

脳梗塞に関する実験的研究 (第3報)

—No-reflow phenomenon の再検討—

柴田 尚武・安永 暁生・森 和夫

Experimental Cerebral Infarction in the Dog

—3 Reassessment of the No-Reflow Phenomenon—

SHOBU SHIBATA, AKIO YASUNAGA and KAZUO MORI

Department of Neurosurgery, Nagasaki University

Summary

To make an experimental cerebral infarction in the dog, a proximal clipping of the middle cerebral artery (MCA) was performed and the collateral blood supply was compromised by subjecting the animal hemorrhagic hypotension involving reduction of blood pressure to 50 mmHg for 1 hour. Then, the systemic blood pressure was restored by infusion of the shed blood. The clip was removed at different times—immediately, 0.5 hours, 3 hours, 6 hours, 12 hours and 24 hours after restoration. The no-reflow area was investigated by fluorescein angiography (FAG) and carbon perfusion method (CP). There were other groups in which the clip had been taken off at 0.5 or 4 hours after restoration and circulation was maintained 24 hours. Then the no-reflow area was also investigated.

There was no evidence of the no-reflow phenomenon on the surface vessels after cerebral ischemia in any of the experimental conditions. Arteriovenous shunt or perivascular infiltration of fluorescein dye were only observed in the reflow area in animals which received temporary occlusion of the MCA for 6 hrs or more.

On the other hand, the no-reflow phenomenon was observed by CP in intraparenchymal vessels which had been exposed to focal cerebral ischemia. The longer the duration of ischemia, the more extensive were the areas of non-filling. In animals with recirculation of 24 hrs duration after 4 hrs of temporary occlusion, large perfusion defects were also observed.

In continuous occlusion of the MCA for 24 hrs without removing the clip, extravasation of carbon particles were localized only in the boundary zone between the deep cortical layer and the subcortical white matter. To the contrary, animals with temporary occlusion for 24 hrs or animals with 4 hrs occlusion followed by recirculation for 24 hrs frequently caused wide exudation of carbon particles which extended into the gray matter of the MCA territory. These animals showed more severe hemorrhagic infarction than those with the permanent occlusion.

Key words: regional cerebral ischemia, no-reflow phenomenon

I はじめに

脳血管閉塞解除後に生ずる no-reflow phenomenon (NRP) については, Ames ら¹³⁾⁶⁾⁷⁾ 自身も本現象の存否, 原因について再検討を行っており, 未だ見解の一致をみていない. この混乱の原因として, 虚血の作製法

(global ischemia か regional ischemia か), 虚血時間の長短, 再循環時間の長短の相違によることが挙げられる.

そこで, 第1, 2報に報告したと同一の局所脳梗塞犬を作製し, 脳血管閉塞解除後に生ずる NRP について永久閉塞群と対比して検討を行った.

長崎大学脳神経外科

[連絡先: 〒852 長崎市坂本町7-1, 長崎大学脳神経外科, 柴田尚武]

1979年9月10日 受稿

Ⅱ 実験方法

1. 脳梗塞犬の作製

10kg前後の雑種犬をネンプタール静麻(25 mg/kg)後、右側頭骨を穿頭し硬膜に小切開を加えて側頭葉を挙上し、中大脳動脈起始部にハイフェツ動脈瘤クリップ659-100をかけ、硬膜切開部にスポンゼルを当てた後皮膚を縫合し閉頭、直ちに脱血により血圧を50 mmHgまで下げて1時間維持し、ついで採取血の再注入により血圧を元に戻して実験的脳梗塞のモデルとした。これらの手順については第1報に詳述した。

実験1で restoration 直後(5頭)、3時間後(5頭)、6時間後(5頭)、12時間後(5頭)、24時間後(10頭)にそれぞれ閉塞を解除し、fluorescein angiography (FAG)を閉塞解除の前後に施行した後、carbon perfusion (CP)を行い、直ちに脳を取り出して固定した後、光顕による微小血管の組織学的検索を行った。実験2で restoration 直後(5頭)と4時間後(8頭)に解除を行い、24時間

後まで再循環させた後にFAGを施行し、CPを行って直ちに脳を取り出して固定した後、同様の検索を行った。

2. 検索法

Fluorescein angiography (FAG)²⁰⁾: 舌動脈カテーテルを総頸動脈分岐部まで挿入し、1%フルオレスチン1.6 mlを注入し、注入と同時にシャッターを切り、自動的に蛍光高速連続写真を36枚撮る。大腿静脈より注入する場合は10%フルオレスチン4 mlを使用する。Kodak high speed ektachrome film, EH 135-36を使用し、4倍増感現像を行う。

Carbon perfusion (CP)²⁰⁾: 開胸後カテーテルを左心室および上大静脈に挿入し、下行大動脈をclamping後、直ちに10%ホルマリン500 mlと不易墨汁720 mlの混合液を120 mmHgでperfusionした後脳を取り出し、10%ホルマリンに7日間固定した。固定脳を7個のcoronal sectionとし、パラフィン包埋後150 μ の切片を作成し、弱拡大(6.6倍、13.2倍)で検鏡し顕微鏡写真を撮った。

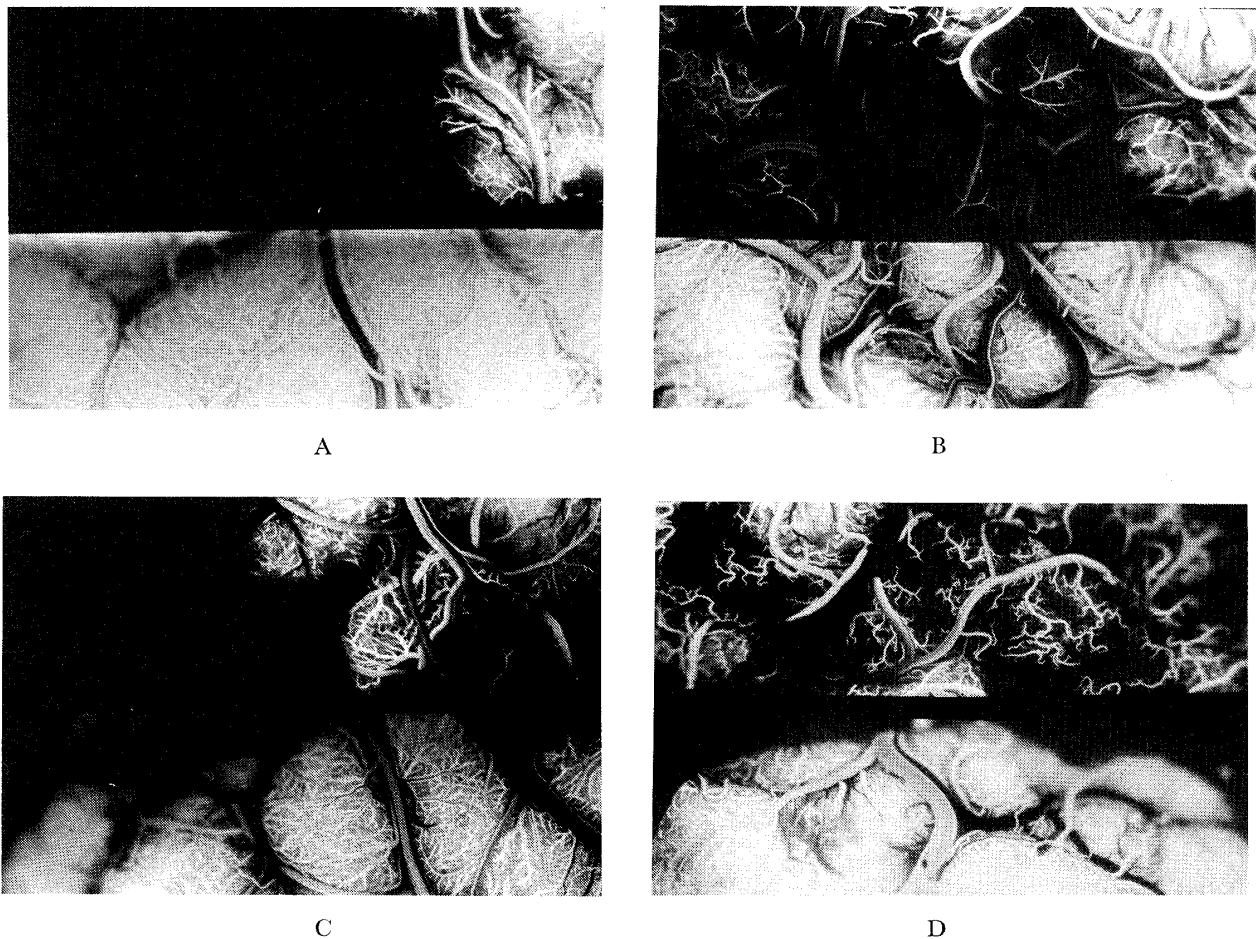


Fig. 1 Fluorescein angiographs (FAG) before (upper) and after (lower) removal of the clipping of the middle cerebral artery (MCA) in the dog. The clip was removed 3 hrs (A), 6 hrs (B), 12 hrs (C) and 24 hrs (D) after restoration of BP.

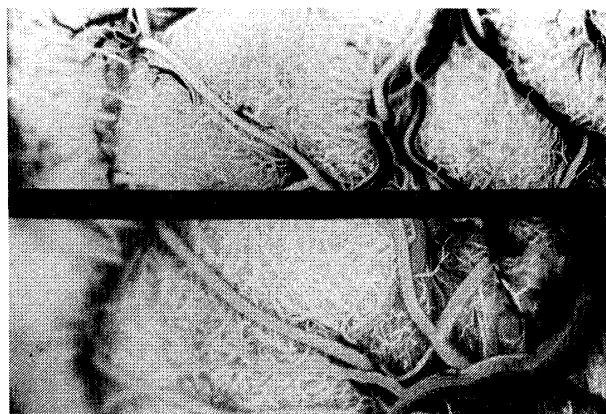


Fig. 2 FAG after 24 hrs of recirculation following 0.5 hrs (upper) and 4 hrs (lower) of temporary occlusion of MCA.

Ⅲ 結 果

1. 虚血部皮質表面

Fig. 1 は実験 1 で、上段は閉塞解除直前の、下段は直後の FAG を示す。Restoration 直後および 3 時間後に閉塞を解除した群では、解除前に見られた虚血部は正常に造影される (A)。6 時間後解除群でも虚血部は造影されるが reflow の部分に局所循環時間の異常や A-V shunt の形成が見られる (B)。12 および 24 時間後解除群では reflow area に局所循環時間異常に加えて fluorescein の extravasation をみとめる (C, D)。

Fig. 2 は実験 2 で、上段は restoration 直後に、下段は 4 時間後に閉塞解除をそれぞれ行い、24 時間後まで再循環させた後の FAG で、両群とも虚血部は造影されるが、後者では reflow area に局所循環異常、A-V shunt, fluorescein extravasation 等が見られ、時として subpial haemorrhage のため造影されない部分も見られる。

以上、虚血時間の長短、再循環時間の長短に関係なく、皮質表面血管に NRP はみとめられなかった。しかし restoration 後 4～6 時間目より reflow area に局所循環時間異常、A-V shunt, fluorescein extravasation 等が見られ、これらの所見は 24 時間後解除直後群よりも 4 時間後解除し、24 時間後まで再循環群に著明であった。

2. 虚血部皮質内部

Fig. 3 は実験 1 で、閉塞解除直後の CP の肉眼的および顕微鏡的所見を示す。直後解除群ではまったく正常に造影されるが、3 時間後解除群では patchy non-filling area が見られ、周辺部に少量の carbon extravasation をみとめる (A)。6 時間後解除群では中大脳動脈領域に一致した大きな non-filling area をみとめる (B)。12 および 24 時間後解除群では non-filling area はさらに増大し、

この中の比較的大きな動静脈に carbon の進入をみとめ、その末端に extravasation が見られる。また虚血部皮質境界の carbon extravasation も増加しており、永久閉塞群よりも出血性梗塞の所見が著明である (C, D)。

Table 1 および Fig. 4 は CP における皮質内虚血部面積 (最大の non-filling area を示す section で、半球面積に対する non-filling area の % であらわす) の経時的变化を、永久閉塞群と閉塞解除群と対比してまとめたものである。解除群の虚血部面積は経時的に増大し、永久閉塞群とほぼ同じ経過をとるが、永久閉塞群で 6 時間後に見られる一過性の虚血部増加の傾向は見られず、このことはこの時期における虚血部周辺の微小血管は未だ reflow の能力を有していると考えられる。

実験 2 で、restoration 直後に閉塞解除を行い 24 時間後まで再循環させた群の CP では虚血部は完全に reflow され正常所見を示す (Table 2)。Fig. 5 は restoration 4 時間後に閉塞解除を行い、24 時間後まで再循環させた後の CP で、永久閉塞群とほぼ同じ大きさの虚血部をみとめるが (Table 2)、虚血部内で毛細血管の破綻による carbon extravasation がみとめられ、虚血部皮質境界の carbon extravasation も増加しており、実験 1 の 24 時間後解除直後群よりも出血性梗塞の所見がさらに著明であった。

以上、皮質内部血管では NRP をみとめた。実験 1 で no-reflow area は虚血時間に比例して増大し、永久閉塞群とほぼ同じ経過をとるが、永久閉塞群で 6 時間後に見られる一過性の虚血部増加の傾向は見られなかった。実験 2 で 4 時間後に閉塞解除を行い、24 時間後まで再循環させた群にもやはり NRP をみとめた。また、虚血部内の carbon extravasation が、実験 1 の 24 時間後解除直後群で皮質動静脈末端枝に、実験 2 の 4 時間後解除し 24 時間後まで再循環群で毛細血管に見られ、虚血部皮質境界でも著明に増加しており、永久閉塞群よりも出血性梗塞の所見が著明であった。

Ⅳ 考 察

Ames ら (1968)¹⁾ は、ウサギの両側総頸動脈と椎骨動脈の結紮および頸部圧迫により脳血流を 5 分以上遮断すると、血流再開直後に毛細血管レベルで血流が回復しない部分のあることを発見し、これを NRP と名付けた。この NRP が脳卒中患者でも起こるとすれば、脳血管そのものの虚血性変化も念頭におかなければならないことを強く示唆する。その後多くの追試が行われつつあるが、その存否、原因について未だ見解の一致をみていない。この混乱の原因として、虚血の作製法 (global is-

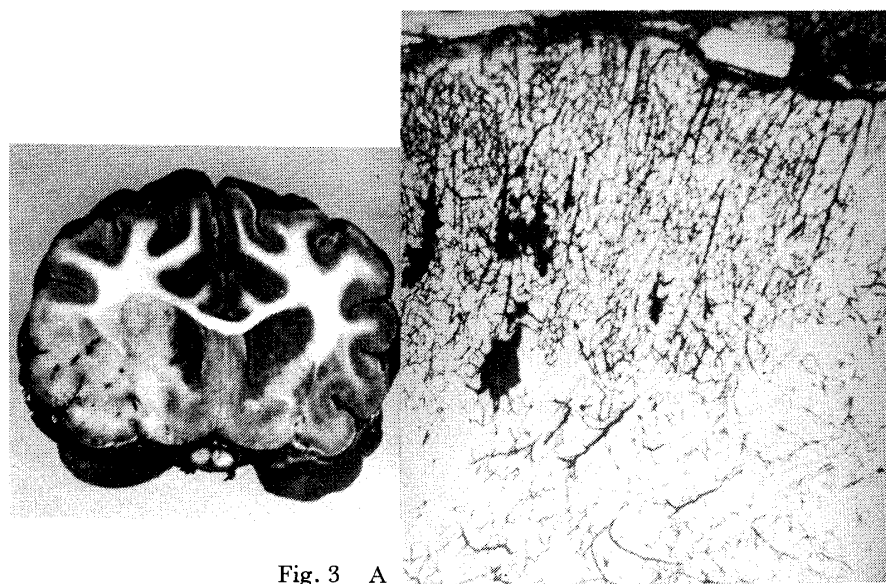


Fig. 3 A

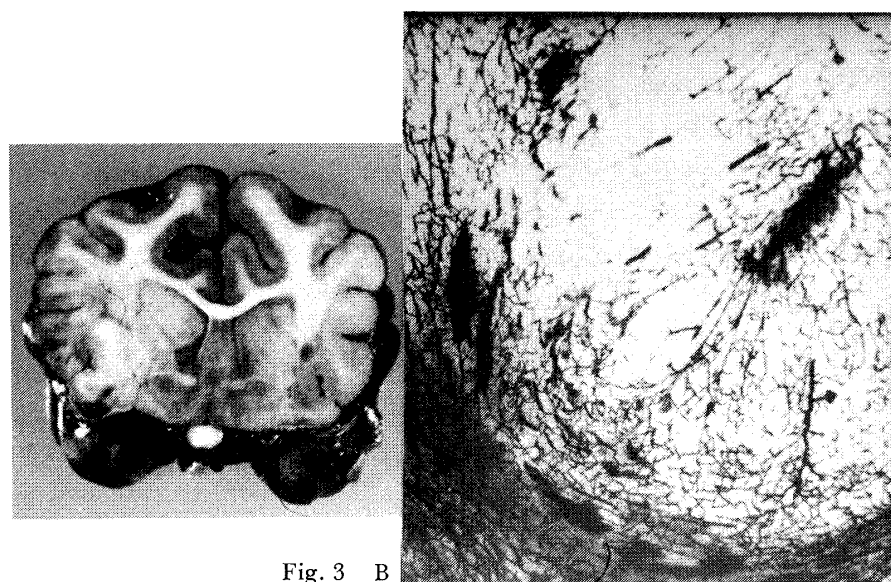


Fig. 3 B

Table 1 Extent of carbon non-filling in brain parenchyma of dogs following permanent or temporary occlusion of R-MCA

Time after BP restoration	Permanent		Temporary	
	No. of dogs	Maximum area* of ischemia (%)	No. of dogs	Maximum area* of ischemia (%)
0.5 hrs	5	3±1	5	0
3 hrs	5	8±1	5	4±3
6 hrs	5	40±8	5	13±9
12 hrs	5	18±6	5	15±7
24 hrs	10	33±11	10	23±11

*Percent of the surface of the most affected coronal section which did not fill with carbon

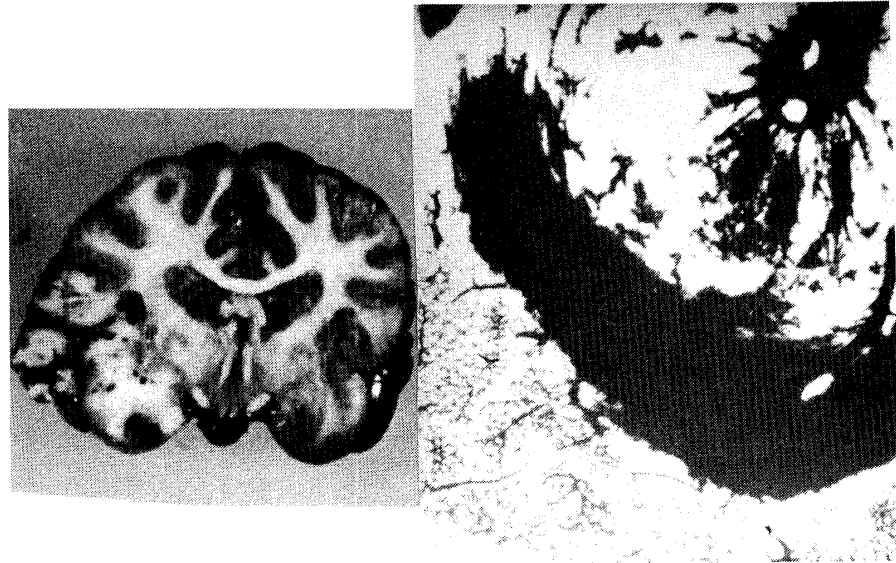


Fig. 3 C

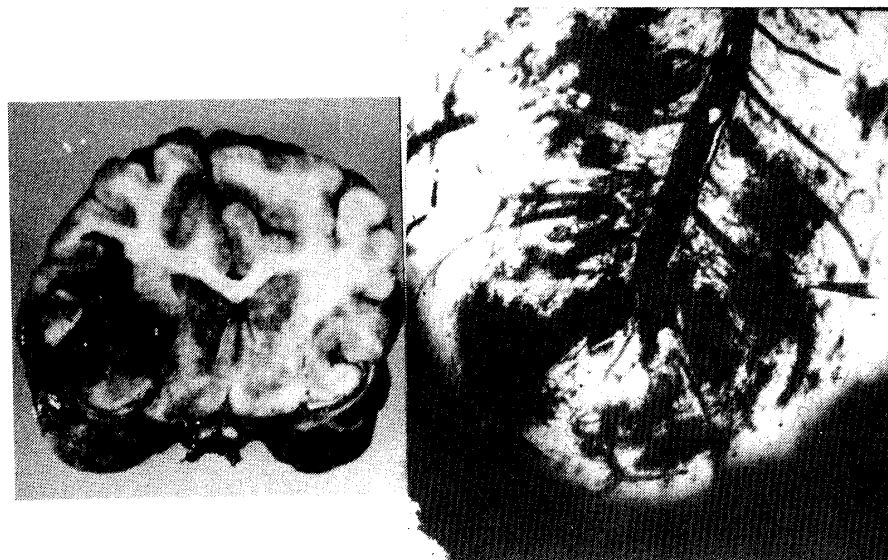


Fig. 3 D

Fig. 3 Carbon perfusion (CP) after temporary occlusion of MCA for 3 hrs (A), 6 hrs (B), 12 hrs (C) and 24 hrs (D) after restoration of BP.

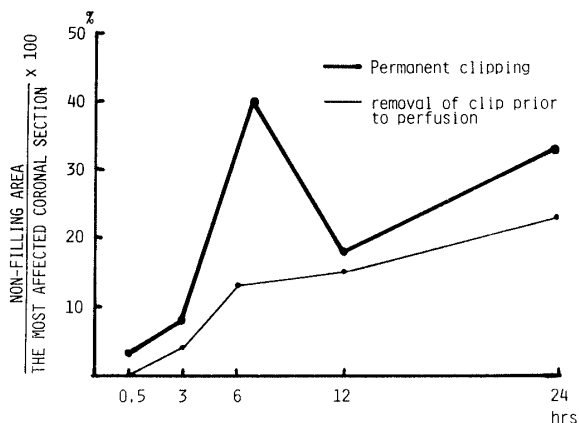


Fig. 4 Changes of ischemic area after restoration of BP.

chemia か regional ischemia か), 虚血時間の長短, 再循環時間の長短等の差違によることが挙げられる。

Ames ら自身もその後, ウサギの上行大動脈起始部を15分間以内結紮して global ischemia を作製して解除直後の NRP を観察し, 本現象の主因は, 毛細血管内皮細胞や perivascular glia の膨化による毛細血管内腔の狭窄や閉塞であるとしていたが³⁾, その後脳血流停止により生じた赤血球凝集に伴う blood viscosity の上昇であるとし⁶⁾, さらに最近では頭蓋内圧亢進に伴う precapillary shunting による intracapillary pressure の減少⁷⁾や extracellular potassium concentration の増加による vascular constriction⁷⁾²¹⁾ とし, 変遷を重ねている。

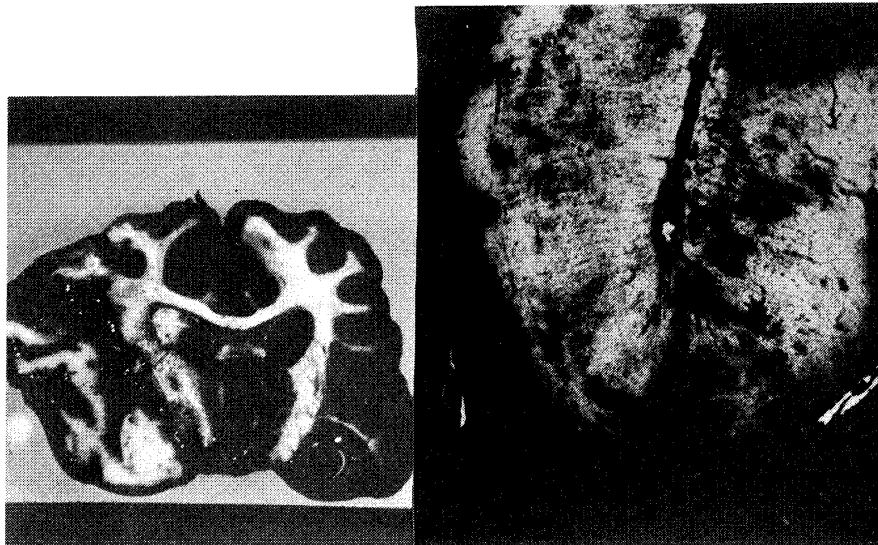


Fig. 5 CP after 24 hrs of recirculation following 4 hrs of temporary occlusion of MCA.

Table 2 Extent of carbon non-filling in brain parenchyma of dogs after 24 hrs of recirculation following 0.5 hrs and 4 hrs of temporary occlusion of R-MCA

Duration of temporary occl.	0.5 hrs		4 hrs	
	No. of dogs	Maximum area of ischemia	No. of dogs	Maximum area of ischemia
24 hrs	5	0%	8	37±3%

Ames ら以後の NRP に関する報告を検討してみると実験の動物や方法の差違が目立つ。もっとも多いのが、systemic circulatory arrest による global ischemia による方法で、Hossman ら (1970)¹³⁾、Olsson ら (1971)¹⁰⁾ はネコで 8 分間、鎖骨下、腕頭、両側総頸、椎骨動脈を結紮し、再循環 20 分後に、Cuypers ら (1974)⁹⁾ は 20 分間、腕頭、鎖骨下動脈を結紮し、再循環直後に、Hart ら (1978)¹¹⁾ は 30 分間頸部圧迫を行い、解除 20 分後にそれぞれ観察を行い、Ginsberg ら (1972)⁸⁾、Miller ら (1972)¹⁷⁾ はサルで 10 分間、大小循環の動静脈をすべて結紮し、再循環直後に、Harrison ら (1975)¹⁰⁾ は gerbil で 30 分間、両側総頸動脈を結紮し、再循環 10 分後に、Wade ら (1975)²¹⁾ はラットで 16 分間、上行大動脈を結紮し、再循環直後に、それぞれ観察を行い NRP をみとめた。Cardiac arrest による global ischemia では、Hekmatpanah (1973)¹²⁾、Lin ら (1977)¹⁵⁾ がイヌで 10 分間行い、再循環 4~6 時間後に NRP をみとめた。Regional ischemia による報告は少なく、Crowell ら (1972)⁴⁾ はサルで 2 時間~7 日間、中大脳動脈を結紮し再開通直後に NRP をみとめた。以上のごとく、total circulatory あるいは cardiac arrest のような重症な global ischemia では短時間の虚血

でも NRP が生じるようであるが、regional ischemia の場合は一定時間以上の虚血が必要と思われる。

伊藤ら (1976)¹⁴⁾ は gerbil で一側総頸動脈を 6 時間以内結紮し、再循環直後では NRP をみとめたが、15 分後には消失したとし、宮坂ら (1978)¹⁸⁾ はイヌで上行大動脈および上下大静脈を 15 分間結紮し、再循環直後では NRP をみとめたが 15 分後には消失したとそれぞれ報告しているが、前者は Harrison らの実験が両側であるのに対して片側のみであり、後者は Hekmatpanah らの cardiac arrest に対して上行大動脈結紮であり、いずれも虚血の程度が軽いところが異なっている。また、Marshall ら (1975)¹⁶⁾、浅野ら (1976)²⁾ はウサギ、イヌの cisterna magna infusion で 200 mmHg、15 分間の圧負荷による全脳虚血では NRP は可逆性であったと報告しているが、これらの実験法も血管結紮法と比較して虚血が軽度であると考えられる。

著者らのイヌの中大脳動脈結紮では、restoration 3 時間以後皮質内部血管に NRP をみとめ、no-reflow area は虚血時間に比例して増大し、永久閉塞群とほぼ同じ大きさの経過をとった。また restoration 4 時間後に閉塞解除を行い 24 時間後まで再循環させても、永久閉塞群とほぼ

同じ大きさの no-reflow area をみとめた。本モデルでは脱血による低血圧を加えることにより complete に近い regional ischemia を作製しようところから、Crowell らのサルによる実験成績と良く一致した結果が得られたものと考えられる。皮質表面血管では虚血時間や再循環時間の長短に関係なく、NRP はみとめられなかった。これは皮質内部の穿通枝には副血行路がないが、脳表血管系には豊富であるという解剖学的利点のみならず、浮腫による圧迫や metabolic regulation の影響が少ない⁹⁾ ということ等からも説明できると考えられる。

V 結 語

局所脳梗塞犬を作製し脳血管閉塞解除後に生ずるNRPについて、脳表血管はFAGで、脳内血管はCPで観察を行った。

NRPは皮質表面ではみとめられなかったが、皮質内では虚血時間に比例してみとめられた。また、24時間後では虚血部皮髄境界のみならず no-reflow area の中にも出血が見られた。

本論文の要旨は第19回日本神経学会総会（1978年5月30日、於東京）および第4回日本脳卒中学会（1979年2月3日、於京都）において発表した。

文 献

- 1) AMES, A., III., WRIGHT, R. L., KOWADA, M., THURSTON, J.M. & MAJNO, G.: Cerebral ischemia II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol* 52: 437-453, 1968
- 2) 浅野孝雄, 田村 晃, 永宗明仁, 卓 允信, 金 是二, 佐野圭司: 急性頭蓋内圧亢進の脳微小循環に及ぼす影響について. *神経外科* 16 (II): 387-395, 1976
- 3) CHIANG, J., KOWADA, M., AMES, A., III., WRIGHT, R. L. & MAGNO, G.: Cerebral ischemia III. Vascular changes. *Am J Pathol* 52: 455-476, 1968
- 4) CROWELL, R. M. & OLSSON, Y.: Impaired microvascular filling after focal cerebral ischemia in monkeys. *J Neurosurg* 36: 303-309, 1972
- 5) CUYPERS, J. & MATAKAS, F.: The effect of postischemic hyperemia on intracranial pressure and the no-reflow phenomenon. *Acta Neuropathol* 29: 73-84, 1974
- 6) FISCHER, E. G. & AMES, A.: Studies on mechanisms of impairment of cerebral circulation following ischemia. Effect of hemodilution and perfusion pressure. *Stroke* 3: 538-542, 1972
- 7) FISCHER, E. G., AMES, A., III., HEDLEY-WHYTE, E. T. & O' GORMAN, S.: Reassessment of cerebral capillary changes in acute global ischemia and their relationship to the no-reflow phenomenon. *Stroke* 8: 36-39, 1977
- 8) GINSBERG, M. D. & MYERS, R. E.: The topography of impaired microvascular perfusion in the primate brain following total circulatory arrest. *Neurology* 22: 998-1011, 1972
- 9) HARPER, A. M., DESHMUKH, V. D., ROWAN, J. O. & JENNETT, W. B.: The influence of sympathetic nervous activity on cerebral blood flow. *Arch Neurol* 27: 1-6, 1972
- 10) HARRISON, M. J. G., SEDAL, L., ARNOLD, J. & ROSS RUSSELL, R. W.: No-reflow phenomenon in the cerebral circulation of the gerbil. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 38: 1190-1193, 1975
- 11) HART, M. N., SOKOLL, M. D., DAVIES, L. R. & HENRIQUEZ, E.: Vascular spasm in cat cerebral cortex following ischemia. *Stroke* 9: 52-57, 1978
- 12) HEKMATPANAH, J.: Cerebral blood flow dynamics in hypotension and cardiac arrest. *Neurology* 23: 174-180, 1973
- 13) HOSSMAN, K. A. & OLSSON, Y.: Suppression and recovery of neuronal function in transient cerebral ischemia. *Brain Res* 22: 313-325, 1970
- 14) 伊藤梅男: Mongolian Gerbil における脳虚血と血流再開後の脳障害に関する研究. *日独医報* 21: 47-68, 1976
- 15) LIN, S. & KORMANO, M.: Cerebral circulation after cardiac arrest, microangiographic and protein tracer studies. *Stroke* 8: 182-188, 1977
- 16) MARSHALL, L. F., WELSH, F., DURITY, F., LOUNSBURY, R., GRAHAM, D. I. & LANGFITT, T. W.: Experimental cerebral oligemia and ischemia produced by intracranial hypertension, Part 1: Pathophysiology, electroencephalography, cerebral blood flow, blood-brain barrier, and neurological function. *J Neurosurg* 43: 308-317, 1975
- 17) MILLER, J. R. & MYERS, R. E.: Neuropathology of systemic circulatory arrest in adult monkeys. *Neurology* 22: 888-904, 1972
- 18) 宮坂佳男, 川野信之, 齊藤武志, 大和田隆, 矢田賢三: 定量的分析法による no-reflow phenomenon の再検討. 第21回脳循環代謝研究会, 1978, pp 74-75
- 19) OLSSON, Y. & HOSSMAN, K. A.: The effect of intravascular saline perfusion on the sequelae of transient cerebral ischemia, light and electron microscopical observation. *Acta Neuropathol* 17: 68-79, 1971
- 20) 柴田尚武, 安永暁生, 森 和夫: 脳梗塞に関する実験的研究 (第1報) — 出血性梗塞の発生機序について —. *神経外科* 18 (II): 377-383, 1978
- 21) WADE, J. G., AMTORP, O. & SORENSEN S. C.:

No-flow state following cerebral ischemia, role of
increase in potassium concentration in brain

interstitial fluid. *Arch Neurol* 32: 381-384, 1975