

## 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—

柴田 尚武・安永 暁生・森 和夫

## Experimental Cerebral Infarction in the Dog

### 1. Pathogenesis of Hemorrhagic Infarction

SHOBU SHIBATA, AKIO YASUNAGA and KAZUO MORI

*Department of Neurosurgery, Nagasaki University*

#### Summary

1. The middle cerebral artery of dogs was occluded by a clip and the collateral blood supply was compromised by subjecting to hemorrhagic hypotension for 1 hour. Following restoration of the systemic blood pressure by infusion of the shed blood, changes in an area of ischemia was investigated chiefly by fluorescein angiography (FAG) through the lingual artery and the femoral vein and by carbon perfusion (CP) through the heart. The involved cerebral tissue showed to marked hemorrhagic infarction 24 hours after restoration of the blood pressure.

2. Figure 1 demonstrated the capillary network in the normal canine brain by FAG and CP. During period of the early three hours after restoration of blood pressure to normal, patchy non-filling area by carbon black was observed within the cortex which surface showed complete or incomplete ischemia by FAG (Fig. 2). By six hours, a statistically significant increase in the ischemic area of the cerebral cortex was demonstrated in the territory of the clipped artery and edema could then be demonstrated in the affected cerebral tissue (Fig. 3). After twelve hours, diapedesis and extravasation of carbon particles had resulted from permeability changes in dilated long perforating vessels (Fig. 4) and within 24 hours the involved cerebral tissue showed marked hemorrhagic infarction which massive amount of extravasated carbon particles localized in the boundary zone between the deep cortical layer and the subcortical white matter (Fig. 6).

**Key words: hemorrhagic infarction, gray and white junction, fluorescein angiography, carbon perfusion**

#### I はじめに

昭和48年の死因統計では、脳出血：脳梗塞の比が0.99となり脳梗塞が多くなっている。脳出血に比して死亡率の低い脳梗塞死が増えてきたということは、脳梗塞の発生頻度が著しく増えてきたことを物語っていると考えてよい。高血圧性脳出血をはじめとして、いろいろの脳出血について外科的治療の大筋はほぼ確立されつつあるが、一方脳梗塞の治療は内科的にも外科的にもいまだ混

沌としているのが現状である。

そのためには、脳梗塞の基礎的研究が必要であり、現国内外において、循環動態、血液成分、生化学、組織学等あらゆる面からのアプローチがなされ隆盛を極めていくの観がある。著者らも中大脳動脈閉塞による脳梗塞犬を作成し、実験Iでまず脳血管閉塞後に生ずる出血性梗塞の発生機序を知る目的で、fluorescein angiography (以下FAGと略す)とcarbon perfusion (以下CPと略す)により脳微小循環動態の変動を観察し、組織学的所

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]

1978年3月22日 受稿

見と対比して、実験2で同一モデルにおいて脳血管閉塞解除直後に生ずる no-reflow phenomenon について、実験3で閉塞を解除して24時間後の recanalization の状態について、それぞれ永久閉塞群と対比して検討を行っている。今回は第一報として実験1について報告する。

## II 実験方法

### 1. 脳梗塞犬の作成

10kg前後の雑種犬をネンブタール静麻 (25mg/kg) 後挿管し、カテーテルを動脈圧モニターおよび脱血のため両側大腿動脈に、輸血輸液およびFAGのため右側大腿静脈に、FAGのため右側舌動脈に合計4本挿入した。東大脳研式定位脳固定装置に固定し右側頭骨を穿頭後、硬膜に小切開を加えて側頭葉を挙上し、内頸動脈、後交通動脈、前・中大脳動脈を露出して、中大脳動脈起始部にハイフエツ動脈瘤クリップ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、ただ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た。血液はテルモ血液バッグACD, A液 (100 ml 中クエン酸ナトリウム2.20 g, クエン酸0.8 g, ブドウ糖2.20 g) に採集し、脱血量は30 ml/kgであった。以上の実験操作中は血圧をモニターし、脱血中はハーバード動物実験用レスピレーターで人工呼吸を行い、12時間以上生存させる群には抗生剤の投与を行った。

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FAGを施行した後CPを行い、ただちに脳を取り出し10%ホルマリンに固定した。また以上の操作の中で中大脳動脈クリッピングのみを除外した sham operation を行って restoration 24時間後に同様にFAG, CP, 組織学的検索を行い対照 (5頭) とした。

### 2. Fluorescein angiography (FAG)

FAGは著者<sup>17)</sup>がすでに報告した方法により施行した。舌動脈カテーテルを総頸動脈分岐部まで挿入し、総頸動脈に向かって1%フルオレスチン1.6ml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4mlを使用する。所見として以下の項目をチェックした。

(1) Normal filling: 舌動脈注, 大腿静脈注において、動脈相, 毛細血管相, 静脈相を通じて造影されるもの。

Incomplete ischemia: 舌動脈注では3相を通じて造影されないが、大腿静脈注では造影されるもの。

Complete ischemia: 舌動脈注, 大腿静脈注において

3相を通じて造影されないもの。

(2) 虚血部面積比: フィルムを600区画の用紙に拡大投影して虚血部と半球全体の面積の比を計測する。

(3) 局所循環時間: 200  $\mu$  前後の動静脈を選び舌動脈注においてフルオレスチンの動脈流入から静脈流入までの所要時間。

動脈蛍光時間: フルオレスチンの動脈流入から流出するまでの所要時間。

(4) A-Vシャント: 大きな血管に見られるもの。

(5) フルオレスチンの血管外漏出: 舌動脈注に引き続いて施行した大腿静脈注のフィルムで見られるもの。

(6) Focal hyperemia: 小血管の拡張による異常発光。

(7) Microcollateralの状態: 虚血部周辺で出現しフルオレスチンの動脈出現時間がずれるが局所循環時間はほぼ正常であるもの。

### 3. Carbon perfusion (CP)

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、ただちに10%ホルマリン500mlと不易墨汁 (カーボン [直径1.0 $\mu$ ] 6%, ニカワ3%, 塩化カルシウム6%, 有機フェノール微量) 720ml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 $\mu$ の切片を作成し、キシロールで脱パラフィンおよび透徹を行い弱拡大 (6.6倍, 13.2倍) で検鏡し顕微鏡写真を撮った。

### 4. 組織学的検査

前述の7個のcoronal sectionで、それぞれ厚さ15 $\mu$ の切片としヘマトキシリン・エオジン染色を行い検鏡後、顕微鏡写真を撮った。

## III 結果

### 1. 対照 (5頭)

舌動脈注および大腿静脈注による正常のFAGをFig. 1Aに示し、局所循環時間は3.2秒である。CPではFig. 1Bに見るように皮質内で密な毛細血管網を形成する皮質動脈と、それよりやや太くて、皮質内への分枝は少なく、皮髄境界まで達する皮質下動脈と、ほとんど太さを減ずることなしに髄質に至ると、ただちにもっとも近い側脳室壁に向かい、急に方向を転ずる髄質動脈が見られる。一方静脈還流について見ると、皮髄境界部までのものは動脈と逆行して脳表に帰り、髄質では脳室壁に集まり深部脳静脈に流出する。

### 2. Restoration 直後 (5頭) および3時間後 (5頭)

直後のFAGでincomplete ischemiaの面積は右半球の15%, complete ischemiaの面積は4%である (Fig.

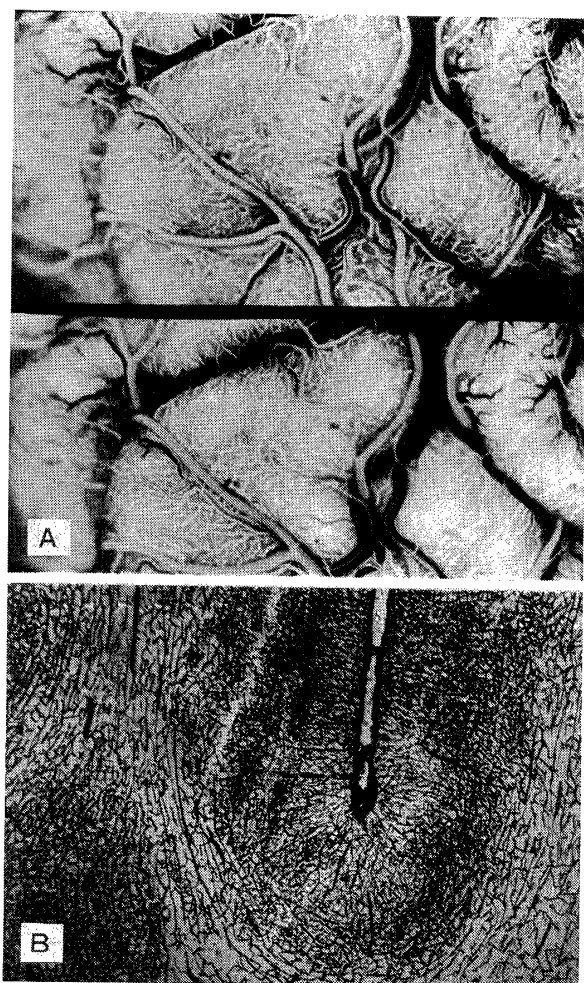


Fig. 1 Fluorescein angiograms (FAG) of lingual (A above) and femoral injection (A below) and carbon perfusion (CP, B) before clipping of the middle cerebral artery in dog, showing the normal angio-architecture.

2 A). CPでは肉眼的には明らかな虚血部を認めないが、顕微鏡的にはFAGでcomplete ischemiaを示す部分の皮質内にcarbonのnon-filling areaが小さなpatch状に散在して見られる (Fig. 2 B). 組織学的にはnon-filling areaの毛細血管はcollapseを生じている.

3時間後のFAGでは直後との差は認められないが、CPでpatchy non-fillingはFAGでincomplete ischemiaを示す部分の皮質内にも出現してその数を増す。また小さなpatchy non-fillingは互いに融合して大きくなる傾向にある。組織学的にはこの時期から浮腫性変化が始まる。

### 3. Restoration 6時間後 (5頭)

FAGでincomplete ischemiaの面積は14%で直後と変化はないが、complete ischemiaの面積は38%と最大に達し、中大脳動脈領域全体に及ぶ (Fig. 3 A)。CPでもnon-fillingの面積は40%を占め最大となり、中大脳動脈領域に一致した大きな虚血部を形成する。虚血部は皮質内に止まり、皮質下髄質の血行は良く保たれている。虚血部周辺に拡張蛇行した穿通枝が多数出現している (Fig. 3 B)。組織学的には虚血部に浮腫性変化の増強が見られ、毛細血管のcollapseもますます増強している。

### 4. Restoration 12時間後 (5頭)

FAGで、6時間目に比べてincomplete ischemiaの面積は21%と拡大するが、complete ischemiaは逆に11%と著明に減少する。すなわち虚血部周辺に出現時間および局所循環時間がまちまちなmicrocollateral circulationが出現して不完全な血流増加が見られるため、complete ischemiaの部分は縮小する (Fig. 4 A)。CPでnon-fillingの面積は6時間目の半分に縮小しており、虚血部周辺の血流は改善し、虚血部の皮髄境界にcarbonの濃染が見られ、顕微鏡的には拡張蛇行した穿通枝の末端から

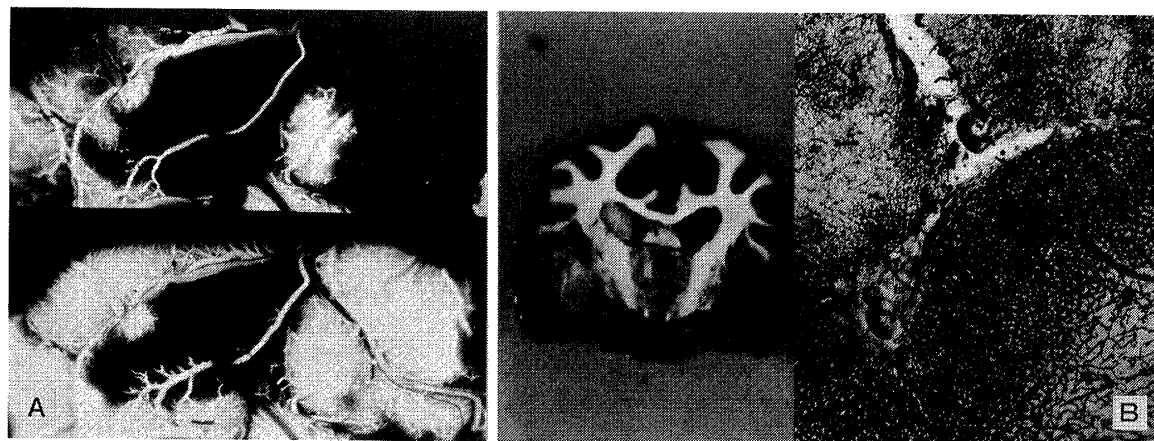


Fig. 2 FAG (A) and CP (B) immediately after restoration of BP. A. Showing the complete and incomplete ischemic area. B. Showing patchy non-filling of carbon.

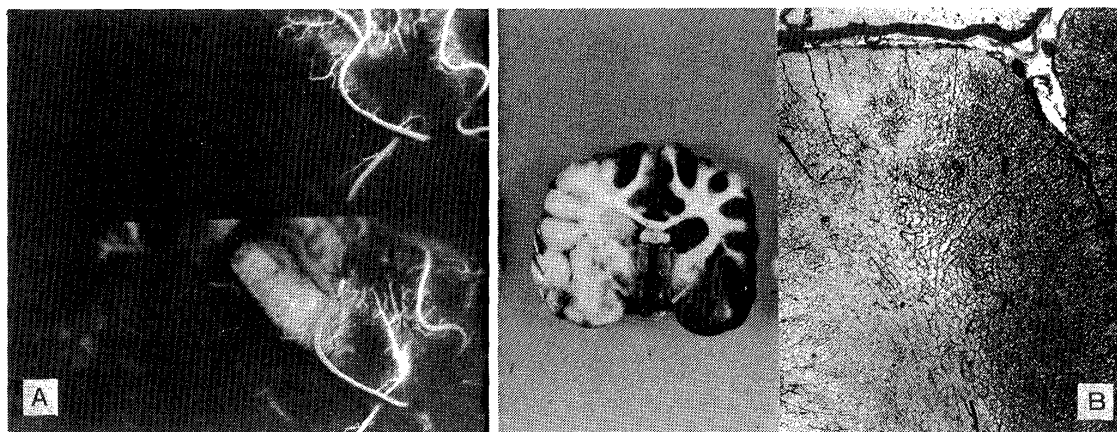


Fig. 3 FAG (A) and CP (B) of 6 hours after restoration of BP. A. Showing the large complete ischemic area. B. Showing the large non-filling area in distribution of right middle cerebral artery.

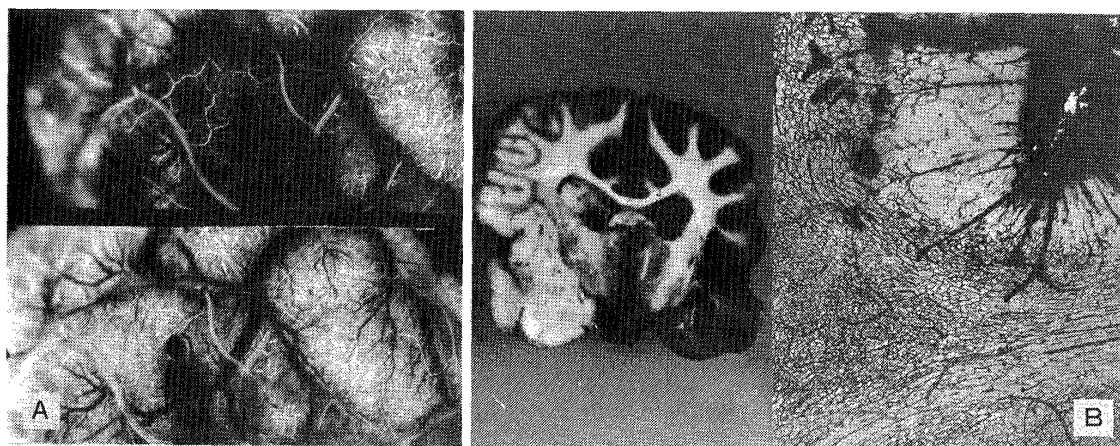


Fig. 4 FAG (A) and CP (B) of 12 hours after restoration of BP. A. Showing perivascular infiltration of fluorescein dye. B. Showing carbon extravasation of dilated long perforating vessels.

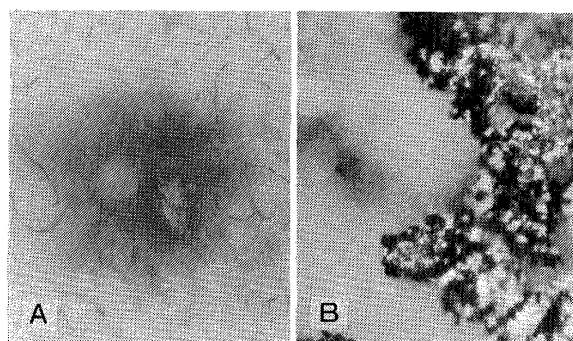


Fig. 5 Fluorescence microscope of 12 hours (A) and 24 hours (B) after restoration of BP. A. Intra- and perivascular fluorescence of erythrocytes. B. Extravascular fluorescence of erythrocytes.

carbon の extravasation が虚血部周辺のうち、皮髄境界で見られ皮質内では見られない。この extravasation を示す血管は皮質下動静脈の末端部と思われる (Fig. 4 B)。

Carbon の extravasation の部分を、蛍光顕微鏡で観察すると血管内腔に蛍光を発する血球成分を多数認めるのみであり、漏出性出血と考えられる (Fig. 5 A)。組織学的には虚血部皮質の神経細胞に虚血性変化が見られ貧血性梗塞と考えられる。

#### 5. Restoration 24時間後 (10頭)

FAG で incomplete ischemia の面積は30%とさらに拡大するが、complete ischemiaの面積は7%と進行性に縮小する。すなわち虚血部周辺の microcollateral circulation はさらに進行し、脳表静脈でフルオレスチンの extravasation および stasis が出現する (Fig. 6 A)。CP では non-filling の面積は12時間目の2倍に拡大し、6時間目の広さまで拡大する。すなわち FAG で incomplete ischemia を示す部分の皮質内では non-filling となり壊死に陥っている。虚血部の皮髄境界に大量の carbon の extravasationが生じ、壊死皮質は髄質から剝がされるよ

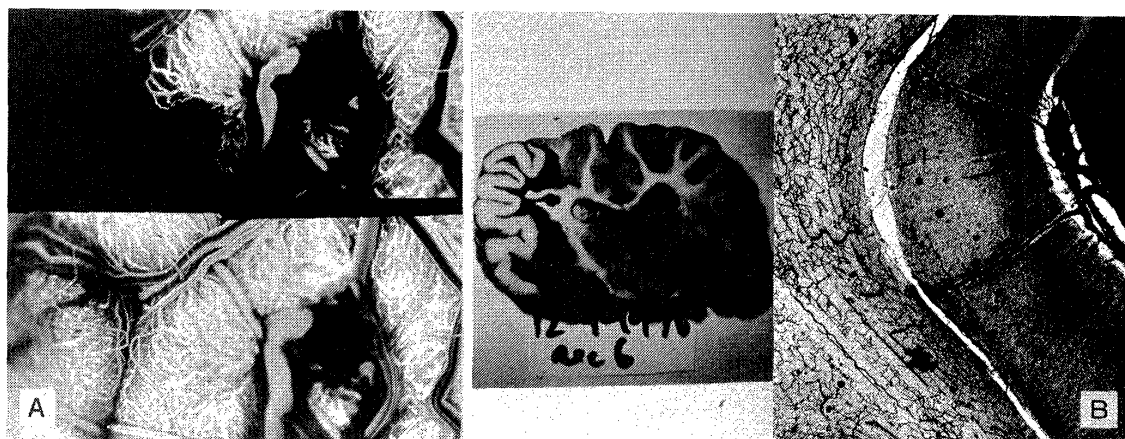


Fig. 6 FAG and CP of 24 hours after restoration of BP. A. Showing arteriovenous shunt. B. Showing massive carbon extravasation in the gray and white junction.

うに浮き上がっている。顕微鏡的には carbonの extravasation はまず皮髄境界に層状に生じ、ついで皮質内へと進行していく。この時期にもなお髄質の血行は良く保たれている (Fig. 6 B)。Carbon の extravasation の部分を蛍光顕微鏡で観察すると、12時間目とは異なり, extravasation の部分に無数の血球成分が見られる。したがってこの時期の出血は壊死血管からの破綻性出血と考えられる (Fig. 5 B)。組織学的には虚血部皮質の神経細胞は壊死化し、皮髄境界には多量の出血が見られ、出血性梗塞と考えられる。

#### 6. 小括

Table 1 に要約したごとく、永久閉塞群の皮質表面には restoration 直後および3時間後に incomplete および complete ischemia を認め、皮質内に patchy non-filling を認める。6時間後には皮質表面および内部で虚血部は最大となり、この時期には急激な脳浮腫の増強が見られる。12時間後になると皮質表面および内部の虚血部周辺に不完全な血流増加が見られ、この周辺部より漏出性出血が始まる。24時間後では皮質表面で不完全な血流増加は続行するが、この部の皮質内では血流は途絶し壊死化が生じており、皮髄境界では破綻性出血が見られる。

一方脳表と内部の微小循環の相違を見るために、FAG における incomplete および complete ischemia の面積と CP における non-filling の面積の経時的变化をまとめると Fig. 7 のごとくなる。すなわち restoration 6 時間後で皮質表面および内部の虚血部は最大となり、この時期に急激な脳浮腫の増強が見られる。12時間になると皮質表面および内部の虚血部周辺に不完全な血流増加が見られ、この周辺部より漏出性出血が始まる。24時間後になると皮質表面では不完全な血流増加が続行するが、この部の皮質内では血流は途絶し、壊死化が生じており、皮

Table 1 Summary

After restoration of BP	Fluorescein angiography & carbon perfusion	Histological findings
Immediately	Patchy non-filling in complete ischemic cortex	Capillary collapse
3 hours	Patchy non-filling in complete and incomplete ischemic cortex	Edematous change
6 hours	Large non-filling area in distribution of right middle cerebral artery Dilated vasculature around non-filling area	Development of edema
12 hours	Carbon extravasation from dilated vasculature (Diapedesis)	Anemic infarction
24 hours	Massive carbon extravasation in gray and white junction (Hemorrhage)	Hemorrhagic infarction

髄境界では破綻性出血が生ずる。これら皮質表面と内部との微小循環の相違が24時間後に虚血部の皮髄境界で破綻性出血（出血性梗塞）を引き起こすと考えられる。

#### IV 考 察

脳梗塞の実験動物としては Mongolian gerbil をはじめとして、ウサギ、ネコ、イヌ等が使用されているが、血管形態学の面から研究する場合は大動物の方が適当であ

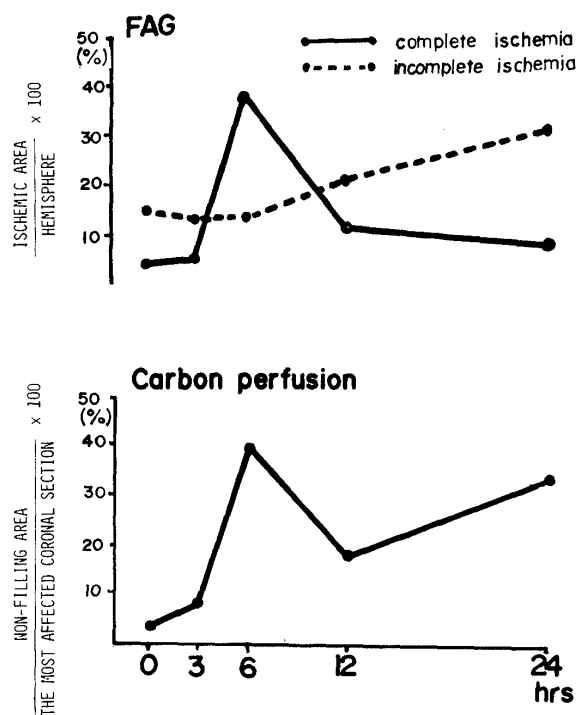


Fig. 7 Changes of ischemic area after restoration of BP.

のためイヌを使用した。しかしながらイヌでは外頸動脈の直径は内頸動脈の5倍もあり、これからの collateral<sup>1</sup> circulation が発達しているため、一側中大脳動脈の clipping のみでは24時間後に大脳基底核および内包に小梗塞を認めるのみで、この collateral circulation からの血流を遮断するために clipping 後 50 mmHg, 1時間の hypotension を施行し、さらに採取血の再注入による血圧の restoration を行った。本法により24時間後に、中大脳動脈領域の皮質および皮質下髄質に大小さまざまな梗塞を 100%作成することに成功した<sup>3)16)</sup>。

虚血部の皮髄境界部に出血が生ずる機序としては、中大脳動脈閉塞によりまず虚血部の毛細血管の collapse が生じ、これは当部の浮腫の進行とともにますます増強される。したがって余分の血流は残存せる大きな血管、すなわち皮質下動脈へ流れ込む。一方皮質下静脈は浮腫による圧迫のため stasis が生じる。このため皮質下動、静脈の折返し点である皮髄境界部において venule にまず漏出性出血が生じ、ついで破綻性出血へ移行すると思われる<sup>11)</sup>。なおこれらを確認するために電顕による経時的観察を併せて行い検討中である<sup>4)6)15)</sup>。

つぎに、皮髄境界部に出血が生ずる機序として、虚血が皮質表面より内部により高度に生ずるため、表面の余分の血流が内部の虚血部周辺で出血を引き起こすと考えられる。このことは脳表を走る髄膜動脈から分岐した穿

通動脈は脳表に垂直に脳内に穿入するため、これら穿通枝は血流遮断や浮腫による圧迫等の影響を表面血管より受けやすいという解剖学的特性より説明できると考えられる<sup>8)20)</sup>。しかしながらこの脳梗塞実験モデルは open cavity であるため、脳圧や髄液の生化学成分の影響を除外しており理想的とはいえない。したがってより臨床に類似した脳梗塞モデルとしては closed cavity によるものを作成する必要がある。このために一側頸部内頸動脈よりシリコン円柱を注入して中大脳動脈近位部を閉塞後<sup>13)14)</sup>、open cavity と同様に hemorrhagic hypotension および restoration を加えることにより、開頭することなしに脳梗塞モデルを作成し、前者と同様の観察を行うべく準備中である。

今後、本モデルを使用して解決せねばならない問題として、血管閉塞による障害をさらに悪化させる再開通現象がある。このためには第1に脳血管閉塞解除直後に生ずる no-reflow phenomenon について<sup>1)5)7)</sup>、restoration 直後、3時間後、6時間後、12時間後、24時間後にそれぞれ閉塞を解除して同様の観察を行い、永久閉塞群と対比して検討を行うことが必要であり、第2に recanalization の影響について<sup>10)18)19)</sup>、restoration 後脳浮腫のもっとも増強するのは6時間後であるので、これを critical point と考え、restoration 直後および6時間後にそれぞれ閉塞を解除して24時間後に同様の観察を行い、永久閉塞群と対比して検討を行う必要がある。第3には、本モデルで脳血管閉塞後に生じる変化を主として微小循環動態の面から観察してきたが、脳全体としての reversibility<sup>2)9)12)</sup>を論ずるには、神経細胞の虚血性変化の観察が必要であり、そのためにはまず永久閉塞群で時間経過を追って神経細胞の虚血性変化を観察し、ついで no-reflow phenomenon や recanalization の影響についても観察する必要がある。以上3つの問題点についてはすでに結果を得ており、機会を見つけて報告する予定である。

## V 結 語

1. イヌで右側中大脳動脈起始部を clipping 後脱血による hypotension を維持し、ついで採取血の再注入による血圧の restoration を加えて実験的脳梗塞のモデルとし、fluorescein angiography, carbon perfusion による脳微小循環動態観察および組織学的検索を行った。本実験モデルで24時間後には 100%に出血性梗塞を作成することができた。

2. Restoration 直後 および 3 時間後で、皮質表面に incomplete および complete ischemia を認め、皮質内には patchy non-filling を認める。6 時間後には皮質表面



および皮質内で虚血部は最大となり、この時期に急激な脳浮腫の増強が見られる。12時間後になると皮質表面および皮質内虚血部周辺に不完全な血流増加が見られ、この周辺部より漏出性出血が始まる。24時間後では皮質表面で不完全な血流増加は続行するが、この部の皮質内では血流は途絶し壊死が生じており、皮髄境界では破綻性出血が見られる。

本論文の要旨は第36回日本脳神経外科学会総会（昭和52年10月27日、於大阪）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) COIMBRA, A.: Nerve cell changes in the experimental occlusion of the middle cerebral artery. Histological and histochemical study. *Acta Neuropathologica* 3: 547-557, 1964
- 3) DODSON, R. F., AOYAGI, M., HARTMANN, A. & TAGASHIRA, Y.: Acute cerebral infarction and hypotension: An ultrastructural study. *J Neuropathol Exp Neurol* 33: 400-407, 1974
- 4) DODSON, R. F. & KAWAMURA, Y.: Perivascular hemorrhagic lesions in temporal cortex following cerebral infarction (A morphological study). *Exp Mol Pathol* 20: 24-32, 1974
- 5) FISCHER, E. G., AMES, A., III., HEDLEY-WHITE, 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
- 6) GARCIA, J. H., COX, J. V. & HUDGINS, W. R.: Ultrastructure of the microvasculature in experimental cerebral infarction. *Acta Neuropathol* 18: 273-285, 1971
- 7) HARRISON, M. J. G., SEDAL, L., ARNOLD, J. & ROSSRUSSELL, R. W.: No-reflow phenomenon in the cerebral circulation of the girbil. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 38: 1190-1193, 1975
- 8) HASEGAWA, T., RAVENS, J. R. & TOOLE, J. F.: Precapillary arteriovenous anastomose-throughfare channels in the brain. *Arch Neurol* 16: 217-224, 1967
- 9) HOSSMANN, K-A. & KLEIHUES, P.: Reversibility of ischemic brain damage. *Arch Neurol* 29: 375-384, 1973
- 10) 入野忠芳: 脳血管閉塞の再開通現象. *脳神経* 30: 135-151, 1978
- 11) KAMIJYO, T., GARCIA, J. H. & COOPER, J.: Temporary regional cerebral ischemia in the cat. A model of hemorrhagic and subcortical infarction. *J Neuropathol Exp Neurology* 36: 338-350, 1977
- 12) LITTLE, J. R.: Microcirculatory obstruction in focal cerebral ischemia. Relationship to neuronal alterations. *Mayo Clin Proc* 50: 264-270, 1975
- 13) MOLINARI, G. F.: Experimental cerebral infarction. I. Selective segmental occlusion of intracranial arteries in the dog. *Stroke* 1: 224-231, 1970
- 14) MOLINARI, G. F.: Experimental cerebral infarction. II. Clinicopathological model of deep cerebral infarction. *Stroke* 1: 232-244, 1970
- 15) OLSSON, Y., CROWELL, R. M. & KLATZO, I.: The blood-brain barrier to protein tracers in focal cerebral ischemia and infarction caused by occlusion of the middle cerebral artery. *Acta Neuropathol* 18: 89-102, 1971
- 16) SHIBATA, S., HODGE, C. P. & PAPPUS, H. M.: Effect of experimental ischemia on cerebral water and electrolytes. *J Neurosurg* 41: 146-159, 1974
- 17) 柴田尚武, 森 和夫: Fluorescein angiographyによる脳表微小循環動態の観察. *脳外* 4: 679-684, 1976
- 18) 新谷 彬: 実験的中大脳動脈閉塞症に対する血流再開術の検討. *脳外* 1: 77-83, 1973
- 19) SUNDT, T. M., GRANT, W. C. & GARCIA, J. H.: Restoration of middle cerebral artery flow in experimental infarction. *J Neurosurg* 31: 311-322, 1969
- 20) 山村武夫, 河原裕憲: 脳の動脈および静脈, 特に微小循環系と動静脈吻合について. *最新医学* 25: 1675-1687, 1970