

ラ ッ ト 脳 灌 流 法

——手技と長時間脳波記録例——

岐阜大学医学部第2外科学教室（主任：竹友隆雄教授）

檜 木 良 友, 大 前 勝 正, 中 條 武, 佐 藤 昭 夫
山 田 弘, 国 枝 篤 郎, 坂 田 一 記

〔原稿受付：昭和50年2月28日〕

Isolated Rat Brain Perfusion

——Experimental Preparation Technique and Report of
a Case of Long Electroencephalographic Survival——

by

YOSHITOMO KASHIKI, KATSUMASA OMAE, TAKESHI CHUJO, AKIO SATO,
HIROMU YAMADA, TOKURO KUNIEDA and KAZUKI SAKATA

The 2nd Department of Surgery, Gifu University School of Medicine
(Director: Prof. Dr. TAKAO TAKETOMO)

Experiences with the isolated rat brain perfusion developed by H. A. SLOVITER et al. were reported, with special reference to our preparation technique, the observed changes in weight of the perfused rat brain and a case of long electroencephalographic survival.

Brain perfusion experiments, as measures of brain research, have kept an unique place heretofore, however the usual brain perfusion methods using big animals have various difficulties in performance of surgical preparation for isolation of circulatory system between the brain and the trunk and also in equipments.

On the other hand, the isolated rat brain perfusion method is quite simplified in those respects and can be carried out in any laboratory.

In the present preparation of the isolated rat brain perfusion, surgical procedure was performed under deep-hypothermia without any anesthesia, the brain was perfused with the perfluorocarbon blood substitute (1.8 ml/min) under a closed perfusion system, and EEG was used for observing the brain function during perfusion.

The brain weight within 2 hours of perfusion, which is thought to be the most suitable period for experimental observations in our experience, was 1.73 g 60 minutes after starting perfusion, 1.72 g 80 minutes after starting perfusion and 1.70 g 120 minutes after starting perfusion. EEG activities immediately before weighing the perfused brains were active and no brain edema was noted.

Key words: Rat brain perfusion, Perfusion technique, Deep hypothermia, Perfluorocarbon blood, Brain weight perfused

Present address: The 2nd Department of Surgery Gifu University School of Medicine, Gifu, Japan. 〒500.

A case of the isolated brain perfusion was reported, in which EEG activities were observed as long as 380 minutes, and observed changes in EEG and in perfusion pressure were described. Based on the above results, some discussion was made concerning the surgical preparation technique, the effect of deep hypothermia and the optimal perfusion rate.

はじめに

1928年 Schmidt¹⁾²⁾ 1937年 Heymans³⁾ がイスを用いた脳灌流実験に成功して以来、イス⁴⁾⁵⁾、ネコ⁶⁾⁷⁾⁸⁾、サル⁹⁾²⁰⁾ 等による脳灌流実験があい次いで成功し、同時に脳に関する物質代謝、薬理学的、生物学的研究分野において、多数のすぐれた新知見が得られてきた。

一般に脳灌流法による脳研究の利点は、従来からおこなわれてきた脳切片或は脳ホモジネートによる研究法と異なり、脳機能と代謝、生理、薬理学的関連性を in vivo の状態で観察できる点にある。また in situ の脳実験においては、種々の脳外因子の影響が複雑に関与するため、その実験結果はしばしば複雑なパターンを呈し、これらの解釈は必ずしも容易ではない。これに対し、脳灌流法においては脳幹及び循環系から脳を完全に分離して、脳外諸影響因子を排除し、脳からの情報を単純化することが可能である。

しかしながら、従来の脳灌流法はネコ、イス、サル等の比較的大きい動物を使用するため、脳分離手術には熟練されたスタッフと大がかりな脳灌流装置が必要であり¹¹⁾、また脳分離操作が複雑なため脳損傷を生じ易く、実験成功率が低いという欠点がある。その他大動物での脳灌流には多量の人工血液（灌流液）が必要で、経済的な面での負担も欠点の1つになっている。

我々がここに紹介するラット脳灌流法は、長年我々の教室と協同研究を行ってきたペンシルバニア大学、Henry A. Sloviter²²⁾等によって開発されたものであるが、この脳灌流法は前に述べた如き従来の脳灌流法の諸欠点に改良を加えたものである。即ち、この脳灌流法の特徴は、1名の術者により脳分離操作・脳灌流操作のすべてを短時間内に行い得ること、超低体温法の応用により脳分離操作に由来する脳損傷が少なく、従って実験成功率が高いこと、ラット脳重量が小さいことから脳灌流液の使用量が少なく、その他灌流設備も極めて簡単で、経済的に実施できるのが特徴である。

我々はこの方法を用いて種々の満足すべき研究成果をあげてきたが、今回は本法の脳分離操作、低体温法及び灌流装置等、主として技術的な面を紹介し、併せて本法により6時間に亘り脳波を記録し得た実験例を

報告し若干の検討を加えた。

脳灌流法及び実験結果

1) 実験動物

我々が実験に用いるラットは、体重200~250gのウィスター系雄ラットである。これらラットの脳重量は、表1に示す如く、1.62~1.69g、平均1.66gである。

表1 ラットの体重と脳重量との関係

No.	Body weight (gm)	Brain weight (gm)
1	240	1.63
2	240	1.62
3	245	1.64
4	245	1.67
5	250	1.69
6	250	1.65
7	250	1.69
8	250	1.68
9	250	1.69
10	250	1.67
Average	247	1.66

2) 無麻酔下超低体温法

脳に関する実験において、麻酔前による脳機能への影響は無視出来ぬ問題である¹³⁾。また正常体温下での脳幹-脳分離操作中に生ずる出血や低酸素状態は、麻酔剤の影響と同様、灌流脳機能へ悪影響を及ぼすことは言うまでもなく、これらの問題が脳灌流実験を極めて困難なものとする最大の原因となっている。

我々はこれらの問題を考慮して、脳幹・脳分離手術に際して一切の麻酔剤を使用せず、単純な超低体温法を採用することにより好結果を得ている。即ち、超低体温下の脳分離操作は殆んど無出血下に操作をすゝめることができ、また術中の代謝を極度に低下せしめることにより脳低酸素状態を予防し、手術操作に由来する脳損傷を最小限に止めることができる。さらに灌流脳においては麻酔剤の影響は考慮の外においてよい。

以下我々のラットに対する無麻酔下超低体温導入法について述べる。

まず、容積 3000ml の密閉可能な口広の瓶を用意し糞尿による汚染を防ぐため底にペーパータオルを敷き、1匹のラットを入れ密閉する。次いで crushed ice をつめた別の容器中に上記瓶を埋め90分間放置・冷却する。90分後にラットを瓶より取り出し、直腸温を測定する。通常この時点でのラットは不活発ながらも歩行可能で、直腸温は24～25℃を示す。次いで汚れたペーパータオルを取り換え、充分瓶内の空気を換気した後、ラットを瓶にもどし、再び密閉した氷中に埋め冷却する。その後約90分間放置・冷却すると、直腸温が16～18℃の超低体温ラットを得ることができる。しかし再冷却60分後より、時折瓶内のラットを観察する必要がある。即ち、瓶を横に倒した時、ラットが起き上れず、四肢を僅かに動かす程度の反応を示す場合は、既に直腸温が16～18℃に下降した状態であって、手術操作に最も適した状態である。このような状態になったらラットを瓶より取り出し、体重と直腸温を測定する。次いで口腔、気道内の分泌物を吸引して、手術台へ仰臥位にねかせ、四肢、上顎をゴムバンド等で固定し手術操作へと移る。

躯幹・脳分離操作に要する時間は30～40分程度であるが、この間ラットは室温下で20～22℃迄徐々に復温させる。もし手術操作に支障となる体動があれば、手術台の下に氷を入れて冷却するか、或は重量の軽い氷嚢で腹部を冷却することにより、直腸温を18～22℃に維持することができる。この直腸温下でのラットは手術に支障となる体動もなく、殆んど無出血下に手術操作をすゝめることができる。またこの間自発呼吸が充分保たれてはいるが、細い tube を通じて経鼻的に酸素吸入を行っている。

3) 躯幹・脳分離手術

ラットを仰臥位に固定し、下顎より胸部にかけ逆三角状に皮切を加えこの皮膚組織を切除する。直下の皮下組織・顎下腺等を正中より開いて両外側へ翻転し、両側の胸鎖乳突筋を頭側で圧挫した後切断。これを胸側へ翻転し軽く牽引する。同様に前頸筋を純的に正中線上で開き、舌骨下縁及び胸側で圧挫し切断摘除すると術野が拡大され、総頸動脈が充分露出されてくる。この間に気管も露出されるが、必要に応じて気管切開を行ない、経鼻的に行なわれていた吸入チューブを切開口より挿入して酸素吸入を行う。次いで両側総頸動脈を周囲組織より剥離して、外頸動脈を起始部で結紮

する。この際に注意すべきことは、内・外両動脈分岐部は後頭動脈を底辺とする小三角状間隔を形成しているので、後頭動脈を切断せぬように3-0絹糸を通し外頸動脈を結紮遮断する(図1, A)。次いで内頸動脈

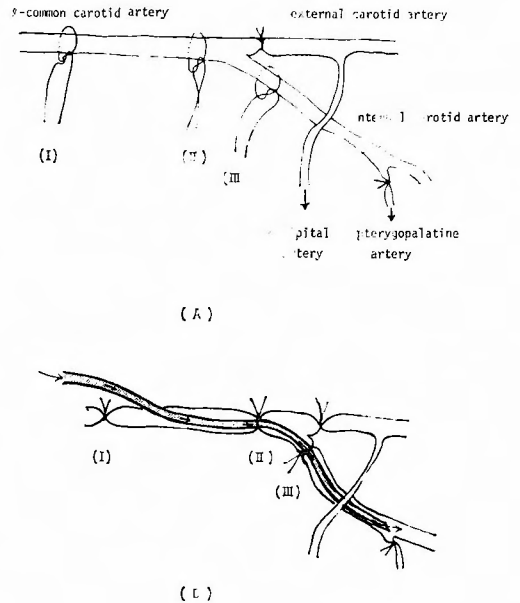


図1 ラット頸動脈の処理法

から分岐する翼口蓋動脈を分岐部で結紮するのであるが、同部での結紮には non-traumatic needle 3-0 血管縫合糸を用いると便利である。即ち、この血管分岐部の手術野は極めて狭く、同部での血管の剥離、遊離、結紮等の操作は血管を損傷し易いため、針つき血管縫合糸で翼口蓋動脈の周囲を通し結紮する。ただし結紮に際して、内頸動脈の本幹が糸によりまき込まれた周囲組織により圧迫され、狭窄または閉塞を生じないように注意する必要がある。

以上の操作で両側総頸動脈血はすべての内頸動脈系へ流入することになる。この段階で脳灌流前の control EEG がとられる。control EEG 記録には、先ずラットを腹臥位に戻し固定した後、頭皮を鼻部より両肩部にかけ三角状に切離する。次いで頭蓋骨膜を剝離し、両側前頭部及び後頭部に 齒科用ドリルを用い、EEG 電極固定用の計4コの浅い小陥凹を作る。この小陥凹へ食塩水を浸した小線球を置き、その上から電極を当て記録する。この時点の直腸温は 20～21℃ が最適であるが、これらの詳細については後述する。control EEG の記録が終ると、最後の断頭・灌流操作に入る。

再びラットを仰臥位にもどし固定して、頸椎 C₃-C₄の周りに6~9号絹糸を通し、断頭直前に椎骨動脈を含め、vertebral columnを結紮できるようにあらかじめ用意する。次いで図1、Aに示す如く、両側総頸動脈の中脳側(I)及び末梢側(II)と、内頸動脈(III)へそれぞれ結紮・tube固定用の3号絹糸をまわし、一回軽く結んで灌流 tubeのcannulationに備える。cannulationにはまず中脳側結紮系(I)を結んで総頸動脈を結紮遮断し、ついで末梢側結紮系(II)を軽く持ち上げながら総頸動脈を切開して灌流 tubeを挿入する。tubeの先端は内頸動脈内へ挿入し、図1、Bに示す如く、翼口蓋動脈分岐部を越える部位まで挿入する。tubeが挿入し得たら結紮系(II)、(III)を結び tubeを固定する。次いで断頭を行なうわけであるが、断頭時の直腸温は21~24℃が適当である。なお両側総頸動脈へのcannulationに際しては、既に脳灌流操作が開始されており、この詳細については灌流法の項で述べる。

両側総頸動脈へのcannulationが完了したら、手早く下顎骨及び気管を鋭的に切断し、次いで前に用意した頰椎の結紮糸を強く結び、その直下で頰椎及び総頸動脈、頸部筋群を一気に遮断・断頭する。その際に頰椎切断の脊椎腔はbone waxで閉鎖する。断頭後10分間は脳灌流をopen circulationにして、充分断頭脳内の血液を灌流液で洗い流す。この間に頭蓋及び頸部に附着する頭皮、筋肉、骨を充分に切除した後、生理食塩水で附着する血塊、筋肉片等を洗い流す。次いで灌流脳を灌流セット固定台へ移し、EEG電極、圧力計等を設置して全ての手術操作を完了する。この間の所要時間は30~40分である。

4) 灌流装置

灌流装置は図2に示す如く、灌流脳が置かれ、灌流脳より流出する灌流液を集める漏斗状固定台(T)。固定台(T)につづくY字形コネクター(C₁)は一方より5% CO₂ 95% O₂ mixture gas(G)をとり入れ、他方より固定台(T)から下降する灌流液をmixture gasでbubblingしつつreservoir(R)へ導く。このreservoir(R)は灌流液を少なくとも20ml以上貯留しうるものである。灌流ポンプ(RP)はroller pump(sigma motor model FM 20-2)を使用し、ラット脳灌流に必要な0.5~2.0 ml/minの微量注入調節が可能なポンプである。次いでポンプから拍出された灌流液は28℃に恒温されたwater bath(WB)内をめぐり、二股コネクター(C₂)を介して両側総頸動脈内に挿入

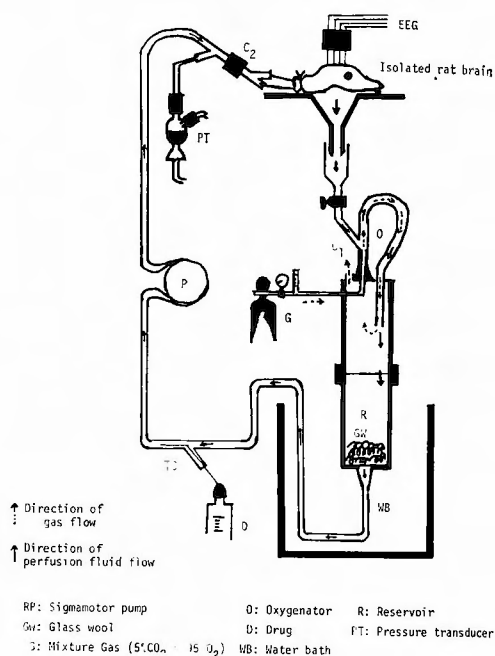


図2 脳灌流システム

された tube (ポリエチレンチューブ, Intermedic PE 10 Clay Adams) へと流れ、脳内へ灌流される。灌流圧の測定には二股コネクター(C₂)の直前にpressure transducer (LPU-0.5日本光電) (PT)へ直結する回路を設置し記録される。また必要に応じて薬剤注入用の三方括栓(TC)がおかれる。

以上が灌流システムであるが、roller pump(RP)を除く灌流システムは全て臨床で用いる点滴セット、disposable syringeを利用して作成されたもので、特別な装置は一切使用されていない。たとえばreservoir(R)は点滴用reservoir (Abbott Laboratories No. 4447)を用いるか、或は20ml disposable syringe 2本を、内筒挿入部で接着剤により接合し、底部にグラスファイバーをつめ、これをフィルターとしたものを使用する。

5) 灌流液

我々が使用している灌流用人工血液は、所謂 perfluorocarbon 血^{14,15)}で、これは近年開発された酸素運搬能を有する chemical な人工血液であって、赤血球浮遊液を用いた人工血液とは全く異なるものである。

この灌流液の組成及び作成法について、先ず我々の perfluorocarbon 血作製法の概略を述べると次の如くである。

- 1) modified Krebs-Ringer solution.....25ml
- 2) Albumin solution (Fraction V, Bovinalbumin 4g).....25ml
- 3) Perfluorocarbon (FC-43)10 ml

の混合液を sonicate し, perfluorocarbon (FC-43)を大略1 μ 大の粒子の emulsion にする. この emulsion に glucose を加え 200mg% の glucose 濃度に調整した後, PH 7.40 に補整. perfluorocarboncrit 20%の灌流液約60mlを作成して灌流液とする.

以上が我々の灌流液であるが, 最近神戸大学第2外科, 大柳治正博士等により開発された新しい perfluorocarbon 血を使用する機会を与えられ, 以来我々の脳灌流実験は極めて良好な結果が得られるようになった. 本報告もこの新しい perfluorocarbon 血を使用した結果に負うところが多い. 従って現在我々が使用している灌流液に関する詳細は, 大柳治正博士等の著書を参照されたい⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾.

6) 灌流法

灌流液は脳分離操作の間に 5% CO₂-95% O₂ Mixture Gas で bubbling しつつ, 少なくとも30分間循環させ動脈血化する. 脳灌流操作は両側頸動脈へ tubing を行う段階から徐々に開始される. そして tubing 完了後の灌流量は, 脳分離操作の進行に平行させ, 出血の程度に応じて漸次増量しつつ, 脳血流の低下を防ぐことが灌流操作の重要なポイントとなる.

そこで我々は手術操作に応じて, 経験的に次の如き灌流基準を設け灌流量を調節している. 先ず総頸動脈内への tubing に際しては, 挿入時に生ずる tube 内の血液による閉塞, 空気栓塞等による脳血流の低下を防ぐため, 0.5~0.6ml/min の流量で流しながら tubing を行ない, tube を固定する. 次いで下顎を切除する直前に0.7~0.8ml/min に流量を増した後直ちに下顎切除に移る. 下顎を切除すると可成りの出血を生ずるが, 出血と同時に 1.4~1.5ml/min に流量を増量する. 続いて頸椎を強く結紮し, 手早く断頭すると同時に 1.8~2.0 ml/min に増量して, 以後実験終了までこの灌流量を維持する. ただし, 断頭後10分間は open circulation にして, 灌流脳より流出する血液を混じった灌流液を全て wash out する. 最後に生理食塩水で血液, 筋肉片等の附着物を洗い流し, 断頭後10分より脳灌流は closed perfusion にきりかえられる.

7) 灌流脳の脳波

灌流中の脳機能を観察するうえに音, 光に対する瞳孔の収縮, 瞬目運動, 眼球運動等も示標となる. しか

し我々の実験においては, これらの反応は比較的早期に消失するため, 現段階では長時間にわたり観察可能な脳波活動が用いられている.

脳波記録は既述した如く, 両側前頭部及び後頭部から双極誘導により連続的に記録される. 断頭前の control EEG は断頭直前の脳機能の良否を判定するうえに重要である. 断頭直前の直腸温が21°C前後であれば, 脳波は通常10~15 μ V, 10 CPS 前後の pattern を示す. しかしこの時点においてもなお著明な低振幅徐波 (5 μ V 以下) を呈し, 或は asymmetry が認められる場合は, 脳循環不全, 脳浮腫の発生が考えられ, 断頭後の灌流脳々波は短時間で消失することが多い. ただし直腸温が18~19°C以下の control EEG では, 極度の低振幅徐波を示し, 25°C以上では体動, shivering による筋電図の混入により安定した脳波記録は不能である.

断頭後の灌流脳々波については, 個々の実験例において若干の差異はあるが, 一般に灌流開始後より脳内温度 (灌流液温度28°C) が上昇するにつれ, しばしば速波化を示しながら振幅を増大 (6~12CPS, 10~100 μ V) し, しばしばこの時期に spindle burst が認められる. その後灌流時間の経過, 灌流圧の上昇とともに徐々に振幅は増加しはじめ徐波化する. またこの頃になると, 脳浮腫が maximum に達する直前 (頸椎断端より脳脱が認められる直前) に spike が頻発することもある. その後脳波活動は徐々に平坦化 (5 μ V) し脳波は消失する. 図3は灌流脳々波記録の実例を示したものであるが, この記録にもある如く, 通常我々の実験においては断頭後の2~3時間は最も安定した脳波 (10 CPS 前後) が得られ, この間に種々の脳灌流実験を行い好結果を得ている⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾.

8) 灌流圧の変化

脳灌流中の灌流圧の変動は roller pump と両側総頸動脈に挿入された tube との中間圧を連続的に記録し観察する. 断頭直後の初期灌流圧は, 1.8 ml/min の灌流量下では通常 100~200 mmHg の範囲にある. しかしこの初期圧も, 断頭時の脳機能の良否により可成りの変化が認められる. その後灌流時間の経過に従い, 灌流圧は徐々に上昇しはじめ, 脳波は徐波化を呈してくる. この間に灌流圧が急激に上昇 (400 mmHg 以上) を示す場合は, やゝ遅れて脳波は明らかな低振幅徐波 (5 μ V 以下) を呈するか, または spike が出現し, 頸椎切断端より脳脱を生じ著明な脳浮腫の発生とともに脳波は消失する. 斯様に一般に断頭後の初期

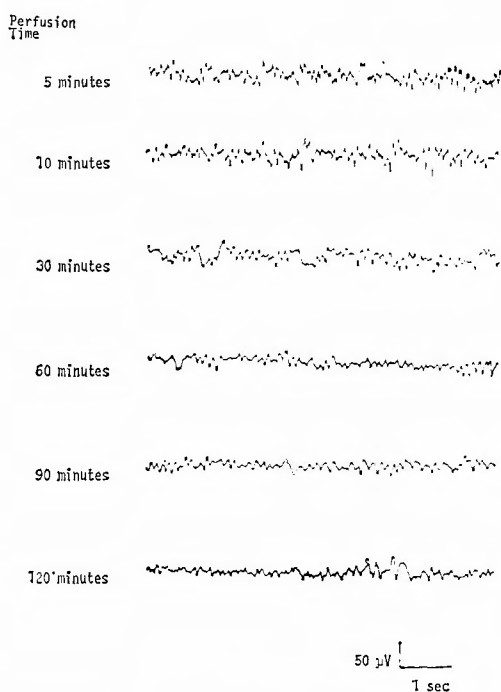


図3 灌流脳波記録

灌流圧が100~200 mmHg の範囲内にあって、灌流経過中の圧上昇勾配が緩く、200~300 mmHg 程度に保たれるものほど、脳波の持続性及び活動性が良好であると云える。

9) 灌流脳の重量変化

我々の脳灌流実験において、脳波が最も安定し、かつ灌流圧が250 mmHg 以下に維持された状態、即ち経験的に諸実験をおこなううえに、最適と考えられる時期の灌流脳重量の経時変化について観察した。

結果は表2に示す如く、経時的にみた各灌流脳重量の比較では、著明な変動は認められず、脳波上最も安定した時期の灌流脳重量は、ほぼ一定の状態に保たれていることが分かった。しかしながら対照脳重量(灌流前脳重量)と各灌流脳重量との比較では(体重の相違による平均脳重量差を考慮外として)、2~4%の重量増を示している。

この理由に関しては、灌流液として用いる perfluorocarbon の比重が、血液の比重1.06に対し、1.83と極めて高比重であることから¹⁶⁾、灌流脳内に含まれる perfluorocarbon による重量増が考慮されねばならないと考えている。現在我々はこの点に関する詳細なデ

表2 灌流時間と灌流脳重量の変化
—実験最適時間内における—

Perfusion Time (minutes)	Number of cases	Body weight before decapitation (g)	Brain weight after perfusion (g)
60	5	250	1.73
		250	1.76
		240	1.77
		245	1.74
		250	1.68
	Average	247	1.73
80	4	245	1.74
		250	1.72
		250	1.71
		250	1.76
	Average	248	1.72
120	4	240	1.62
		240	1.79
		245	1.70
		250	1.72
	Average	245	1.70
Control	Average in 10 rats	247	1.66

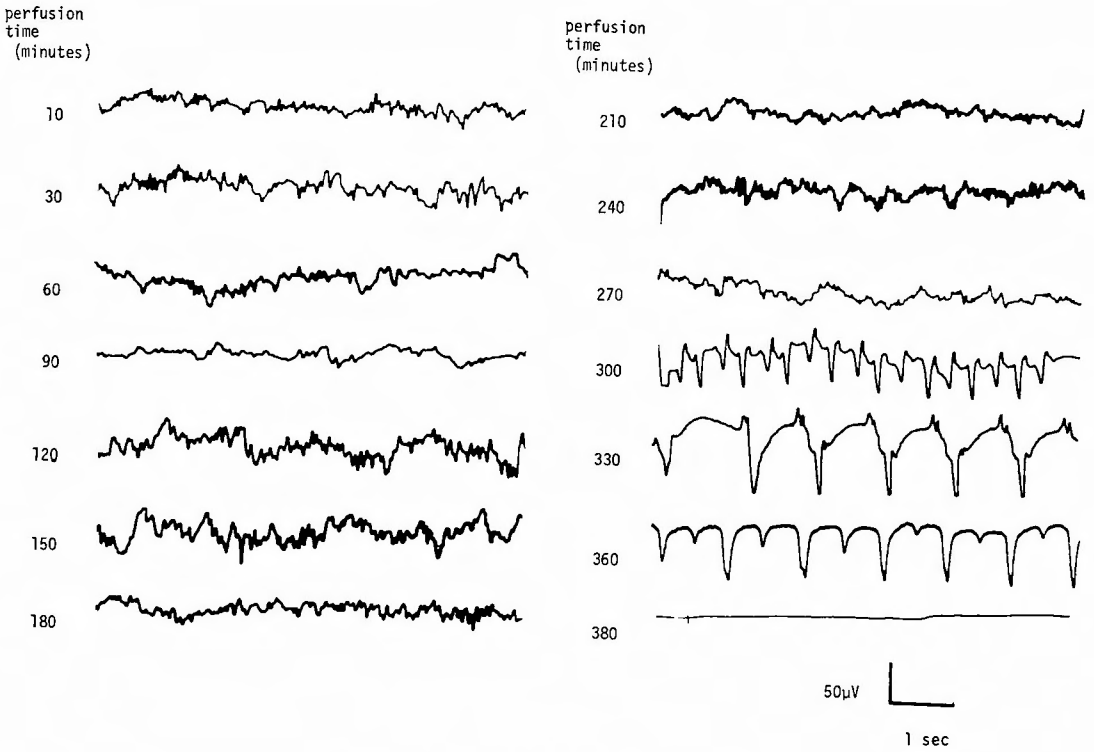


図4 長時間灌流脳波記録

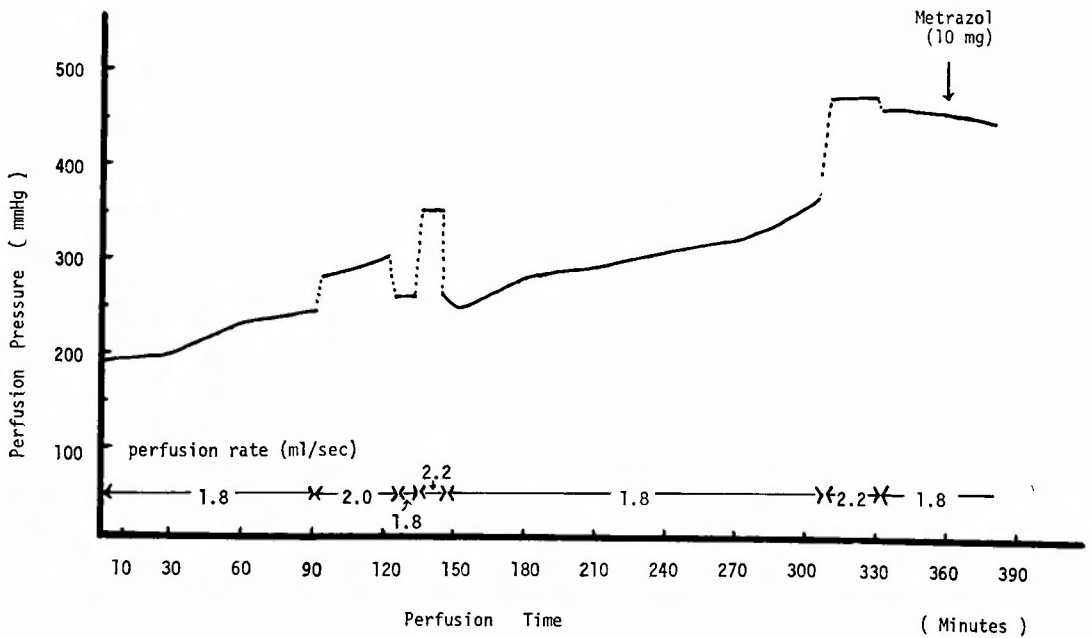


図5 長時間脳波記録例の灌流圧の変動

ーターを有していないが、かかる灌流前・後の脳重量変化は、前の理由から脳浮腫の発生を意味するものとは考え難く、たとえ脳浮腫があったとしても、実際は極めて軽度の変化に過ぎないものと考えている。事実これら脳重量測定に供された灌流脳は、いづれも肉眼的には脳浮腫の発生を認めず、また重量測定直前の脳波活動は極めて活発であった。

10) 本法による長時間脳波記録例

前述した超低体温法、脳分離操作及び灌流法によりラット脳灌流実験を行い、6時間以上に亘り脳波活動を記録し得た実験例について報告する。

この実験例の経時的灌流脳波記録は図4に示す如くであるが、まず断頭後270分(4時間30分)にわたり10~30 μ Vの脳波活動が連続的に観察された。その後(断頭後300分頃より)脳浮腫の発生に起因すると考えられる急激な灌流圧の上昇をきたし、これを契機に頻発する spike wave が発現した。この spike は時間の経過とともに徐々に発現頻度を減じ、同時に振幅の低下を示したが、断頭後360分(6時間)に metrazol 10mg を投与するや再び高振幅の metrazol response を示し、この時点においてもなお灌流脳は刺激に対する反応性を示した。その後 metrazol response は徐々に減少し、断頭後380分に至り脳波は完全に消失した。

一方、上記全経過中の灌流圧の変動は図5に示したとおりである。すなわち断頭直後1.8ml/minの灌流下では初期圧は190mmHgを示した。その後灌流圧は徐々に上昇し、断頭後210分(3時間30分)において290mmHgを示した。ただしこの間に灌流圧を2ml/min・30分間、2.2ml/min・10分間増量した後、再び1.8ml/minに戻して灌流圧の復元現象を観察している。その結果図5に示す如く、流量の増量により著明な灌流圧の上昇を認め、次いで再び1.8ml/minに減量するやほぼ増量前の灌流圧まで下降してくる。このようにこの間の灌流脳は、灌流量の増減によって生ずる灌流圧の変動に対し回復現象が認められている。その後灌流圧は徐々に上昇し、断頭後270分では300mmHg、300分で350mmHgに達し、この頃より急速な灌流圧の上昇と同時に、頻発する spike が出現してくる。この時点に至ると、灌流量を増量(2.2ml/min・15分間)するや著しい圧上昇(450mmHg以上)を示すが、再び1.8ml/minに減量してもはや灌流圧の回復現象は殆んど認められなくなる。そしてついには頡椎切断端より脳脱を生じ、著明な脳浮腫が発現してくる。しかしこの時期に至るもなお灌流脳は metrazol

に反応を示し、約20分間反応した後断頭後380分に至り、灌流圧450mmHgの状態では脳波は消失した。

おわりに

我々の経験をもとに、ラット脳灌流法とその実験結果について述べてきたが、最後に本法に関する2・3の問題について若干の検討を加えたい。

まずここに紹介したラット脳灌流法は従来の脳灌流法^{4)~11)}に比べ、手技、設備の点で極めて簡単で、実験成功率も高く(我々の経験では90%前後)、いずれの施設においても容易に実施可能な脳灌流法である。殊に従来の脳灌流実験の最大の難点は、解剖学的に複雑な動物脳の動・静脈を駆幹よりいかに完全に分離するかにあり、従ってその手術手技には高度の熟練と数名のスタッフが必要であった²¹⁾。これに対し本ラット脳灌流法は、手術手技の面では、内頸動脈より分岐して外頸動脈域組織を灌流する pterygopalatine artery を遮断する操作以外には特別な困難はなく、その上断頭を行い頭蓋外組織を最少限に残すのみにて駆幹より完全に分離され得る。しかもこの操作は一人の術者により短時間にかつ灌流操作も同時に行なえることが最大の利点である。

ところで本ラット脳灌流法は厳密な定義に従うならば頭部灌流法(ラット脳及び脳被蓋組織を含む)と称すべきものであるが、断頭後の頭蓋頭皮、皮下組織、筋肉、骨等は殆んど切除され最少限の脳被蓋組織を残すに止めるのであって、これら組織が実験に与える影響ははなはだ少ないものと考えている。即ち我々の実験結果においては、前記した如く、長時間に亘る灌流脳波記録も可能であり、その他代謝面¹²⁾、循環面¹⁸⁾⁹⁹⁾での実験結果においても、脳被蓋組織に由来する不都合は未だ経験していない。

一方、脳に関する動物実験においては、麻酔法により脳機能・代謝・循環面への影響がしばしば問題となる¹³⁾。本法においては単純な無麻酔超低体温法を採用し、何ら支障なく脳分離操作が行なわれていることは前に述べた通りである。一般に低体温法が脳分離手術操作によるアノキシア、侵襲作用から脳を保護する上に効果的に働くのみならず、極度の血圧低下による無出血下手術が脳分離操作時間の短縮(30~40分)となり、これらの利点が本法の高い成功率に導く重要な要素となっている。ところで、かかる無麻酔超低体温法の動物生体に及ぼす影響に関しては殆んど知られていない。しかし我々が行なった無麻酔超低体温(17℃)

下ラットの髄液産生、血圧・呼吸、心拍等を示標とする生理的生体反応実験では、復温に従いこれら諸反応はすべて正常に復し、また回復後も何らの障害なく生存し得た事実から、無麻酔下超低体温法のラット脳への悪影響は殆んどないものと考えている²²⁾。

次にラット脳血流と実験灌流量との関係について触れたいと思うが、生体ラット脳血流の正確な測定ははなはだ困難なため、これに関する報告は余りなされていない²³⁾²⁴⁾。Sapirstein and Hamisek²⁴⁾の測定結果によれば、1.6g のラット脳の分時血流量は0.82ml/min であると報告している。これに対し我々の脳灌流実験では、既述した如く安定した脳機能を維持するに必要な灌流量は1.8ml/min であり、これは Sapirstein 等の測定量に比べ2倍強の流量である。このような流量の相違は、生体脳と灌流脳との根本的な違いに由来するのであろうが、おそらく灌流脳の代謝、血管抵抗の変化、灌流液の組織等に関連した変化に起因するものと考えられる。殊に、本法での脳および頭蓋静脈系は完全に解放された状態下にあるため、灌流中の静脈系還流圧は生体に比べ著しい減少を示し、循環面での短絡化を生じていることになる。従ってこれらすべての因子を考慮に入れるならば、脳機能を維持するに必要な脳循環量を供給するためには、生体脳流量よりも当然多い灌流量が必要であらう。しかしこの点に関しては今後さらに検討を要すべき事柄と考えている。

斯様に本法は未だ未解決な問題が多く含まれているが、既述した如く6時間20分に亘る long survival time の得られる程の実験法として一応の成功をおさめている。因みに今日までに報告された、種々の脳灌流法による longest survival time は、ネコでは4時間⁶⁾、サルでは7時間¹⁰⁾、ラットでは Andjus, Suhara and Sloviter の5時間¹²⁾と、Krieglstein, krieglstein and Urban の10時間²⁵⁾の報告がみられる。我々の結果は Krieglstein 等の報告結果には至らなかったが、脳灌流方式において、最も簡単な灌流システムによる閉鎖式灌流法 (closed perfusion system) を用いた実験法としては、我々の結果も longest survival time の1つと云える。その他灌流方式、灌流圧の問題、灌流脳の性状等についても検討すべき点が多々あるが、本法について現在の段階において云えることは、斯様な簡単な手技・装置によっても脳灌流実験法としての価値が失われず、従来の脳灌流実験の諸欠点をおきない、技術的、経済的な面でも有益な実験法であると考えている。

最後に、いつれの脳灌流法についても、最終的には

生体脳と灌流脳との間にいかなる本質的な相違が存在するかが問題であり、今後これらの問題について一層の検討が望まれるところである。

稿を終るに臨み、御指導御校閲を賜りました竹友隆雄教授に深謝致します。

参考文献

- 1) Schmidt, C. F.: The influence of cerebral blood-flow on respiration, I. The respiratory responses to changes in cerebral blood-flow., *Amer. J. Physiol.*, **84**: 202, 1928.
- 2) Schmidt, C. F.: The influence of cerebral blood-flow on respiration, II. The gaseous metabolism of the brain., *Amer. J. Physiol.*, **84**: 223, 1928.
- 3) Heymans, C., Bouckaert, J. J., Jourdan, F., Novak, S. J. G. and Farber, S.: Survival and revival of nerve centers following acute anemia., *Arch. Neurol. Psychiat.*, **38**: 304, 1937.
- 4) 熊谷 洋, 油井 享, 小川喜一, 大賀 皓: 新しい頭部循環灌流法とその吟味. *日葉理誌*, **50**: 595, 1954.
- 5) Chute, A. L. and Smyth, D. H.: Metabolism of the isolated perfused cat's brain., *Quart. J. Exptl. Physiol.*, **29**: 379, 1939.
- 6) Geiger, A. and Magnes, J.: The isolation of the cerebral circulation and the perfusion of the brain in the living cat., *J. Physiol.*, **149**: 517, 1947.
- 7) Geiger, A., Magnes, J. and Geiger, R. S.: Survival of the perfused cat's brain in the absence of glucose., *Nature*, **170**: 754, 1952.
- 8) 池田久男: 灌流ネコ脳髓の代謝—脳灌流法の基礎的研究—, *精神経誌*, **63**: 611, 1961.
- 9) Schmidt, C. F. Kety, S. S. and Pennes, H.: The gaseous metabolism of the brain of the monkey., *Amer. J. Physiol.*, **143**: 33, 1945.
- 10) White, R. J., Albin, M. S. and Verdura, J.: Preservation of viability in the isolated monkey brain utilizing a mechanical extracorporeal circulation., *Nature*, **13**: 1082, 1964.
- 11) 川北幸男: 脳の生化学, 脳灌流法, 医学書院, 東京, 1964.
- 12) Andjus, R.K., Shuhara, K. and Sloviter, H.A.: An isolated, perfused rat brain preparation, its spontaneous and stimulated activity., *J. Appl. physiol.*, **22**: 1033, 1967.
- 13) 山田高春: 灌流猫脳髓の電気生理学的研究—脳波を中心として—, *精神経誌*, **64**: 742, 1962.
- 14) Geyer, R. P.: Fluorocarbon-polyol artificial blood substitutes., *New Engl. J. Med.*, **289**: 1077, 1933.

- 15) Maugh, T.H. II.. Perfluorochemical Emulsion: Promising Blood Substitutes., *Science*, **179** : 669, 1973.
- 16) 大柳治正, 藤田忠義, 松本義信, 松本邦彦, 山下修一, 杉原俊一, 光野孝雄, H. A. Sloviter : 人工赤血球としての Fluorocarbon Particles—ガス運搬能とその機構について—外科, **33** : 1085, 1971.
- 17) 山下修一 : フルオロカーボン乳剤を利用した犬における交換輸血について, —血液ガス運搬面よりの検討—, 日外会誌, **74** : 247, 1973.
- 18) 中条 武, 大前勝正, 山田 弘, 坂田一記, 竹友隆雄 : 第31回日本脳神経外科学会 総会 発表 (岡山), 昭和47年,
- 19) 大前勝正, 中条 武, 山田 弘, 坂田一記, 竹友隆雄 : 第15回日本神経学会総会発表 (大阪), 昭和48年.
- 20) 中条 武 : 脳血流遮断解除後の血流再開に関する実験的研究, 岐阜医紀, **22** : 678, 1974.
- 21) 大月三郎, 渡辺昌祐 : 脳灌流法—その特徴と限界—, 神経化学, **8** : 3, 1969.
- 22) Kashiki, Y. and Sloviter, H. A. : Effect of hypothermia on cerebrospinal fluid pressure in the rat., *Brain Research*, **68** : 179, 1974.
- 23) Ross, G., White, F. N. Brown, A. W. and Kolin, A. : Regional blood flow in the rat., *J. Appl. Physiol.*, **21** : 1273, 1966.
- 24) Sapirstein, L.A. and Hanusck, G.E. : Cerebral Blood Flow in the Rat., *Amer. J. Physiol.*, **193** : 272, 1958.
- 25) Krieglstein, G., Krieglstein, J. and Urban, W. : Long survival time of an isolated perfused rat brain., *J. Neurochemistry*, **19** : 885, 1972.