Mongolian gerbil における脳幹部微小血管構築について

—— India ink 注入法と Mercocox 注入法 ——

乾 洋史¹⁾・菊岡 政久¹⁾・藤田 信哉¹⁾
松永 喬¹⁾・吉井 致²⁾

Microvascular Architecture of the Brainstem of the Mongolian Gerbil

—— India Ink and Mercocox Injection Method ——

Hiroshi Inui¹⁾, Masahisa Kikuoka¹⁾, Nobuya Fujita¹⁾
Takashi Matsunaga¹⁾, Itaru Yoshii²⁾

¹⁾ *Department of Otolaryngology, Nara Medical College*

²⁾ *Department of anatomy, Kawasaki Medical School*

The perforating vessels in the brainstem of the Mongolian gerbil were examined by India ink injection and the brainstem microvascular architecture was examined by Mercocox injection.

1. Three types of perforating vessels were identified. Type 1 perforators branched into capillaries soon after penetrating the brainstem, type 2 perforators changed into capillaries in the middle of the brainstem, and type 3 perforators penetrated the dorsal part of the brainstem and changed into capillaries. The diameter of type 1 perforators was 10-15 μm , that of type 2 was 20-25 μm , and that of type 3 was 35-55 μm .

2. The capillary blood vessels generally showed T-shaped or Y-shaped branching but occasional atypical configurations were observed. The blood flow may be regulated by these different configurations.

3. We observed no difference between the capillary blood vessels of the vestibular nucleus and those of the cochlear nucleus.

4. We observed that the brainstem contains a dense capillary network, and that blood flow in the perforators was regulated by the site of entry into the brainstem and by the diameter of the perforating vessel.

Key words: Mongolian gerbil, microvascular architecture, brainstem, classification of arterioles, India ink and Mercocox injection method

¹⁾ 奈良県立医科大学耳鼻咽喉科学教室

²⁾ 川崎医科大学解剖学教室

はじめに

我々は、脳血流の障害が原因で起こるとされるめまい疾患を解明するために、これまでに解剖実習用遺体によりヒト脳幹部、特に前庭神経核領域の血管走行を消化器造影用バリウムを用いて明らかにした¹⁾²⁾。しかしこの方法は血管内径 $60\mu\text{m}$ までしか観察できず毛細血管レベルの観察は行えない欠点があった。

一方、微小血管の観察には近年メタクリレート樹脂（メルコックス[®]、以下樹脂）を用いた血管鋳型観察が多く研究者によりなされ、耳鼻咽喉科領域においても内耳道、鼓膜、蝸牛等の微小血管走行が明らかになっている³⁾⁴⁾。しかし脳幹部微小血管については、その報告がほとんど見られず詳細が明らかであるとはいえない。

今回我々は Mongolian gerbil（スナネズミ）を用いて、脳幹内穿通枝の走行を従来より行われている India ink 注入法により、また、樹脂注入鋳型標本を作成することにより脳幹部毛細血管の観察を行ったので報告する。

方 法

1. 血管内 India ink 注入標本作成方法

実験動物には体重 $80\sim 90\text{g}$ のスナネズミ 2 匹を使用した。スナネズミをエーテル麻酔下に手術台に固定し開胸、開腹を行った。左心室に 22G エラスターを挿入し、大動脈起始部に結紮固定後下行大静脈を横隔膜の高さで結紮した。次に右心耳切開を行い脱血する一方でエラスターより灌流ポンプをもちいてヘパリン加生食 (1000IU/ml) 300ml を灌流し、血管腔より血液成分を完全に除去した。その後血管内還流用固定液にて灌流固定を行った。固定終了後、精製粉末ゼラチンを適量加えた India ink をエラスターより用手的に約 60ml 注入し、切開した右心耳より India ink が流出するまで行った。動物を氷冷、硬化を待ち、開頭し脳を摘出した。開頭した脳は約 5mm ずつの冠状断に切りだしたが、橋延髄移行部を一切断面にするよう注意した。India ink 注入脳はサリチル酸メチル、安息香酸ベンゼンにより組織の透明化を行い透明標本を作成、実体顕微鏡により観察した。

2. 樹脂注入鋳型標本作成方法

5 匹のスナネズミについて血管内還流固定終了までは India ink 注入法と同様の方法で行った。

還流固定終了後、あらかじめ硬化剤を加え冷却した樹脂（Mercor CL-2R、大日本インキ）をエラスターより用手的に約 60ml 注入した。注入は切開した右心耳より透明の樹脂が流出するまで行った。動物を氷冷、硬化を待ち、開通し脳を摘出した。開頭した脳は約 5mm ずつの冠状断に切りだしたが、橋延髄移行部を一切断面にするよう注意した。脳組織の腐食は次亜塩素酸ナトリウムを含む蒸留水を持続灌流させることにより行い、腐食完了した血管鋳型標本は液体窒素にて凍結し、真空乾燥後、金パラジウム蒸着を行い日立 S-570 型走査電子顕微鏡（加圧電圧 20kV ）で観察した。

また、別のスナネズミの脳幹部を用いることにより橋延髄移行部の Klüver-Barrera 染色を行い前庭神経核、蝸牛神経核を同定した。

結 果

1. India ink 注入標本の観察

(1) 脳幹腹側部の血管走行

椎骨動脈 (VA) は、延髄脊髓移行部のやや上方正中部で合流し脳底動脈 (BA) となった。BA はその後正中部を走行し、左右の上小脳動脈 (SCA) を分枝し終わったが、途中左右に $3\sim 4$ 本の外側回旋枝（仮称）を脳幹外側方向に分枝した。そのうち BA 中間部で分枝した左右の小枝は第 8 脳神経方向へ走行した。

BA 末梢部先端からは数本の小穿通枝を分枝した。今回の India ink 注入による観察では、BA の明らかな Willis 動脈輪との連絡は認められなかった。

(2) 橋延髄移行部横断面の観察 (図 1, a)

BA 側面から分枝した外側回旋枝は脳幹部外表面を走行、脳幹部背側まで走行した (図 1, a)。

1) BA からの脳幹内穿通枝（正中穿通枝：仮称） (図 1, a, b)

BA 背側面より第 4 脳室前面まで正中穿通枝が走行した。正中穿通枝は脳幹部腹側部、中央部でそれぞれ数本の小枝を分枝し、第 4 脳室前面でも数本の小枝に移行した。

2) 外側回旋枝からの穿通枝 (図 1, a, b)

外側回旋枝が脳幹外表面を腹側から外側に走行する間に分枝する穿通枝は、穿通後第 4 脳室前面やや外側に達する穿通枝と、脳幹中央部からやや背側部に達した後に毛細血管に移行する穿通枝に分類できた。両穿通枝とも毛細血管に移行するま

でに数本の分枝を出したが分枝部位などに明らかな規則性は観察されなかった。

脳幹外側部から背側にも外側回旋枝は数本の穿通枝を分枝した。しかし、これらの穿通枝のうち、第4脳室面まで同定できる穿通枝は観察されなかった。

脳幹内穿通枝から分枝した小枝はそれぞれ数回

の分枝を繰り返したが、分枝した小枝の合流は認めなかった。

2. 樹脂注入鋳型標本の観察

(1) 脳幹内穿通枝

India ink 注入標本で観察した穿通枝は、鋳型標本でも同様の走行をした。すなわち脳幹内穿通枝は脳幹周囲から穿通後、そのすべてが第4脳室

図2 脳幹内穿通枝の分類

方向に向かってそれぞれほぼ平行に走行した (parallel arrangement)。それらより移行した毛細血管は、規則正しく分枝、吻合を繰り返す巣状構造をなした (reticular arrangement)。

parallel arrangement を示す穿通枝はその穿通深度、血管径により 3 種類に分類された (図2)。

Type 1: 穿通直後より第1~3分枝の後に毛細血管に移行する血管径 10~15 μm の小枝。

Type 2: 血管中央部まで穿通し、毛細血管に移行する間に若干の分枝をだす血管径 20~25 μm の小枝。

Type 3: 第4脳室前面まで走行する間に脳幹腹側部、脳幹中央部、第4脳室前面で分枝を出し、それぞれが毛細血管に移行する血管径 35~55 μm の小枝。

それぞれの細動脈から移行した毛細血管は互いに複雑に吻合した。

(2) 微小血管構築

1) 脳幹正中部

腹側部での正中穿通枝は、直径約 50 μm であり、第4脳室前面に達するまでに 6~7 本の細動脈を分枝したが、分枝部位は脳幹腹側部、中央部であり規則性が見られた。しかし正中穿通枝とは交通を持たない小枝も BA から直接分枝した。これらの直径は約 13 μm で第1, 第2分枝の後に毛細血管に移行、複雑な毛細血管網を形成した。この部位の毛細血管径は約 5.5 μm であった。

図3 第4脳室前面での正中穿通枝
2分枝した正中穿通枝が毛細血管に移行(↑)

第4脳室前面で正中穿通枝は数本の細動脈に移行した (図3)。細動脈は毛細血管に移行したが、再び脳幹腹側方向へ走行する細動脈も観察できた。この部位での毛細血管径は約 4 μm であった。

2) 脳幹外側部

a :

b :

図4 脳幹内毛細血管

a : 前庭神経核領域, b : 蝸牛神経核領域

脳幹外側部も正中部と同様に複雑で密な毛細血管網が観察できた。しかし直径約 $35\mu\text{m}$ の第4脳室にまで達する外側穿通枝は、この部位で見られる毛細血管網にはほとんど分枝を出さず、第4脳室に達するまでに数本の細動脈を分枝するのみであった。

3) 前庭神経核, 蝸牛神経核領域

別に作成した橋延髄移行部の病理標本にて神経核を同定し領域に一致する部位の鋳型観察を行った。前庭神経核は第4脳室前面やや外側に存在し、蝸牛神経核は脳幹外側から背側に存在した。

前庭神経核領域 (図4, a) は、前述した Type 3 の細動脈 (正中穿通枝と外側回旋枝から分枝し第4脳室やや外側に達する小枝) から移行した毛細血管網に置き変わっていた。

一方、蝸牛神経核領域を形成する毛細血管網 (図4, b) は、Type 2 の細動脈からの毛細血管で、両領域とも血管径 $4\sim6\mu\text{m}$ の毛細血管が規則正しく分枝、吻合した。血管径、血管密度に大きな差異は認めなかった。

(3) 毛細血管の分枝と走行の様子

reticular arrangement を示す毛細血管は、そのほとんどがT型、Y型の分枝、吻合を繰り返し

図5 一般的な毛細血管の分枝, 吻合

た (図5)。しかし、蛇行した毛細血管やコークスクリュー型の吻合をする毛細血管も観察した (図6)。これらの特異的な走行、吻合をする毛細血管

図5 特異的な毛細血管の走行

- a: 蛇行する血管 (矢印)
 b: コークスクリュー型の吻合 (矢印)
 c: コイル型の走行 (矢印)

は散見されるのみであった。

考 察

我々はこれまでにヒト遺体を用いて、脳幹部微小血管構築の観察を行ってきた。しかし消化器造影用バリウム注入による stereomicroangiography 法は、直径 $60\mu\text{m}$ 以上の血管しか描出されず毛細血管は観察できないことが欠点である。今回は India ink 注入による観察と、樹脂注入による観察を併せて行うことにより脳幹内微小血管走行の観察を行った。

微小血管への樹脂の応用は1971年 Murakami⁵⁾の報告が最初であるが、組織の横断面を観察する場合は横断面作成のために外的損傷が加わり、観察したい面の血管構築が損傷する可能性が考えられる。我々は透明標本を作成することによりこの欠点を補った。その結果、India ink 注入透明標本では脳幹内の主要な穿通枝が毛細血管に移行する直前まで観察でき、また樹脂注入標本では脳幹部毛細血管網が観察できた。

我々は脳組織の腐食に次亜塩素酸ナトリウム、界面活性剤を含む蒸留水を用い、鋳型の乾燥に急速凍結乾燥法を用いた。これは中枢神経系が脂質を多く含む臓器であることを考慮し従来の方法を改良したものであり、大脳皮質などの観察でもこの方法が用いられている⁶⁾。

樹脂を用いた中枢神経系の微小血管構築については、Duvernoy ら^{7,8)}がヒトを用いて大脳皮質、

小脳皮質を穿通する微小血管を観察している。それによると、皮質内細胞層の違いにより大脳皮質、小脳皮質を穿通する血管はそれぞれ5種類に分類可能であったとしているが、脳幹部については、その報告がほとんどなく詳細を究めているとはいえない。我々の観察では、脳幹内穿通枝はその穿通深度により3種類に分類できた。なかでも Type 2, Type 3 の小枝は毛細血管に移行する分枝を脳幹内で豊富に出すのではなく、ある程度の規則性をもっていることが特徴的であった。特に前庭神経核、蝸牛神経核を栄養する血管についての観察を行ったが、前庭神経核領域は Type 3 の穿通枝（脳幹正中からと外側からの穿通枝）により栄養されており、これはヒトでの我々の観察と同様であった¹⁾²⁾。一方、蝸牛神経核領域は脳幹外側から背側にかけての Type 2 の穿通枝により栄養されていることが示唆され、これら2領域は異なる穿通枝群により栄養されていることが観察された。しかし、これら2領域の毛細血管網はどちらも同程度の血管径、血管密度であった。毛細血管レベルでは、これら2領域の虚血による易受傷性は差がないことが考えられる。従ってこれら2領域に差があるとすれば、毛細血管レベルでは脳幹内は毛細血管が非常に密に集合し、組織は虚血による変化は受けにくい構造であるが、その部位を栄養する毛細血管が分枝する細動脈や穿通枝は穿通部位により決定しているため、脳幹内穿通直前

後の血管になんらかの狭窄または閉塞を惹起する因子が加われば、その支配領域は選択的に容易に虚血になることが考えられる。

毛細血管は一般的にはT型、Y型の分枝、吻合を繰り返したが、時に特異的な型も観察された。Nakai ら⁹⁾は、ラット parietal cortex での微小血管構築の観察で sphincter 状の血管を観察し、毛細血管レベルでの血流調節機構であると考察しているが、今回の観察での特異的な分枝、吻合は Nakai らの観察に比べて非常に低頻度であり、これらが血流調節機構であると断言はできない。しかし、観察の事実よりその可能性は示唆されられると思われる。

結 語

1. Mongolian gerbil における脳幹部微小血管構築の観察を、血管内 India ink 注入法と樹脂による鋳型作成法により行った。

2. 第4脳室に達する穿通枝は、脳幹部腹側正中と脳幹外表面を外側に走行した後に穿通する小枝の2種類に分類でき、また脳幹内穿通枝は穿通する部位により3種類に分類できた。

3. 微小血管構築の観察において、毛細血管はT型またはY型の分枝を繰り返した。組織の虚血に直接関与する血管は、脳幹内穿通直前後の細動脈であると思われるが、特異的な吻合、分枝をする毛細血管も散見され、これらが血流調節の一因子である可能性も示唆された。

4. 前庭神経核、蝸牛神経核領域の毛細血管網に特徴的な違いは見られなかった。

なお、本研究は厚生省特定疾患前庭機能異常調査研究費、文部省科学研究費の援助により行われたものである。

本論文の要旨は The 4th Japan-Korea joint meeting of Otorhinolaryngology and head and neck surgery, 第51回日本平衡神経科学会, 第243, 244回日本耳鼻咽喉科学会大阪地方連合会において発表した。

稿を終えるにあたり、終始ご指導、ご協力いただきました川崎医科大学池田 章名誉教授をはじ

め解剖学教室、電子顕微鏡センター諸兄姉に感謝します。さらに、標本写真撮影にご協力いただいた奈良県立医科大学第2解剖学教室長野晃子助手にお礼申し上げます。

文 献

- 1) 乾 洋史, 菊岡政久, 藤田信哉, 他: ヒト椎骨脳底動脈系の肉眼的, X線の立体解析(第1報). 日耳鼻 95: 1206-1215, 1992
- 2) 乾 洋史, 菊岡政久, 藤田信哉, 他: ヒト椎骨脳底動脈系の解剖学的立体観察 — 前庭神経核の栄養血管について —. Equilibrium Res Suppl 8: 86-89, 1992
- 3) 吉岡 達: 前庭微小循環の血管網構築. 耳鼻臨床 79: 963-977, 1986
- 4) 大道卓也: 内耳血管の微細構造に関する走査電顕学的研究 — 前庭および内リンパ嚢周辺血管について —. 日耳鼻 90: 1772-1780, 1987
- 5) Murakami T: Application of the scanning electron microscope to the study of the fine distribution of the blood vessels. Arch Histol Jap 32: 445-454, 1971
- 6) 菊岡政久: ラット脳における微小血管構築の検討 — 血管鋳型走査電顕法による解析 —. 川崎医会誌 14: 539-551, 1988
- 7) Duvernoy HM, Delon S, Vannson JL: Cortical blood vessels of the human brain. Brain Res 7: 519-579, 1981
- 8) Duvernoy H, Delon S, Vannson JL: The vascularization of the human cerebellar cortex. Brain Res 11: 419-480, 1983
- 9) Nakai K, Imai H, Kamei I, et al: Micro-angioarchitecture of rat parietal cortex with special reference to vascular "sphincters". Stroke 12: 653-659, 1981

(原稿到着: 平成5年4月16日
別刷請求先: 乾 洋史
〒634 奈良県橿原市四条町840
奈良県立医科大学耳鼻咽喉科学教室)