

## 脳梗塞に関する実験的研究

血管鑄型走査電顕法を中心に

堤 健二

### *Experimental Cerebral Infarction in the Dog*

*Scanning Electron Microscopy with Vascular Endocasts of the Microvessels in the Ischemic Brain*

Kenji TSUTSUMI

*Department of Neurosurgery, Nagasaki University, Nagasaki*

#### Abstract

Large-sized infarctions of the cerebral hemisphere (LSICH) were experimentally induced in 17 dogs by injecting two silicone cylinders through the right cervical internal carotid artery. The LSICH models were perfused with heparinized saline and fixed with 1.5% glutaraldehyde solution through the contralateral carotid artery. Then 24 hours after the embolization, Mercox® CL-2B and CL-2R were injected manually. The brains were immediately removed, and specimens were obtained from the basal ganglia and the ectosylvian cortex. Disruptions of the degenerated arterioles with numerous erythrocytes and Mercox were observed in the area of massive hemorrhagic infarct in the basal ganglia. On the other hand, disruptions of degenerated venules with a few erythrocytes and Mercox around the vessels were observed in the petechial hemorrhagic infarct in the cortico-medullary junction area. Dilatation of the perivascular space of the microvessels and vacuolation of the neuropiles were related to the severity of the vasogenic edema. Microvessels were narrowed and decreased in flexibility in severe vasogenic edema. Some arterioles ran parallel and branched convergently. It was suggested that changes in the microvascular structure were caused by disturbance of the autoregulation of the cerebral microcirculation.

**Key words:** vessels, experiment, hemorrhagic infarction, electron microscopy

#### I はじめに

虚血脳の微小血管の変化に関しては、すでに光顕ならびに電顕による詳細な研究がなされてきた<sup>2,4,7,13-15,23,24</sup>が、樹脂を用いた三次元レベルでの立体的検索はごくわずかしかなされていない<sup>9,10,17,21</sup>。我々は、脳梗塞犬にメチルメタクリレート樹脂を注入して血管鑄型標本作製し、血管構築の変化を走査電顕により観察し、従来の透過電顕での成績とも合せて、血管構築と脳循環との関連につき考察した。

#### II 実験方法

実験には、体重 10 kg 前後の雑種成犬を用い、大脳半球大梗塞 (large-sized infarctions of the cerebral hemisphere: LSICH) を作製しえた 17 頭を用いた。そのうち 12 頭を血管鑄型および凍結割断標本に、残り 5 頭は透過電顕に供した。対照とした正常犬は 25 頭で、そのうち 15 頭は血管鑄型および凍結割断標本用に、10 頭は透過電顕用に使用した。

##### 1. LSICH モデル犬の作製

すでに報告<sup>21,22</sup>したごとく、一側内頸動脈からシリコン

長崎大学脳神経外科

Address reprint requests to: K. Tsutsumi, M.D., Department of Neurosurgery, Kitakyushu-Yahata City Hospital, 4-18-1 Nishihon-machi, Yahatahigashi-ku, Kitakyushu, Fukuoka 805.

受稿 1985年7月29日 受理 1986年2月18日

円柱を注入して中大脳動脈近位部, 前大脳動脈および後交通動脈を塞栓させることにより, 広範囲にわたる梗塞巣を高率に作製することができた. その結果, 大脳基底核部には塊状出血巣, 側頭葉皮髄境界部には点状出血巣, 中大脳動脈と後大脳動脈の境界領域には軟化巣という3つの病巣の局在が認められた<sup>21,22)</sup>. 今回は, LSICH モデルにおいて塞栓後24時間目に灌流固定を行い, 大脳基底核部と外シルビウス回の2カ所について電顕的検索を行った.

## 2. 樹脂の注入

ケタラール筋注(5 mg/kg)とネンブタール静注(20 mg/kg)により麻酔して気管内挿管を行い, 対側の総頸動脈, 両側の外頸静脈および大腿動脈にカニューレを挿入しヘパリン5,000単位を静注した. ついで, 人工呼吸下に開胸して上大静脈にもカニューレーションを行い, 本静脈および両側の外頸静脈と大腿動脈から脱血を行った. 上行および下行大動脈を結紮後, 総頸動脈から37°Cのヘパリン加生食水(1,000~1,500 ml, ヘパリン5,000単位)を圧150 mmHgで注入し, 脱血用カニューレからの流出液が清澄になってから, 4°Cの1.5%グルタルアルデヒド溶液(0.1 M リン酸緩衝液, 1,000~1,500 ml)を注入して灌流固定を行った.

対側総頸動脈のカニューレを通してメチルメタクリレート樹脂(Mercox®, 大日本インキ, 東京)を, カニューレに接続した圧力計を用い200 mmHgを越えないようにしながら手動にて注入した. なお, Mercoxは50 mlずつビーカーに小分けしておき, 注入する直前に硬化剤MA®を0.5 mlずつ加えよく混合して使用し, また注入時には動・静脈の区別がつきやすいように, あらかじめCL-2B(青色)を400 ml, 次にCL-2R(赤色)を100 ml, 計500 mlを15分間で注入した.

## 3. 血管鋳型標本の作製

樹脂注入後ただちに開頭して脳を取り出し, 視交叉と乳頭体のレベルで冠状断の切片を作製した. この切片の大脳基底核部, 外シルビウス回から, それぞれ1 cm<sup>3</sup>程度のブロックを2個ずつ採取した. 次に村上の方法<sup>8)</sup>に準じ, 1つのブロックを60°C, 20%NaOH溶液に1晩浸漬し, 染色籠中で1時間流水洗滌して腐蝕脳を除去した. 7日間この操作を繰り返すと, 血管鋳型標本ができた. 自然乾燥後, 四酸化オスミウム結晶1 gを入れた標本瓶中で48時間蒸着を行い, 走査電顕用スタブにドータイドで接着し, イオンコーターJFC-1100型(日本電子, 東京)により金イオン蒸着を5分間行い, 走査電顕JSM-35-LaBaIII A(日本電子, 東京)で観察した.

## 4. 凍結割断標本の作製

もう1つのブロックをさらに3×3×8 mm<sup>3</sup>の角柱状に

切出し, 4%グルタルアルデヒド溶液で3時間固定し, さらに4%タンニン酸と2.5%グルタルアルデヒドの混合液で8時間固定し, 蒸留水で2時間洗滌したのちエタノール系列で脱水し, 100%エタノール液中でゼラチンカプセル#3に試料を入れ, 液体窒素で冷却した凍結割断台上で凍結させたのち, 小刃で割断した. その後, 室温で100%エタノール液中に戻し, 100%酢酸イソアミル浸漬後に臨界点乾燥を行い, スタブに接着し金イオン蒸着を行い, 走査電顕で観察した.

## 5. 透過電顕標本の作製

グルタルアルデヒドで灌流固定後, 脳を取り出して1 mm<sup>3</sup>に細切し, 2.5%グルタルアルデヒドで前固定, 1%オスミウム酸で1時間後固定を行い, エタノール系列で脱水後プロピレンで置換し, エポン812に包埋した. 超薄切片を作製後, 酢酸ウラニルおよび酢酸鉛で二重染色し, JEM-100B(日本電子, 東京)で観察を行った.

## III 実験結果

### 1. 正常犬

血管鋳型走査電顕(vascular endocast-scanning electron microscopy: VE-SEM)では, 約50 μmの細動脈は弾力性に富んだ走行をとりながら, 網目状の毛細血管に移行していた(Fig. 1A). 細静脈は鋭角に分岐し, 二次元的に収束するような走行をとり, 小静脈へ集合していた. 細動脈および毛細血管の表面には, 内皮細胞の核に相当する10×5 μmの紡錘形の陥没(nuclear indentation)が多数認められたが, 細静脈の表面には7×7 μmの円形の陥没が少数存在していた. また, 細動脈から毛細血管に移行するmeta-arterioleにはprecapillary sphincterに相当する輪状陥没が認められた(Fig. 1B).

凍結割断走査電顕(cryofracture-scanning electron microscopy: CF-SEM)では, 約30 μm径の細動脈の血管壁は平滑であり, 内腔にはMercoxが充満し, 血管周囲腔は狭く, neuropileも平滑であった(Fig. 1C).

透過電顕(transmission electron microscopy: TEM)では, 毛細血管の内皮細胞, 基底膜およびpericyteに異常は認められなかった(Fig. 1D).

### 2. LSICHモデル

17頭中, 大脳基底核部の塊状出血を3頭(18%)に, 外シルビウス回皮髄境界部の点状出血を15頭(88%)に認め, この2つの病巣について電顕的検索を行った.

**塊状出血巣(大脳基底核部):** VE-SEMでは, 約40 μm径の細動脈の分岐部からMercoxがcauliflower状に血管外に流出しており, 毛細血管の表面は不整で不規則な輪状陥没が多数認められた(Fig. 2A). CF-SEMでは, 約50 μm

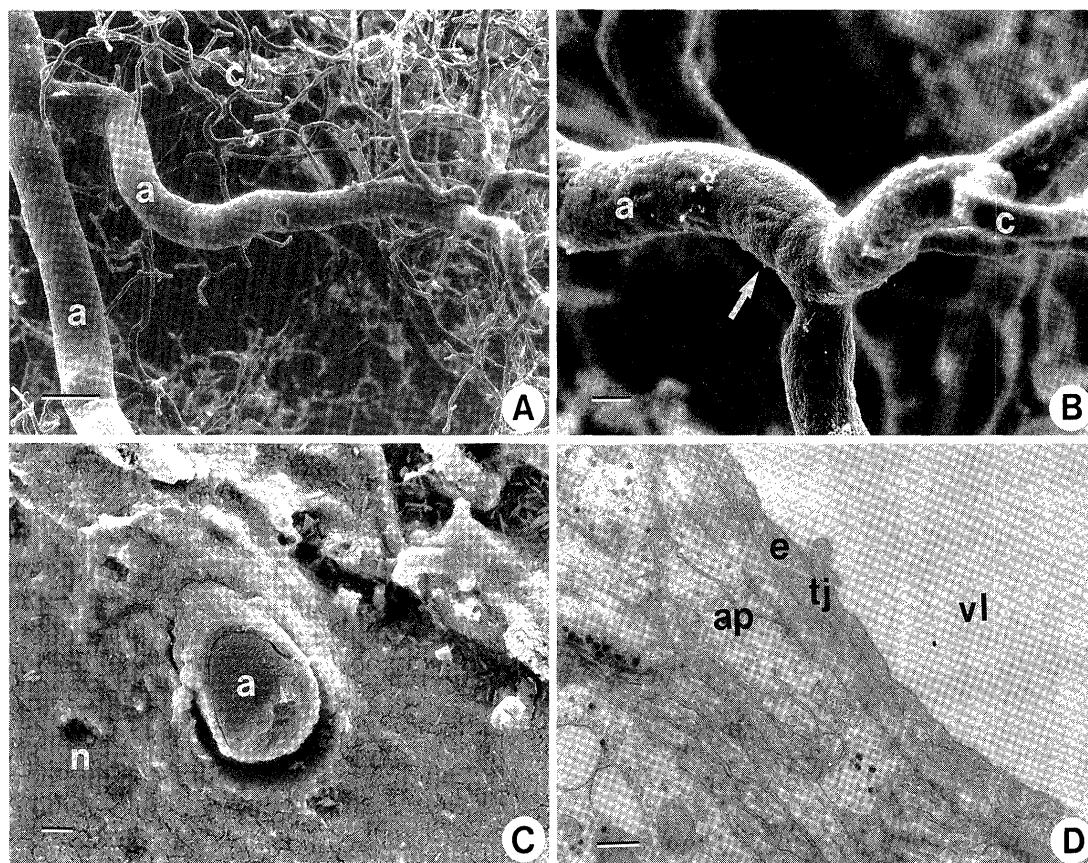


Fig. 1 Scanning and transmission electron micrograms (SEM and TEM) show the microvessels of the ectosylvian cortex of the normal dogs. A: SEM of vascular endocasts shows the arterioles (a) and capillary (c) network.  $\times 100$ , Bar= $100\ \mu\text{m}$ . B: SEM of vascular endocasts shows a ring-shaped depression corresponding to the precapillary sphincter (arrow) of the arteriole (a).  $\times 600$ , Bar= $10\ \mu\text{m}$ . C: SEM of cryofracture shows an arteriole (a) and neuropile (n).  $\times 450$ , Bar= $1\ \mu\text{m}$ . D: TEM shows an endothelium (e), tight junction (tj), and vascular lumen (vl) of the capillary and astrocytic process (ap).  $\times 6,000$ , Bar= $1\ \mu\text{m}$ .

径の細動脈分岐部の apex 付近に破綻を認め、血管周囲には多数の赤血球と Mercoc の流出がみられ、血管周囲の neuropile は空胞化が顕著であった (Fig. 2B). TEM では、約  $50\ \mu\text{m}$  径の細動脈において、内皮細胞の空胞化や bleb の形成、基底膜の膨化、さらに平滑筋細胞の空胞化を認め、血管周囲腔に赤血球や fibrin matrix の凝集塊が存在した (Fig. 2C). 毛細血管では、内皮細胞の luminal surface infolding の増加や空胞形成がみられ、tight junction の開大は不明瞭であったもののその周囲の基底膜の膨化は著明であった。一方、血管周囲腔には浮腫液が多く貯留し、cell debris が散在していた (Fig. 2D).

**点状出血巣(外シルビウス回):** VE-SEM では、細動脈は狭小化して陥没は細長い溝に変形し、弾力性に乏しく蛇行して分岐角度も鋭角になっていた。毛細血管の表面は不整で、輪状陥没を多数認め、細動脈に沿ってまとわりつくようになる傾向があった。 $50\ \mu\text{m}$  径の細静脈に沿って、

Mercoc がコンブ状に血管外に流出していた (Fig. 3A). CF-SEM では、毛細血管の内腔は狭小化し neuropile には多数の空胞がみられ、 $100\ \mu\text{m}$  径の細静脈では内腔に Mercoc が充満し、血管周囲にも Mercoc のコンブ状の流出を認め、拡大した血管周囲腔に赤血球やマクロファージの流出も認められた (Fig. 3B, C). TEM では、細動脈の内腔は狭小化し、内皮細胞では infolding の増加、および pinocytotic vesicle の増加がみられたが、空胞形成は認められなかった。一方、細静脈の内腔は不規則な収縮と拡張を示し、内皮細胞および pericyte の空胞形成、基底膜の膨化、さらに著明に拡大した血管周囲腔に少数の赤血球の流出を認めた (Fig. 3D).

#### IV 考 察

血管鑄型を作製する試みは、Hill ら<sup>6)</sup>の報告によれば、1672年 Jan Swammerdam が wax を用いてヒトで行ったのが

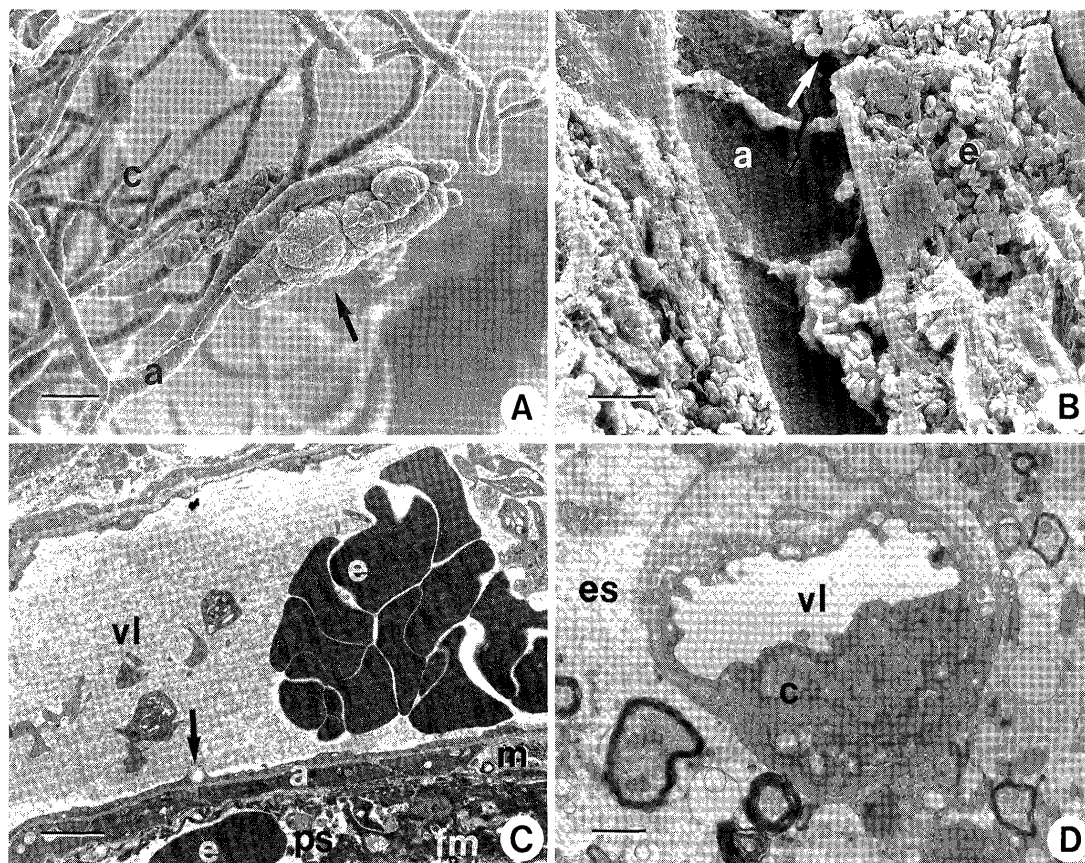


Fig. 2 SEM and TEM of the microvessels in a massive hemorrhagic infarction in the basal ganglia. A: SEM of vascular endocasts shows extravasation of Mercox® at the bifurcation of the arteriole (a) (arrow).  $\times 160$ , Bar=50  $\mu\text{m}$ . B: SEM of cryofracture shows disruption (arrow) of the arteriole (a) and extravasation of the Mercox and erythrocytes (e) into the perivascular space.  $\times 500$ , Bar=20  $\mu\text{m}$ . C: TEM shows a degenerated arteriole (a) with bleb formation (arrow) and extravasation of the erythrocytes (e), a macrophage (m), and the fibrin matrix (fm) into the perivascular space (ps).  $\times 1,800$ , Bar=5  $\mu\text{m}$ . D: TEM shows a degenerated capillary (c) and dilatation of the extracellular space (es) with accumulation of edematous fluid.  $\times 4,000$ , Bar=2  $\mu\text{m}$ .

始まりとされ、1954年には Batson がポリエステルレジンであるメチルメタクリレート樹脂を用いて動脈の血管鋳型を作製したとされている。最近では、ヒトの頭頸部の血管鋳型<sup>6)</sup>や、イヌの側頸動脈結紮後の側副血行路発達の観察に応用されてきている<sup>3)</sup>。さらに、村上が開発した血管鋳型走査電顕法によって脳の微小血管構築を立体的に観察できるようになり<sup>8,16)</sup>、precapillary arteriole の sphincter の機構の研究に応用されている<sup>1,10)</sup>。

大動物の血管鋳型を作製するためには、十分な脱血と生食水による洗滌を行い、血管内腔から血液成分を完全に除去することがもっとも重要であり、また樹脂注入時に注入圧が高すぎて血管破綻を起こさないようにすることも大切である。私はこの点に注意し、樹脂注入に際しては梗塞側とは反対側の総頸動脈から圧を 200 mmHg を越えないように保ち注入した。また、血管鋳型走査電顕では血管内腔

の変化しか判らないため、血管および周囲組織の変化を含めて知るためには凍結割断標本の走査電顕や透過電顕の所見も合わせて検索することが必要である。

さて、LSICH モデルにおいて微小血管の周囲腔の拡大と neuropile の spongiotic な空胞形成を認めたが、これは血管透過性の障害による血漿の漏出が生じ血管周囲腔に浮腫液が貯留した状態であり、vasogenic edema の状態<sup>4,5,7,12,14)</sup>と考えられた。さらに、vasogenic edema の増大に伴い脳組織圧が上昇し、微小血管が伸展して直線状に走行し、分岐角度も鋭角となり収束する血管構築を示すようになったと考えられる。このような血管構築は、灌流圧の変化が末梢側に直接的に伝達される可能性が高く、いわゆる normal perfusion pressure breakthrough 現象<sup>19)</sup>が生じると考えられ、このような微小血管構築の変化が虚血脳循環における dysautoregulation の一要因となっていると考

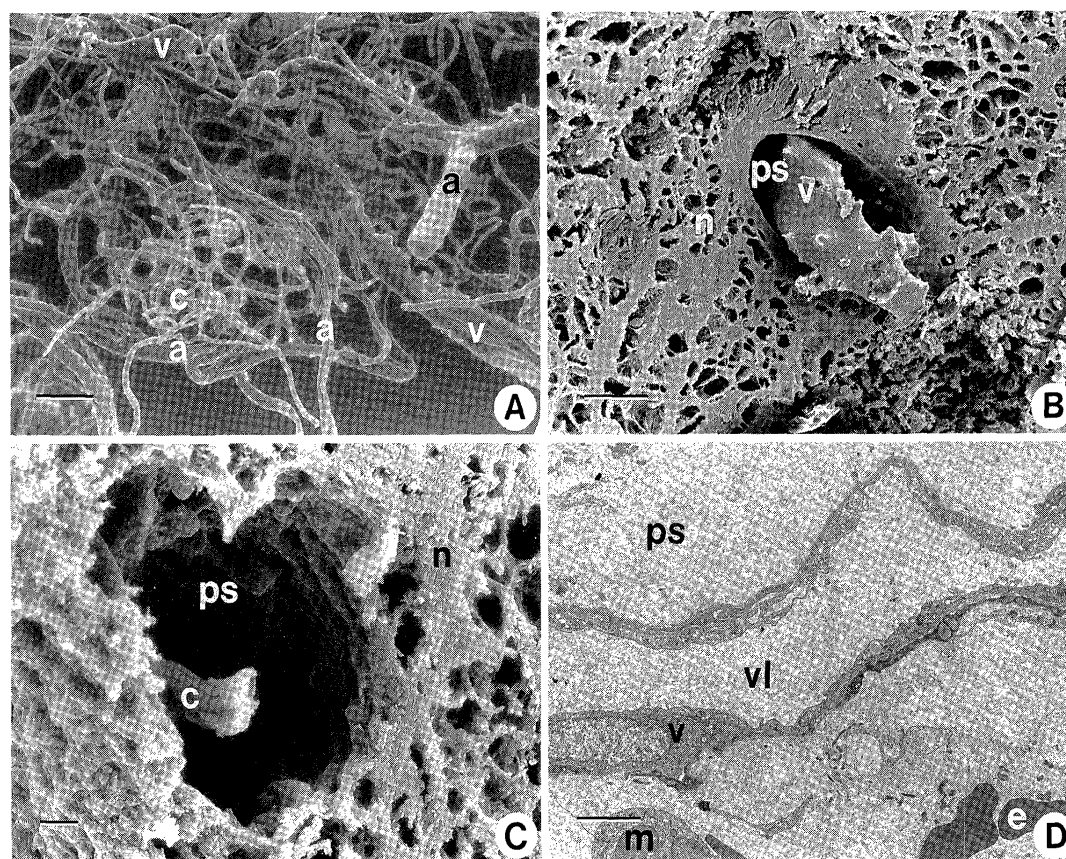


Fig. 3 SEM and TEM of the microvessels in petechial hemorrhagic infarction in the corticomedullary junction area of the ectosylvian cortex. A: SEM of vascular endocasts shows narrowing of arterioles (a), and extravasation of the Mercox around the venule (v).  $\times 160$ , Bar =  $50 \mu\text{m}$ . B: SEM of cryofracture shows extravasation of the Mercox around the venule (v) and dilatation of the perivascular space (ps).  $\times 100$ , Bar =  $100 \mu\text{m}$ . C: SEM of cryofracture shows narrowing of capillaries (c) and dilatation of the perivascular space (ps) around a neuropile (n) with extensive vacuolation.  $\times 600$ , Bar =  $10 \mu\text{m}$ . D: TEM shows a degenerated venule (v), dilatation of the perivascular space (ps), and extravasation of the erythrocyte (e) and macrophage (m).  $\times 1,000$ , Bar =  $10 \mu\text{m}$ .

えられる。

中大脳動脈近位部閉塞の実験例において、皮質よりも大脳基底核部に高度な虚血が生じることは、局所脳血流量測定や病理学的所見の結果から述べられている<sup>4,5,7,14,20)</sup>が、LSICHモデルでも同様に、皮質よりも大脳基底核部にvasogenic edemaや血管壊死が高度に認められ、外シルビウス回の皮髓境界部では主として細静脈の血管壊死からの破綻性出血に止まっていた。さらに、大脳基底核部に塊状出血を認めることがあったが、これは細動脈の血管壊死からの破綻性出血が主であると考えられた。この細動脈の破綻する部位は、約  $50 \mu\text{m}$  径の血管分岐部が多かったが、レオロジー学的には血管分岐部には応力集中現象が生じ、特に apex 部において近位部の血管内圧の約 3 倍の圧力が集中すると言われており<sup>11)</sup>、この apex 部を中心として血管破綻が生じたと考えられた。一方、postcapillary venule

は open junction によって血球漏出が起りやすいと言われている<sup>9,18)</sup>が、外シルビウス回の皮髓境界部で細静脈の周囲にコンプ状の Mercox の流出を認め、これは細静脈の open junction を中心とした血管破綻によって生じたものと考えられた。

## V 結 語

1. 血管鋳型走査電顕は、微小血管構築を三次元的に観察できるため、異常血管の局在部位が容易に把握できるという利点があるが、本法にも限界があるため、凍結切断走査電顕および透過電顕の所見と対比させて検索する必要がある。

2. LSICHモデルの虚血脳には、微小血管の壊死、vasogenic edema、neuropile の spongiotic な空胞変性などが認められた。特に、大脳基底核部では細動脈の血管壊死に

よる破綻性塊状出血を、一方外シルビウス回の皮髄境界部では細静脈の壊死による破綻性点状出血を認めた。

3. 虚血脳の微小血管構築において、細動脈は狭小化して直線状に伸展し、弾力性に乏しい走行となっていた。また、毛細血管も狭小化し弾力性を失い、細動脈に沿ってまわりつくように走行していた。一方、細静脈は不規則に拡張し、表面も不整であった。これらの微小血管構築の変化は、脳循環の dysautoregulation を反映していると考えられた。

稿を終えるにあたり、御校閲を頂きました長崎大学脳神経外科 森 和夫 教授、ならびに御指導を頂きました同 柴田尚武 助教授に深甚の謝意を捧げます。

## 文 献

- 1) Anderson BG, Anderson WD: Scanning electron microscopy of microcorrosion casts: Intracranial and abdominal microvasculature in domestic animals. *Am J Anat* 153: 523-536, 1978
- 2) Chiang J, Kowada M, Ames A, Wright RL, Majno G: Cerebral ischemia. III. Vascular changes. *Amer J Path* 52: 455-476, 1968
- 3) Clendenin MA, Conrad MC: Collateral vessel development, following unilateral chronic carotid occlusion in the dog. *Am J Vet Res* 40: 84-88, 1979
- 4) Dodson RF, Miyakawa Y, Chu LWF, Ishihara N, Naritomi H, Hsu MC, Deshmukh VD: An ultrastructural assessment of an embolic method of producing ischemia. *Stroke* 8: 337-341, 1977
- 5) Garcia JH, Lossinsky AS, Kaufman IC, Conger KA, Mera H: Fine structure and biochemistry of brain edema in regional cerebral ischemia, in Price TR, Nelson E (eds): *Cerebrovascular Disease*. New York, Raven, 1979, pp 169-189
- 6) Hill EG, McKinney WM: Vascular anatomy and pathology of the head and neck, method of corrosion casting, in Carney AL, Anderson EM (eds): *Advances in Neurology, vol 30, Diagnosis and Treatment of Brain Ischemia*. New York, Raven, 1981, pp 191-199
- 7) Little JR, Kerr FWL, Sundt TM: Microcirculatory obstruction in focal cerebral ischemia: An electron microscopic investigation in monkeys. *Stroke* 7: 25-30, 1976
- 8) 村上宅郎: 微細血管分布機構のための鋳型走査電子顕微鏡法. *細胞* 7: 11-18, 1975
- 9) Nagy Z, Mathieson G, Hüttner I: Blood-brain barrier opening to horseradish peroxidase in acute arterial hypertension. *Acta Neuropathol (Berl)* 48: 45-53, 1979
- 10) Nakai K, Imai H, Kamei I, Itakura T, Komai N, Kimura H, Nagai T, Maeda T: Microangioarchitecture of rat parietal cortex with special reference to vascular "sphincters": Scanning electron microscopic and dark field microscopic study. *Stroke* 12: 653-659, 1981
- 11) 新見英幸, 半田 肇: バイオレオロジーからみた血栓形成. *脳神経外科* 7: 125-130, 1979
- 12) O'Brien MD, Jordan MM, Waltz AG: Ischemic cerebral edema and the blood-brain barrier. Distributions of pertechnetate, albumin, sodium, and antipyrine in brains of cats after occlusion of the middle cerebral artery. *Arch Neurol* 30: 461-465, 1974
- 13) Okada Y, Shima T, Yokoyama N, Uozumi T: Comparison of middle cerebral artery trunk occlusion by silicone cylinder embolization and by trapping. *J Neurosurg* 58: 492-499, 1983
- 14) Petito CK, Pulsinelli WA, Jacobson G, Plum F: Edema and vascular permeability in cerebral ischemia: Comparison between ischemic neuronal damage and infarction. *J Neuropathol Exp Neurol* 41: 423-436, 1982
- 15) Povlishock JT, Kontos HA, Rosenblum WI, Becker DP, Jenkins LW, DeWitt DS: A scanning electron-microscopic analysis of the intraparenchymal brain vasculature following experimental hypertension. *Acta Neuropathol (Berl)* 51: 203-213, 1980
- 16) Rieke GK, Bowers DE, Penn P: Vascular supply pattern to rat caudatoputamen and globus pallidus: Scanning electron microscopic study of vascular endocasts of stroke-prone vessels. *Stroke* 12: 840-847, 1981
- 17) 柴田尚武, 福嶋政昭, 井上 優, 堤 健二, 森 和夫: 脳梗塞に関する実験的研究(第7報) —微小血管への電子顕微鏡的アプローチ—. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 24: 831-839, 1984
- 18) Simionescu N, Simionescu M, Palade GE: Open junctions in the endothelium of the postcapillary venules of the diaphragm. *J Cell Biol* 79: 27-44, 1978
- 19) Spetzler RF, Wilson CB, Weinstein P, Mehdorn M, Townsend J, Telles D: Normal perfusion pressure breakthrough theory: *Clinical Neurosurgery, vol 25*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1977, pp 651-672
- 20) Symon L, Branston NM, Chikovani OC: Ischemic brain edema following middle cerebral artery occlusion in baboons: Relationship between regional cerebral water content and blood flow at 1 to 2 hours. *Stroke* 10: 184-191, 1979
- 21) Tsutsumi K, Inoue M, Shibata S, Mori K: Experimental cerebral infarction. Ultrastructural changes of the microvessels in terminal and boundary zones. *J Clin Electron Microscopy* 15: 791-792, 1982
- 22) 堤 健二, 井上 優, 柴田尚武, 森 和夫, 安永暁生: 脳梗塞に関する実験的研究 —塊状出血巣, 点状出血巣, 軟化巣の局在—. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 25: 333-339, 1985
- 23) 渡辺孝男, 吉本高志, 甲州啓二, 坂本哲也, 鈴木二郎: 脳梗塞の形成過程 —実験的, 電顕的研究— 第二報 小血管の変化. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 19: 811-816, 1979
- 24) 安永暁生: 脳梗塞に関する実験的研究(第4報) —血行再建時の微小血管の変化—. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 22: 185-191, 1982

[別刷請求先: 〒805 福岡県北九州市八幡東区西本町4-18-1, 北九州市立八幡病院脳神経外科, 堤 健二]