脳損傷後の微小血管構築の経時的観察

織田 哲至

Changes in Brain Microvascular Architecture following Experimental Cold Injury

Tetsuji ORITA

Department of Neurosurgery, Yamaguchi University, Ube, Yamaguchi

Abstract

Sequential changes in the microvascular architecture of rat brains following local freezing injury were studied by scanning electron microscopy involving the cerebrovascular casting method. Repair of the microvascular architecture was initiated on day 3 after injury. Hematogenous cells and reactive astrocytes within the edematous zone participated in the regenerative process. The microvascular architecture was reconstructed from the edge of the lesion toward the brain surface. On the other hand, in small parts of the brain surface subjected to severe, focal freezing, the microvascular architecture was newly formed and resembled that of fetal and newborn rat cortices. Within 7 days after injury, the microvascular architecture was completely repaired.

Key words: microvascular architecture, scanning electron microscopy, vascular casting, brain edema, cold injury

I はじめに

脳浮腫の血管についての形態学的な面からの多くの研究は、急性期の血管透過性に焦点が当てられている。しかし最近、脳浮腫を病巣修復の一過程として捉えた研究⁷⁾や浮腫液の消長経路に関する研究^{8,15,18)}など、慢性期にも目が向けられるようになった。この時期の血管系についての研究³⁾は少なく、その形態、特に血管構築についてはほとんど不明である。私は脳損傷後に伴う脳浮腫時の血管構築を経時的かつ立体的に観察し、病巣修復という面から考察したので報告する。

II 方 法

体重200~250 gのWistar系ラットをネブタール静注(40 mg/kg)により麻酔して、硬膜に損傷を与えないように径3 mmの小開頭を設けた。そこよりドライアイスとアセトンにて冷却(-78°~80°C)した金属棒を硬膜外に15秒

間当て、凍結脳損傷を作製した。損傷1, 2, 3, 5, 7日後、おのおの5匹ずつを対象とした。

浮腫の程度をみるために、屠殺1時間前に2%エバンスブルー(2 ml/kg)を経静脈的に投与した。その後、人工呼吸下に開腹・開胸を行った。下行大動脈を結紮後、ただちにカニューレを左心室へ挿入し、右心耳の切断と同時に37°Cの生食約400 ccを100~120 mmHgの圧で注入し、血液を流出させた。カニューレを大動脈起始部に進め、固定し、37°Cの10% buffered formalinを、ついで動物を冷却させる目的で4°Cの10% buffered formalinを同圧にて注入し、灌流固定を行った。

固定後、レジン(Mercor CL-2Rにpolymeligerを40対1の割合で混合)を4 ml/minの速度でカニューレから注入し、硬化後、約5~10 mm厚のスライスに切り出した。次に、Yoshidaら²⁰⁾の方法に準じ、以下の操作を行った。そのスライスを20% NaOH液に一晩浸漬し、0.5% NaClO液にて約2週間かけて脳組織を溶解させた。その血管鋳型

山口大学脳神経外科

Address reprint requests to: T. Orita, M.D., Department of Neurosurgery, Yamaguchi University, 1,144 Kogushi, Ube, Yamaguchi 755.

受稿 1986年10月22日 受理 1987年7月27日

を蒸留水にて十分洗滌し、液体窒素にて急速凍結後、真空乾燥させた。試料をスパッタコーティング(Eiko IB-3 Ion Coater)し、走査電顕JSM-T300 (JEOL-Technics Co. Ltd.)にて観察した。一方、レジンの代りにAmesら¹¹⁾の方法により作製したゼラチン加コロイダルカーボンを同様の方法にて灌流固定したのち注入し、microslicerにて100 μm 切片として血管鋳型と比較観察した。

III 結 果

浮腫の程度は、エバンスブルーの血管外漏出の強さによ

り観察した。その結果、浮腫は1日目にもっとも強く、7日目にはほぼ消失した。

1日目の浮腫内の血管数は非常に少なく、毛細血管網はほとんどみられず、残っている血管は直線走行を示した。時に5 μm 前後の血管がみられたが、その壁は不整で、珠数玉状を呈していた。2日目の所見も1日目と大差はなかった。

3日目になると、浮腫周辺より既存の血管構築を再現する形で、毛細血管網が浮腫の中心を取り囲むように出現してきた(Fig. 1)。しかし、毛細血管網は非常に疎であり、

Fig. 1 Day 3 after cold injury. Repair of the microvascular architecture begins at the edge of the lesion and advances toward the brain surface. A: Microvasculature demonstrated by colloidal carbon. $\times 40$. B: Scanning electron microgram of vascular cast. Bar = 100 μm .

Fig. 2 Scanning electron micrograms of vascular cast obtained on day 3 after cold injury. A, B: Many capillaries with irregular walls are seen in the margin of the edematous zone. Bar = 10 μm . C: A blood vessel at the brain surface exhibits a sprouting branch (arrow). Bar = 10 μm .

Fig. 3 Day 5 after cold injury. A, B: Microvascular architecture demonstrated by colloidal carbon. Tortuous, irregular vessels (arrow) are seen at the brain surface. A: $\times 40$, B: $\times 200$. C: Scanning electron microgram of vascular cast showing dilated, tortuous vessels at the brain surface, with many nodular protrusions and septal formation (arrow). Bar=100 μm .

その径は5~7 μm のものが多く、壁は一部スムーズなところもみられるが、多くは不整であった (Fig. 2A, B). また、皮質に対して長軸方向の30~50 μm 径の血管が早期に出現してくる傾向にあった (Fig. 1B). そのほか、脳表近くの血管には10 μm 前後の血管の盲嚢形成がみられた (Fig. 2C).

5日目になると、脳表近くに拡張・蛇行の日立つ50 μm 前後の血管が出現してきたが、その表面構造は内皮細胞の核の notch¹¹⁾ がみられず、動脈とも静脈とも判定できないものであった (Fig. 3). 血管壁の一部が膨隆し、一部には中隔が形成されていた (Fig. 3C). さらに、長軸方向の血管 (30 μm 前後) が早期に出現してくるのが5日目でも判った。毛細血管網は3日目に比べると徐々に発達してきており、そのほか10 μm 前後の壁不整の血管およびねじれを持った血管がみられた (Fig. 4). 5 μm の血管に3日目にみられたのと同様の盲嚢形成がみられた。

7日目になると、毛細血管網が全域にみられ、血管構築

はほぼ完成されたと考えられた (Fig. 5). 脳表近くでは拡張・蛇行の日立つ血管が5日目同様みられ、さらには10~15 μm の壁が不整の血管網がみられ、一部には sinusoid 様に拡張したところもみられた (Fig. 6A). Fig. 6B のごとく、螺旋状を呈した血管もみられたが、その周辺の毛細血管網は5日目と比べ、その数が増加していた。しかし、壁不整の血管は減少し、Fig. 6C のごとく、スムーズな壁を持ったほぼ正常の毛細血管網が多くみられた。

IV 考 察

現在まで正常脳^{4,11,20,21)}あるいは種々の疾患^{6,9,12,13,17,19)}における血管構築の研究は散見される。しかし、脳浮腫における微小血管構築の、しかも経時的観察を行ったものは、我々が渉猟したかぎりでは見当らない。血管構築の観察に対して microangiography が従来より用いられている^{9,13)}が、我々はより立体的に、しかも走査電顕を用いることにより、さらに微小血管を観察することのできる血管鋳型

Fig. 4 Day 5 after cold injury. A: Many capillaries show kinking (arrows). Bar=10 μm . B: Irregular vessel walls in the margin of the edematous zone. Bar=10 μm .

Fig. 5 Day 7 after cold injury. The microvascular architecture of the lesion has been totally reformed. A: Microvasculature demonstrated by colloidal carbon. $\times 40$. B: Scanning electron microgram of vascular cast. Bar = $100\ \mu\text{m}$.

Fig. 6 Day 7 after cold injury. A: Blood vessels with irregular walls at the brain surface and dilated sinusoidal vessels. Bar = $10\ \mu\text{m}$. B, C: Smoothly running microvessels with uniform diameters and three-dimensional distribution are visible. Spiral formation of the capillaries (arrow) is demonstrated. Bar = $10\ \mu\text{m}$.

法¹⁰⁾により行った。

この鋳型法の有用性についてはすでに述べられている^{12,20)}が、この方法で問題になるのはレジンの注入が不完全なために血管鋳型に欠損が生じることである。この問題を解決するために私は、血管鋳型標本が断続しているところではゼラチン加コロイドカーボンを注入した標本と比較観察し、なるべくすべての血管が連続している部を検索するようにした。さらに、Yoshidaら²⁰⁾の方法に準じ、血管鋳型を乾燥させるとき、水の表面張力により構築に変形・虚脱をきたすのを防ぐ目的で凍結真空乾燥を行い、よりよい試料を得ることができた。

従来、脳浮腫の血管構築を修復という面より観察した報告はないが、cytotoxic edemaの急性期をmicroangiographyにて観察したもの¹³⁾、さらに脳梗塞作製24時間後の血管構築を観察し、微小血管が伸展して直線状に走行し、一部にレジンの血管外流出の所見を認めた報告¹⁷⁾はある。我々の1日目と2日目の観察からも同様の血管走行を認めている。しかし、レジンがコンプ状に血管外へ流出した所見はなかった。

さて、血管構築の修復は3日目より開始され、7日目にはほぼ完成されることが判った。血管構築の修復は大きく二つのタイプに分けられる。一つは主に既存の血管構築を再

現しながら浮腫周囲より修復されるもので、もう一つは脳表近くの小部分にみられるが、正常ラット脳ではみられない形態をとるものである。この異常血管には種々の形状を認めた。すなわち、10 μm 前後の盲嚢形成、網状に吻合する壁不整の血管網に sinusoid 状に拡大した血管、さらに屈曲・蛇行し、血管壁の一部が膨れ、径が大きいにもかかわらず、動脈とも静脈とも同定できないもの、中隔が形成されつつある像などである。このうち10 μm 前後の盲嚢形成は、鋳型法では盲嚢部の先がどのようにになっているか不明であるが、透過電顕の観察から vascular sprout と考えられている^{2,21)}。また、sinusoid 様に拡張した血管は、正常胎生期にみられるばかりでなく²¹⁾、脳梗塞や実験脳腫瘍^{14,19)}においてもみられる所見である。その他、脳表近くでみられた所見も胎生期のラット脳にみられた所見と同様であった²¹⁾。このことより、これら脳表近くでみられた血管は新生血管であると思われる。

では、どうしてこのように二つの型があるのであろうか。脳浮腫時の血管内皮細胞を経時的に透過電顕で観察した報告³⁾では、通常の場合、基底膜が保存され、内皮細胞の再生はこの基底膜に沿ってなされる。しかも、3日目より浮腫の周囲から再生内皮細胞がみられるという。しかし、基底膜が強く損傷された場合、どのようになるのかは検討されていない。今回、私は脳表近くの組織傷害の非常に強いところでの透過電顕での観察を行っていないが、おそらくこの部では基底膜の断裂または破壊がみられ、新生血管にて血管構築の修復がなされたと思われる。このことは、ヒト胎児脳の血管発生初期において基底膜の非連続部に未熟な血管がみられたという報告⁵⁾ときわめて類似した所見である。つまり、基底膜が保存されているところでは既存の血管構築のまま修復が行われ、基底膜がある程度破壊されているところでは新生血管により血管構築の修復がなされると思われる。

次に、経過中に血管壁の不整がみられるが、血管構築の修復とともにその不整が少なくなっている。これらは血管内血栓と腫大している再生内皮に関係があると思われる。つまり、浮腫の消退とともに血管内血栓が溶解し¹⁶⁾、また再生内皮細胞は時間の経過とともに薄くなってくること³⁾に起因していると思われる。

どのようなメカニズムにより血管構築が修復されるのかは定かではない。脳浮腫が軽減されるにしたがって血管構築が改善してくるのか、それとも血管構築が改善してくるから脳浮腫が軽減してくるのか、一概には論ずることはできない。脳浮腫が軽減してくるという現象は、血管だけを論じて解決するものではなく、グリア細胞および血液由来細胞など、代謝面も含めて総合的に考えなければならな

い。

最後に、さらに興味あることは、Ikuta ら⁷⁾が脳浮腫という細胞外間隙の異常な拡大を示す病態を、細胞の増生や移動運動に必要な細胞外腔を持っている胎生期の脳の状態に関連付けて考察していることである。彼らによれば、グリア細胞による病変修復は、やはり我々の血管構築の結果と同様、3日目より始まっているという。さらに、我々の観察した脳表近くの新生血管が胎生期の血管形態と非常に似ていることは、Ikuta ら⁷⁾の報告を合せ考えると、非常に興味深いものである。

V 結 語

脳損傷後に伴う脳浮腫における微小血管構築の経時的観察を血管鋳型法により行った。血管構築の修復は3日目より開始され、7日目にほぼ完成される。主に既存の血管構築を再現しつつ、浮腫周囲より修復されるが、脳表近くの小部分、つまり浮腫の非常に強い部分では血管の新生により血管構築の修復がなされると考えられる。

稿を終えるに当たり、終始変らぬ御指導を賜りました山口大学脳神経外科 青木秀夫 教授に深謝致します。また、鋳型作製において適切な御助言を戴きました新潟大学脳研究所神経病理 吉田泰二 博士に深く感謝致します。さらに、本研究遂行に当たり、山口大学脳神経外科 西崎隆文 先生、原田有彦 先生、上領俊文 先生には標本作製で、市村好江 嬢には写真・文献整理、タイプなどで御協力を戴きました。

本論文の要旨は、第45回日本脳神経外科学会総会(1986年10月、東京)において発表した。

文 献

- 1) Ames A, Wright RL, Kowada M, Thurston JM, Majno G: Cerebral ischemia. The no-reflow phenomenon. *Amer J Path* 52: 437-453, 1968
- 2) Bar T, Wolff JR: The formation of capillary basement membranes during internal vascularization of the rat's cerebral cortex. *Z Zellforsch* 133: 231-248, 1972
- 3) Cancilla PA, Frommes BS, Kahn LE, DeBault LE: Regeneration of cerebral microvessels. A morphologic and histochemical study after local freeze-injury. *Lab Invest* 40: 74-82, 1979
- 4) Fischer ED, Lorenzo AV, Landis WJ, Welch K, Ofori-Kwakye SK, Dorval B, Hodgins KJ, Kerr CS: Vasculature to the germinal matrix in rabbit pups. *J Neurosurg* 64: 650-656, 1986
- 5) Hauw JJ, Berger B, Escourrolle R: Electron microscopic study of the developing capillaries of human brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 31: 229-242, 1975
- 6) Hekmatpanah J, Hekmatpanah CR: Microvascular alterations following cerebral contusion in rats. Light, scanning and electron

- microscope study. *J Neurosurg* 62: 888-897, 1985
- 7) Ikuta F, Yoshida Y, Ohama K, Oyanagi S, Takeda S, Yamazaki K, Watabe K: Revised pathophysiology on BBB damage. The edema as an ingeniously provided condition for cell motility and lesion repair. *Acta Neuropathol [Suppl] (Berl)* 8: 103-110, 1983
 - 8) Klatzo I, Chui E, Fujiwara K, Spatz M: Resolution of vasogenic brain edema, in Cevos-Navarro J, Ferszt R (eds): *Brain Edema*. New York, Raven, 1980, pp 359-373
 - 9) Kuroiwa T, Tsuyumu M, Takei H, Inaba Y: Effects of Nd: YAG and CO₂ lasers on cerebral microvasculature. Study in normal rabbit brain. *J Neurosurg* 64: 128-133, 1986
 - 10) 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
 - 11) 中井國雄, 今井治通, 亀井一郎, 板倉 徹, 駒井則彦, 木村 宏, 永井利三郎, 前田敏博: 脳内微小循環とその調節機構に関する研究 — 微細血管樹脂鋳型標本の立体的観察 —. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 20: 155-161, 1980
 - 12) 岡 伸夫, 中田潤一, 遠藤俊郎, 高久 晃, 篠原治道, 森沢左歳: 実験的水頭症における血管構築. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 25: 701-706, 1985
 - 13) Perez CA, Hodges FJ, Margulis AR: Microangiography in experimental cerebral edema in rats. *Radiology* 82: 529-535, 1964
 - 14) Press MF: Lead encephalopathy in neonatal long-evance rats. Morphologic studies. *J Neuropathol Exp Neurol* 36: 169-195, 1977
 - 15) Reulen HJ, Tsuyumu M, Tack A, Fenske AR, Prioleau GR: Clearance of edema fluid into cerebrospinal fluid. A mechanism for resolution of vasogenic brain edema. *J Neurosurg* 48: 754-764, 1978
 - 16) Segawa H, Patterson RH: Role of platelets in vasogenic brain edema. Significance of thrombus formation in the damaged vessels. *Arch Neurol* 38: 265-270, 1981
 - 17) 堤 健二: 脳梗塞に関する実験的研究 — 血管鋳型走査電顕法を中心に —. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 26: 595-600, 1986
 - 18) Vorbrodt AW, Lossinsky AS, Wisniewski HM, Suzuki R, Yamaguchi T, Masaoka H, Klatzo I: Ultrastructural observations on the transvascular route of protein removal in vasogenic edema. *Acta Neuropathol (Berl)* 66: 265-273, 1985
 - 19) 吉田泰二: 実験膠腫内微小血管の立体像 — 胎仔, 新生仔期の脳血管形成との関連 —. *脳と神* 35: 619-627, 1983
 - 20) Yoshida Y, Ikuta F: Three-dimensional architecture of cerebral microvessels with a scanning electron microscope. A cerebrovascular casting method for fetal and adult rats. *J Cereb Blood Flow Metabol* 4: 290-296, 1984
 - 21) Yoshida Y, Ikuta F, Watabe K, Nagata T: Developmental microvascular architecture of the rat cerebellar cortex. *Anat Embryol (Berl)* 171: 129-138, 1985
- [別刷請求先: 〒755 山口県宇部市小串1,144, 山口大学脳神経外科, 織田哲全]