

脳虚血に関する実験的研究

第 1 編

脳虚血モデルについて

岡山大学医学部脳神経外科学教室 (主任: 西本 詮教授)

宮 田 伊 知 郎

(昭和63年5月17日受稿)

Key words: 脳虚血, transorbital approach, 中大脳および前中大脳動脈閉塞, 局所脳血流量, fluorescein angiography

緒 言

実験的脳虚血のモデルを作成する上において、とりわけ犬に関しては、その豊富な側副血行路が存在するために、頭蓋外血管閉塞のみではそのモデルとして不適当である。従って頭蓋内血管を種々の方法で閉塞することにより、適当なモデル犬の作成が試みられている¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾。Transorbital approach⁶⁾⁷⁾による中大脳動脈起始部(M1)の閉塞は、脳への侵襲が少なく手技が比較的容易で、しかも慢性実験にも適していることから実験的脳虚血のモデルとして種々の動物に対して行われてきた。犬においても、このtransorbital approachにより、一側中大脳動脈起始部(M1)を閉塞した脳虚血モデルが作成され検討されてきたが、このモデルでは虚血巣が小さく、部位と広がりにもバラツキが大きいため、脳虚血モデルとして充分満足しうるものではなかった。そこで今回著者は、transorbital approachにより sensorimotor cortex をも含む広範な脳虚血モデルの作成を試みた。犬においては、sensorimotor cortex は、ヒトより前方に位置し、前中大脳動脈からの血流も多く受けるため、従来のM1のみの閉塞では sensorimotor cortex を常に一定の虚血に陥らせることは困難であると思われる。そこで前中大脳動脈の common trunk (A2) をM1と同時に閉塞したところ、目的とする広範かつ強い脳虚血モデルを作成す

ることができたので報告する。

対象と方法

- (1) Transorbital approach による前および中大脳動脈閉塞についての手技

実験には体重約10kgの雑種成犬を用いた。Ketamine 5—10mg/kgの筋肉内注射による麻酔下に気管内挿管を行い、succinylcholine chrolideにて無動化し、respiratorにより調節呼吸を行った。次いで犬を左上側臥位にし充分開口した状態で犬固定装置に固定した。動脈血PaCO₂は生理的範囲内とし、体温は直腸温で測定し36—38度に保った。

まず左側頭下部を剃毛し、頬骨部にY字状の皮切を加えて皮膚弁を反転した。次いで頬骨弓を骨鉗子にて除去し、さらに下顎骨筋突起の部で咬筋を離断し眼窩内に到達して眼窩内組織を摘出した。Transorbital approachによりM1及びA2を露出するまでの手技は、基本的には従来の方法⁶⁾⁷⁾と同様であるが、A2を露出するためには lesser sphenoid wing に開けた骨窓をさらに吻側及び内側に拡大し、optic foramen の開放を必要とする。硬膜を開けM1を露出し、次いでA1の近位部から末梢へたどっていくと、まず ophthalmic artery が分岐しているのがみられる。これはすでにその末梢で凝固切断されている。さらにその末梢より ethmoidal artery が分岐している。これは凝固切断する。さらに

A1を末梢に追うと、A1は数本の細い枝をだしながら正中側に走行して行き、ほぼ chiasm の真上に到達する。同時に反対側のA1部が見え、ここで両者は合流し正中を前上方に走るA2部 (common trunk) を形成する⁸⁾。この合流部の長さは1.0—3.0mmで、その末梢は再び左右に分岐している。血管閉塞には Scoville clip を用い、M1及びA2を閉塞した (Fig. 1)。

(2) 慢性実験群

実験には成犬20頭を用いた。上記の transorbital approach により顕微鏡下に左中大脳動脈起始部 (M1) 及び前大脳動脈 common trunk (A2) を露出した。18頭にはM1及びA2に clip をかけ、2頭は血管露出のみの sham operation を行った。以上の操作は無菌的に行い、術後抗生物質を投与し感染を予防した。なお、術後の食物摂取は動物に委ねた。術後原則として1週間生存させることとしたが、神経症状の悪化が強く、瀕死の状態で食物摂取が不能なものは、脳への二次的影響が加わることを避けるためその時点で屠殺した。飽和 KCl 静脈内注射による屠殺後、脳を10%ホルマリンで灌流固定し、

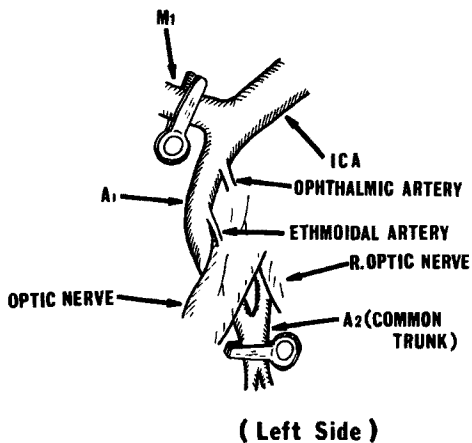


Fig. 1 Schema showing the operative view of left internal carotid, middle cerebral and anterior cerebral arteries through the operating microscope. The initial portion of middle cerebral artery (M1) and the common trunk of anterior cerebral artery (A2) are occluded with Scoville clips.

5 mmの厚さに前額断して肉眼的に検索した。次いで hematoxylin-eosin 染色及び Klüver-Barrera 染色により顕微的に検索した。

(3) 急性実験群

従来のM1単独閉塞モデルと今回のモデルの相違を確かめるために以下の実験を行った。

成犬4頭を用い同様の方法により左中大脳動脈起始部 (M1) 及び前大脳動脈 common trunk (A2) を露出し、さらに左前頭側頭開頭を行い脳を広範に露出した。次いで閉塞前、M1閉塞時、M1 A2の同時閉塞時にそれぞれ局所脳血流量 (I-CBF) を測定し、また fluorescein angiography (FAG) を行い、血流動態の変化を観察した。局所脳血流量測定には、水素クリアランス⁹⁾¹⁰⁾法を用いた。関電極として直径300 μ の水素電極 (標準ニードルタイプ UHE-100, ユニークメディカル社製) を用い、不関電極としては Ag/AgCl 電極を用い、頭皮下に埋めこんだ。測定回路は、UHメーター PHG-201 (ユニークメディカル社製) を使用し、約7%水素ガスを4分間吸入させクリアランスカーブを記録し、カーブの解析は初期40秒—1分を除き two-minutes initial index method¹¹⁾¹²⁾で算出した。測定部位は sigmoid gyrus, coronal gyrus, anterior sylvian gyrus の皮質3カ所とした。

Fluorescein angiography は、0.5% fluorescein sodium 5 ml を左総頸動脈より bolus で注入し、連続撮影 (2/秒) を行った¹³⁾¹⁴⁾。撮影には、カメラ: Nikon F 2 motor drive, レンズ: Medical Nikkor Lens, フラッシュ: Nikon Repeating Flash SB-6, 蛍光フィルター: Kodak Wratten No.12, 励起フィルター: 励起用干渉フィルター (朝日分光製 420—485nm), フィルム: Kodak TriX (ASA400) を用いた。

結 果

(1) 慢性実験群

a) 神経症状の変化 (Fig. 2)

術後の神経症状は Smith 等¹⁵⁾に順じて評価した (Table 1)。

No.215, No.218は血管剥離のみを行った sham operation のものである。この2例は、術後の覚醒もよく、全経過を通じて全く神経脱落症状を認め

なかった。血管閉塞を行った18頭についてみると、大きく2つのGroupに分けられた。

Group 1は、術後3日以内に死亡ないし屠殺した13頭で、術後早期よりGrade 3即ち意識障害や強度の片麻痺のために起立不能であったもの、もしくは術直後Grade 1または2であったものが、術後1日目頃より神経症状がGrade 3に悪化をきたしたものである。これらのうち5頭は術直後よりGrade 3で、呼吸状態が悪く瀕死の状態であり、改善の傾向がみられなかったため、6-8時間後に屠殺した。

Group 2は、術後1週間生存した5頭で、術後1-3日目に神経症状が一時的に悪化したものもあるが、比較的神経症状が安定していたも

のである。

b) 肉眼的及び組織学的所見

術後3日以内に死亡または屠殺したGroup 1では、全例前大脳動脈、中大脳脈領域のほぼ全体にわたり染色性が低下し、脳浮腫を主体とする虚血性変化とそれによるmidline structureの著明なshiftが認められた(Fig. 3-a)。これらの虚血部の広がり、13頭いずれも大脳前半部の皮質、皮質下に及んでいた(Fig. 3-b)。基底核部は虚血性変化のあるものとないものがあった。

術後1週間生存したGroup 2では、肉眼的には病巣半球のshrinkageがみられ(Fig. 4-a, b)、組織学的には知覚、運動領域を含む大脳前半部に及ぶ皮質、皮質下白質、基底核部、側脳室外側部にnecrosis, neocapillarization, macrophageの浸潤等の典型的な貧血性梗塞を認めた。しかし、5頭中1頭は、皮質下に比較的限局した梗塞がみられただけであった。なお全例thalamusには梗塞がみられなかった。またsham operation例では4日目、7日目に屠殺したものいずれも組織学的変化を認めなかった。

(2) 急性実験群

a) 局所脳血流量(1-CBF)及びFluorescein Angiography (FAG)の変化

1-CBFはsigmoid gyrus, coronal gyrus, anterior sylvian gyrusの3カ所の皮質において測定した(Fig. 5, 6, 7)。M1閉塞時、FAG上シルビウス溝近傍、特にanterior sylvian gyrusの造影が不良となり(Fig. 8-b)、同部の1-CBFは平均54%減少した。一方造影の良好なsigmoid gyrusの1-CBFは平均29%しか減少せず、また前大脳動脈と中大脳動脈のいわゆるwatershed areaと考えられるcoronal gyrusは一部造影不良域があり、その1-CBFは平均43%減少し中間的値を示した。

M1閉塞1時間後、A2も閉塞を行ったところFAG上coronal, sigmoid gyrusを含む大脳前半部の造影も不良となり(Fig. 8-c)、1-CBFの減少もanterior sylvian gyrusでは70%、coronal gyrusでは71%、sigmoid gyrusでは62%減少し、いずれの部位においてもM1のみの閉塞時に比べて1-CBFがより減少した。

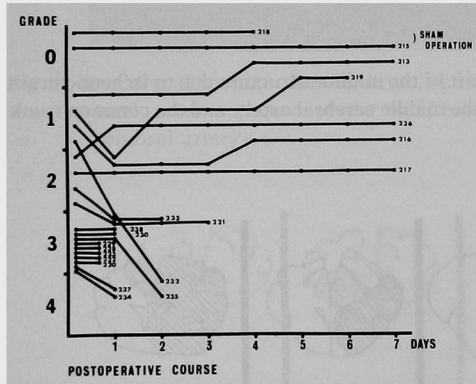


Fig. 2 Neurological evaluation of postoperative course. Each number indicates the dog's number.

Table 1 Neurological evaluation grade (after Smith, A. L.¹⁵⁾)

Neurological Evaluation Grade	
Neurological signs	Grade
No neurological deficit	0
Walks with limp or circles to side of lesion	1
Walks poorly; stands, but cannot support body with right limbs held off ground	2
Cannot stand without support	3
Dead	4



Fig. 3 -a Coronal section of a dog brain, showing the shift of the midline structure due to ischemic brain edema. (Dog No.236 : 3 days after occlusion of the middle cerebral artery and the common trunk of the anterior cerebral artery)

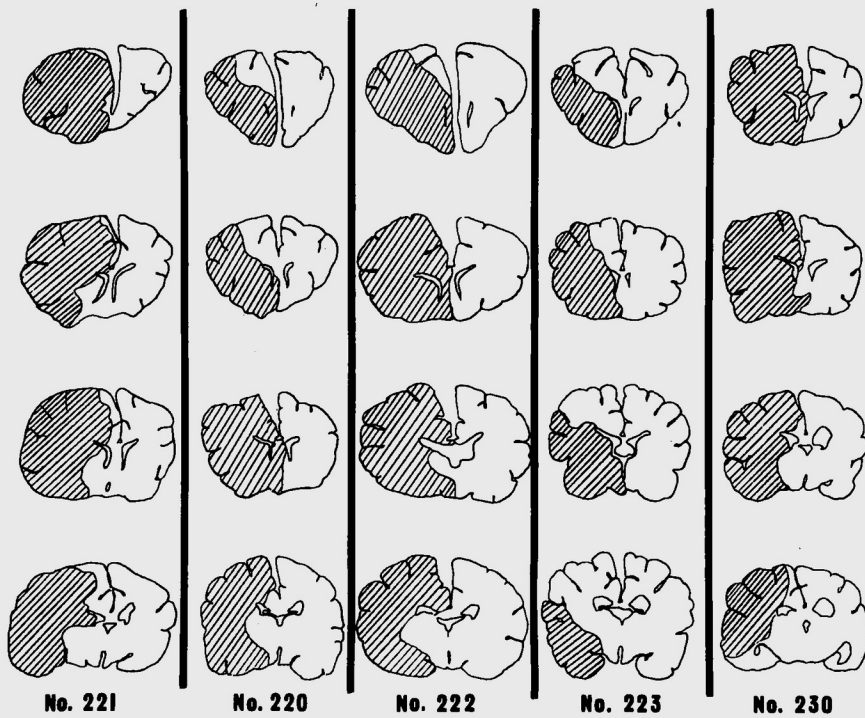


Fig. 3 -b Location of the ischemic area within 3 days after clipping.

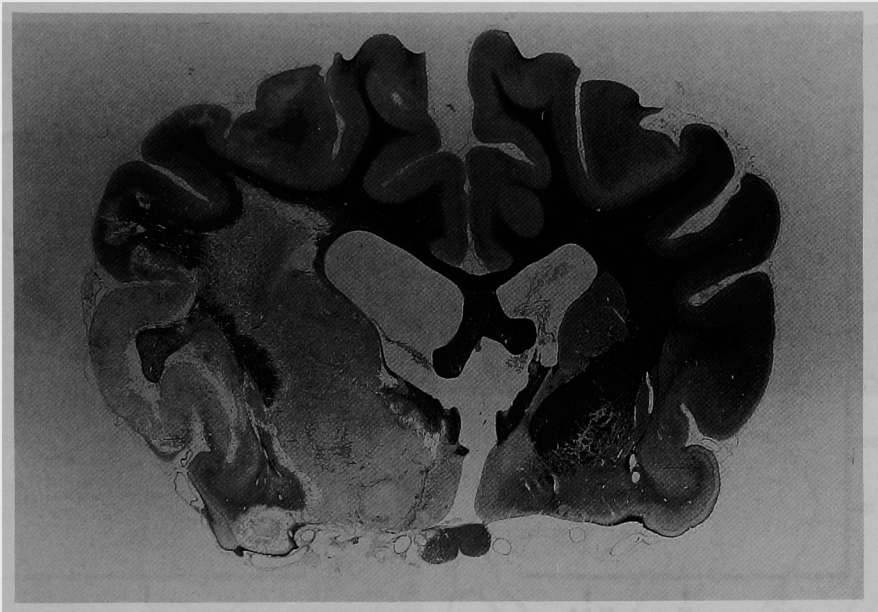


Fig. 4-a Coronal section of a dog brain, showing the infarct of the left hemisphere. (Dog No.221 : 1 week after occlusion of the middle cerebral artery and the common trunk of the anterior cerebral artery)

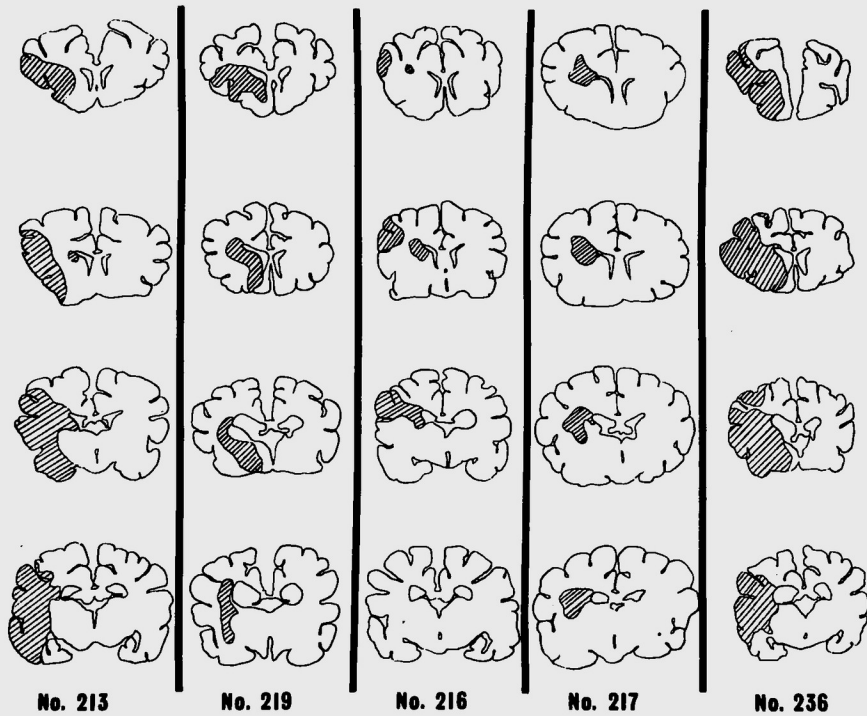


Fig. 4-b Location of the infarct at 7th day after clipping.

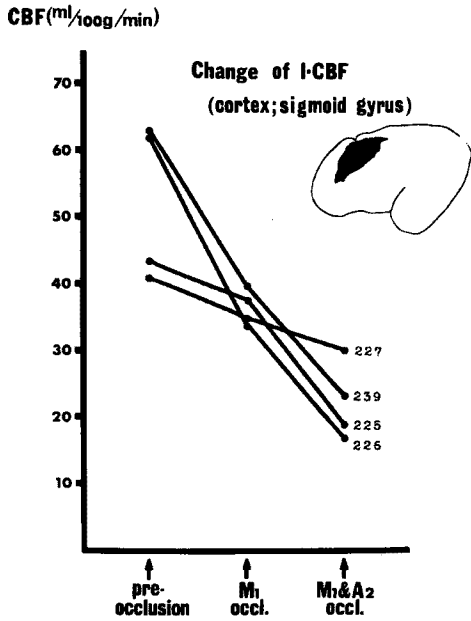


Fig. 5 Change of the I-CBF values in the cortex of the sigmoid gyrus.

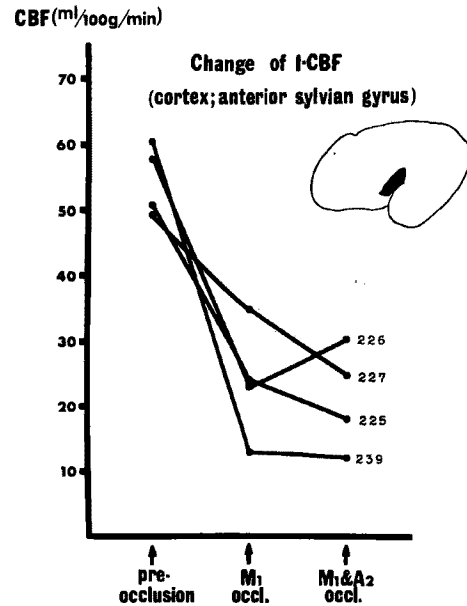


Fig. 7 Change of the I-CBF values in the cortex of the anterior sylvian gyrus.

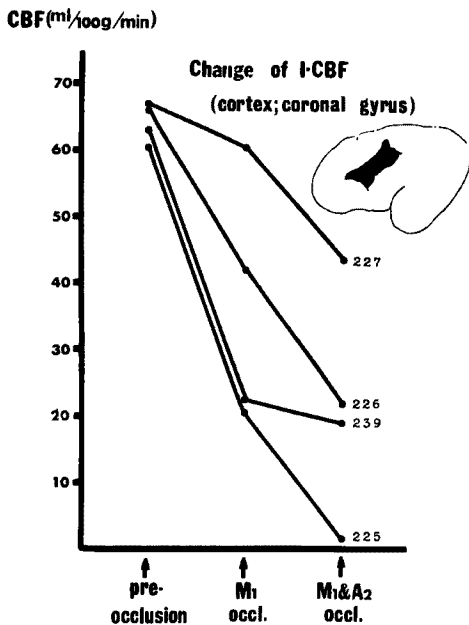


Fig. 6 Change of the I-CBF values in the cortex of the coronal gyrus.

考 案

実験的脳虚血のモデルについては、今まで多くの報告¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾¹⁶⁾があるが、いずれのモデルも一長一短があり、実験目的に適したモデルの選択が必要と思われる。

従来より transorbital approach による中大脳動脈起始部 (M₁) の閉塞をもって脳虚血モデルとすることが多かった。この方法は、脳への侵襲が少なく、作成手技が比較的容易で、しかも慢性実験にも適している点で、優れた方法といえる。さらに、approach の段階で眼動脈の末梢を切断するため内頸動脈と眼動脈吻合による頭蓋内外の側副路が遮断されるという利点がある。しかし犬では leptomeningeal anastomosis が発達し、また左右の前大脳動脈合流部から出る回帰動脈が線状体動脈と吻合しており⁸⁾、今回著者の目的とした、大脳前半部に位置する sensorimotor cortex もを含む脳虚血を高頻度で得ることは困難と考えた。

Symon¹⁷⁾は、犬を用いた実験で、中大脳動脈

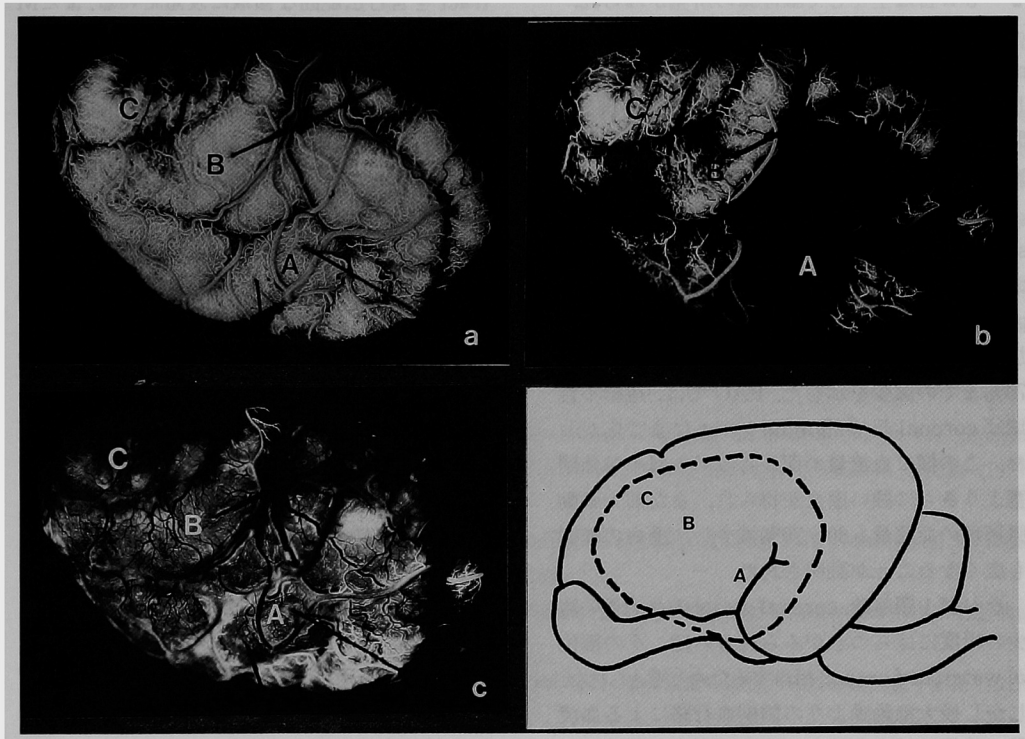


Fig. 8 Fluorescein angiograms showing a filling defect after arterial occlusion (Dog No.231). a : before clipping, b : after M1 clipping, c : after M1 and A2 clipping. Inside the dotted circle of the schema are visualized in the photographs. A, B and C indicate the anterior sylvian, coronal and sigmoid gyri respectively.

閉塞のみでは血流量の有意な減少は認められず、前大脳動脈を同時に閉塞することによりはじめて有意な減少が認められたと報告し、前大脳動脈と中大脳動脈の leptomeningeal anastomosis の重要性を指摘している。水素クリアランス法で 1-CBF を測定した今回の実験では、M1 閉塞のみでもその領域の有意な 1-CBF の減少を認めているが、A2 閉塞を加えると前大脳動脈領域の血流量ばかりか、中大脳動脈領域の血流量もさらに減少し、中大脳動脈領域における前大脳動脈からの側副血行路の存在がはっきりと認められた。

慢性実験における神経症状の経過をみてみると、このモデルの一つの特徴として Group 1 にみられる様に、かなり早期より脳浮腫がみられることである。この様な場合、術後の覚醒が悪く、また嘔吐を繰り返したり、不規則な呼吸を

呈する例もあった。そして術後 6—8 時間で屠殺した例にも著明な脳浮腫を認めている。また、術後 1—2 日目にさらに神経症状の悪化する傾向があり、これも脳浮腫の進行によるものと思われる¹⁸⁾。このように 18 頭中 13 頭に強い脳浮腫がみられたことは、このモデルの虚血の強さ、範囲の広さを裏付けるものと考えられる。この時期に脳浮腫が軽度で Grade の低い Group 2 では、その後脳浮腫の改善とともに多少とも神経症状も改善してくる傾向にあった¹⁵⁾。しかし尚かつ 1 頭を除き術後 7 日目に大きい梗塞巣をみた。急性期に脳浮腫をきたしたところは、いずれは梗塞に陥ることから、このモデルは、90% 以上に大脳前半部も含む大きな梗塞をきたし、従来の犬の中大脳動脈閉塞モデルにくらべても、高度な脳虚血モデルといえる¹⁹⁾。

一方、組織学的にも神経症状に一致して術後

2—3日目は主として脳浮腫の所見がみられ、一週間目では necrosis, neocapillarization, macrophage の浸潤等の典型的な梗塞像を示し²⁰⁾、これら組織学的変化の局在と神経症状との間に明らかな関連をみた。梗塞は全例貧血性梗塞で、出血性梗塞はみられなかった。

Fluorescein angiography (FAG) と CBF study を4例で行った。M1閉塞ではシルビウス溝近傍の造影が不良となり、anterior sylvian gyrus の I-CBF は平均54%減少し、A2閉塞を加えると I-CBF はさらに減少し閉塞前値の平均70%までの減少を示した。FAG では、造影不良域は coronal 及び sigmoid gyrus にまで広がった。この様に血流量の面からみてもM1単独閉塞よりさらに強い虚血が得られ、また前大脳動脈領域の血流量も60—70%減少し、虚血の範囲も広がる事が証明された。

なおM1閉塞時、coronal gyrus の血流量の減少の程度にばらつきがみられるのは、その部位が watershed area に相当するためと考えられた。しかし後大脳動脈よりの側副血行路による血流量の代償は、FAG や I-CBF の測定でもはつきり捉えられなかった。

従来犬のM1閉塞では血流量の減少は、20—50%にとどまるとされていたが¹⁹⁾²¹⁾、今回のモデルでは、60%以上の減少を示す虚血が得られ、positron emission tomography において測定された脳梗塞患者のCTスキャン上、低吸収域を示す部分の I-CBF は、60%以上の減少であったという報告からも、高度虚血脳モデルとあってよいと思われる¹⁹⁾。しかも sensorimotor cortex-

tract を含む広範囲な領域に及んでいる。またM1とA2の閉塞あるいは閉塞解除を時間的にずらすことにより、虚血の程度や範囲をある程度変化させることも可能であり、このモデルは種々の脳虚血病態の研究に有用であると考えられる。

結 論

犬を用い、transorbital approach により中大脳動脈起始部 (M1) 及び前大脳動脈 common trunk (A2) を閉塞した脳虚血モデルを作成し、神経症状及び病理組織学的検索を行った。術後3日以内に死亡した例は、前大脳動脈及び中大脳動脈領域のほぼ全体に脳浮腫を主体とする虚血性変化と midline shift がみられた。術後1週間生存した例は、M1単独閉塞に比べ大脳前半部に及ぶ広範な梗塞巣が高頻度に見られた。Fluorescein angiography, I-CBF の検討においてもM1単独閉塞との明らかな差異が認められた。

このモデルでは、時間をずらしてM1, A2の閉塞及びその解除を行うことにより段階的に脳血行動態を変化させることもでき、脳虚血の実験的研究に有用であると考えられる。

稿を終わるに臨み、御懇篤なる御指導を賜った恩師、岡山大学脳神経外科西本 詮教授ならびに本研究につき直接御指導を戴いた香川医科大学脳神経外科大本堯史教授に深謝いたします。また本実験に際し御助言、御協力いただいた柳生康徳先生、松本章伝先生、山中明彦先生、脇本秀輝氏をはじめ教室員各位に感謝いたします。

文 献

- 1) Molinari GF: Experimental cerebral infarction. 1. Selective segmental occlusion of intracranial arteries in the dog. *Stroke* (1970) 1, 224—231.
- 2) Molinari GF: Experimental cerebral infarction. 2. Clinicopathological model of deep cerebral infarction. *Stroke* (1970) 1, 232—244.
- 3) Sibata S, Hodge CP and Pappius HM: Effect of experimental ischemia on cerebral water and electrolytes. *J Neurosurg* (1974) 41, 146—159.
- 4) 鈴木二郎, 吉本高志, 田中 悟: 頭蓋内主幹動脈遮断による各種脳梗塞モデルの作製. *脳と神経* (1980) 32, 185—190.
- 5) 吉本高志, 坂本哲也, 鈴木二郎: 実験的脳梗塞 (第一報). 視床梗塞モデル犬の作製. *脳神経外科* (1978)

- 6, 355—359.
- 6) 衣笠和孜：大脳の血管閉塞に関する実験的研究—犬における中大脳動脈血管閉塞後の microangiography 所見と病理組織学的所見について—。岡山医誌 (1986) 98, 1—20.
 - 7) Hudgins WR and Garcia JH : Transorbital approach to the middle cerebral artery of the squirrel monkey : A technique for experimental infarction applicable to ultrastructural studies. Stroke (1970) 1, 107—111.
 - 8) 西丸雄也：脳血管障害の観点における脳動脈の構築学的研究. 第一報 犬脳動脈の副血行路について, 福岡医誌 (1963) 54, 988—1006.
 - 9) Pasztor E, Symon L and Dorsch NWC : The hydrogen clearance method in assessment of blood flow in cortex, white matter and deep nuclei of baboons. Stroke (1973) 4, 556—567.
 - 10) 田村 晃, 浅野孝雄, 卓 允信：水素クリアランス法による脳局所血流量の測定. 方法および Venous Out Flow 法との相関. 脳と神経 (1978) 30, 47—54.
 - 11) Symon L, Pasztor E and Dorsch NWC : Physiological response of local areas of the cerebral circulation in experimental primates determined by the method of hydrogen clearance. Stroke (1973) 4, 632—642.
 - 12) Doyle TF, Martins AN and Kobrine AI : Estimating total cerebral blood flow from the initial slope of hydrogen washout curve. Stroke (1975) 6, 149—152.
 - 13) 河瀬 斌：脳血管蛍光連続撮影による脳微細循環の研究(1), 撮影方法と局所脳循環時間の測定. 脳と神経 (1977) 29, 181—189.
 - 14) 河瀬 斌：脳血管蛍光連続撮影による脳微細循環の研究(2), 微細循環の病態とその分類. 脳と神経 (1977) 29, 289—299.
 - 15) Smith AL, Hoff JT and Nielsen SL : Barbiturate protection in acute focal cerebral ischemia. Stroke (1974) 5, 1—7.
 - 16) Hayakawa T and Waltz AG : Immediate effects of cerebral ischemia : Evolution and resolution of neurological deficits after experimental occlusion of one middle cerebral artery in conscious cats. Stroke (1975) 6, 321—327.
 - 17) Symon L : Observations on the leptomeningeal collateral circulation in dogs. J Physiol (1960) 154, 1—14.
 - 18) O' Brien MD and Waltz AG : Ischemic cerebral edema. Distribution of water in brains of cats. Arch Neurol (1974) 30, 456—460.
 - 19) 中川 翼：総説. 虚血脳. 脳神経外科 (1980) 8, 409—422.
 - 20) Zülch KJ : Hemorrhage, thrombosis, embolism ; in Pathology of the Nervous System, J. Minckler ed, McGraw-Hill Book Company, New York (1971) pp1519—1521.
 - 21) 岡田芳和, 島 健, 魚住 徹：Embolization 法による中大脳動脈閉塞の実験的研究. 局所脳血流と evoked potential の相関について. 脳と神経 (1980) 32, 417—424.

Experimental study of cerebral ischemia
Part 1. A new model of cerebral ischemia

Ichirou MIYATA

**Department of Neurological Surgery, Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan**

(Director : Prof. A. Nishimoto)

The author developed an original model of local cerebral ischemia using mongrel dogs. A left transorbital approach was used to occlude both the first segment of the middle cerebral artery(M1) and the common trunk of the anterior cerebral artery(A2). Histopathological examination revealed severe ischemic brain edema coinciding with severe neurological deficits within 3 days of the occlusion. Additionally, large cerebral infarcts involving the sensorimotor cortex were frequently found at 7 days. These infarcts were more extensive than those in cases with M1 occlusion alone.

Fluorescein angiography and measurement of the local cerebral blood flow(l-CBF) demonstrated a filling defect of fluorescein in the gyri around the sylvian fissure coinciding with a 54% reduction of l-CBF in the anterior sylvian gyrus after M1 occlusion. Additional occlusion of the A2 extended the filling defect zone to the coronal and sigmoid gyri, and lowered the l-CBF further.

The author believes that this model of cerebral ischemia is useful because one can alter the extent and duration of cerebral ischemia by the combination of occlusion or release of M1 and/or A2.