

## ニードルプローブ型 CCD 生体顕微鏡による脳微小循環の生体内計測

新名 健治

従来より cranial window を作製し実体顕微鏡により限られた領域の脳軟膜微小血管の観察は可能であった。本研究ではニードルプローブ型 CCD 生体顕微鏡を使用することにより広い領域での脳軟膜の微小血管の生体内における動態観察をおこなうことにより、脳血流調節において、どのレベルの細動脈が重要な働きを担っているかを明らかにすることを目的とした。

脳微小血管の生体内での観察に、ニードルプローブ型 CCD 生体顕微鏡を用いたが、脳表面の微小血管観察に直視型システム、大脳皮質内の微小血管観察に側視型システムを用いた。

動物実験に雑種成犬を使用した。全身麻酔下で、左頭蓋骨の除去を行い硬膜を切開した。内頸動脈血流をトランジットタイム型超音波血流計で測定した。

10% CO<sub>2</sub> 負荷、アデノシン、ニトログリセリンの頸動脈内投与では頸動脈血流の増加と、それに対応する脳表細動脈径の全般的な増大を認めた。これに対しアンギオテンシン II の頸動脈内投与では頸動脈血流の減少と脳表面の細動脈径増大減少の混在を認めた。これらの血管の直径の変化は特に血管径 75 μm 未満のものに大きい傾向を認めた。一部の例で、側視型ニードルプローブを大脳皮質内に刺入する事により、大脳皮質内の微小血管を観察することが可能であった。

以上、血流の調節は主として血管径 75 μm 未満の比較的細い細動脈で行われ、血流の増加は細動脈の全般的な拡張で、血流の減少はその部分的な収縮で行われる。

(平成10年9月8日受理)

### In Vivo Observation of the Brain Microvessels by Needle-probe CCD Intravital Microscope

Kenji SHIMMYO

In vivo observation of cerebral arterioles and venules is important for the analysis of the mechanism(s) of cerebral blood flow regulation. It has been possible to observe pial microvessels by using a cranial window and a intravital microscope. However, accession areas are limited and the microvessels within cortex are not visualized. A needle-probe CCD intravital microscope was developed with the cooperation of Nihon Kodan Co Ltd. Tokyo, Japan and is used to observe microvessels.

By observing the movement of red blood cells, blood flow is also visualized. We used two











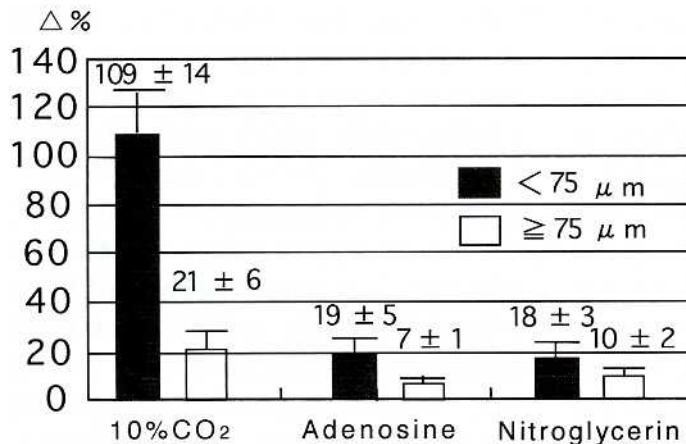


Fig. 4. The response of dilation.

The response of dilation in smaller arterioles is much more than in larger arterioles.

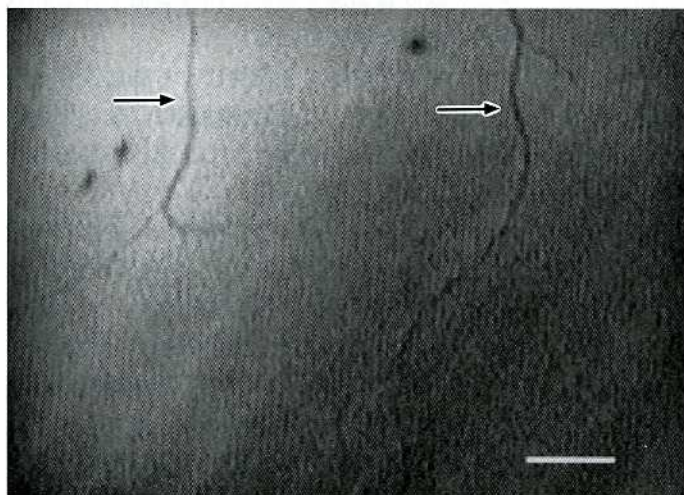


Fig. 5. Visualization of microvessels within the brain cortex by using the side-view needle-probe CCD videomicroscope.

Scale bar = 100 μm.

の収縮，拡張ともほとんどみられなかった (Fig. 3D).

#### iv) 大脳皮質内微小血管

側視型のニードルプローブ先端を脳表から約 1 mm 刺入して脳表に垂直な断面内の微小血管像を観察した (Fig. 5)。モニター上ではリアルタイムに観察が可能であるため，図下方から上方へ血球成分が移動しているのが観察され，この微小血管が細静脈であることがわかった。

## 考 案

本研究では 2 種類のニードルプローブ型 CCD 生体顕微鏡を使用し脳軟膜血管の CO<sub>2</sub>，薬剤刺激による反応と一部脳内血管の観察を行った。

その結果 1) 10% CO<sub>2</sub> 負荷，アデノシンとニトログリセリンの頸動脈内投与では 75 μm 未満の比較的細い細動脈でより大きな拡張反応を示し，その拡張はびまん性の反応である。2) アンギオテンシン II の頸動脈内投与では収縮部位と拡張部位の混在を認め，その変化は血管が 75 μm 未満の比較的細い細動脈で認める。3) 側視型ニードルプローブの先端を脳実質内に刺入することにより脳内の微小血管を観察することが可能であった。

以前から脳循環における自己調節機能を微小血管レベルで解明するため，様々な方法が試みられている。cranial window を作製した後に脳表血管を観察することは 19 世紀の半ばから始められた非常に歴史の古い観察法である。1978 年から cranial window を用いた実体顕微鏡での観察が

されてきた。頭蓋骨を開けた後アクリル板などをデンタルセメントで固定をしてアクリル板の窓を通して通常の光学顕微鏡で観察を行う方法である。この方法は，髄液や脳圧は生理的条件下に近い状態での観察が可能であるが，アクリル板の窓に視野が限られている点と対象は脳表血管であり，脳実質内の血管が観察できない点に限界がある。また，アクリル板等で cranial window 部を閉鎖するが，時間と共にフィブリンの析出反応がおり，このため視野の制限が

起こり、観察が難しくなってくる。これに対し本研究で使用したニードルプローブ型 CCD 生体顕微鏡は頭蓋骨を広く除去することで、血管直径、動静脈等、条件のよい場所を選択し、in vivo での動態観察を行うことが可能である。また、3 CCD を用いた直視型システムでの観察では色彩および血流方向から動脈系、静脈系の判別が容易である。ニードルプローブ型 CCD 生体顕微鏡の観察対象へのアクセスの良さを活用し、我々は視野中に直径 15~150  $\mu\text{m}$  の細動脈、細静脈が同時に観察できるような場所をできるだけ選択した。

脳を栄養する動脈は内頸動脈と椎骨動脈の計 4 本あり、それが脳底部で Willis 動脈輪を形成しているため、薬剤投与、血流量計測に際して、投与部位、血流量計測部位と脳微小血管動態の観察部位との関係に注意が必要である。

本実験では、外頸動脈に分岐する直前の甲状腺動脈から頸動脈にカテーテルを留置し、外頸動脈は結紮することにより投与した薬剤がニードルプローブ型 CCD 生体顕微鏡による微小血管観察部位を十分に循環するようにした。また外頸動脈を結紮し、頸動脈血流測定用プローブを甲状腺動脈と内頸動脈の間に装着することにより頸動脈血流のトランジットタイム型超音波血流計の計測値が脳血流を反映するようにした。これらにより脳表微小血管の直径の変化とその観察部位への血流量を反映する頸動脈血流の変化を同時に観察することができた。またイヌは脳への血流のうち椎骨動脈からの血流の割合が大きい。薬剤を注入した頸動脈からの血液が観察領域の脳を栄養していることを、実験終了時に空気を甲状腺動脈から注入し、観察部位の細動脈が空気塞栓を起こすことで確認するとともに、これにより細動脈、細静脈の最終的な確認を行った。

脳血流の調節に関与する因子として、組織  $\text{CO}_2$  分圧、組織  $\text{O}_2$  分圧、アデノシン、プロスタグランジン、一酸化窒素等が詳しく調べられているが、調節を行っている部位については、漠然と抵抗血管である細動脈と考えられている

だけで、それより詳しい分析はない。本研究では、細動脈を対照時の血管径が 75  $\mu\text{m}$  以上の比較的太い細動脈と 75  $\mu\text{m}$  未満の比較的細い細動脈に分類して検討した結果、 $\text{CO}_2$  負荷による血流増加時、アデノシンまたはニトログリセリン投与による血流増加時のいずれにおいても直径 75  $\mu\text{m}$  未満の比較的細い細動脈の直径増加が著しく、比較的太い細動脈の血流調節への関与は少なかった。血管径 75  $\mu\text{m}$  未満の比較的細い細動脈は脳表においてネットワークを形成しているが、75  $\mu\text{m}$  以上の比較的太い細動脈どうしの吻合は少ない。従って、比較的太い血管は導管としての役割が大きく、主として比較的細い細動脈が拡張することにより、より小さな大脳皮質領域を個別に血流調節できる利点があるものと考えられる。

アンギオテンシン II 投与による脳血流量は著明に減少したが、この時細動脈は収縮部位と拡張部位が混在し、全体として数珠状の形態を呈した。これは、 $\text{CO}_2$  負荷、ニトログリセリンまたはアデノシン投与による細動脈の拡張が全般的であったのと好対照をなす。細動脈の抵抗は、血管の長さ、直径および血液の粘性により決定されるが、血流増減時、血管の長さや血液の粘性はほとんど変化しないので、細動脈抵抗は事実上、血管径により決定されると考えられる。従って、1カ所でも血管径の小さい部位があれば、血流増加を阻害することになる。そのため、血流増加時には比較的細い細動脈全般に拡張する一方、血流減少時には比較的細い細動脈が全般的に収縮する必要はなく、ところどころ数珠状に収縮すれば、十分と考えられる。ただし、比較的細い細動脈の直径の変化量と頸動脈血流の変化量は定量的に正確に対応はしなかった。ニードルプローブ型 CCD 生体顕微鏡は移動することにより広い領域を観察できるが、1点時での観察領域は約  $1 \times 1.2 \text{ mm}$  であり、これは一方の頸動脈灌流域のごく一部でしかない。細動脈径の変化量は、脳の部位により当然変動があると考えられるので、一領域の細動脈径の変化量と頸動脈血流量の変化量は定量的に正確に



対応しない可能性があるが、脳の部位による血管径変化の分布等の定量的解析は今後の課題である。

本研究では側視型ニードルプローブ CCD 生体顕微鏡のプローブ先端のプリズムを大脳皮質内に若干刺入し、脳表に垂直な断面で大脳皮質内の微小血管を生体内で観察することに成功した。生体における大脳皮質内微小血管の観察は現在までほかに報告はなく、側視型システムは大脳皮質内微小血管動態の解析に寄与するものと期待される。しかし、現在の方法では大脳皮質に小さな切れ目を付けるため、出血が問題となり、安定した観察は困難である。また、数例で大脳皮質内微小血管の観察に成功しているが、血流方向から判断してすべて細静脈であった。細動脈が存在しないということはあり得ないので、観察操作のために、脳表部分で細動脈に障害を与えている可能性がある。脳表の細静脈にも同じく障害を与えたとしても、大脳皮質内の細静脈は脳組織より血液を回収して脳表へ向けて運搬するため、大脳皮質内で細静脈が観察で

きたと考えられる。

結論として、脳血流の調節部位は直径  $75\ \mu\text{m}$  未満の比較的細い細動脈であり、 $75\ \mu\text{m}$  以上の比較的太い細動脈の血流調節への関与は小さい。血流増加時の比較的細い細動脈の拡張は血管全般に発生するが、血流減少時の比較的細い細動脈の収縮は部分的で、血管全般には発生しない。また、大脳皮質内微小血管の生体内観察に成功した。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、懇切なるご指導とご校閲を賜りました川崎医科大学生理学教室 辻岡克彦教授に深甚なる謝意を捧げます。また終始ご指導いただいた川崎医療短期大学 山根正信教授に心より感謝いたします。さらに本研究に協力していただいた川崎医科大学生理学教室員の皆様にも深く感謝いたします。

なお、本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費 (No 10-202)、文部省科学研究費補助金 (平成 9 年度～平成 10 年度、基盤研究 A (1).08558085) の援助により行った。

## 文 献

- 1) Ngai AC, Ko KR, Morii S, Winn HR : Effect of sciatic nerve stimulation on pial arterioles in rats. *Am J Physiol* 254 : H133-H139, 1988
- 2) Morii S, Ngai AC, Winn HR : Reactivity of rat pial arterioles and venules to adenosine and carbon dioxide : With detailed description of the closed cranial window technique in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 6 : 34-41, 1986
- 3) Bouma GJ, Levasseur JE, Muizelaar JP, Watt RG, Kontos HA : Description of a closed window technique for in vivo study of the feline basilar artery. *Stroke* 22 : 522-526, 1991
- 4) Sato A, Uchida S, Yamauchi Y : A new method for continuous measurement of regional cerebral blood flow using laser doppler flowmetry in a conscious rat. *Neurosci Lett* 175 : 149-152, 1994
- 5) Wang Q, Pelligrino DA, Baughman VL, Koenig HM, Albrecht RF : The role of neuronal nitric oxide synthase in regulation of cerebral blood flow in normocapnia and hypercapnia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 15 : 774-778, 1995
- 6) Yada T, Hiramatsu O, Kimura A, Goto M, Ogasawara Y, Tsujioka K, Yamamori S, Ohno K, Hosaka H, Kajiya F : In vivo observation of subendocardial microvessels of the beating porcine heart using a needle-probe videomicroscope with a CCD camera. *Circ Res* 72 : 939-946, 1993
- 7) Yada T, Hiramatsu O, Goto M, Ogasawara Y, Kimura A, Yamamoto T, Tsujioka K, Kajiya F : Effects of nitroglycerin on diameter and pulsation amplitude of subendocardial arterioles in beating porcine heart. *Am J Physiol* 267 : H1719-H1725, 1994
- 8) Yada T, Hiramatsu O, Kimura A, Tachibana H, Chiba Y, Lu S, Goto M, Ogasawara Y, Tsujioka K, Kajiya F : Direct in

- vivo observation of subendocardial arteriolar response during reactive hyperemia. *Circ Res* 77 : 622 - 631, 1995
- 9) Yada T, Hiramatsu O, Kimura A, Goto M, Ogasawara Y, Tsujioka K, Yamamori S, Ohno K, Hosaka H, Kajiya F : In vivo observation of subendocardial microvessels of the beating porcine heart using a needle-probe videomicroscope with a CCD camera. *Circ Res* 72 : 939 - 946, 1993
- 10) Hiramatsu O, Goto M, Yada T, Kimura A, Tachibana H, Ogasawara Y, Tsujioka K, Kajiya F : Diameters of subendocardial arterioles and venules during prolonged diastole in canine left ventricles. *Circ Res* 75 : 393 - 397, 1994
- 11) Kajiya F, Yada T, Kimura A, Hiramatsu O, Goto M, Ogasawara Y, Tsujioka K : Endocardial coronary microcirculation of the beating heart. *Adv Exp Med Biol* 346 : 173 - 180, 1993
- 12) 山本徳則, 久保田英司, 松田洋人, 林 晃一, 田中啓幹, 小笠原康夫, 仲本 博, 梶谷文彦 : ニードル型 CCD プローブ法による生体微小循環への応用, 腎微小循環を中心に. 循環制御学会誌 6 : 掲載予定, 1998