

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——

菊岡 政久

脳の微小血管構築を立体的に追究する第一歩として、ラット脳の微小血管にメタクリレート樹脂を注入して血管鋳型標本を作製し、これを走査電顕で観察（血管鋳型走査電顕法）した。この方法により、従来の形態学的研究では困難であった脳の微小血管構築の全貌を立体的に検討することができた。さらに、血管鋳型標本の表面には内皮細胞核による特徴的な陥凹が見られ、血管内腔の構造もレプリカ面として観察された。解剖学的部位の微小血管構築を見ると、組織特有の血管密度や走行を有する立体的な微小血管構築が具体的な所見として観察され、各々の組織の細胞構築や機能に対応すると考えられる微小血管構築が明瞭となった。

(昭和63年7月29日採用)

Microvascular Architecture of the Rat Brain: Scanning Electron Microscopic Study of Vascular Corrosion Casts

Masahisa Kikuoka

The microvascular architecture of the rat brain was investigated by means of scanning electron microscopy of vascular corrosion casts. A series of representative sites are described in detail from the viewpoint of microvascular morphology. At each anatomical site, the three dimensional microvascular architecture showed clear differences in direction and density, and was closely related to the function and histological structure of the brain.

Contrary to previous reports, this method enables one to represent finer and three dimensional microvascular architecture, and seems to be a useful tool in the investigation of the microvasculature of the central nervous system. (Accepted on July 29, 1988) *Kawasaki Igakkaishi* 14(4): 539-551, 1988

Key Words ① Corrosion casts ② Rat brain ③ Scanning electron microscopy ④ Microcirculation

I. はじめに

脳の微小血管は脳循環の生理学的特殊性や種々の中枢神経系疾患の病態とも深く関連し、重要な役割を演じていることは周知の事実であ

る。しかし、従来より脳の主要血管の形態や病理に関してはさまざまな方面から十分な研究が行われているにもかかわらず、同じ血管系でありながら、微小血管に関する形態学的研究の大部分は電子顕微鏡を用いた微小血管の壁構造に

関するものであった。したがって、その立体的な血管構築に関する知見は少なく、脳の微小血管構築の全体像を理解することが困難である。

本研究では、脳の微小血管構築を立体的に追究する第一歩として、ラット脳の微小血管にメタクリレート樹脂であるメルコックス®(大日本インキ)を注入して血管鋳型標本を作製し、これを走査電顕で観察(血管鋳型走査電顕法)した。この方法により、従来の形態学的研究とは次元の異なる視野で脳の微小血管構築の全貌を立体的に観察することができ、若干の興味ある知見を得たのでその成績を報告する。

II. 方 法

実験動物は体重200g前後のフィッシャー系ラット(日本クレア)を使用した。ラットはエーテル麻酔下で手術台に固定して開腹、開胸を行った。左心室より18G エラスターを挿入して大動脈起始部に結紮固定した。下行大動脈は横隔膜上で遮断し、心臓循環を上半身のみに隔離した。次いで右心耳切開を行い脱血しつ

つ、大動脈起始部に固定したエラスターより灌流ポンプを用いて37°Cに加温したヘパリン加生食(1000 IU/l)約500 mlで灌流し、血管腔より血液成分を完全に除去した。組織および血管は磷酸緩衝液にて3%に調製したグルタルアルデヒド(pH 7.3)を用いて灌流固定を行った。次いで前もって硬化剤を加え冷却したメタクリレート樹脂(以下樹脂と略)をラットの平均収縮期血圧である100~120 mmHgの圧に保ちながらガラスシリンジを用いて用手的に注入した。注入量は約40 mlで、右心耳切開部より固定液の混入のない透明な樹脂が流出するまで十分に注入した。樹脂は水中にてゆっくり重合、硬化させた後、開頭を行い脳を摘出した。大脳は厚さ約5 mmのcoronal sectionに、小脳および脳幹はsagittal sectionに切り出した。組織の腐食はまず約50°Cに加温した20%水酸化ナトリウム液に3日間浸漬し、次いで0.5%次亜塩素酸ナトリウムを含む流水で組織を完全に腐食、除去した。また、一部は水酸化ナトリウム液に浸漬した後、約50°Cに加温し

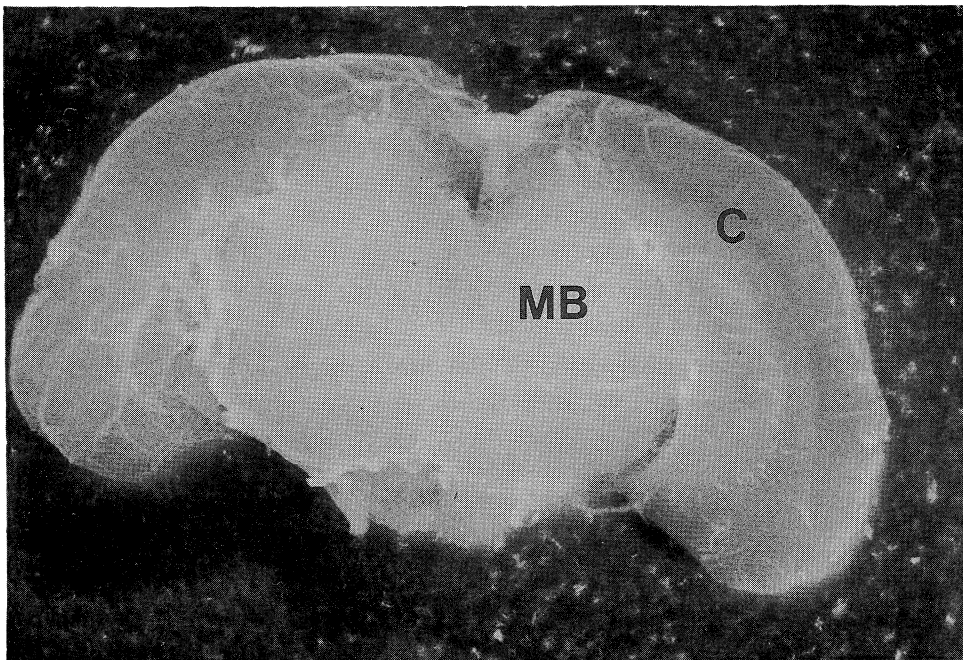


Fig. 1. Coronal section of the vascular corrosion casts, showing a macroscopic vasculature of the cerebral hemisphere (C) and midbrain (MB) ($\times 10$).

た界面活性剤を含む中性洗剤および酵素（プロテアーゼP：天野製薬）により組織を腐食し、流水で組織を完全に除去した。できあがった血管鋳型標本は液体窒素中で凍結し、真空乾燥後、金パラジウム蒸着を行って走査電顕（日立、S-570、加速電圧20KV）で観察した。また、血管鋳型標本に対応するすべての組織はパラフィンに包埋し、ヘマトキシリン・エオジン

染色、PAS染色、および鍍銀染色を用いて光顕で観察した。

III. 結 果

動脈系から静脈系まで樹脂が完全に注入された血管鋳型標本は、脳実質を化学的および物理学的処理にて腐食、除去した後もその基本構築をよく保持しており、各々の解剖学的部位によ

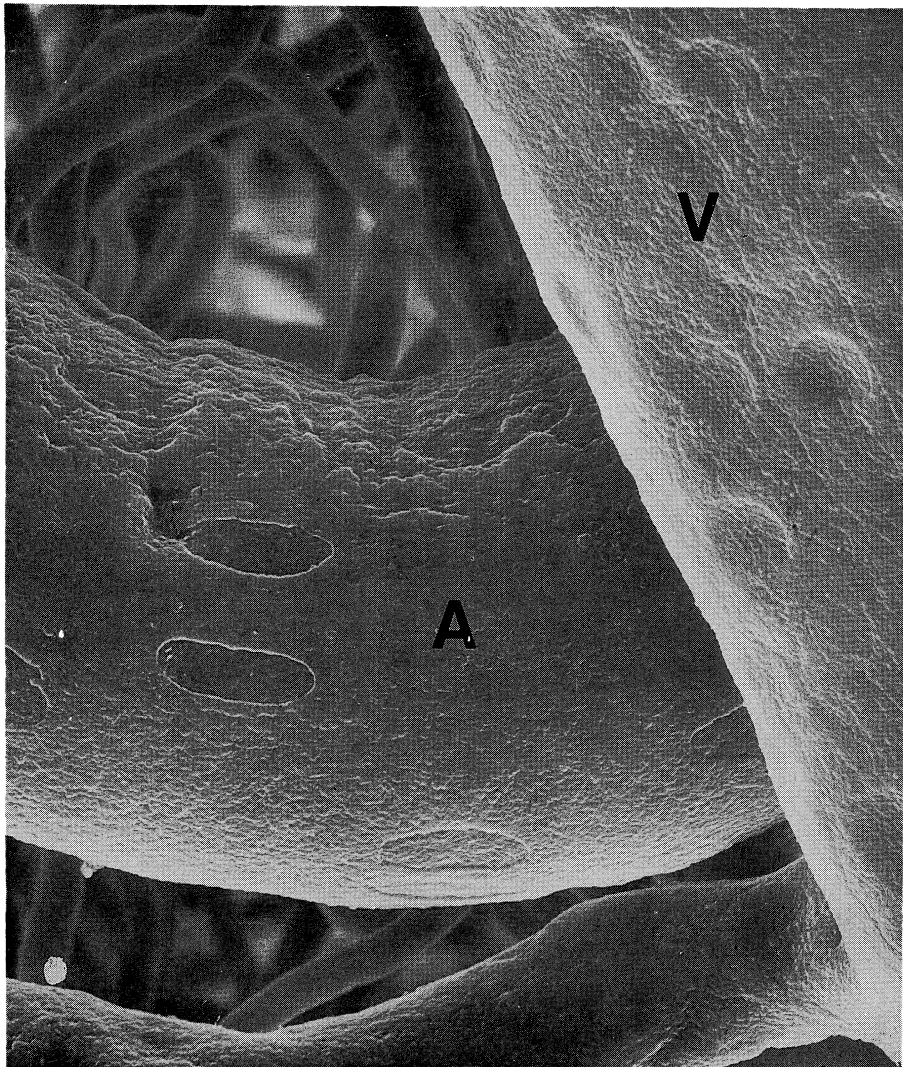


Fig. 2. Scanning electron micrograph of the artery (A) and vein (V), showing the different impressions of the endothelial cell nuclei. Note the well demarcated ovoid impressions on the arterial surface. There are oriented in the axial direction of the vessel. The venous casts show the round impressions with a random distribution ($\times 800$).

り明らかに異なる血管構築を肉眼的にも確認することができた (**Fig. 1**). 走査電顕で観察すると、樹脂は径が $5\sim 7\ \mu\text{m}$ の毛細血管までくまなく流入しており、目的とする微小血管レベルまでの立体的観察が可能であった。また、血管内腔のレプリカ面である血管鑄型の表面は種々の化学的処理による影響を受けることなく、動脈および静脈の内皮細胞核配列の違いを克明に再現していた (**Fig. 2**)。動脈の内皮細胞核は血管の長軸にそって規則的に配列する境

界鮮明な楕円形の陥凹として認められた。一方、静脈の内皮細胞核は動脈とは明らかに異なり、規則性のない境界が不鮮明な類円形の陥凹として認められた。これら内皮細胞核の陥凹は毛細血管にも散見され、その形態は動脈に類似していたが、配列の規則性は認められなかった。

【A】 脳の各部位における微小血管構築

I) 大脳皮質表面: ラットの大脳は脳回、脳溝の存在しない滑脳であるため、大脳皮質表面

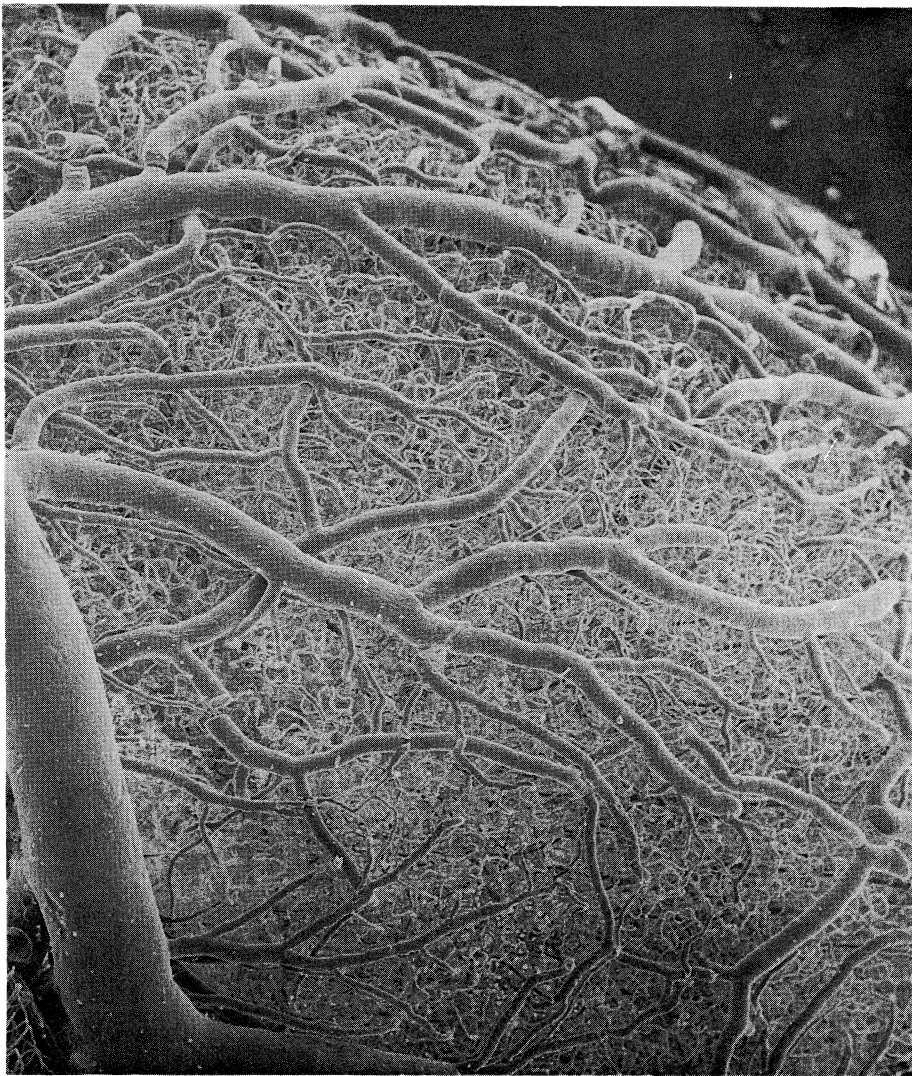


Fig. 3. Scanning electron micrograph showing tangential view of the cerebral surface. The leptomeningeal vessels run in a random course ($\times 40$).

には規則性のない大径の leptomeningeal vessels が互いに交錯していた (Fig. 3). 静脈は屈曲蛇行が強く、動脈は直線的な走行を示す傾向が見られ、動静脈の交差部では静脈側に変形が認められた。また、静脈間の吻合は豊富に認められたが動脈間の吻合は血管支配の境界部に散見されるにすぎなかった。

II) 大脳皮質: leptomeningeal artery は大脳表面を不規則に走行しながらほぼ一定の間隔で大脳皮質に向かって垂直に穿通する径が

30~50 μm の cortical artery を分枝していた (Fig. 4). これらの cortical artery は脳実質に垂直に穿通するとすぐに分枝し、皮質毛細血管網の形成に関与するものと、脳実質に穿通してしばらく分枝せず、皮質中間層から深層にかけての毛細血管網の形成に関与する2種類の cortical artery が認められた。cortical artery には基本的に動脈間あるいは動静脈間の吻合は認められなかったが、皮質表層においてわずかの毛細血管を介して動脈あるいは静脈と連絡す

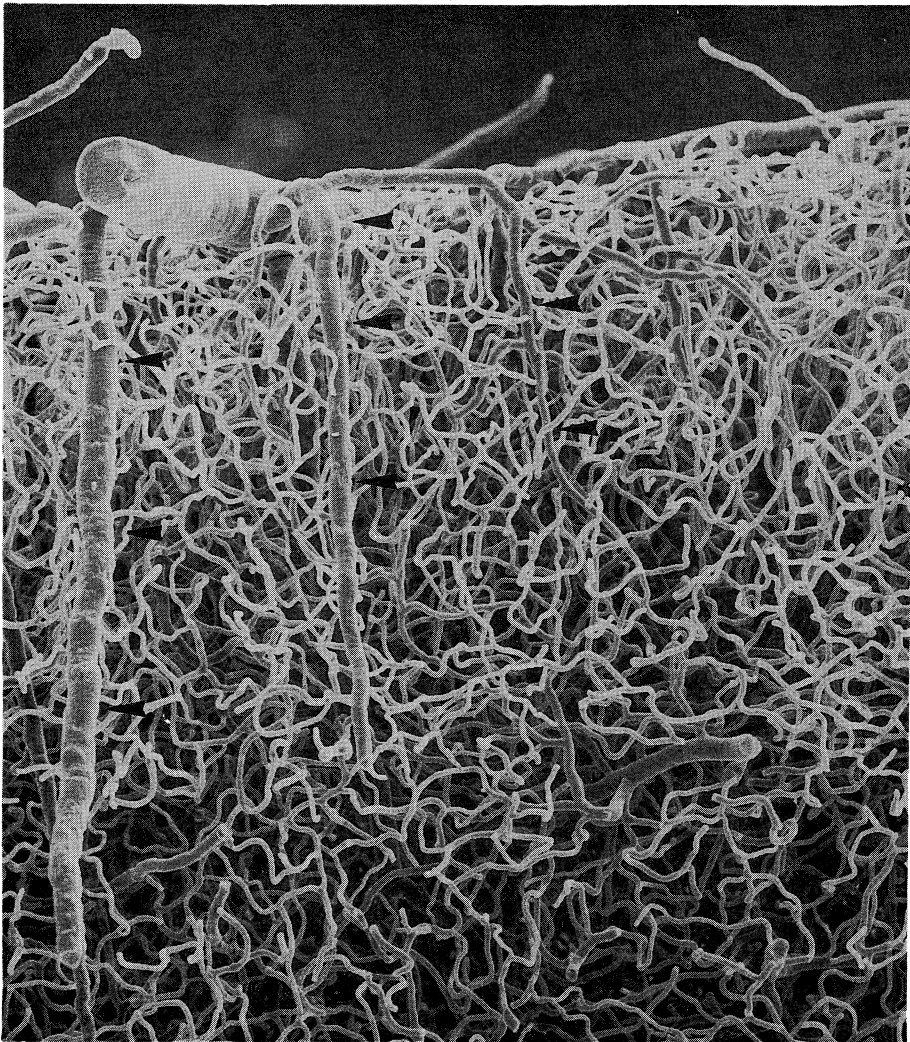


Fig. 4. Microvascular architecture of the cerebral cortex. Cortical arteries (arrow-heads) which perforate from the leptomeningeal arteries run perpendicular to the cortical surface ($\times 100$).

る部分が存在した。大脳皮質の毛細血管網の形態は **Figure 5** のごとく reticular arrangement を示し、血管径が $5\sim 7\mu\text{m}$ の均一な血管径を有する棍棒状の毛細血管が一定の間隔で分岐、吻合する規則的な3次元構築が認められた。これらの毛細血管は集合して細静脈となり、大脳皮質表面に向かう静脈系と合流していた。細動脈や細静脈の区別は内皮細胞核の配列や、全体の血管構築から血行動態を推測することにより可能であったが、加えて、細動脈は鋭角な分枝を繰り返すのに対し、細静脈はほぼ直

角に近く鈍角に合流する傾向を示した。

III) 大脳白質: 大脳白質は皮質深層を灌流する cortical artery の一部と、大脳皮質表面から垂直に穿通し、皮質毛細血管網の形成に関与しない medullary artery によって支配されていた。大脳白質の毛細血管網の形態は、血管径は皮質と同様であるが、分枝の少ない粗な毛細血管が神経線維の走行に一致した parallel arrangement を示し、毛細血管密度および血管の立体的走行において大脳皮質とは明らかに異なる微小血管構築が認められた (**Fig. 6**)。

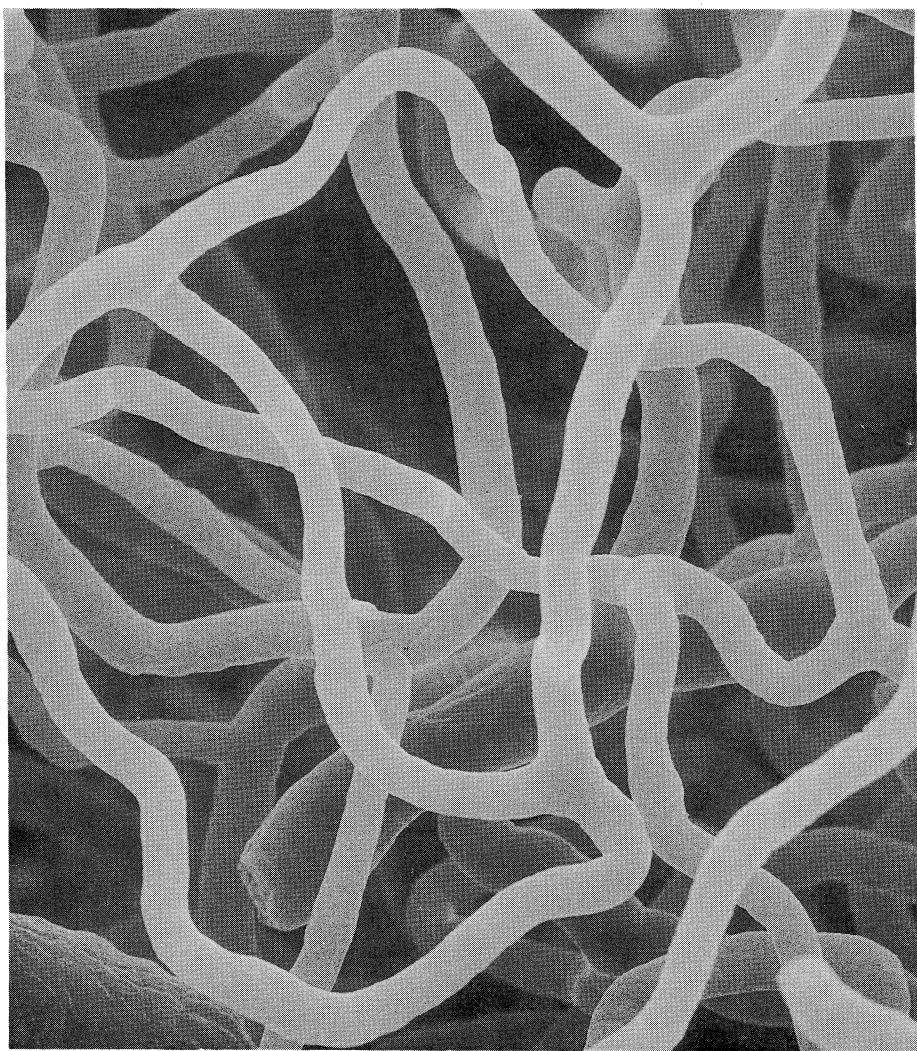


Fig. 5. Microvascular architecture of the capillary network in the cerebral cortex, showing typical three dimensional reticular arrangements ($\times 1,000$).

IV) 大脳基底核：脳底部の主要血管から垂直に穿通した細動脈により支配されていた。細動脈は基底核に到達するとすぐ樹枝状に分布して毛細血管網を形成していた。毛細血管網の形態は大脳皮質と類似する reticular arrangement を示したが、細動脈、細静脈ともにその走行が樹枝状で豊富な毛細血管網に隠れその追究は困難であった。

V) 脳 幹：主に脳幹腹側より穿通する細動脈により支配されていた。穿通動脈は大脳皮質

と同様、脳幹に向かって垂直からやや尾側に向かって穿通し、脳幹の毛細血管網を形成していた。脳幹腹側の毛細血管網の形態は大脳白質に類似して分枝が少なく、parallel arrangement を示す毛細血管が背尾側方向に向かう方向性を有する部分と、大脳皮質類似の reticular arrangement を示す部分が混在していた (Fig. 7)。脳幹背側は reticular arrangement を示す毛細血管網が主体であったが、第4脳室底を形成する部分の毛細血管網は尾

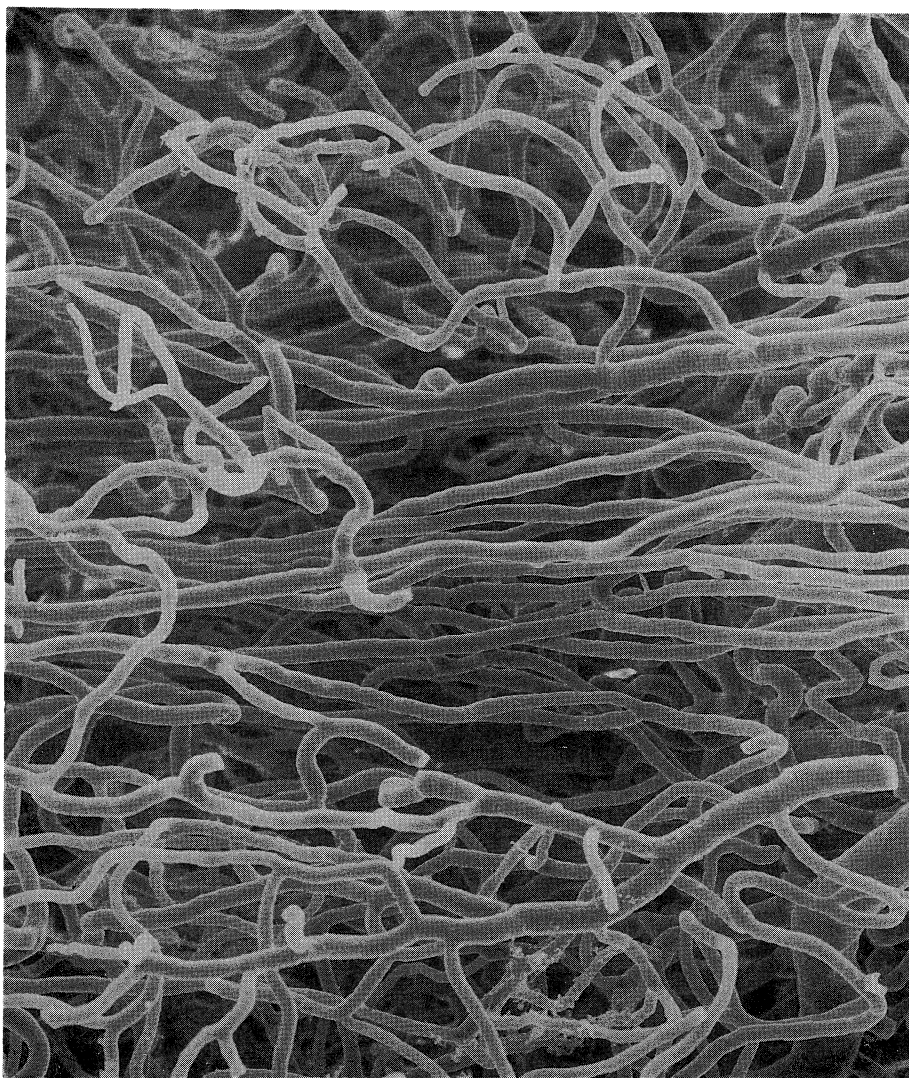


Fig. 6. Microvascular architecture of the capillary network in the cerebral white matter, showing typical three dimensional parallel arrangements($\times 200$).

側方向に向かう parallel arrangement を示した。

VI) 小 脳: 小脳表面は大腦とは異なり, 小脳回, 小脳溝が存在するため大径の leptomeningeal vessels は小脳溝を規則正しく走行し, その分枝が小脳回を横切るものと, 小脳溝の深部に垂直に進入するものが存在した. 小脳皮質を見ると小脳表面の leptomeningeal artery から垂直に穿通する細動脈が分枝して毛細血管網を形成していた. **Figure 8** は小脳

皮質の微小血管構築と血管鋳型標本に対応する組織像との対比を示すが, 小脳皮質の細胞構築と一致した微小血管構築が認められた. molecular cell layer と考えられる小脳皮質表層の毛細血管網は脳表に対して直角に配列する parallel arrangement を示し, 互いに archade を形成していた. 一方, granular cell layer と考えられる深層の毛細血管網は表層とは明らかに異なる reticular arrangement を示した. Purkinje cell layer は両者の境界部に一致す

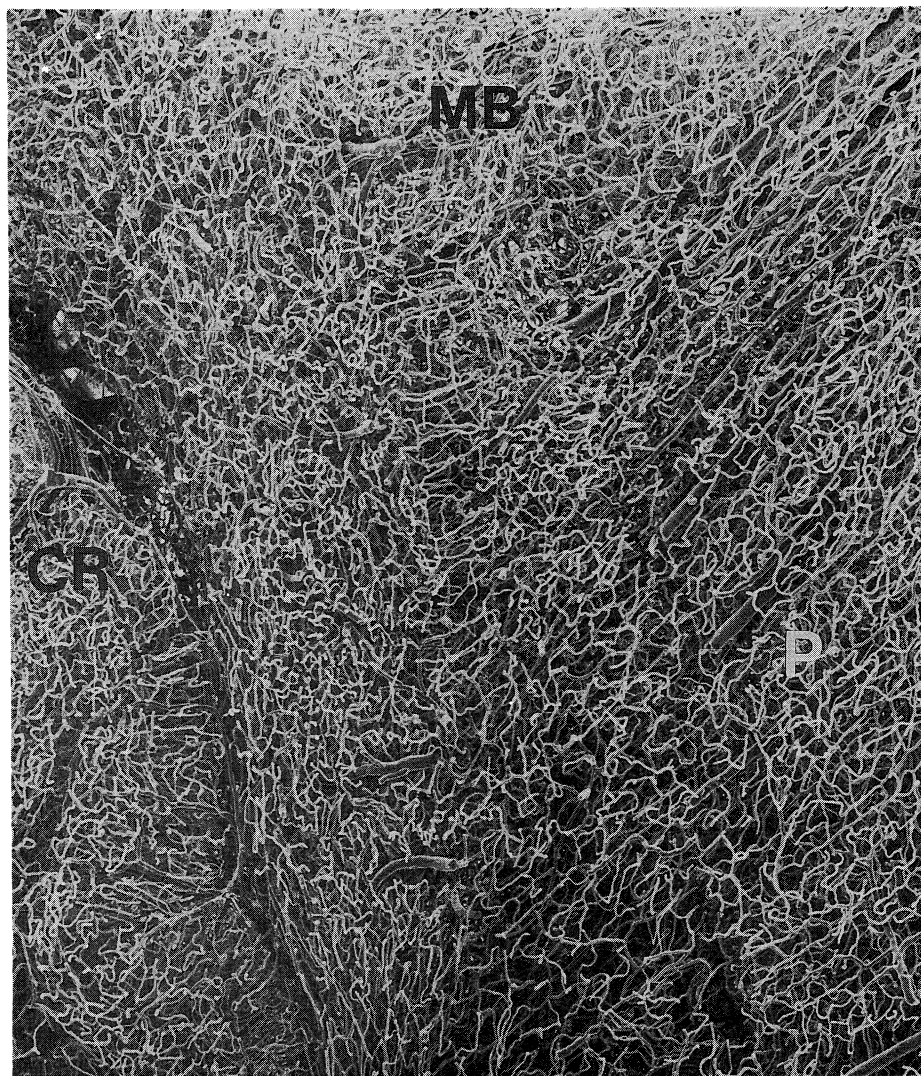
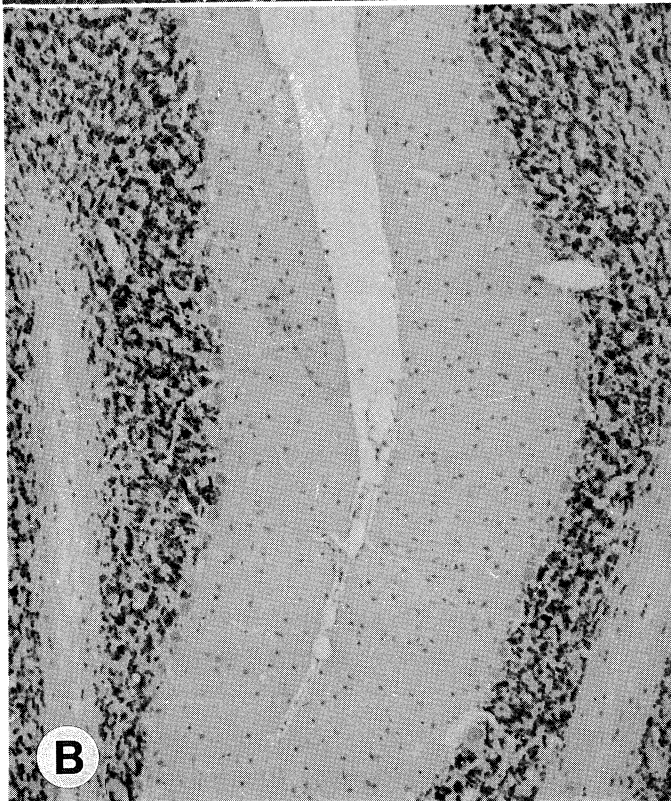
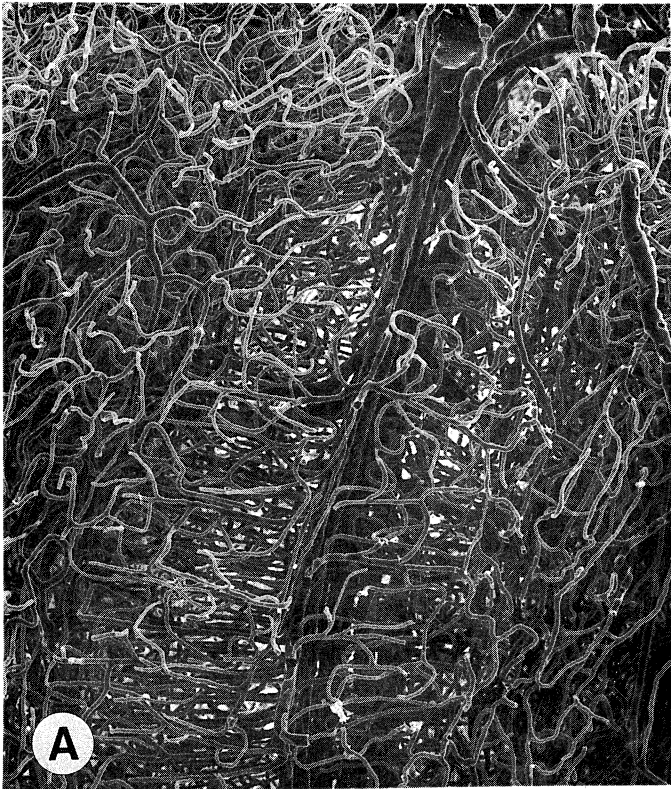


Fig. 7. Microvascular architecture of the brain stem. CR: cerebellum, MB: midbrain, P: pons ($\times 40$)



と考えられた。小脳白質の毛細血管網の形態は、大脳白質と同じく分枝の少ない粗な毛細血管が神経線維の走行に一致した parallel arrangement を示した。

VII) 脈絡叢：脈絡叢は脳実質とは明らかに異なる特異な微小血管構築を示した。細動脈は脈絡叢に入るとすぐに樹枝状に分枝して毛細血管網を形成していた。毛細血管網の形態は、密に分枝し、著しい屈曲を示す特徴的な毛細血管が一塊となって存在した。また、毛細血管は細動脈および細静脈の周囲に絡みつくように走行する部分や、脳実質では認められない環状構造を示す部分が多数存在した (Fig. 9)。

【B】組織所見との対比

血管鋳型標本に対応するすべての組織は各種染色法を用いて詳細に観察したが、光顕観察では血管鋳型走査電顕法で観察し得た立体的な微小血管構築はもちろんのこと、微小血管を連続性のある構造物として解析することは困難であった。さらに、小血管においては動静脈の区別も不可能であった (Fig. 10)。しかし、血管鋳型標本に対応する組織所見との対比は、周囲組織を完全に除去した血管鋳型標本の観察において、それぞれの解剖学的部位の確認だけでなく、血管とその周囲組織との関係を知るうえでも不可欠であった。

Fig. 8A, B. Scanning electron micrograph of the cerebellar cortex (Fig. 8A, $\times 100$), and paraffin section opposing the vascular corrosion cast, stained by hematoxylin and eosin (Fig. 8B, $\times 100$).

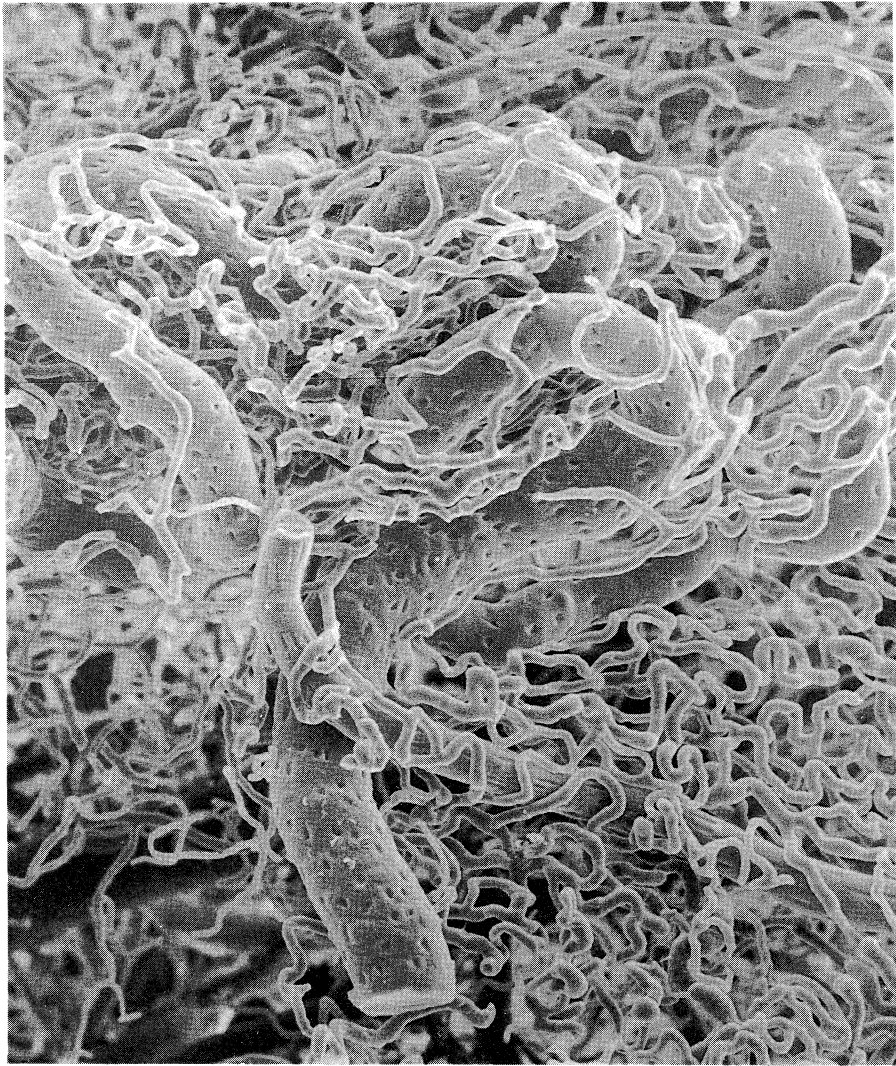


Fig. 9. Microvascular architecture of the choroid plexus in the lateral ventricle, showing the vessels running in a winding course and intricate form ($\times 100$).

IV. 考 察

微小血管構築を立体的に研究する手段として、組織の連続切片からその立体的な血管構築を復元する方法や、India ink など種々の色素を注入した組織の検索、および stereomicroangiography 法などが従来より用いられてきた。しかし、連続切片は手技が複雑であったり、色素注入組織の検索では組織の厚さが制限されるため、部分的な観察には適するものの

全体像の把握は困難であった。一方、stereomicroangiography 法は立体的観察が容易に行えるものの、血管の認識限界がおよそ $50 \sim 100 \mu\text{m}$ までであり、目的とする微小血管構築の全貌を詳細に解析することは困難であった。

corrosion cast の概念は数世紀前より導入され、空洞を有する組織の形態学的研究に用いられてきたが、微小血管への応用は1970年、rubber compound を用いた Nowell¹⁾ 1971

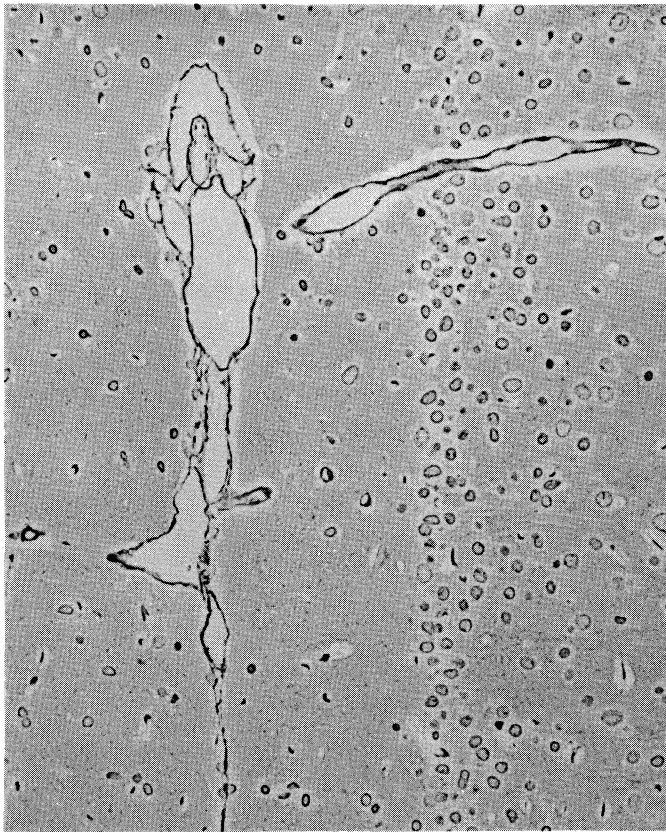


Fig. 10. Paraffin section opposing the vascular corrosion cast, showing the transverse and longitudinal section of the capillaries in the cerebral cortex (Silver stain, $\times 100$).

年，メタクリレート樹脂を用いた Murakami²⁾ の報告が最初である。彼らの方法の特筆すべき点は、血管鋳型標本を gross anatomy だけでなく走査電顕を用いて立体的観察が可能なことである。以来、微小血管構築を走査電顕下でそのまま立体的に観察することができ、得られる所見が具体的なことから種々の臓器に応用され、多数の報告^{3)~9)}が見られる。しかし、中枢神経系に関しては、当初、厚い骨に囲まれた柔らかい組織であり、脂質成分を多く含むという解剖および生化学的特殊性と関連して満足のゆく結果は得られなかった。その後、技術上の問題が解決され、中枢神経系の微小血管構築に関する報告^{10)~14)}も散見されるようになったが、いまだ中枢神経系全般にわたる詳細な検討はな

されていないのが現状である。本研究で用いた血管鋳型走査電顕法は、Murakami²⁾により開発され、吉田ら¹⁰⁾が中枢神経系に適した技術面の改良を加えた方法である。改良点は、組織を樹脂注入前に血管とともに灌流固定し、微小血管の支持性を増すこと、血管鋳型標本の乾燥に凍結真空乾燥を行うこと、そして脂質成分の多い脳組織の腐食に次亜塩素酸ナトリウムを用いることである。さらに本研究では、脳組織の腐食に界面活性剤を含む中性洗剤や酵素（プロテアーゼP）をも作用させることにより、繊細な微小血管を損傷することなく完全な形で観察することが可能となった。また、今回使用したラット脳は血管鋳型標本を細切することなくそのまま試料台に固定することが可能であり、不必要な機械的操作を加えることなくその全貌を連続して観察するのに適していた。この方法により観察し得た脳の微小血管構築を見ると、Zweifach¹⁵⁾により報告された微小循環系の解剖単位を立体的に観察することができた。解剖学的部位の微小血管構築を見ると、組織特有の血管密度や走行を有する立体的な微小血管構築が具体的な所見として観察され、各々の組織の細胞構築や機能に対応すると考えられる微小血管構築が明瞭となった。さらに、血管鋳型の表面には内皮細胞核による特徴的な陥凹が見られ、血管内腔面の構造もレプリカ面として観察されたが、Hodde and Nowell¹⁶⁾の報告した内皮細胞境界や、Nakai ら¹²⁾が脳循環の調節に関与すると考えている ring shaped compression は鋳型表面の微細な変化として散見されるにすぎず、artifact との判別が困難であった。

これまで血管鋳型走査電顕法の有用性について述べたが、本法は化学反応により重合、硬化

されていく性質がある。そのため、観察後に硬化剤を除去する必要がある。また、硬化剤の除去が不完全な場合、観察時に硬化剤の残渣が観察視野に入ることがある。この点に注意して観察を行う必要がある。

する鋳型物質を用い、血管内腔面より血管構築を再現した血管鋳型標本を観察していることを忘れてはならない。すなわち、血液成分の残存や樹脂注入不十分による血管の狭小化や途絶だけでなく、樹脂の重合、硬化による変形も予測され、血管鋳型標本の作製に際しては、すべての血管腔を完全に血液成分の無い空虚な腔として維持するために、十分な血液成分除去と灌流固定を行い、そして適切な注入圧による十分な樹脂注入が必要である。また本来、連続性があるべき血管が途絶し盲端となった部分や鋳型表面の微細な変化については、血管鋳型標本に対応する組織標本と慎重に対比し、“読みすぎ”に細心の注意が必要である。

以上の点に留意することにより、本法は中枢

神経系の立体的な微小血管構築の検討には有用な方法であると考えられた。また将来、実験脳腫瘍や脳梗塞における微小血管構築の検討にも応用しうる可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えて下さった川崎医科大学脳神経外科 石井鎮二教授に深謝致します。また、本研究には、新潟大学脳研究所脳神経外科教室 田中隆一教授の御好意により、同神経病理学教室 吉田泰二講師 および同脳神経外科学教室 日高俊彦先生の貴重な御教示をいただきました。なお、終始有益な助言と協力をいただいた電子顕微鏡センター、動物実験センターおよび当教室の諸兄に深謝致します。

本研究は川崎医科大学プロジェクト研究費 (No. 61-308) によった。

文 献

- 1) Nowell, J. A., Pangborn, J. and Tyler, W. S.: SEM of the avian lung. Scan. Electron Microsc. Chicago, IIT Research Institute. 1970, pp. 249—256
- 2) Murakami, T.: Application of the scanning electron microscope to the study of the fine distribution of the blood vessels. Arch. Histol. Jpn. 32: 445—454, 1971
- 3) Fujita, T. and Murakami, T.: Microcirculation of monkey pancreas with special reference to the insulo-acinar portal system. A scanning electron microscope study of vascular casts. Arch. Histol. Jpn. 35: 255—263, 1973
- 4) Murakami, T., Itoshima, T. and Shimada, Y.: Peribiliary portal system in the monkey liver as evidenced by the injection replica scanning electron microscope method. Arch. Histol. Jpn. 37: 245—260, 1974
- 5) Fujita, H. and Murakami, T.: Scanning electron microscopy on the distribution of the minute blood vessels in the thyroid gland of the dog, rat and rhesus monkey. Arch. Histol. Jpn. 36: 181—188, 1974
- 6) Bielke, S. R., Nagle, R. B., Trump, B. F. and Bulger, R. E.: Scanning electron microscopy of renal vascular casts. J. Microsc. 108: 89—96, 1976
- 7) Ohashi, Y., Kita, S. and Murakami, T.: Microcirculation of the rat small intestine as studied by the injection replica scanning electron microscope method. Arch. Histol. Jpn. 39: 271—282, 1976
- 8) Hijiya, K. and Okada, Y.: Scanning electron microscope study of the cast of the pulmonary capillary vessels in rats. J. Electron Microsc. 27: 49—53, 1978
- 9) Miodonski, A., Hodde, K. C. and Kus, J.: Scanning electron microscopy of the cochlear vasculature. Arch. Otolar. 104: 313—317, 1978
- 10) 吉田泰二, 生田房弘: 走査および透過電子顕微鏡による中枢神経系微小血管構築の観察—脳血管鋳型法について。生田房弘: 厚生省・神経疾患研究委託, 低エネルギー低酸素症に基く脳障害の形態学・生化学的研究, 昭和55年度研究報告書。1981, pp. 114—124
- 11) 吉田泰二, 生田房弘, 永田伴子: ラット小脳皮質の微小血管構築について。生田房弘: 厚生省・神経

疾患研究委託，低エネルギー低酸素症に基づく脳障害の形態学的生化学的研究，昭和55年度研究報告書，1981，pp. 137—155

- 12) Nakai, K., Imai, H., Kamei, I., Itakura, T., Komai, N., Kimura, H., Nagai, T. and Maeda, T.: Microangioarchitecture of rat parietal cortex with special reference to vascular "sphincters". Scanning electron microscopic and dark field microscopic study. *Stroke* 12: 653—659, 1981
- 13) Hodde, K. C. and Veltman, W. A. M.: The vascularization of the pineal gland (epiphysis cerebri) of the rat. *Scan. Electron Microsc.* 3: 369—374, 1979
- 14) Motti, E. D. F., Imhof, H. G. and Yasargil, M. G.: The terminal vascular bed in the superficial cortex of the rat. An SEM study of corrosion casts. *J. Neurosurg.* 65: 834—846, 1986
- 15) Zweifach, B. W.: Functional behavior of the microcirculation. Illinois, Charles C. Thomas, Springfield. 1961
- 16) Hodde, K. C. and Nowell, J. A.: SEM of micro-corrosion casts. *Scan. Electron Microsc.* 2: 89—106, 1980