

学 位 論 文 題 名

実験的脳虚血ラットの中樞神経系における
病理学的ならびに病態生理学的研究

学位論文内容の要旨

I. 目 的

脳虚血の病態に関する研究は数多くあるが多発性の脳梗塞巣を特徴とする脳虚血モデルの病態についての研究報告は少ない。今回、直径50 μ mのマイクロスフェアーを内頸動脈に注入し多発性の脳梗塞巣を持つ新しい実験的脳虚血ラットを作成した。この実験的脳虚血ラットの中樞神経系における病理組織学的ならびに病態生理学的変化につき検討した。更に、この新しい実験的脳虚血ラットが多発性脳梗塞モデル動物になりうるか否かについて考察した。

II. 実験方法

1. 実験的脳虚血ラットの作成

A. 急性脳虚血ラット

塩酸ケタミン100mg/kgの腹腔内投与により麻酔したウイスター系雄性ラット（10-12週齢）を用いて、19匹の実験的脳虚血ラットを作成した。実験的脳虚血ラットの作成は Kogure 及び Kiyota らの方法に準じて右外頸動脈から逆行性に PE-10 ポリエチレンカニューレ（内径0.28×外径0.61mm）を挿入し、その先端を内頸及び外頸動脈分岐部より1mm遠位に固定した。このカニューレより直径50 μ mのカーボンマイクロスフェアー、2000個（20%デキストラン100 μ lに浮遊）を右内頸動脈内へ注入、動脈塞栓による脳虚血ラットを作成した。対照としてマイクロスフェアーの代わりに生理食塩水を注入したラットを13匹作成した。

B. 手術後7日目の脳虚血ラット

急性脳虚血ラットの作成法に準じて手術後7日目の脳虚血ラットを8匹作成した。対照として偽手術群のラット8匹を作成した。

2. 病理組織学的検討

急性脳虚血ラットのうち4匹についてマイクロスフェア注入後5時間で、脳の病理組織学的検討を行った。この他、手術後7日目に受動回避反応試験を行った脳虚血ラットのうち1匹について試験が終了した後約6週間後（手術後約8週間）に脳の病理組織学的検討を行った。

3. 大脳皮質脳波測定

脳虚血ラット10匹及び対照7匹について定位脳固定装置を用いて頭蓋を露出し、Bregmaより尾側3mm、左右外側2mm、脳表面より1mmの深さの大脳皮質に直径0.2mmの絶縁ステンレスチール製で先端を0.5mmだけ絶縁を除去した双極電極を2本挿入し、大脳皮質脳波を記録した。大脳皮質脳波は周波数解析装置（日本光電、ATAC-450）を用い周波数解析を行った。大脳皮質脳波の測定は、マイクロスフェア注入前から注入後1時間の間行った。

4. 大脳皮質局所血流量測定

脳虚血ラット5匹及び対照6匹について大脳皮質脳波測定時と同様の位置に直径550 μ mの針型プローベを挿入し、レーザー式組織血流計（バイオメディカルサイエンス、LBF-221）を用いて、大脳皮質局所血流量を測定した。今回の研究における血流量はマイクロスフェア注入前の値を100%とした相対的血流量で表した。大脳皮質局所血流量の測定は、マイクロスフェア注入前から注入後1時間の間行った。

5. 受動回避反応試験

手術後7日目のラット8匹及び偽手術群7匹について受動回避反応実験装置（小原医科産業）を用いて、獲得試行（75V、3秒間の電気ショック）を行った。獲得試行後24時間から5日間再生試行を行い、反応潜時を測定し、記憶保持能力を調べた。

Ⅲ. 結 果

1. 急性脳虚血ラットの病態

A. 病理組織学的結果

注入したマイクロスフェアは、ほとんどが注入側に分散しており、極僅かであるが非注入側にも認められた。注入側のマイクロスフェアは前大脳動脈領域及び中大脳動脈領域に分布し、大脳皮質の前頭葉および頭頂葉の実質の中、さらに大脳基底核、視床、視床下部、海馬などに認められた。非注入側で認められたマイクロスフェアは前大脳動脈領域がほとんどであった。脳梗塞巣は健常部分と混在し小梗塞が多発した状態が基本であり、一部でこれらの小梗塞が融合した状態となっていた。脳梗塞巣は、中大脳動脈及び前大脳動脈の支配領域に認められ、これらの

脳梗塞巣では、周囲よりも染色性が低下し神経網の粗鬆化が認められ、神経細胞は核、胞体ともに縮小し、濃染していた。これらは、急性脳梗塞の特徴的な病理組織学的所見であった。

B. 大脳皮質脳波変化

大脳皮質脳波は δ 波が両側ともマイクロスフェアー注入直後より有意なパワーの増加を示し、5分後で最も増加し、その後僅かに減少を示した。これらの変化は注入側でより顕著であった。また、注入側では60分後でも有意なパワーの増加状態は継続していた。非注入側では増加傾向を示した。

C. 大脳皮質局所血流量変化

大脳皮質局所血流量はマイクロスフェアー注入後より注入側で有意な血流量減少を示した。血流量の減少は60分後も続いていた。また、非注入側では、注入後20分までは血流量減少の傾向を示したが、対照群との間に統計学的な有意差はなかった。その後は有意な血流量の減少を示し、60分後も血流量の減少は続いていた。

2. 手術後7日目以後の脳虚血ラットの病態

A. 受動回避反応試験

手術後7日目の脳虚血ラットでは、5日間の再生試行のうち、獲得試行24時間後から3日目まで、偽手術群に比較して再生試行において反応潜時の有意な短縮を認めた。

B. 病理組織学的検討

手術後約8週間経過した時点での脳虚血ラットの病理組織学的変化は、多発性の脳梗塞巣を認めたが、その脳梗塞巣は、局所的に神経細胞の脱落を示し、その体積も萎縮しており、グリアの増生がみられ、ときにヘモジデリンの沈着を伴い、陳旧性脳梗塞の像を呈していた。

IV. 考 案

マイクロスフェアーの大きさと注入量を適切に設定することによって、ラットに多発性の脳梗塞巣を作成できることがわかった。この脳虚血ラットは急性期では大脳皮質脳波の徐波化及び大脳皮質局所血流量の減少を特徴とし、7日後の時点で記憶障害が認められることが特徴であった。また大脳皮質脳波と大脳皮質局所血流量は脳虚血発症早期では必ずしも相関した変化を示さないと考えられた。今後さらに検討を加えることにより、この脳虚血ラットが多発性脳梗塞モデルとなることが期待された。

V. 結 語

1. 直径 $50\mu\text{m}$ のマイクロスフェアをラット右内頸動脈内に注入することによって新しい脳虚血モデルを作成できた。
2. 病理組織学的には多発性脳梗塞で、脳梗塞巣は主にマイクロスフェア注入側の前頭葉、頭頂葉、大脳基底核、視床、視床下部に認められ、わずかに非注入側の前頭葉にも認められた。
3. 脳虚血ラットの急性期における大脳皮質脳波は大脳皮質局所血流量の減少とほぼ平行して徐波化し、マイクロスフェア注入後60分では両者とも、もとの状態には戻らなかった。
4. 本病態モデルは手術後7日目の時点で記憶保持能力の低下が示唆され、多発性脳梗塞の病態生理を研究する上で有益なモデル動物となることが考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齋 藤 秀 哉

副 査 教 授 阿 部 弘

副 査 教 授 近藤 喜代太郎

直径 $50\mu\text{m}$ のカーボンマイクロスフェア（以下、MS と略記）を内頸動脈内に注入し多発性脳梗塞巣を特徴とする新しい実験的脳虚血ラットの作成を試み、この脳虚血ラットの中枢神経系における病理組織学的ならびに病態生理学的変化について検討した。さらに、この脳虚血ラットが多発性脳虚血モデル動物になりうるか否かについて考察した。

I. 実験方法：塩酸ケタミン 100mg/kg の腹腔内投与により麻酔したウィスター系雄性ラット（10～20週齢）を用いた。ラットの右外頸動脈から逆行性にポリエチレンカニューレを挿入し、このカニューレより直径 $50\mu\text{m}$ の MS 2000個（20%デキストラン $100\mu\text{l}$ に浮遊）を右内頸動脈内へ注入して、塞栓による実験的脳虚血ラットを19匹作成した。対照として MS の代わりに生理食塩水を注入したラットを13匹作成した。また、手術後7日目の脳虚血ラットを、急性脳虚血ラットの作成法に準じて8匹作成した。対照として偽手術群のラットを7匹作成した。

病理組織学的検討は、急性脳虚血ラットのうち4匹について MS 注入後5時間で、手術後7日目の脳虚血ラットのうち1匹について MS 注入後8週間でそれぞれの脳を摘出し、病理組織学的変化を調べた。

大脳皮質脳波測定は、急性脳虚血ラット10匹および対照7匹について定位脳固定装置を用いて頭蓋を露出し、Bregmaより尾側3mm、左右外側2mm、脳表面より1mmの深さの大脳皮質に直径0.2mmの絶縁ステンレススチール製で先端を0.5mmだけ絶縁を除去した双極電極を2本挿入し、大脳皮質脳波を記録し、周波数解析装置にて周波数解析を行った。

大脳皮質局所血流量の測定は、急性脳虚血ラット5匹および対照6匹について大脳皮質脳波測定時の電極と同様の定置に直径550 μ mの針型プローベを挿入し、レーザー式組織血流計を用いて行った。

受動回避反応試験は、手術後7日目の脳虚血ラット8匹と偽手術群7匹について受動回避反応実験装置を用いて行った。獲得試行(75V、3秒間の電気ショック)後、24時間から5日間再生試行を行い、その反応潜時を測定し、記憶保持能力を調べた。

II. 結果：急性脳虚血ラットの病態のうち、病理組織学的結果は次の通りであった。注入したMSは、ほとんどが注入側に分布しており、ごくわずかであるが非注入側にも認められた。MSは主に前大脳動脈および中大脳動脈領域に分布していた。脳梗塞巣は多発性であることが特徴であった。脳梗塞巣では周囲よりも染色性が低下し神経網の粗鬆化が認められ、神経細胞は核、胞体ともに縮小し、濃染していた。

大脳皮質脳波は δ 波が両側ともMS注入後より有意なパワーの増加を示し、これらの変化は注入側でより顕著で、60分後も続いていた α 、 β_1 波の変化に一定の傾向は認められず、 θ および β_2 波の変化は認められなかった。

大脳皮質局所血流量はMS注入後より注入側および非注入側とも血流量の減少を示した。血流量の減少は60分後も続いていた。また、注入側の血流量減少がより著明であった。

手術後7日目以後の脳虚血ラットの病態を検討する目的で受動回避反応試験を行った。手術後7日目の脳虚血ラットは、5日間の再生試行のうち、獲得試行24時間後から3日目まで、偽手術群に比較して再生試行において反応潜時の有意な短縮を認め、記憶保持能力の低下が示唆された。

MS注入後8週間経過した時点での脳虚血ラットの脳の病理組織学的変化は、急性脳虚血ラットと同様に多発性の脳梗塞巣を認め、梗塞巣は、局所的に神経細胞の脱落を示し、グリアの増生がみられ、ときにヘモジデリンの沈着を伴い、嚢胞の形成も認められた。

III. 考案ならび結語：これまでに多くの脳虚血モデルが報告されてきたが、多発性脳塞栓モデルの病態に関する報告は少ない。そこで今回MSを用いて多発性の脳梗塞巣を特徴とする脳虚血ラットの作成を試みた結果、主にMS注入側に多発性の脳梗塞巣を有する新しい脳虚血ラットの作成に成功した。さらに、この脳虚血ラットの病態生理を明らかにすることができた。

口頭発表に際して、阿部（弘）、近藤、皆川および田代の各教授から、ヒトの多発性脳梗塞との相違点、他の脳虚血モデルとの差異塞栓に加えて二次的变化が病態に関与する可能性、注入後7日目での意識障害の有無につき、それぞれ質問があったが、森井はおおむね適切な回答をなし得たと考える。また、副査の阿部（弘）および近藤両教授から、詳細なる論文審査ならびに面接の試験が課せられた。本論文は、直径50 μ mのカーボンマイクロスフェアを内頸動脈内に注入し多発性脳梗塞巣を特徴とする新しい実験的脳虚血ラットを作成し、その中枢神経系の病態を解明した研究であり学位に値すると判定された。