質が血管収縮の方向で作用するのであれば、知覚神経が侵害刺激を中枢へ順行性に伝達することが重要であり、血管拡張の方向に働くのであれば、知覚神経が軸索反射により逆行性に伝達物質の放出を起こすことが重要となる。これを解明するため、既に報告されている種々の方法による知覚神経遮断の結果を踏まえて、外科的に一側三叉神経を神経節の節前または節後で切断する方法と、免疫学的な除神経術による方法を採用し、その影響を脳血管造影と脳血流測定にて評価することとした。

b. 研究方法

(1) リスザルSAHモデル

脳血管反応性における種差の問題を克服するため、リスザル (Squirrel monkey; *Saimiri sciureus*) を用いて同種動脈血注入によりSAHを作成した^{15, 16}。SAHモデルについては、既に報告済みであるため、本論文ではその要点のみ記載する。使用した動物は体重650 gから900 g程度の成熟した雌雄リスザルであり、これらはスウェーデンのルンド大学およびカロリンスカ研究所の動物実験倫理規定に適合した施設にて、自由に飲水可能でかつ定時に動物食と果実を投与される飼育体制下で管理された。

(i) クモ膜下カテーテルの留置

SAH作成のための血液注入や後述する抗血清の投与を、簡便な麻酔で随意かつ安全に遂行するため大槽cisterna magnaにクモ膜下カテーテルを留置した。リスザルを althaxollone - alphadollone acetate (Saffan, 14 mg/kg i.m., Glaxovet, England)による麻酔下に腹臥位で定位脳手術用固定枠にその頭部を保持させた。外後頭隆起から第7頸椎にいたる直線状の皮切を置き、大槽直上の硬膜に約2 mmの小切開を加えてpolyethylene catheter (OD/ID = 0.9/0.5 mm, Surgimed A/S, Denmark)の一端をクモ膜下腔内に固定し、他端を盲管として後頸部から頭頂部まで皮下を誘導して固定した。

(ii) SAHの作成

クモ膜下カテーテル留置後1ないし3週経過後にSAHを作成した。リスザルをまず4% isoflurane (Forene, Abbott, USA)にて入眠させ、atropine (0.05 mg/kg i.m.)投与後に未熟児用挿管チューブ (no. 2.5-3, Portex, England)を用いて経口挿管した。直ちに静脈路を確保して thiopental sodium (Pentothal Natrium, 10 mg/kg i.v., Abbott, USA)を投与し、isofluraneを2%に減量し、笑気70%と酸素30%で調節呼吸とした。(i)と同様に腹臥位で定位脳手術用固定枠にその頭部を保持し、清潔操作下に直径約4 mmの穿頭を傍正中中部右側で冠縫合の直後に開け、血液注入用の腰椎穿刺針 (O.D. = 0.5 or 0.7 mm)を大脳脚間槽を目標に刺入した。その際の目標は外耳孔を結ぶ線の約6.9ないし7.5 mm前方を目指す、正確な位置決定は頭蓋側面のX線撮影により後床突起先端と同じ高さでその1 mm前方となるように調整を加えた。脳脊髄液の自然排液が得られれば、刺入した腰椎穿刺針を methylmetacrylate cement を用いて頭蓋骨に固定した。頭蓋内圧計(脳実質型、MTC, Hellige, The Netherlands)を前頭部脳実質に設置し、次項に述べるcontrolとなる血管撮影を行なったのち、同種動脈血0.6 mlを用手的に腰椎穿刺針から、また0.5 mlを(i)で留置したクモ膜下カテーテルから大槽へ約2分間かけて緩徐に注入した。注入に際しては頭蓋内圧(ICP)を連続的に計測し、これが80 mmHgを越えないように注入速度を配慮した。血液注入より10分間は手術台を30度傾けて頭部の低位を維持し、血液注入開始より10分後に血管撮影を行なった。最初の血液注入より30分後と90分後に大槽への血液注入を追加し、ICPの値に応じて総量

で2ないし2.6 ml(体重あたり3 ml/kg)の血液を注入した。最終の血液注入後に腰椎穿刺針を抜き、クモ膜下カテーテルを皮下にもどして閉鎖した。麻酔からの十分な覚醒を待って気管内チューブを抜き、神経症状の観察の後、加湿、加温された特別の飼育施設に1日間収容し、以後は通常の施設内で飼育した。

(iii) 脳血管撮影

脳血管撮影は外科的除神経術あるいは抗血清投与前、血液注入前、血液注入10分後および六日後に行なった¹⁵。カテ留置までの麻酔は(ii)と同様に行ない、背臥位で抗血清投与前には両側腋窩動脈に、外科的除神経術群では、右側は腋窩動脈に、左側は外頸動脈に逆行性に(心臓側へ向けて) polyethylene catheter (OD/ID = 0.7/0.4 mm, Surgimed A/S, Denmark)を留置した。Heparin (30 IU/kg i.v., Kabi Vitrum, Sweden)を投与したのち isoflurane麻酔を止めて、fentanyl (Leptanal, Janssen Pharmaceutica, Belgium)による静脈内麻酔へ切り替え(50 μ g/kgのbolus i.v.の後25 μ g/kg/hourで持続静脈内投与)、動物の非動化は Suxamethonium chloride (Celocurin; Kabi Vitrum, Sweden; 3 mg/kg i.v.)の間欠的投与にて維持した。血管撮影を行うまで45分間待機し、直腸温を38°Cに保ち、体血圧、動脈血のpH、PaO₂およびPaCO₂を一定の範囲に保って全身状態の安定を図った。

撮影に際しては、動物を背臥位のまま内頸動脈と脳底動脈が重ならないように頭部を左側へ75度傾けた。造影剤はMetrizamide (Amipaque; Nygaard and Co., Oslo, Norway)を370 mg/mlの濃度に溶解したものを用い、腋窩動脈撮影では同時に、右側腋窩動脈撮影と左側頸動脈撮影では一側ずつ用手的に約2秒間かけて注入した。一回の血管撮影あたりに用いる造影剤の量は1.2ないし1.5 ml(体重あたり1.8 ml/kg)で、乳腺撮影用フィルム(Kodak NMB Film)を用い、各撮影毎に単純撮影も同時に行ってサブトラクション処理を加え、骨陰影の除去をはかった。撮影終了後にカテを抜き、刺入動脈を結紮した。

血管径の計測は、Gabrielsen and Greitz²⁸らの方法に従い、拡大鏡を用いて一定の拡大率下にあらかじめ設定しておいた計測点、すなわち両側腋窩動脈撮影では1ヶ所、右側腋窩動脈撮影と左側頸動脈撮影では4ヶ所ずつ実測し、同一動物の初回血管撮影における計測値との百分比で表わした。血管径の計測は、血管撮影の実施とは独立に、実験内容の予備知識なく行なった。

(iv) 脳血流測定

抗血清投与前では、血液注入六日目の血管撮影後に¹⁴C-iodoantipyrineを用いたオートラジオグラフィ法により脳血流を測定した¹⁶。

血液注入六日目の血管撮影の際に、撮影用のカテ挿入と合わせて血液採取用に両側大腿動脈へ、またトレーサー注入用に一侧の大腿静脈にカテーテルを留置した。麻酔導入時に使用したthiopental sodiumの影響をなくすため、脳血流測定は麻酔導入より3時間経過させた後に行なった。脳血流測定の原理はSakurada⁷⁵らの方法に従い、実際の手技はGjedde

²⁹らの変法に準じている。すなわち、体血圧、直腸温、動脈血のpH、PaO₂およびPaCO₂が一定の範囲に保たれた時点で、¹⁴C-iodoantipyrine (150 μCi/kg, i.v., Amersham)を生食0.3mlに溶解してbolusで静脈内投与、同時に大腿動脈から、注入直後より20秒間のあいだに正確に122 μlの動脈血を採取した。この血液中の¹⁴C活性は、液体シンチレーションカウンターでquench correctionを考慮して計測した。注入20秒後に動物を断頭し、速やかに脳を摘出して-50 °Cのisopentane内で凍結させた。凍結脳から20 μmの切片を作り、スタンダード(¹⁴C methylmetacrylate standards, Amersham)とともにX線フィルム(Kodak MIN-R)上に16日間密着させてオートラジオグラムを作成した。計測は、オートラジオグラム上のスタンダードをLeitz TAS plus (R) image analyzerにまず読み込ませてスタンダードカーブを求め、あらかじめ設定しておいた計測部位の光学濃度を複数回測定し、得られた組織内¹⁴C濃度から以下に記すGjedde ²⁹らの計算法により脳血流を算出した。すなわち

$$fbl = \frac{CB_r(T)}{E(T) \int_0^T Ca(t) dt}$$

ここでfblは単位重量あたりの組織(脳)血流量、CB_r(T)は組織(脳)内の¹⁴Cの量、E(T)は¹⁴Cの組織(脳)への取り込み率、Ca(t)は¹⁴Cの時間tにおける動脈血中濃度であり、注入時間Tは本実験では20秒である。

(2) 外科的除神経術

三叉神経切断による知覚神経伝達物質の非特異的枯渇が血管径に及ぼす影響を調べるため以下の処置を行なった。除神経術は初回の血管撮影から1ないし3週間後(SAH作成の2週間前)に一側(右側)の三叉神経Gasserian神経節の節前切断と三叉神経第一枝と第二枝の節後切断をそれぞれ施行した。

一側の三叉神経の節前切断群(4匹)

一側の三叉神経の節後切断群(4匹)

対照群(シャム手術2匹を含む対照9匹)シャム手術を行なった2匹に対しては、外科的除神経術を行なった二群と厳密に同じ方法で血管撮影を行なった。その血管撮影所見はすでに報告¹⁵した除神経術を行っていないSAH動物(7匹)の血管攣縮と同様であったため、これらを一括して本研究の対照群として扱った。

麻酔は血管造影と同様に行ない、動物を腹臥位で定位脳手術用固定枠に頭部を保持し、清潔操作下にて右側側頭部の頬弓直上に直径約4 mmの開頭を行なった。リスザルの Gasserian神経節内において、SPとCGRP繊維の神経細胞は三叉神経第一枝、第二枝領域吻側部に位置しているため³²、節前切断は硬膜外にGasserian神経節を露出させ、Meckel's cave内で神経根をナイフにより完全に切断した(Fig. 1)。節後切断は、三叉神経第一枝(ophthalmic nerve)と第二枝(maxillary nerve)から海綿静脈洞内で脳血管へ向かう反回枝も確実に切断するため、第一枝と第二枝の起始部を3-4 mmの長さにわたり切除した(Fig. 1)³²。Gasserian神経節の腹側には脳血管の副交感神経である大錐体神経が位置するためこれを温存した。シャム手術ではGasserian神経節の露出までは同様に行なったのち、側頭葉を除神経術に要する時間(15分)のあいだ同程度の強さに圧迫することとどめ、三叉神経には何の障害も加えなかった。なお術後の角膜潰瘍予防のため、全動物に閉創後に同側の眼瞼縫合を行なった。除神経術の確認は、摘出した三叉神経第一枝と第二枝の起始部をCoons¹⁰らの方法に従ってSPとCGRPに対する免疫組織学的染色を行なったほか、脳摘出後に頭蓋底を手術用顕微鏡で観察した。

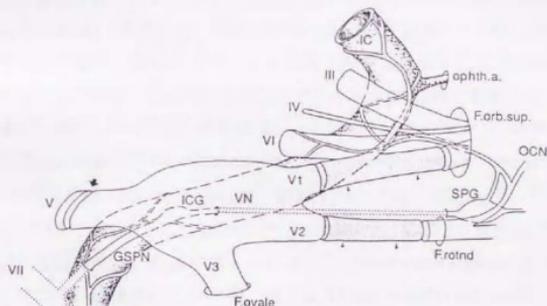


Figure 1. 三叉神経Gasserian神経節の節前切断と三叉神経第一枝と第二枝の節後切断の模式図。節前切断は硬膜外にGasserian神経節を露出させ、Meckel's cave内で神経根をナイフにより完全に切断した(矢印)。節後切断は、三叉神経第一枝と第二枝から海綿静脈洞内で脳血管へ向かう反回枝も確実に切断するため、第一枝と第二枝の起始部を3-4 mmの長さにわたり切除した(矢頭)。F. orb. sup. = superior orbital fissure; F. ovale = foramen ovale; F. rotnd = foramen rotundum; IC = internal carotid artery; ICG = internal carotid ganglia; OCN = orbitociliary nerve; SPG = sphenopalatine ganglion; III = oculomotor nerve; IV = trochlear nerve; V = trigeminal nerve, V1 = ophthalmic branch of V; V2 = maxillary branch of V; V3 = mandibular branch of V; VI = abducens nerve; VII = facial nerve.

(3) 抗血清による除神経術

SPとCGRPの作用をそれぞれ選択的に阻害することを意図して、おのおの抗血清をSAH直前およびSAH後連日5日間にわたり髄腔内投与し、血管径と脳循環に与える変化を脳血管造影とオートラジオグラフィ法により検討した。

抗SP血清投与群(4匹)

抗CGRP血清投与群(4匹)

対照群(正常ウサギ血清投与2匹を含む対照7匹)正常ウサギ血清をSPあるいはCGRP抗血清投与と全く同じプロトコールで行なった2匹に対して、抗血清投与の二群と厳密に同じ方法で血管造影およびオートラジオグラフィ法を行なった。その血管造影所見および脳血流所見はすでに報告^{15, 16}した血清投与を行っていないSAH動物(5匹)と同様であったため、これらを一括して本研究の対照群として扱った。

SPとCGRPに対する抗血清の作成はHolstとBersani³⁵の方法に従って行なった。すなわち合成SP(Peninsula Laboratories, inc. San Carlos, California)とヒトCGRP-1(Novabiochem, Laufelfingen, Switzerland)をおのおのブタ血清アルブミンとpeptideとproteinの比率が10:1となるように接合させ、これを生食と同体積のFreund Adjuvant(State Serum Institute, Copenhagen, Denmark)で希釈した。SPとCGRPのpeptideに換算して100 μ g相当量をデンマーク白ウサギの背部の皮膚に、6ないし8回皮下注射し、得られた血清の効力を¹²⁵IでラベルしたSPないしCGRP-1を用いたstoichiometric chloramine-T法で判定した。SPの抗血清の平衡定数は 1.5×10^{11} l/molであり結合能は12 nmol/mlで、neurokinin A, neurokinin B, neuropeptide K, galanin, hCGRP, somatostatin, gastrin releasing peptideやvasoactive intestinal polypeptideとの交叉反応は一切みられず、SPに対してのみ反応した⁷⁹。CGRPの抗血清の平衡定数は 0.5×10^{11} l/molであり結合能は0.2 nmol/mlで、CGRPを除き先述のpeptideとは交叉反応を示さなかった。抗血清中の γ グロブリンはammonium sulphate (2.5 mol/l)により抽出し洗浄された後、蒸留水に20時間、さらに引き続き塩酸(0.01 mol/l)で処理され、内因性リガンドの除去を行なった。対照として用いた正常ウサギ血清も同様の処理で内因性リガンドの除去を行なった。

一回あたり血清として0.5 mlに相当する γ グロブリンを、生食0.5 mlに溶解して髄腔内投与を行なった。投与時期は対照となる初回血管造影のあと(SAH作成の45分前)と翌日(SAH後第1日目)よりSAH後第5日目まで毎日とした。除神経術の効果判定は、屠殺後に頭蓋内血管(中大脳動脈の一部)を迅速に摘出して外科的除神経術の際と同様の免疫組織学的手法を用いて確認した。

(4) 統計手法

2群間の比較にはStudent's t-testを用い、多群間の比較が必要な場合には一次元配置分散分析(ANOVA)を行ない⁹³、危険率5%以下で有意差が認められた場合にBonferroniによるmodified t-testにて有意差検定を行なった^{93, 98}。

c. 結果

(1) リスザルSAHモデル

本モデルは脳血管撮影で評価しうる高い再現性を持った二層性の血管狭窄を得ることができ、acute spasm (対照比83%)は血液注入10分後、late spasm (対照比77%)は六日後にみられる(Fig. 2, Fig. 3)¹⁵。

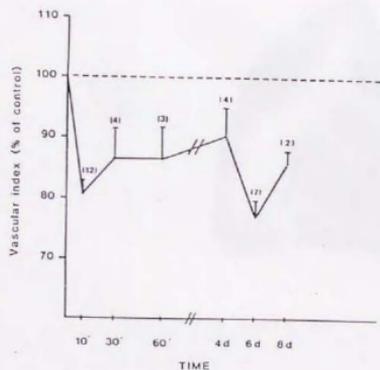
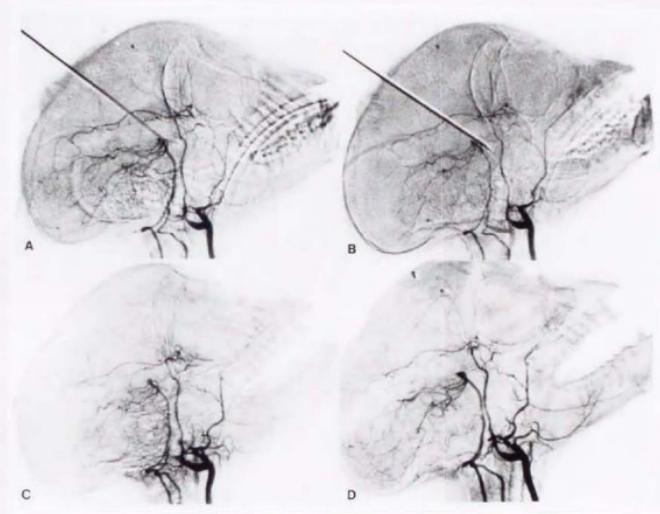


Figure 2 (upper). リスザルの両側腋窩動脈撮影。写真は(A)血液注入前、(B)血液注入10分後、(C)四日後、(D)八日後を示す。

(文献 15. Delgado-Zygmunt TJ, Arbab MAR, Shiohawa Y, Svendgaard NAa: Acta Neurochirurgica 118;130-136, 1992)

Figure 3 (lower). リスザルの脳膜下出血モデルにおける平均血管径 (percent of control \pm S.E.M.) の経時変化。括弧内は用いた動物の例数。(文献 15. Delgado-Zygmunt TJ, Arbab MAR, Shiohawa Y, Svendgaard NAa: Acta Neurochirurgica 118;130-136, 1992)

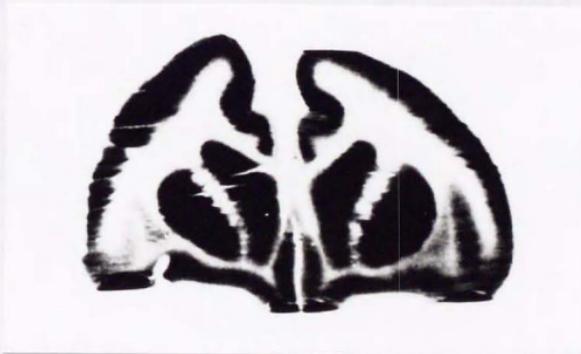
このlate spasmは臨牀的に重要な脳血管攣縮に相当し、この時期の脳血流は正常群と比べ全体的に20%の低下を示す (Table 1)¹⁶。

Table 1 ¹⁴C-iodoantipyrineを用いたオートラジオグラフィー法により測定したリスザルの正常および蛛膜下出血後 (血液注入六日目) の脳血流 (ml/100g/min)。(文献 16. Delgado-Zygmunt TJ., Arbab MAR., Shiokawa Y., Svendgaard NAa.;Acta Neurochirurgica. 121:166-173, 1993)

REGION	NORMAL (N=4)		SAH (N=5)		
Frontal cortex	124	± 9	78	± 5	**
Temporal cortex	83	± 8	66	± 4	
Parietal cortex	114	± 6	77	± 7	*
Caudate nucleus	91	± 6	75	± 4	
Putamen	106	± 9	84	± 9	
Thalamus	89	± 8	82	± 9	
Hypothalamus	80	± 11	69	± 10	
Cerebellar cortex	90	± 4	65	± 4	**
Occipital cortex	103	± 2	64	± 5	**
Trigeminal nucleus	95	± 3	77	± 6	
Olive	121	± 8	92	± 7	
Inferior colliculus	197	± 24	145	± 13	*

* p<0.05、** p<0.01

Fig. 4 ¹⁴C-iodoantipyrineを用いたオートラジオグラフィー法により測定した正常リスザルの脳血流 (ml/100g/min)。(文献 16. Delgado-Zygmunt TJ., Arbab MAR., Shiokawa Y., Svendgaard NAa.;Acta Neurochirurgica. 121:166-173, 1993)



(2) 外科的除神経術の結果

外科的除神経術を行なった二群と対照群の生理学的指標をTable 2に示す。血管撮影時における平均血圧は111ないし135 mmHgであり、動脈血PaCO₂は31 mmHg近傍と、報告されているリスザルの自発呼吸時のPaCO₂値(31.18±4.7 mmHg)に近かった⁷。動脈血pHは7.35近傍に、また動脈血pO₂はおおよそ130 mmHg前後に維持された(Table 2)。外科的除神経術後の動物は、二群とも顔面右側の三叉神経第一枝、第二枝領域に、自傷行為による潰瘍を生じた。SAH後、一ないし二日は活動度の低下を認め、体重が10ないし15%程度減少したが、6日めの時点で三叉神経領域の皮膚潰瘍以外の神経脱落症状は見られなかった。

Table 2. 外科的除神経術を行なった二群と対照群の生理学的指標

Group	time point	MABP (mmHg)	pH	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)
対照群 (N=9)					
	pre-op	135±9	7.37±0.03	143± 20	33.1±1.1
	post-op	127±3	7.42±0.03	127± 7	30.7±0.6
	10 min	135±2	7.41±0.03	129± 4	30.0±1.0
	6 days	115±4	7.34±0.02	139± 30	34.2±0.1
節前切断群 (N=4)					
	pre-lesion	135±6	7.39±0.01	154± 7	31.9±0.5
	post-lesion	135±5	7.35±0.01	148± 5	33.6±1.0
	10 min	125±6	7.36±0.02	148± 14	31.5±0.8
	6 days	123±5	7.39±0.02	167± 11	31.7±0.7
節前切断群 (N=4)					
	pre-lesion	113±9	7.31±0.02	139± 11	31.8±1.2
	post-lesion	125±9	7.30±0.01	117± 9	33.8±1.2
	10 min	125±11	7.28±0.02	121± 8	34.7±0.9
	6 days	111±5	7.38±0.03	155± 20	33.0±0.6

Values are mean ± SEM

SAH, subarachnoid hemorrhage

MABP, mean arterial blood pressure

10 min, 10 min post SAH

6 days, 6 days post SAH

一側の三叉神経節前切断は、手術側では切断前と比較して血管径になんら影響を与えなかった (Fig. 5 左)。SAH後も手術側の脳血管攣縮の程度は非手術側と同じであり、これは対照群とも同程度であった。なお非手術側の切断後の血管撮影は、動物への侵襲性から行なわれなかった。

一側の三叉神経第一枝と第二枝の節後切断により、手術側では切断前と比較して有意の ($p < 0.001$) 血管径の狭細化が認められた (Fig. 5 右)。SAH後にはそれ以上の脳血管攣縮は見られなかったが、非手術側と比べるとSAH10分後と6日目の血管径は手術側で約12%強度であり、特にSAH10分後では有意差 ($p < 0.05$) があった。非手術側では、切断後も血管径にはなんら変化なく、SAH後の脳血管攣縮の程度は対照群と同程度であった。

節前切断と節後切断の二群間で手術側の脳血管攣縮を比較すると、節後切断群でSAH10分後で11% (16 versus 27%)、6日後で19% (13 versus 32%) 狭窄が強度であった (Fig. 5)。

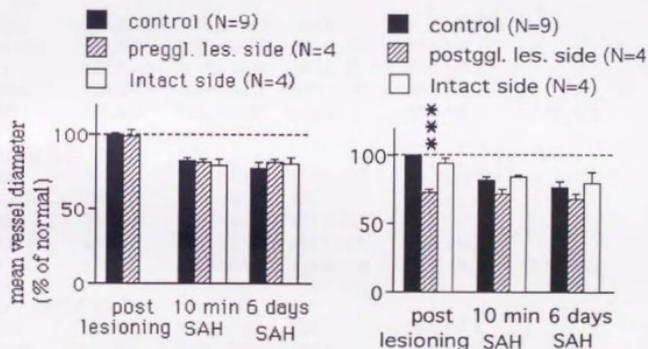


Figure 5. Gasserian神経節前後で一側の三叉神経切断を行なった二群と対照群の脳膜下出血前後の両側頸動脈撮影で得られた内頸動脈・中大脳動脈の狭窄率(左が節前切断preggl. les、右が節後切断postggl. les)。Values are mean \pm standard error. *** $p < 0.001$

(3) 抗血清による除神経術の結果

抗血清による除神経術を行なった二群と対照群のSPあるいはCGRP抗血清投与、およびこれに引き続くSAH後の生理学的指標をTable 3に示す。抗SP血清投与後の動物は、SAH後翌日ころまで活動度の低下を認めたが、6日目の時点で死亡例はなく、神経脱落症状も見られなかった。抗CGRP血清投与後の動物は、SAH後二日目以降も活動度の低下を認め、6日目の時点で死亡例はなく局所の神経脱落症状も見られなかったが、活動性は乏しかった。

Table 3. 抗血清による除神経術を行なった二群と対照群の生理学的指標

Group	Time points				
	MABP (mmHg)	pH	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)	Ht (%)
対照群 (N=7)					
control	128±5	7.34±0.00	161± 2	33.1±0.5	
post i.th.	133±2	7.37±0.02	163± 0	32.8±0.3	
10 min	128±5	7.37±0.02	163± 0	32.8±0.3	
6 days	130±7	7.37±0.02	186± 11	32.2±1.2	
CBF	130±4	7.32±0.00	123± 6	32.9±0.8	38.5±0.4
抗SP血清投与群 (N=4)					
control	133±5	7.39±0.01	146± 10	34.3±0.7	
post i.th.	130±5	7.34±0.03	132± 18	33.5±0.6	
10 min	131±4	7.36±0.03	152± 17	33.6±0.5	
6 days	134±4	7.37±0.02	144± 16	33.4±0.9	
CBF	124±7	7.35±0.01	136± 10	33.3±0.2	36.3±3.0
抗CGRP血清投与群 (N=4)					
control	118±7	7.37±0.03	124± 4	31.8±0.4	
post i.th.	119±4	7.35±0.02	123± 6	31.0±0.5	
10 min	125±4	7.33±0.03	134± 8	31.7±2.0	
6 days	116±9	7.38±0.01	139± 12	33.2±0.7	
CBF	119±10	7.39±0.01	138± 9	32.5±0.3	35.3±2.0

Values are mean ± SEM

post i.th.; 45 minutes after globulin injection

10 min; 10 minutes after SAH

6 days; 6 days after SAH

CBF: cerebral blood flow

SPの抗血清 0.5 ml 髄腔内投与は右内頸動脈および脳底動脈の血管径に何ら変化を起していない(Fig.6 左)のに対して、CGRPの抗血清は軽度ながら有意の血管収縮を示していた(Fig.6 右, * $p < 0.05$)。SAH作成後も連日これらの抗血清投与を続けた結果、SPの抗血清はサルでacuteおよびlate spasmを有意に抑制ないし軽減した(Fig.6 左, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。しかしCGRPの抗血清は、血管撮影上の脳血管攣縮の程度は対照群と同様であった(Fig.6 右)。

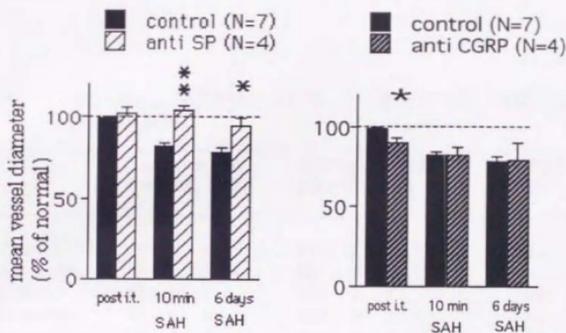


Figure. 6 抗血清による除神経術を行なった二群と対照群の抗血清投与後、颅膜下出血前後の両側腋窩動脈撮影で得られた内頸動脈・中大脳動脈・脳底動脈の狭窄率(左が抗SP血清投与群、右が抗CGRP血清投与群)。Values are means \pm S.E.M., * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

抗SP血清投与群のSAH 6日目の脳血流量を対照SAH群と比較すると、全般的に25%以上の増加を示していた。測定した12領域のうちの5領域、すなわち前頭葉、側頭葉、後頭葉、尾状核および視床下部では、その増加は有意であった (Table 4, $p < 0.05$)。脳幹部の脳血流は対照群と比較して大きく増加しているが、値が分散しており有意差は得られなかった。

抗CGRP血清投与群のSAH 6日目の脳血流量は、皮質、基底核では対照SAH群と差が見られなかった。脳幹部の脳血流は、抗SP血清投与群と同様に対照群と比較して大きく増加しているが、これも値が分散しており有意差は得られなかった (Table 4)。

Table 4 抗血清による除神経術を行なった二群と対照群の脳膜下出血後の脳血流 (ml/100g/min)。

REGION	SAH+SERUM (M \pm SE, N=7)	抗SP血清投与群 (M \pm SE, N=4)	抗CGRP血清投与群 (M \pm SE, N=4)
Frontal cortex	81 \pm 6	111 \pm 6 *	76 \pm 7
Temporal cortex	71 \pm 6	91 \pm 2 *	62 \pm 11
Parietal cortex	81 \pm 7	100 \pm 7	69 \pm 8
Caudate nucleus	82 \pm 6	107 \pm 7 *	80 \pm 7
Putamen	85 \pm 7	119 \pm 8	95 \pm 10
Thalamus	79 \pm 10	93 \pm 4	97 \pm 9
Hypothalamus	67 \pm 6	92 \pm 4 *	68 \pm 5
Cerebellar cortex	68 \pm 4	88 \pm 9	70 \pm 5
Occipital cortex	67 \pm 7	96 \pm 5 *	53 \pm 12
Trigeminal nucleus	93 \pm 11	117 \pm 17	116 \pm 15
Olive	90 \pm 11	167 \pm 19	139 \pm 17
Inferior colliculus	125 \pm 14	224 \pm 15	188 \pm 25

抗SP血清投与群において、対照脳膜下出血群と比べて以下の領域で優位な血流増加が認められた。

Frontal cortex	(F(2,13)=5.77, $p < 0.05$)、
Temporal cortex	(F(2,13)=3.81, $p < 0.05$)、
Occipital cortex	(F(2,13)=4.88, $p < 0.05$)、
Caudate nucleus	(F(2,13)=3.81, $p < 0.05$)、
Hypothalamus	(F(2,13)=5.07, $p < 0.05$)。

* $p < 0.05$

d. 考察

本研究では脳循環の神経性調節機構、なかでも中枢性ノルアドレナリン系細胞群と知覚神経の両者が脳血管攣縮発生に深く関与しているとの仮説に立って、知覚神経、特にその伝達物質であるSPとCGRPの役割を、外科的除神経術と免疫学的除神経術が脳血管径と脳血流に及ぼす影響を評価することにより、これを実験的に検証した。

(1) 外科的除神経術

外科的除神経術で明らかとなった事実は、三叉神経は吻側頭蓋内動脈に対して同側性かつ末梢性に脳血管径の調節に関与していることである。一側の三叉神経の節前切断、すなわち脳血管周囲の神経とその細胞体とは連続しているが中枢との結合が遮断された状態では(Fig.7 右)、その除神経術自身は血管径に変化を見せず、脳血管攣縮の経過も対照群と比べ差は見られなかった。これに対して、節後切断、すなわち脳血管周囲の神経とその細胞体との結合が遮断された状態では(Fig.7 左)、その除神経術自身で脳血管は著明に収縮し(Fig.5 右)、SAH後の脳血管攣縮も有意に増強された。

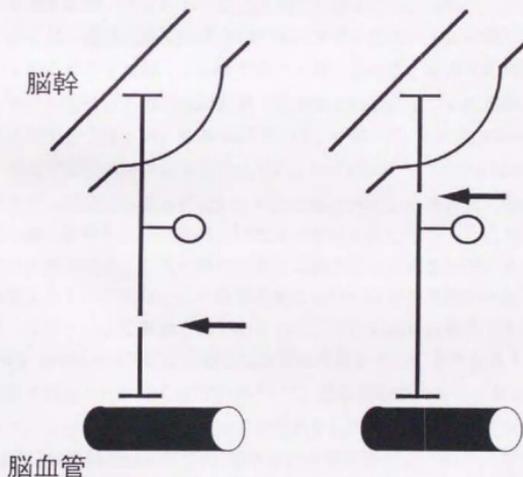


Figure 7 節後切断 (左) と節前切断 (右) の模式図

三叉神経Gasserian神経節はSPおよびCGRPを含有し、その神経支配を同側テント上の脳主幹動脈に投射することがネコ、ラット、モルモット、サルなどで形態的に確認されている^{17, 19, 20}。Ruskellらは⁷¹、電顕を用いた形態的研究でアカゲザルにおいて三叉神経の第一枝と第二枝から同側の内頸動脈と脳底動脈へ至る走行を明らかにし、Hardebo³²らは、トレーサーを用いた免疫組織学的検討より、リスザルにおける脳血管の知覚神経支配が吻側内頸動脈系の分枝は同側三叉神経の主として第一枝から由来し、一部は第二枝から由来することを明らかにした(Fig. 1)。三叉神経は形態的には偽双極性細胞であり、細胞体から出た一本の軸索は直ちに二本に別れて一方は末梢側の効果器へ、他方は中枢側(脳幹)へ向かうため、Gasserian神経節の筋後切断により脳血管周囲の軸索の変性が惹起されることになる(Fig. 7 左)。これに対して筋前切断の場合には、末梢側軸索分枝を含む神経節細胞は障害されておらず、末梢側軸索末端からのトランスマッターの分泌は可能な状況と推測できる(Fig. 7 右)⁴⁴。

末梢性感覚神経の神経根切断後の神経節細胞の機能と末梢側軸索分枝の機能についてはすでにLewisが軸索反射として報告している⁵¹。本研究で得られた外科的除神経術自身の血管径に及ぼす影響、すなわち一側三叉神経筋後切断で、同側に有意の狭窄(親血管の27%)が生じ、筋前切断ではまったく変化が見られなかった事実は、少なくとも三叉神経の軸索反射の存在を裏付ける証拠であると考えられる。本研究の実験結果はTsai⁸⁹らの報告、すなわちラットの三叉神経第一枝切断10日後に生じた組織標本で確認した脳血管の同程度の狭窄と一致する。なお本研究では、in vivoで、しかもprimateを用いてこれを確認している点で類似の報告は見当たらない。McCulloch⁵⁴、およびMoskowitz⁶¹らは、ネコで一側の三叉神経筋前切断を行ない、その効果を14ないし20日後に頭蓋開窓法にて観察して、脳表の軟膜動脈および小動脈にはなんの変化も生じなかったことを報告している。また以上の実験結果は、三叉神経が同側に脳血管の拡張を維持するように作用していることを示唆するものであり、この血管運動性の作用は血管周囲の神経末端から分泌されるトランスマッターにより調節されているものと考えるのが合理的である。三叉神経にはCGRPやSP、neurokinin Aなどの強力な血管拡張能を有したトランスマッターが存在し、合成、分泌されることが知られている^{17, 58}。筋後切断後に生じた血管径の減少は、これらのトランスマッターあるいは未知の物質の分泌障害や枯渇により惹起されたものである。本研究では外科的除神経術の2週間後に血管造影およびSAH作成を行なった。この時間経過は三叉神経切除後にそのトランスマッターの有意な減少が確認されている既報(ネコで10日⁸⁹、ラットで14ないし20日^{58, 61})と一致するものである。

ほかに、末梢性の反射が脳血管の血管径調節を行ないうる機序として考えられるのは、三叉神経と他の自律神経系、特に翼口蓋神経節や上位頸椎後根神経節を介するものである

82。ラットでは翼口蓋神経節由来の脳血管血管拡張性神経 (NOを含む) の存在が指摘されているが、リスザルの大浅錐体神経はGasserian神経節の腹側では骨性の隔壁でへだてられており、本研究ではこれは温存されている。また、三叉神経の節前あるいは節後切断に起因する中枢への影響も考慮されねばならない。これについての報告は今までに見られないが、脊髄後根では、Folkow²⁴ や Frumin²⁶ らが後根切断に起因する中枢神経系經由の血管拡張の可能性を調べ、その存在を否定している。

SAH後の血管狭窄すなわち脳血管攣縮が、節後切断群において切断側が健側より強度であったのも、おそらくは血管拡張性トランスミッターの分泌障害に起因するものであろう。節前切断群と節後切断群について切断側間相互を比較すると、除神経術後とはもとより、SAH後も血管径の相違は大きくなっており、その説明としても節後切断群で血管拡張性トランスミッターの分泌障害が持続していると考えるのが妥当である。見方を変えれば、軸索反射はSAH後の脳血管攣縮を軽減する方向に作用しているとも言える。

(2) 免疫学的除神経術

抗血清髄腔内投与による免疫学的除神経術で明らかとなった事実は、同じく脳血管拡張作用を有するSPとCGRPが、脳血管径と脳循環調節において異なった機序で機能していることである。すなわち抗SP血清の髄腔内投与は血管径に何ら変化を起こさないが、抗CGRP血清は有意の血管収縮を惹起し、またSAH作成後の抗血清の連日投与により、抗SP血清は脳血管攣縮と脳血流低下を有意に抑制ないし軽減したが、抗CGRP血清にはその働きは見られなかった。この実験結果から知覚神経伝達物質の脳血管攣縮への関与について以下のごとき推論を行った。すなわち、SPはSAHを侵害刺激としてとらえ、知覚神経を介してその情報を脳幹内の血管運動中枢に伝達する際のトランスミッターとして作用している。またCGRPは知覚神経の末梢側軸索で脳血管の血管径調節に関与している軸索反射をつかさどるトランスミッターと推定できる(Fig. 8)。

抗血清投与により除神経を行う方法は、神経ペプチドに対する抗体を用いた受動免疫によりその信号伝達が阻止できるため現在でも広く行なわれている。本研究でも、SPとCGRPに対する抗体を作成したが、その際には他の血清成分による非特異的反応や生物学的な副作用を可及的に排除するように配慮した。抗体の作用にはいくつかの異なる機序が考えられ⁸⁷、理論的には抗体は、標的となるペプチドに対して分泌部位から作用部位にいたる細胞外腔ではどこでも結合しうる。神経情報の伝達はミリ秒の単位であるが、ペプチド性の内分泌学的な信号伝達は秒以上の単位で行なわれるため⁸⁷、神経ペプチドに対する抗体は、まず細胞膜ないしシナプス間隙内のレセプターに結合するか、あるいは神経細胞内に侵入して神経機構を破壊して作用を発揮するとされている⁸⁷。

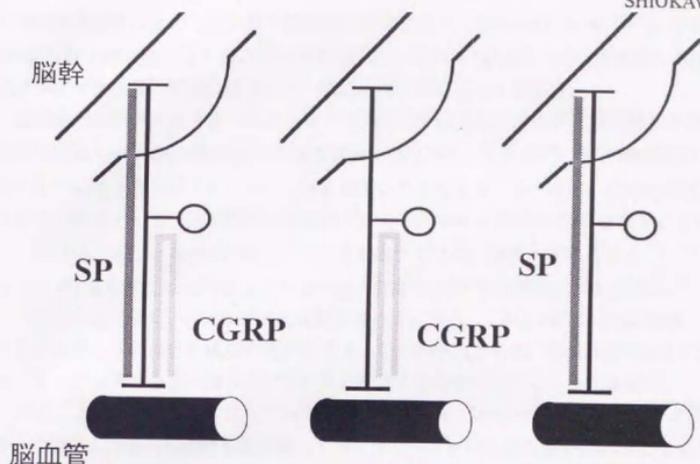


Figure 8 抗血清投与による除神経術の模式図。左が正常、中央が抗SP血清投与、右が抗CGRP血清投与により想定される知覚神経の除神経

形態的な知見と生理、薬理学的検討から、SPが直接に脳血管周囲の知覚神経終末部で血管運動を調節しているとは考えにくいと思われる。血管内皮依存性の弛緩作用を有するSPを含む神経終末は主に血管外膜に位置しており、SPが内皮に到達するには相対的に長い距離を拡散する必要がある^{53, 62}。静脈内投与されたSPは内頸動脈の血流にはほとんど影響せず、また髄腔内投与されたSPアゴニストも脳や脊髄の血流を変化させないことが知られている^{33, 77}。多くの種で、SPには大動脈の弛緩作用があり、小動脈や穿通枝にも軽度ながら拡張効果がみられるが、SPの脳血管に対する作用はほとんど知られていない^{21, 31, 45}。

脳血管を支配する三叉神経線維にはCGRPやSP、neurokinin Aなどの共存が知られている。CGRP陽性線維はすべてのSP陽性線維に認められるが、逆にCGRP陽性線維の約20%にはSP陽性線維は検出されず、量的にはSPと比較してCGRP優位と考えられる^{32, 58, 65}。更に、脳血管を支配する三叉神経のニューロンは他の部位を支配するニューロンよりもCGRP含有量が2ないし3倍となっている⁶⁵。CGRPは多くの神経ペプチドの中でin vitroでもin situでも最も強力な脳血管の拡張作用を有し^{17, 58, 59}、この血管拡張はCGRPに特異的なレセプターの活性化による内皮非依存性の弛緩である^{31, 90}。CGRPの動脈内ある

いは静脈内投与により心拍出量や脳血流を増加することが示されている^{36,76}。本研究では抗CGRP血清投与により有意な血管狭窄が生じたが、これはCGRPが脳血管に持続的に分泌されて血管径の調節に関与していることを示唆するものである。

軸索反射に関与するトランスミッターは現時点では不明であるが、抗SP血清やSPの拮抗剤である spantide の髄腔内投与が血管収縮をきたさないことは¹⁴、SPが軸索反射を引き起こしているトランスミッターとは考えにくいことを示唆する(Fig. 7)。この仮説を支持する他の所見として、知覚神経の神経毒である capsaicin は選択的にSPを含有するニューロンを破壊するが、capsaicin投与では血管収縮が生じない事実が挙げられる^{14,38}。このように(1)脳血管には他臓器よりも相対的に豊富なCGRP含有神経の支配がある、(2)capsaicin投与後もCGRP含有神経は障害されずに残る、(3)CGRPは既知の神経ペプチドの中では最も強力な血管拡張作用を有する、などの事実からは、軸索反射において機能しているトランスミッターはCGRPであると推定するのが合理的である(Fig. 8)。

SAHによりクモ膜下腔のカリウムやフリーラジカル、bradykininなどの濃度が上昇するが、これらは神経のC線維を脱分極しトランスミッター分泌を促進する因子となる^{4,5,94}。既にLinnikらは⁵²、SAH後にGasserian神経節内においてSP含有量が増加すること、同時にSP前駆体である preprotachykininのmRNAも増加していることを実験的に見いだした。免疫組織学的検索では、SAH後に脳血管周囲の知覚神経内のSPは消失することが知られている⁹¹。これらの事実、すなわちSPが軸索末端の血管周囲では消失しているものの神経節内での含有量はむしろ増加していることは、SAHによる血管周囲神経の破壊によるSPの枯渇よりも、SAHによりSP代謝の亢進が生じたことを示唆している。SP含有神経を選択的に破壊するcapsaicinがラットの脳血管攣縮を予防し¹⁴、SPの拮抗剤である spantide の髄腔内投与によりラット¹⁴で脳血管攣縮が予防された事実は、SPがSAHによる侵害刺激を知覚神経を介して脳幹に伝達するトランスミッターとして機能していると考えて矛盾しない。本研究で得られた知見すなわち、抗SP血清自身は血管径に影響を与えないが、SAH後の脳血管攣縮を抑制し同時にその際にみられる脳血流低下も防止した事実は、この仮説をさらに支持するものである。

CGRPについても、SAH後に脳血管周囲の含有量は減少し^{22,63}、外頸静脈中のCGRPはSAH患者において増加することが報告されている⁴⁰。この事実もSAHによりCGRP代謝の亢進が生じたことを示唆していると解釈することができる。これは軸索反射がSAH後の脳血管攣縮に対して阻的方向に機能しているとする本研究の結果と一致する。

Johnstonらは³⁹、SAH患者においてCGRPの持続静脈内投与により患者の神経症状が有意に改善したことを報告し、その臨床応用の可能性を指摘している。

冒頭で記したように、脳血管攣縮が血管撮影上あるいは臨床的に出現するのは多くの因

子の影響を受けている。これを脳血管の知覚神経の関与の面から見れば、脳血管攣縮を促進的に働くSPと阻止的に作用するCGRPの両者による支配が影響しているためと考えられる。SPの関与した血管運動中枢を介した脳血管攣縮発生を抑制するためには、知覚神経の求心路を遮断する必要がある。本研究における一側三叉神経の節前切断では、少なくとも反対側の三叉神経や上位頸髄後根由来の知覚神経は残存しており、中枢への連絡遮断という観点からは明らかに不完全である。capsaicin投与は、両側の節前切断に近似するものと考えられるが、リスザルにおいてはその両者とも、動物に対する侵襲性から倫理委員会から許可が得られず行なえなかった。脳血管攣縮研究の大きな障壁であった種差の問題を克服するため、本研究ではリスザルのSAHモデルを用いたが、同様に倫理的理由からシャム動物の作成数にも制約を受けた。

e. まとめ

(1) 本研究では脳循環の神経性調節機構、特に中枢性ノルアドレナリン系細胞群と知覚神経の両者が脳血管攣縮発生に深く関与しているとの仮説^{84, 85, 86}に立って、知覚神経伝達物質であるSPとCGRPの役割を実験的に検証した。

(2) 脳血管反応性における種差の問題は従来の脳血管攣縮における大きな障壁であった。これを克服するため本研究で用いたリスザルSAHモデルでは、ヒトの臨床例に近い脳血管攣縮を高い再現性で得られるほか (Fig.2, 3, Table 1)^{15, 16}、リスザルの三叉神経節や脳血管、脳幹内のSPやCGRP含有繊維の局在が明らかにされている (Fig.1)³¹。三叉神経切断や抗血清投与による除神経術の影響が上記(1)の仮説のなかでどのように解釈できるかを検討するのに適しているものと考えられた。

(3) 三叉神経節後切断により同側性に有意な血管狭窄が生じ (Fig.5右)、かつCGRP抗血清投与でも有意な血管径狭小化を呈した (Fig.6右)ことは、脳血管知覚神経が脳血管径の調節に関与していることを示している。この機構にはCGRPが関与しており、その脳血管近傍での放出は軸索反射様の機構によると考えるのが最も合理的である (Figure 7,8)。この軸索反射はSAH後の脳血管攣縮を軽減する方向に作用している。

(4) SP抗血清投与により、脳血管径は影響を受けないにもかかわらずSAH後の脳血管攣縮発生を阻止し (Fig.6左)、脳血流低下も抑制することが示された (Table 4)。この結果よりSPは脳血管運動中枢への求心路に関与していることが示唆される (Figure 7,8)。これは本研究の背景で記したラットのSAHモデルで得られた仮説、すなわちSPの機能を遮断することによって中枢性ノルアドレナリン系への入力が遮断され、結果として脳血管攣縮を抑制するとした考えと矛盾しない。

(5) 中枢性ノルアドレナリン系の出力路のひとつは視床下部一下垂体系であることが報告されており¹³、本研究によりSAH後の脳血管攣縮・循環障害における脳血管知覚神経の役割が明確にされた。

REFERENCES

1. Arbab MAR, Wiklund L, Svendgaard NAa: 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.
2. Arbab MAR, Delgado T, Wiklund L, Svendgaard NAa: Brainstem terminations of the trigeminal and upper spinal ganglia innervation of the cerebrovascular system: WGA-HRP transganglionic study. *J Cereb Blood Flow Metab* 8: 54-63, 1988.
3. Arbab MAR, Delgado-Zygmund TJ, Shiokawa Y, Svendgaard NAa: Central terminations of the innervation to the middle cerebral artery in primates. WGA-HRP study. *Acta Neurochirurgica* 119:104-110, 1992
4. Armstrong D: Pain. *Handb Exp Pharmacol* 25: 434-481, 1970.
5. Asano T, Tanishima T, Sasaki T, Sano K: Possible participation of free radical reactions initiated by clots lysis in the pathogenesis of vasospasm after subarachnoid hemorrhage., in Willkins R. H. (ed): *Cerebral Arterial Spasm*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1980, pp190-201.
6. Bergland RM, Page RB: Can the pituitary secrete directly to the brain ? (Affirmative anatomical evidence). *Endocrinology* 102: 1325-1338, 1978.
7. Brizzee KR, Dunlap WP: Local brainstem glucose utilization in the squirrel monkey. *Brain Research Bulletin* 19: 191-194, 1987.
8. Cardoso ER, Peterson EW: Pituitary apoplexy and vasospasm. *Surg Neurol* 20: 391-395, 1983.
9. Cole AJ, Aube M: Migraine with vasospasm and delayed intracerebral hemorrhage. *Arch Neurol* 47: 53-56, 1990.
10. Coon AH, Leduc EH, Connolly JM: Studies on antibody production. I: A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. *J Exp Med* 102: 49-60, 1955.
11. Cruickshank JM, Neil-Dwyer G, Brice J: Electrocardiographic changes and their prognostic significance in subarachnoid hemorrhage. *J Neurol Neurosurg Psych* 37: 755-759, 1974.
12. Dahlstrom A, Fuxe K: Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central system. I. Demonstrations of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand* 62 (suppl 232): 1-55, 1964
13. Delgado TJ, Arbab MAR, Warberg J, Svendgaard NA: The role of vasopressin in acute cerebral vasospasm. Effect on spasm of a vasopressin antagonist or vasopressin antiserum. *J Neurosurg* 68:266-273, 1988

14. Delgado-Zygmunt TJ, Arbab MAR, Edvinsson L, Ingar J, Svendgaard NA: Prevention of cerebral vasospasm by depletion of sensory nerves to the brain vessels with capsaicin or treatment with a substance P antagonist in rats. *J Neurosurg* 72: 917-925, 1990.
15. Delgado-Zygmunt TJ, Arbab MAR, Shiokawa Y, Svendgaard NA: A primate model for acute and late cerebral vasospasm. Angiographical findings. *Acta Neurochirurgica* 118;130-136, 1992.
16. Delgado-Zygmunt TJ., Arbab MAR., Shiokawa Y., Svendgaard NA.: Cerebral blood flow and glucose metabolism studies during the late phase of cerebral vasospasm in the squirrel monkey. *Acta Neurochirurgica*. 121:166-173, 1993
17. Edvinsson L, McCulloch J, Uddman R: Substance P: immunohistochemical localization and effect upon cat pial arteries in vitro and in situ. *J Physiol (Lond)* 318: 251-258, 1981
18. Edvinsson L, Egund N, Owman C, Sahlin C, Svendgaard NA: Reduced noradrenalin uptake and retention in cerebrovascular nerves associated with angiographically visible vasoconstriction following experimental subarachnoid hemorrhage in rabbits. *Brain Res Bull*. 9: 799-805, 1982.
19. Edvinsson L, McCulloch J, Kingman TA, Uddman R: On the functional role of the trigemino-cerebrovascular system in the regulation of cerebral circulation, in Owman C. and Hardebo J. E. (ed): *Neural Regulation of Brain Circulation*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B,V, 1986, pp407-418.
20. Edvinsson L, Ekman R, Jansen I, McCulloch J, Uddman R: Calcitonin gene related peptide and cerebral blood vessels: distribution and vasomotor effects. *J Cereb Blood Flow Metab* 7: 720-728, 1987
21. Edvinsson L, Mackenzie ET, McCulloch J, Uddman R: Nerve supply and receptor mechanism in intra- and extracerebral blood vessels., in Olsen J. and Edvinsson L. (ed): *Basic mechanisms of headache*. 1988, pp127-144.
22. Edvinsson L, Ekman R, Jansen I, Kingman TA, McCulloch J, Uddman R: Reduced levels of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in human brain vessels after subarachnoid hemorrhage. *Neurosci Lett* 121: 151-154, 1991.
23. Fisher CM, Kistler JP, Davis JM: Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualized by computerized tomographic scanning. *Neurosurg* 6: 1-9, 1980.
24. Folkow B, Ström G, Uvnäs B: Dorsal roots fibers convey centrally induced vasodilator impulses ? *Acta Physiol Scand* 21: 2-3, 1950.
25. Fraser R, Stein BM, Barrett RE, Pool JL: Noradrenergic mediation of experimental cerebrovascular spasm. *Stroke* 1: 214-218, 1970.
26. Frumin J, Nagei SH, Wang SC: Evaluation of vasodilator mechanism in the canine hind leg; Question of dorsal root participation. *Am J Physiol* 173: 428-436, 1953.

27. Furchgott RF: Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Cir Res* 53: 557-573, 1983
28. Gabrielson TO, Greitz T: Normal size of the internal carotid, middle cerebral and anterior cerebral arteries. *Acta Radiol (Diagn)* 10: 1-10, 1970.
29. Gjedde A, Hansen AJ, Siemkowicz E: Rapid simultaneous determination of regional blood flow and blood-brain glucose transfer in brain of rat. *Acta Physiol Scand* 108: 321-330, 1980.
30. Grubb RL, Raichle ME, Eichling JO: Effects of subarachnoid hemorrhage on cerebral blood volume, blood flow and oxygen utilization in humans. *J Neurosurg* 46: 446-453, 1977.
31. Hardebo JE: Segmental pharmacology within the cerebrovascular tree., in Seylaz J. and Sercomb R. (ed): *Neurotransmission and cerebrovascular function*. Amsterdam, The Netherlands, Elsevier Science Publisher, 1989, pp193-210.
32. Hardebo JE, Arbab MAR, Suzuki N, Svendgaard NA: Origins and pathways of cerebrovascular parasympathetic and sensory nerves in monkey. *Stroke* 22:331-342, 1991
33. Helke CJ, Phillips ET, O'Neill JT: Regional peripheral and CNS hemodynamic effects of intrathecal administration of a substance P receptor agonist. *J Auton Nerv Syst* 21: 1-7, 1987.
34. Hilt DC, Buchholz D, Krumholz A, Weiss H, Wolinsky J: Herpes zoster ophthalmicus and delayed contralateral hemiparesis caused by cerebral angitis: diagnosis and management approaches. *Ann Neurol* 14: 543-553, 1983.
35. Holst JJ, Bersani M: *Methods in Neuroscience*, in Conn M. (ed): Academic Press, 1991, pp3-22.
36. Ikegaki I, Suzuki Y, Satoh S, Asano T, Shibuya M, Sugita K: Effect of calcitonin gene-related peptide on canine cerebral artery strips and the in-vivo vertebral blood flow in dogs. *Arch Pharmacol* 340: 431-436, 1989.
37. Ingall TJ, Whisnant JP, Wiebers DO, O'Fallon WM: Has there been a decline in subarachnoid hemorrhage mortality. *Stroke* 20: 718-724, 1989.
38. Jancso N, Jancso-Gabor A, Szolcsanyi J: Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemother* 31: 138-151, 1967.
39. Johnston, Bell BA, Robertson IJA, Miller JD, Haliburton C, O'Shaughnessy D, Riddell AJ, O'Laoire SA: Effect of calcitonin gene-related peptide on postoperative neurological deficits after subarachnoid hemorrhage. *Lancet* 335(8694):869-872, 1990.
40. Juul R, Edvinsson L, Gisvold SE, Ekman R, Brubakk AO, Fredriksen TA: Calcitonin gene-related peptide-LI in subarachnoid hemorrhage in man. *Signs of*

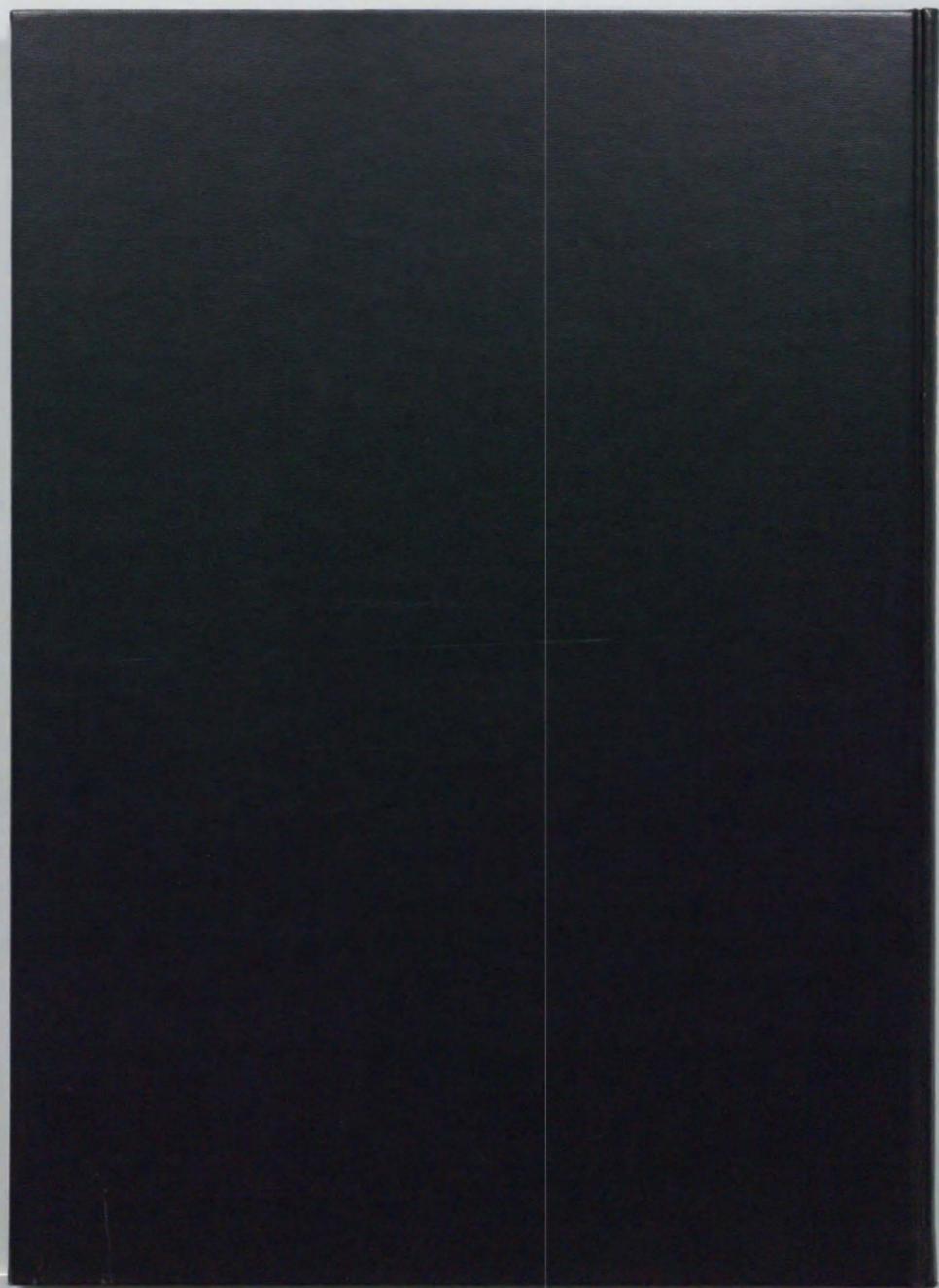
- activation of the trigemino-cerebrovascular system? Br J Neurosurg 4: 171-180, 1990.
41. Kassell NF, Sasaki T, Colohan ART, Nazar G: Cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Stroke 16: 562-572, 1985.
 42. Kassell NF, Torner JC, Halley EC, Jane JA, Adams HP, Kongable GL, Participants: The International Cooperative Study on the Timing of Aneurysm Surgery. Part 1: Overall management results. J Neurosurg 73: 18-36, 1990.
 43. Kim P, Lorenz RR, Sundt TM, Vanhoutte PM: Release of endothelium-derived factor after subarachnoid hemorrhage. J Neurosurg 70:108-114, 1989
 44. Kim P, Schini VB, Sundt TM, Vanhoutte PM: Reduced production of cGMP underlies the loss of endothelium-dependent relaxations in the canine basilar artery after subarachnoid hemorrhage. Cir Res 70:248-256, 1992
 45. Klugman KP, Lembeck F, Markowitz S, Mitchell G, Rosendorff C: Substance P increases hypothalamic blood flow via an indirect adrenergic-cholinergic interaction. Br J Pharmacol 71: 623-629, 1980.
 46. Knigge KM, Joseph SA, Sladek JR, al e: Uptake and transport activity of the median eminence of the hypothalamus. Int Rev Cytol 45: 383-408, 1976.
 47. Kodama N, Hori S, Kamiyama K: Cervical sympathectomy for cerebral vasospasm after aneurysm rupture, in Wilkins R. (ed): *Cerebral Arterial Spasm*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1980, pp680-684.
 48. Lambert GA, Bogduk N, Goadsby PJ, Duckworth JW, Lance JW: Decreased carotid arterial resistance in cats in response to trigeminal stimulation. J Neurosurg 61: 307-315, 1984.
 49. Leeds NE, Goldberg HI: Angiographic manifestations in cerebral inflammatory disease. Radiology 98: 595-604, 1971.
 50. Lembeck F, Gamse R: Substance P in peripheral sensory processes., in (ed): *Substance P in the nervous system*. London, Pitman, 1982, pp 35-54.
 51. Lewis T: The nocifensor system of nerves and its reactions. Br Med J 27: 430-435, 1937.
 52. Linnik MD, Sakas DE, Uhl GR, Moskowitz MA: Subarachnoid blood and headache: Altered trigeminal tachykinin gene expression. Ann Neurol 25: 179-184, 1989.
 53. Liu-Chen LY, Liszczak TM, King JC, Moskowitz MA: Immunoelectron microscopic study of substance P-containing fibers in feline arteries. Brain Res 369: 12-20, 1986.
 54. Liu-Chen LY, Mayberg MR, Moskowitz MA: Immunohistochemical evidence for a substance P-containing trigeminovascular pathway to pial arteries in cats. Brain Res 268: 162-166, 1983.

55. Lyons EL, Leeds NE: The angiographic demonstration of arterial vascular disease in purulent meningitis: Report of a case. *Radiology* 88: 935-938, 1967.
56. Mawk JR, Ausman JJ, Erickson DL, Maxwell RE: Vasospasm following transcranial removal of large pituitary adenoma. Report of three cases. *J Neurosurg* 50: 229-232, 1979.
57. Mayberg MR, Zervas NT, Moskowitz MA: Trigeminal projections to supratentorial pial and dural blood vessels in cats demonstrated by horseradish peroxidase histochemistry. *J Comp Neurol* 23: 46-56, 1984.
58. McCulloch J, Uddman R, Kingman T, Edvinsson L: Calcitonin gene-related peptide: Functional role in cerebrovascular regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 5731-5735, 1986.
59. Meija JA, Pernow J, Holst H, Rudehill A, Lundberg JM: Effects of neuropeptide Y, calcitonin gene-related peptide, substance P and capsaicin on cerebral arteries in man and animals. *J Neurosurg* 69: 913-918, 1988.
60. Minegishi A, Ishizaki T, Yoshida Y, Ahagon A, Shibata N, Kobayashi H: Plasma monoamine metabolites and catecholamines in subarachnoid hemorrhage. Clinical implications. *Arch Neurol* 44: 423-428, 1987.
61. Moskowitz M, Wel EP, Saito K, Kontos HA: Trigeminalectomy modifies pial arterial responses to hypertension or norepinephrine. *Am J Physiol* 255: H1-H6, 1988.
62. Nakakita N: Peptidergic innervation in the cerebral blood vessels of the guinea pig: an immunohistochemical study. *J Cereb Blood Flow Metab* 10: 819-826, 1990.
63. Nozaki K, Kikuchi H, Mizuno N: Changes of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in cerebrovascular nerve fibers in the dog after experimentally produced subarachnoid hemorrhage. *Neurosci Lett* 102: 27-32, 1989.
64. Owman C: Neurogenic control of the vascular system: focus on cerebral circulation, in Mountcastle V. B., Bloom F. E. and Geiger S. R. (ed): *Handbook of Physiology*. Bethesda MD, American Physiological Society, 1986, pp525-580.
65. O'connor TP, Kooy DVd: Enrichment of a vasoactive neuropeptide (calcitonin gene-related peptide) in the trigeminal sensory projection to the intracranial arteries. *J Neurosci* 8: 2468-2476, 1988.
66. Pasqualin A, Vivenza C, Rosta L, Licata C, Cavazzani P, Dapian R: Cerebral vasospasm after head injury. *Neurosurg* 15: 855-858, 1984.
67. Peerless SJ, Yasargil MG: Adrenergic innervation of the cerebral vessels in the rabbit. *J Neurosurg* 35: 148-154, 1971.
68. Phillips LH, Whisnant JP, O'Fallon WM, T M Sundt J: The unchanged pattern of subarachnoid hemorrhage in a community. *Neurology* 30: 1034-1040, 1980.
69. Ray BS, Wolff HG: Experimental studies on headache, pain-sensitive structures of the head and their significance in headache. *Arch Surg* 41: 813-856, 1940.

70. Reis DJ, Iadecola C: Central neurogenic regulation of cerebral blood flow, in Seylaz J. and Sercombe R. (ed): *Neurotransmission and cerebrovascular function*. Amsterdam, New York, Oxford, Excerpta Medica, 1989, pp369-390.
71. Ruskel GL, Simons T: Trigeminal nerve pathways to the cerebral arteries in monkey. *J Anat* 155: 23-37, 1987.
72. Saito I, Ueda Y, Sano K: Significance of vasospasm in the treatment of ruptured intracranial aneurysms. *J Neurosurg* 47: 412-429, 1977.
73. Saito I, Shigeno T, Aritake K: Vasospasm assessed by angiography and computerized tomography. *J Neurosurg* 51: 466-475, 1979.
74. Sakas DE, Moskowitz MA, Wei EP, Kontos HA, Kano M, Oglibly CS: Trigeminovascular fibers increase blood flow in cortical gray matter by an axon reflex-like mechanism during acute severe hypertension or seizures. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1401-1405, 1989.
75. Sakurada O, Kennedy C, Jehle J, Brown JD, Carbin GL, Sokoloff L: Measurement of local cerebral blood flow with iodo ¹⁴C antipyrine. *Amer J Appl Physiol* 234: H59-H66, 1978.
76. Salmon P, Fitzgerald D, Lambe R: A single rising intravenous dose tolerance and pharmacodynamic study of human calcitonin gene related peptide (CGRP) in healthy male volunteers. *Clin Pharmacol Therapeutics* 45: 170, 1989.
77. Samnegard H, Thulin L, Tyden G, Johansson C, Muhrbeck O, Bjorklund C: Effect of synthetic substance P on internal carotid artery blood flow in man. *Acta Physiol Scand* 104: 491-495, 1978.
78. Sasaki T, Kassell NF, Yamashita M: Barrier disruption in the major cerebral arteries following experimental subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 63: 433-440, 1985.
79. Schmidt P, Poulsen SS, Rasmussen TN, Bersani M, Holst JJ: Substance P and Neurokinin A are co-distributed and co-localized in the porcine gastrointestinal tract. *Peptides* 12(5):963-973, 1991
80. Solomon RA, Fink ME: Current strategies for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Arch Neurol* 44: 769-774, 1987.
81. Suzuki N, Hardebo JE, Owman C: Origins and pathways of cerebrovascular nerves storing substance P and calcitonin gene related peptide in rat. *Neuroscience* 31: 427-438, 1989.
82. Suzuki N, Hardebo JE, Kährström J, Owman C: Selective electrical stimulation of postganglionic cerebrovascular parasympathetic fibers originating from the sphenoparotid ganglion enhances cortical blood flow in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 10: 383-391, 1990.

83. Suzuki N, Fukuuchi Y, Koto A, Naganuma Y, Isozumi K, Matsuda S, Gotoh J, Shimizu T: Cerebrovascular NADPH diaphorase-containing nerve fibers in the rat. *Neurosci Lett* 151:1-3, 1993
84. Svendgaard NAa, Arbab MAR, Delgado TJ: Effect of selective lesions of medullary catecholamine nuclei on experimental cerebral vasospasm in the rat. *J Cereb Blood Flow Metabol* 7: 21-28, 1987.
85. Svendgaard NAa, Brismar J, Delgado TJ, Rosengren E: The effect on the development of cerebral vasospasm in the rat of lesioning of the peripheral and central catecholamine systems. *Neuro Res* 7: 30-34, 1985.
86. Svendgaard NAa, Delgado TJ, Brun A: Effect of selective lesions in the hypothalamic-pituitary region on the development of cerebral vasospasm following an experimental subarachnid hemorrhage in the rat. *J Cereb Blood Flow Metabol* 7: 650-657, 1986.
87. Tilder FJH, van-Oers J, White A, Menzaghi F, Burlet A: Antibodies to neuropeptides. Biological effects and mechanism of action., in Porter J. C. and Jezova D. (ed): *Circulating regulatory factors and neuroendocrine function*. New York, Plenum press, 1990, pp135-146.
88. Toda N, Ayajiki K, Yoshida K: Impairment by damage of pterygopalatine ganglion of nitroxidergic vasodilator nerve function in canine cerebral and retinal arteries. *Cir Res* 72:206-213, 1993
89. Tsai SH, Tew JM, Mclean JH, Shipley MT: Cerebral arterial innervation by nerve fibres containing calcitonin gene-related peptide (CGRP): 1. Distribution and origin of CGRP perivascular innervation in the rat. *J Comp Neurol* 271: 435-444, 1988.
90. Uddman R, Edvinsson L: Neuropeptides in the cerebral circulation. *Cerebrovascular and brain metabolism reviews*. 1: 230-252, 1989.
91. Uemura Y, Sugimoto T, Okamoto S, Handa H, Mizuno N: Changes of neuropeptide immunoreactivity in cerebrovascular nerve fibers after experimentally produced SAH. *J Neurosurg* 66: 741-747, 1987.
92. Wall PD, Pribram K: Trigeminal neurotomy and blood pressure response from stimulation of lateral cerebral cortex of *Macaca mulatta*. *J Neurophysiol* 3: 409-412, 1950.
93. Wallenstein S, Zucker CL, Fleiss JL: Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res* 47: 1-9, 1980.
94. Wei EP, Kontos HA, Christman C, DeWitt D, Povlishock J: Superoxide generation and reversal of acetylcholine-induced arteriolar dilatation after acute hypertension. *Circ Res* 57: 781-787, 1985.
95. Whitehead E, DeSouza F: Acute sphenoid sinusitis causing spasm of the internal carotid artery. *Can J Otolaryngol* 3: 216-218, 1974.

96. Wilkins RH: Attempted prevention or treatment of intracranial arterial spasm. *Neurosurg* 6: 198-210, 1980.
97. Wilkins RH: Attempted prevention or treatment of intracranial arterial spasm; An update. *Neurosurg* 18: 808-825, 1986.
98. Winer BJ: *Statistical principles in experimental design*. New York, McGraw-Hill, 1962,
99. Yoshioka J, Clower BR, Smith RR: The angiopathy of subarachnoid hemorrhage. I. Role of vessel wall catecholamines. *Stroke* 15: 288-294, 1984.



Kodak
cm 1 2 3 4 5 6 7 8
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black

Kodak Gray Scale

C **Y** **M**

© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

