

脳梗塞に関する実験的研究

亜急性期脳梗塞の微小血管についての電顕的研究

堤 健二・柴田 尚武・井上 優・森 和夫

Experimental Cerebral Infarction in the Dog

Ultrastructural Study of Microvessels in Subacute Cerebral Infarction

Kenji TSUTSUMI, Shobu SHIBATA, Masaru INOUE and Kazuo MORI

Department of Neurosurgery, Nagasaki University, Nagasaki

Abstract

Large-sized infarctions of the cerebral hemisphere (LSICH) were experimentally induced in 20 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 7 days after the embolization. Mercox® was then injected manually. The brains were immediately removed, and specimens were obtained from the basal ganglia and the ectosylvian gyrus. Regenerated microvessels were observed within the necrosis in the basal ganglia. The regenerated microvessels had an irregular, "bead-like" surface, and formed anastomosed networks. The regenerated capillaries had double basement membranes and endothelia with abundant ribosome and increased pinocytotic vesicles. It is suggested that the regenerated capillaries had immature blood-brain barriers of increased permeability. It is thought that the brain functions of this area are reversible. The microvessels within the vasogenic edema in the corticomedullary junctional area of the ectosylvian gyrus had smooth surfaces, and formed normal capillary networks, but their perivascular spaces were dilated with edematous fluids.

Key words: cerebral infarction, ultrastructural study, microvessels

I はじめに

脳梗塞における微小血管の変化については、すでに光顕および透過電顕による研究が多数報告されている^{3-6,8,9,10,20}が、走査電顕による検索はわずかである^{4,16,17,19}。今回我々は、メチルメタクリレート樹脂の血管鋳型走査電顕により、脳梗塞亜急性期の微小血管構築の変化を検索したので報告する。

II 実験方法

実験には、体重10kg前後の雑種成犬20頭を使用した。まずketamine(5mg/kg)を筋注、nembutal(25mg/kg)静注下に気管内挿管を行い、自発呼吸のまま頸部傍正中切開を加え、右内頸動脈からシリコン円柱(直径1mm、長さ8mm)2個を注入することにより脳梗塞を作製した。塞栓後7日目に、対側総頸動脈から37°Cへパリン加生食水を1,000ml、ついで4°C、1.5%グルタルアルデヒド1,500mlを注入し、メチルメタクリレート樹脂(Mercox®、大日

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11月29日 受理 1986年5月2日

本インキ(東京)の青色400ml、赤色100mlを、圧が200mmHgを越えないように注入した。この間、上大静脈、両側外頸静脈、大腿動脈から脱血を行い、上行および下行大動脈は結紮した。脳はただちに取り出し乳頭体レベルで冠状断を行い、大脑基底核部と外シルビウス回の2ヵ所で標本を採取し、それぞれ2つのブロックに分けた。

おのおの1つのブロックを20%NaOHで腐蝕させ、流水洗滌を7日間繰り返すと血管鉄型のみになり、これを乾燥させたのち、四酸化オスミウムで48時間蒸着、ついで金蒸着を行い鉄型標本を作製した。残りのブロックは、3%グルタールアルデヒドで固定し、4%タンニン酸導電処理と3%オスミウム酸固定後、液体窒素とエタノールを用いて凍結割断を行い、酢酸イソアミル置換後に臨界点乾燥を行い、金蒸着にて凍結割断標本を作製した。以上の標本を、走査電顕JSM-35C(日本電子、東京)で観察した。

さらに、別の梗塞犬で同様の灌流固定を行ったのち、2.5%グルタールアルデヒド前固定、および1%オスミウム酸1時間後固定を施し、エタノール脱水、プロピレン置換、エポン812包埋を行ったのち超薄切片を作製し、酢酸ウラニルおよび酢酸鉛で二重染色し、透過型電顕JEM-100B(日本電子、東京)で観察した。

III 実験結果

1. 肉眼的所見

塞栓術を行った20頭のうち、4頭は意識障害が重篤で7日目までに死亡した。残り16頭は意識障害は軽度で、左片麻痺および左同名性半盲を認め、そのうち12頭を走査電顕用に、4頭を透過電顕用に使用した。剖検では全例において、中大脳動脈近位部から後交通動脈および前大脳動脈の起始部が、塞栓に用いた1ないし2個のシリコン円柱により閉塞していた。塞栓側の大脳半球は腫大し、Mercoxの注入は対側に比して不十分であった。脳の冠状断面でも大脑基底核部の軟化巣は顕著であり、出血性梗塞を3頭に認めた。また、外シルビウス回には浮腫を認めたが、Mercoxの注入は比較的良好であった(Fig. 1)。

2. 外シルビウス回

血管鉄型走査電顕では、20μm径の細動脈は軽度の直線状の伸展化を示し網目状の毛細血管網に移行しており、細動脈の表面には多数のnuclear indentationおよびprecapillary sphincterを認めた。毛細血管網にもMercoxの注入は比較的良好であり、一部に皺状に細小化した毛細血管が認められるのみであった(Fig. 2)。また、30μm径の細動脈から100μm径の細静脈への動脈短絡も認められたが、細静脈からのMercoxの流出はなかった(Fig. 3)。

凍結割断走査電顕では、30μm径の細動脈にはMercox

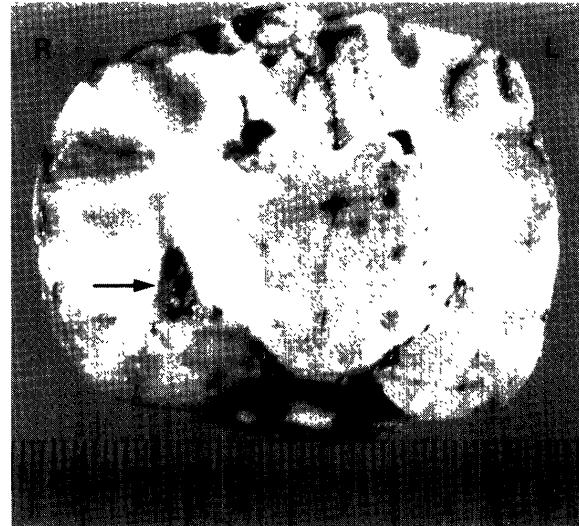


Fig. 1 Coronal section of brain with cerebral infarct in the subacute stage, showing brain swelling in the right hemisphere and necrosis of the basal ganglia (arrow).

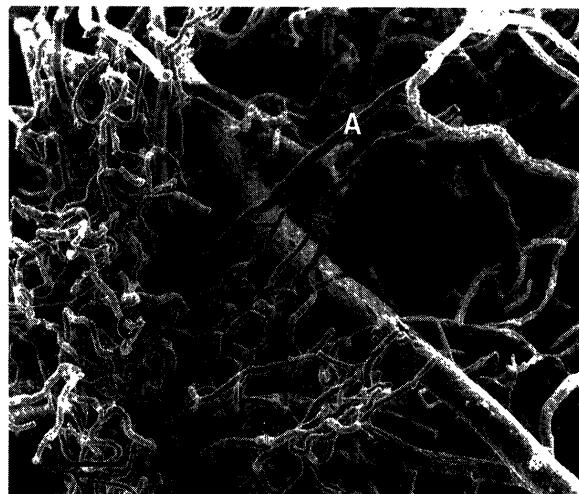


Fig. 2 Scanning electron micrograph (SEM) of vascular endocasts, showing capillary network (C) and stretched arterioles (A) in the corticomedullary junctional area of the ectosylvian gyrus. Bar=100 μm.

がよく流入しており、Mercoxの流出や血管破綻は認められなかった。血管周囲腔は拡大しvasogenic edemaを認めたが、周囲のneuropileにわずかに空胞化が認められた(Fig. 4)。

3. 大脳基底核部

30μm径の微小血管は弾力性に富む分岐様式を示し、相互に血管吻合し血管網を形成して10μm径の毛細血管に移行しているが、血管表面は“数珠状”的な不整な形態をと

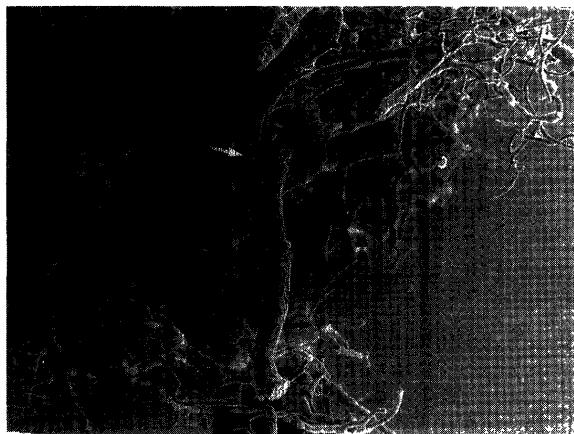


Fig. 3 SEM of vascular endocasts, showing an arteriovenous shunt (arrow) in the corticomedullary junctional area of the ectosylvian gyrus. Bar=100 μm .

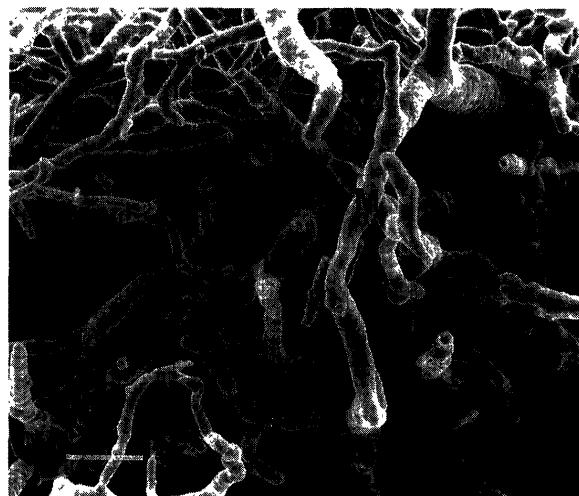


Fig. 5 SEM of vascular endocasts, showing abundant anastomoses and "bead-like" surface of regenerated microvessels (M) in the basal ganglia. Bar=30 μm .

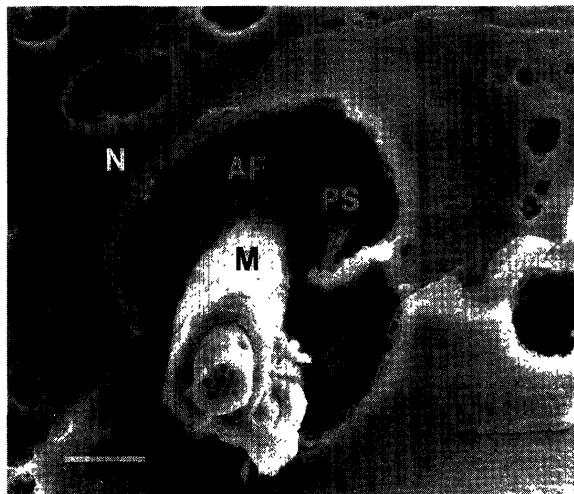


Fig. 4 SEM of cryofracture, showing a microvessel (M) filled with Mercox®, dilated perivascular space (PS), anchoring filaments (AF) and vacuolation of the neuropile (N) in the corticomedullary junctional area of the ectosylvian gyrus. Bar=30 μm .

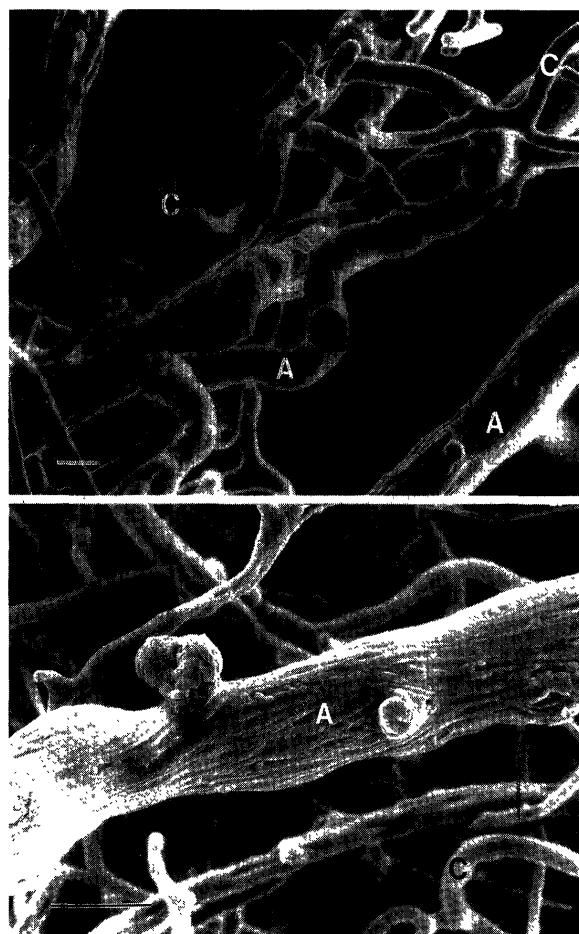


Fig. 6 SEM of vascular endocasts, showing regenerated capillaries (C) and "bud" formation of the arteriole (A) in the basal ganglia. upper: Bar=10 μm , lower: Bar=30 μm .

り、内皮細胞に相当する nuclear indentation や precapillary sphincter に相当する輪状陥没も不明瞭であった(Fig. 5)。また、毛細血管網の発達は不十分であったが、毛細血管は弾力性に富む走行を示し、円滑な表面構造を有していた(Fig. 6 upper)。一部の 100 μm 径の小動脈では、nuclear indentation の著しい増加と“発芽状”的血管分岐も認められた(Fig. 6 lower)。

凍結割断所見では、50 μm 径の不規則な空洞を多数認め、空洞壁には 10 μm 径の橢円形の細胞が多数みられ、一部に Mercox の流入した 10 μm 径の毛細血管を認めた

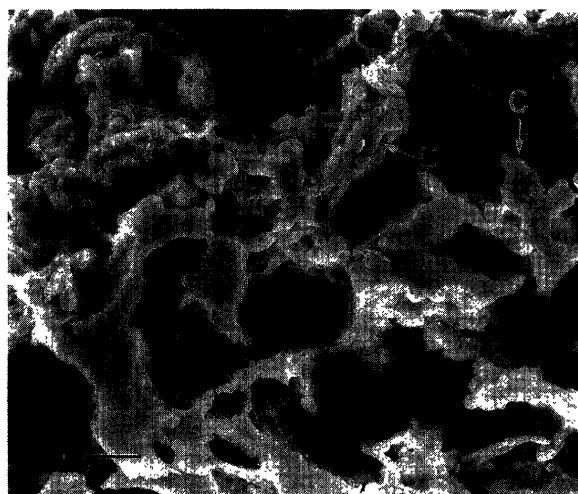


Fig. 7 SEM of vascular endocasts showing infiltration of the phagocyte (P) into the necrotic tissue, and the regenerated capillary (C) in the basal ganglia. Bar=20 μm.

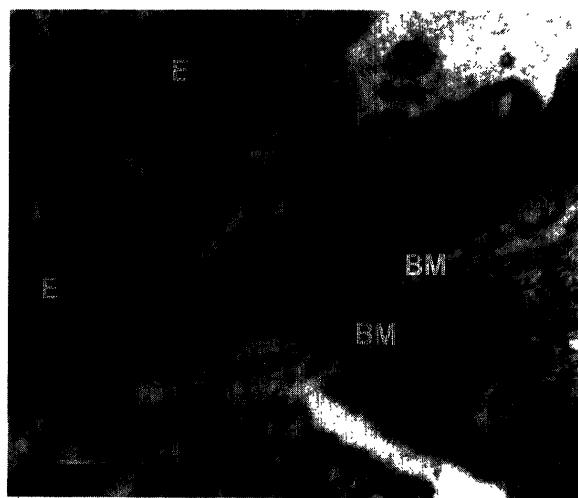


Fig. 8 Transmission electron micrograph, showing abundant ribosomes (arrow) and increased pinocytotic vesicles (arrowhead) of the endothelium (E), and the double structure of the basement membrane (BM) of the regenerated capillary. Bar=1 μm.

(Fig. 7). 透過電顕所見では、10 μm 径の毛細血管は基底膜が二重になっており、内皮細胞では luminal surface infolding が著明に増加し、pinocytotic vesicle とリボゾームの増加を認めた。血管周囲腔は著明に拡大し、周囲の neuropile は壊死に陥っていた(Fig. 8)。

IV 考 察

脳梗塞の亜急性期は、病理学的には脳浮腫の残存、

phagocyte の脂肪顆粒細胞化、出血などが混在している状態であり、病変周囲には毛細血管の新生が生じると言われている^{1,11,13,14)}。ヒトでは発症後第1週後半から3週間までが亜急性期とされており、新生血管の透過性の異常は CT スキャン上 contrast material の漏出による enhancement として認められると言われている^{7,12,15,18)}。この新生血管の出現は、マウスやサルではヒトより早く、7日目には認められている^{5,6,8,9)}。

さて、大脳基底核部では、凍結割断走査電顕により多数の空洞とその空洞壁に 10 μm 径の細胞浸潤および 10 μm 径の毛細血管を認めたが、前者は壊死巣に phagocyte が浸潤し清掃を行っている状態と考えられた。また、この毛細血管では、透過電顕にて基底膜の二重構造、内皮細胞の surface infolding の増加、およびリボゾームと pinocytotic vesicle の増加が認められ、Garcia ら⁶⁾の示した再生毛細血管とほぼ同一と考えられた。脳の毛細血管は Bennett らの分類²⁾では第 I 型に属し、無窓性でよく発達した基底膜を有していると言われているが、脳梗塞亜急性期に出現する再生毛細血管は pericapillary sheath を有し、Bennett 分類では I β 型とされている。しかし、今回の実験で7日目の大脳基底核部の梗塞巣周囲に認められた再生毛細血管は、pericapillary sheath を有しておらず Bennett 分類の Ia 型に属するものと思われたが、これは亜急性期の初期であり未熟な再生毛細血管であったためと考えられた。この再生毛細血管は血管透過性の障害があると言われている^{9,10)}が、透過電顕で基底膜や tight junction には大きな変化は認められず、pinocytotic vesicle の増加が透過性の変化の原因と考えられた。また血管鋸型走査電顕では、大脳基底核部に 30 μm 径の数珠状の不整な表面構造を有する微小血管を認め、これらの血管は相互に吻合し血管網を形成したのち 10 μm 径の毛細血管に移行していたが、nuclear indentation は不明瞭で sphincter も認められず、再生した微小血管と考えられた。一方、外シルビウス回の皮質では、凍結割断走査電顕において、30 μm 径の細動脈には十分に Mercox が流入しており血管壁も円滑であったが、血管周囲腔の拡大と neuropile の空胞形成が残存していたため vasogenic edema の状態は続いていると考えられた。血管鋸型走査電顕では細動脈が軽度の伸展化を示しており、これは vasogenic edema の影響と考えられたが、毛細血管網においても細小化した血管はわずかで、脳循環も良好であると考えられた。このため、このような虚血脳は reversible の可能性を有し、いわゆる penumbra^{1,8)}の領域と考えられ、vasogenic edema が改善されれば正常な autoregulation を有する循環系になるとと考えられる。

V 結 語

1. 7日目の大脳半球大梗塞犬では、大脳基底核部には高度な壊死巣、外シルビウス回には vasogenic edema を認めた。
2. 大脳基底核部の壊死巣には、phagocyte の浸潤と再生毛細血管を認めた。再生毛細血管は未熟な段階で、Bennett の分類で I α 型に属し、pinocytotic vesicle の増加に基づく血管透過性の変化が示唆された。
3. 大脳基底核部の 30 μm 径の再生微小血管は、数珠状の不整な表面構造を示し、相互に吻合して血管網を形成したのち 10 μm 径の再生毛細血管に移行していた。
4. 外シルビウス回の血管構築は、vasogenic edema の残存により細動脈の直線状伸展化および一部の毛細血管網で血管径の狭小化を認め、脳循環の penumbra の領域に相当することが示唆された。

文 献

- 1) Alcalá H, Gado M, Torack RM: The effect of size, histologic elements, and water content on the visualization of cerebral infarcts. *Arch Neurol* 35: 1-7, 1978
- 2) Bennett HS, Luft JH, Hampton JC: Morphological classifications of vertebrate blood capillaries. *Amer J Physiol* 196: 381-390, 1958
- 3) Calhoun CL, Mottaz JH: Capillary bed of the rat cerebral cortex. Fine structure in experimental infarction. *Arch Neurol* 15: 320-328, 1966
- 4) Cancilla PA, Frommes SP, Kahn LE, DeBault LE: Regeneration of cerebral microvessels. A morphologic and histochemical study after local freeze-injury. *Lab Invest* 40: 74-82, 1979
- 5) Dodson RF, Aoyagi M, Chu LWF: Ultrastructural changes in subacute cerebral infarction following middle cerebral artery occlusion in the baboon. *Cytobios* 13: 97-108, 1975
- 6) Garcia JH, Conger KA, Briggs L: Brain capillaries in acute and subacute regional ischemia, in Cervos-Navarro J, Fritschka E (eds): *Cerebral Microcirculation and Metabolism*. New York, Raven, 1981, pp 83-91
- 7) 河瀬 純、水上公宏、田沢俊明、荒木五郎、長田 乾: 脳梗塞の病態推移と血行再開 II —血液脳閥門透過性—. 脳と神 34: 1137-1144, 1982
- 8) Mies G, Auer LM, Ebhardt G, Traupe H, Heiss W-D: Flow and neuronal density in tissue surrounding chronic infarction. *Stroke* 14: 22-27, 1983
- 9) Mitchell J, Weller RO, Evans H: Capillary regeneration following thermal lesions in the mouse cerebral cortex. An ultrastructural study. *Acta Neuropathol (Berl)* 44: 167-171, 1978
- 10) Mitchell J, Weller RO, Evans H: Reestablishment of the blood brain barrier to peroxidase following cold injury to mouse cortex. *Acta Neuropathol (Berl)* 46: 45-49, 1979
- 11) 三浦妙太: 脳軟化巣の電顕的解析 —Vasogenic な脳内病変の一つのモデルとして—. 日臨電顕会誌 5: 1457-1464, 1973
- 12) 森本哲也、榎 寿右、堀 浩、京井喜久男、内海庄三郎、日浅義雄、村田吉郎: 実験的脳梗塞の CT 像と組織像 —血液脳閥門、脳微小循環および contrast enhancement 陽性出現機序について—. 脳と神 35: 465-473, 1983
- 13) 村上宅郎、大谷 修、菊田彰夫、大塚愛二: 走査電子顕微鏡による血管铸型の観察 一方法の総括—. 電顕 16: 11-18, 1981
- 14) 大石 光、甲州啓二、吉本高志、鈴木二郎: 脳梗塞の CT contrast enhancement 陽性所見とその組織像 一実験的研究—. 脳卒中 3: 23-26, 1981
- 15) 斎藤 勇: 脳血管障害(閉塞性)の CT 診断. CT 研究 4: 511-519, 1982
- 16) 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
- 17) 竹重順夫、毛利 純、藤本 淳: 血管新生機序に関する電顕的研究. 脈管学 15: 271-275, 1980
- 18) 高杉晋輔、蔭山武文、山下 茂、日下和昌、上田 伸、松本圭藏: 脳内血腫にみられる環状 enhancement の発現機序について 一実験的、組織学的検討—. CT 研究 2: 303-310, 1980
- 19) 堤 健二: 脳梗塞に関する実験的研究 一血管铸型走査電顕法を中心—. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 26: 595-600, 1986
- 20) 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 一塊状出血巣、点状出血巣、軟化巣の局在—. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 25: 333-339, 1985

[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]