

究も局所脳損傷に比し少ない。慢性期頭部外傷患者高次機能に及ぼす影響としては、び慢性脳損傷は多大な要素を有していると考えられる。本研究では、ラットにおける安定したび慢性脳損傷モデルを作成し本モデルにおける軸索変化を検討することを第一義とした。

臨床的に慢性期のび慢性脳損傷患者を観察した経験より、これらの患者では注意力が散漫であり自発性に乏しい印象を得ている。中枢ノルアドレナリン系は注意・学習・記憶などの高次神経機能と関連することがこれまで研究されてきた。脳内のノルアドレナリン系のほとんどは細胞体が青班核に存在している。本研究では、作成されたモデルを用いて青班核ノルアドレナリン産生細胞の形態的变化、ならびに再生の指標となる GAP-43 の発現について検討した。

B. 研究方法

1. び慢性脳損傷モデルの作成

び慢性脳損傷は主として shear stress により引き起こされる。強度の衝撃を加えて脳挫傷を生じることなく shear stress を加えるために Marmaro は 1994 年にラットを用いてのモデルを報告した。本研究ではこのモデルを改変し以下の装置を作成した。厚さ 20cm のウレタンフォームの底部、周囲をプラスチック板で囲い衝撃吸収台とした。450g 雄 SD ラットを全身麻酔下に頭蓋骨 (coronal suture から lambda suture) を露出して金属プレートを頭蓋骨正中上に固定した。ラットをウレタンフォーム上のせ、内径 1cm のパイプをプレート上に垂直に保持して、450g の重りをプレートめがけてパイプ内を自然落下させ脳損傷を加えた。一定の生存期間の後、全身麻酔下に灌流固定を行い脳を取り出した。その後凍結

冠状断切片を作成し、HE 染色、抗 200KD、及び抗 68KD ニューロフィラメント抗体による免疫組織染色を行ない神経損傷状態を観察した。

2. 青班核ノルアドレナリン神経細胞の形態変化の検討

ノルアドレナリン合成細胞の特異的マーカーであるドーパミン β 水酸化酵素 (DBH) に対する抗体を一次抗体とする免疫染色を行い青班核におけるノルアドレナリン産生神経細胞の形態変化を観察した。先に記載したモデルを用いて、外傷後生存群を受傷後 1 日、2 日、1 週間、2 週間、4 週間、8 週間で 4% パラフォルムアルデヒドを用いて灌流固定した (各群 n=4)。脳を取り出し青班核を含む bregma より 8mm 後方から 11mm までの範囲で厚さ 12 μ m の冠状断凍結連続切片を作成した。本検討では、5 枚ごと (60 μ m 間隔) の連続切片を対象とした。anti-Dopamine- β -Hydroxylase (Eugene Tech International, Inc) を一次抗体とし、ABC-Elite キットを用いて免疫染色を行った。対照群は sham 手術を行った動物 4 匹とし同様の切片を作成した。

光学顕微鏡下に染色標本を観察し、青班核部の画像をコンピュータに取り込んだ (対物レンズ 20 倍、Fuji HC-300 使用)。両側の青班核 DBH 陽性細胞のうち核を含むものについて、画像解析ソフト (Scion Image) を用いて各細胞の断面積を測定した。各動物について全計測細胞の断面積を平均して、その個体の数値とし、各群間で統計検定を行った。

3. 青班核ノルアドレナリン神経細胞における GAP-43 mRNA 発現について

GAP-43 は神経再生の際に軸索伸展に寄

与するといわれている。青班核における GAP-43 mRNA 合成の変化を in situ hybridization 法で検討した。青班核を含む上記連続切片の一部を対象とした。凍結切片を再固定、アセチル化、脱脂、乾燥処理を行った後 non-RI 法を用いて in situ hybridization を行った。フルオレッセイン標識オリゴプローベを作成し 38°C12 時間ハイブリダイゼーションを行った。その後洗淨処理を行い、抗フルオレッセイン抗体を一次抗体とする ABC 法で免疫染色を行い、アルカリフォスファターゼにて発色反応を行った。

C. 研究結果

1-1. び慢性脳損傷モデルの改良経過

まず、至適落下高度、ヘルメットの検討を行った。すでに文献に記載されている 2m の高さよりの落下、径 13mm のヘルメット、体重 350g のラットでは大半の動物が受傷直後より呼吸停止が遷延し死亡した。また多数の動物では頭蓋骨骨折も認められ、中には陥没骨折を来すものもあった。落下高度を減じて 1m の高さとする、死亡率は激減するが組織学的変化に乏しいことを確認した。そこで、50 匹以上のラットを用いて順次実験条件の変更を行い、最終的に、ヘルメットの改良（径 22mm）、頭蓋骨のより硬い 400-450g のラットの使用及び 1.5m の高さより落下させることにより、脳幹部を中心に慢性脳損傷に特徴的な retraction ball などの組織学的変化を安定した形で得ることができた。

また、当初行った抱水クロラール深麻酔（300mg/kg）下での実験では、受傷直後の呼吸停止が遷延し約半数の動物が死亡した。そこで、いったん麻酔から覚醒させ、再度浅麻酔をかけた条件で外傷を加えることに

より受傷直後の死亡率を 19%(12/62)に低下させることができた。

このようにして作成した動物モデルのすべては、受傷直後には一時的に無呼吸を呈した。痙攣発作は全動物の 63% (40/62) に認められた。直後に死亡した動物を含めて、本条件では頭蓋骨骨折は認めなかった。死亡例の剖検では、多量のクモ膜下出血が延髄周囲に存在し、呼吸抑制が回復し得なかったものと考えられた。生存例の断頭屠殺時の脳の所見でも、全例に脳室内出血、脳底槽を中心としたクモ膜下出血を認めたが、受傷部直下の脳表には明らかな異常を認めなかった。

生存動物については受傷後 1 週間で体重は平均 10%減少し、2 週後より増加傾向を示した。また受傷後の動物は自発運動が低下していた。open field での行動も受傷 2 週でも field の中央を横切って動くなどの周囲環境への関心の欠如などが認められた。

1-2. 抗ニューロフィラメント抗体を用いての免疫染色

抗 200KD ニューロフィラメント抗体を用いての免疫染色において、受傷 1 日より脳幹腹側、橋・中脳正中部交叉繊維などに膨化蛇行所見を認め、これらの所見は受傷 2 日にはより拡大明確化し、明らかに断裂と考えられる所見を多数認め、継時的な病変の進行が認められた。約半数の動物では、より吻側の間脳底部、大脳皮質、脳梁にも軸索損傷と考えられる所見を認めた。受傷直下の大脳皮質においても神経細胞の明らかな脱落や脳挫傷は認めなかった。上記吻側部での所見は各動物間で差違が認められたが、脳幹部での変化については共通の所見であった。

抗 68KD ニューロフィラメントは正常の

軸索を染色せず、軸索での染色性は軸索輸送障害を反映し軸索損傷の鋭敏なマーカーである。本抗体において上記変化はより部位特異的に示されたが、抗 200KD 抗体による形態変化に比べて鋭敏性には劣る印象を得た。

なお、上記の変化について脳幹部においては少なくとも4週後でも持続していた。

2. 青班核ノルアドレナリン神経細胞の形態変化

対照群での青班核 DBH 陽性細胞の細胞断面積を 100%としたときの各群での断面積は、1日後 $110 \pm 7.0\%$ 、2日後 $89.4 \pm 6.4\%$ 、7日後 $74.3 \pm 3.7\%$ 、14日後 $83.7 \pm 8.9\%$ 、28日後 $101 \pm 8.4\%$ 、56日後 $93.2 \pm 4.5\%$ であった。対照群と比し2日($p < 0.05$)、7日、14日後($p < 0.01$)において有意の減少を認めた。なお神経細胞数については各群間で有意差は認めず、神経細胞がいったん縮小したのち4週後にはもとの大きさに回復し細胞の脱落はないと結論できる。

青班核から大脳皮質、海馬などへの上行性のノルアドレナリン投射経路である dorsal catecholamine bundle ではニューロフィラメント染色で retraction ball などは明らかではないが、2日後の抗 DBH 染色で DBH 陽性繊維の腫大蛇行が確認された。

3. 青班核ノルアドレナリン神経細胞における GAP-43 mRNA 発現について

青班核においては対照群においても GAP-43 mRNA の発現が神経細胞に認められた。1週、2週後の標本において GAP-43 mRNA は定性的では有るが、明らかに対照群と比して発現増加が認められた。他の時点では、定量的評価を行っていないため断言はできないが対照群と差異はないように

思われた。

D. 考察

Marmaro の記載した 450g の 2m よりの落下、13mm ヘルメットでは頭蓋骨骨折、呼吸停止の遷延が認められ、安定したモデルの作成ができなかった。原因としては、彼らの用いた動物との系統の相違による頭蓋骨の硬さ、厚みなどに差が有ることや、マットレスのばね定数が異なる可能性などが考えられる。ヘルメットの改良、落下高さの短縮により組織学的にび慢性の軸索損傷所見を有する安定したモデルが作成できた。受傷外力、死亡率を考えれば、中等度から高度にかけての頭部外傷とみなすことができよう。Marmaro らは挿管人工呼吸下に実験を行うことにより死亡率は減じるとしているが、臨床的な背景を考えれば、受傷前より調節呼吸を受け得ることはなく、受傷直後の呼吸停止、低酸素などの条件がその後の病態に関係していると考えられ、本モデルでは浅麻酔自発呼吸下の実験とした。

本モデルではび慢性に軸索損傷が認められるが、本研究では青班核神経細胞に注目した。これは、臨床的に慢性期のび慢性脳損傷患者を観察した経験より、これらの患者では注意力が散漫であり自発性に乏しい印象を得ていたことによる。青班核ノルアドレナリン産生細胞は、中枢神経系でのノルアドレナリンの主たる起源であり、大脳皮質、海馬などをはじめ、脳全体に投射繊維を伸ばしている。青班核ニューロンには、以下の4つの重要な特徴がある。

- 1) 脳のほとんどの部位を支配し、しかも単一のニューロンが多数の側枝を出して異なる複数の脳部位へ同時に投射する。

- 2) 末梢からの恐らくすべての感覚入力を受ける。
- 3) 意識レベルが高いほど活動は活発であり、意識レベルの低下とともに活動は減弱し逆説睡眠で完全に消失する。
- 4) 可塑的变化をする能力が高い。

機能的には注意・学習・記憶などの高次神経機能と密接に関係する。実験的に脳内ノルアドレナリンを枯渇させることにより、注意力の低下や外的刺激に対する過剰反応や鈍麻、社会行動の変化などが生じることも確認されている。また、近年の研究では、青班核に BDNF mRNA が存在し神経終末に向かって順行性に輸送されているという報告も有る。各神経終末において神経回路網の形成、再構成に不覚関与している可能性が示唆されている。

本実験では青班核ノルアドレナリン神経細胞の断面積は、対照群と比し2日($p < 0.05$)、7日、14日後($p < 0.01$)において有意の減少を認めた。なお神経細胞数については各群間で有意差はなかった。面積の測定時には核を含めた大きさを測定しており、この核の大きさには通常変化がないことより、細胞体の縮小は本研究が示す数値を上回るものと考えられる。受傷外力が更に強い場合にはこのような回復がさらに遅延あるいは欠如することも十分に予想される。今後機能的意義を検証していく必要が有るが、神経終末の分布の広さから考えて、本実験系で認められた障害がび慢性軸索損傷の慢性期病態において重要な役割を占めている可能性が示唆され、今後の各種治療実験における一つの標的となり得ることが明らかとなった。

E. 結論

本研究により安定したラットび慢性軸索損傷モデルの作成が可能となった。び慢性の病態のなかで、青班核ノルアドレナリン神経細胞が継時的に縮小しその後回復することが示された。今後機能的意義を検証していくとともに、治療実験の標的として研究を進めていきたい。

F. 研究発表

1) 論文発表

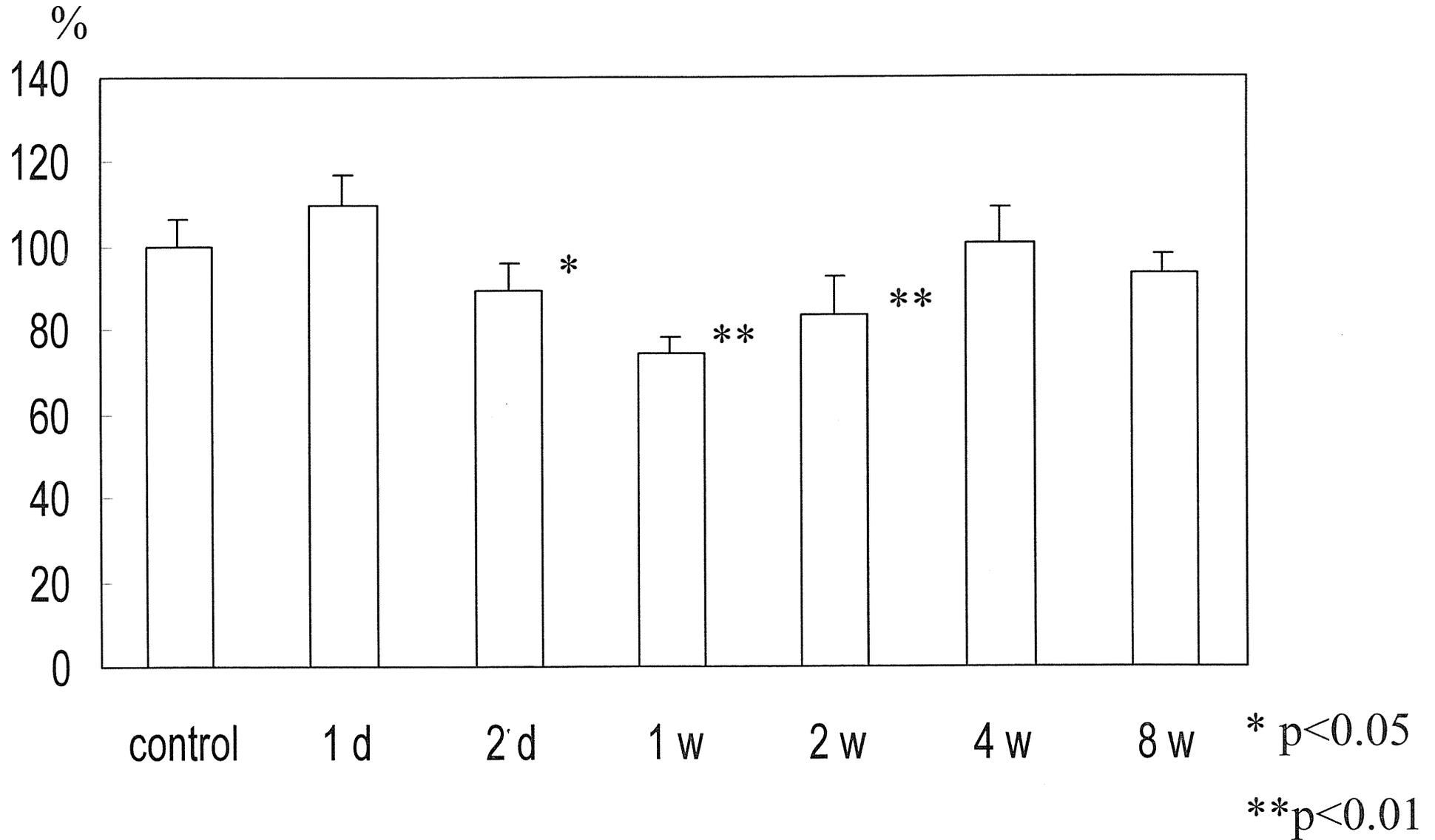
Fujinaka T, Kohmura E, Yuguchi T, Yoshimine T: Shrinkage of locus coeruleus neurons in diffuse brain injury model. *Advances in Neurotrauma Res* Vol.10, 1998 (in press)

2) 学会発表

藤中俊之、甲村英二、湯口貴導：び慢性脳損傷モデルにおける青班核の変化、第10回神経損傷の基礎シンポジウム、東京、1998

藤中俊之、甲村英二、湯口貴導：び慢性脳損傷モデルにおける中枢ノルアドレナリンニューロンの変化、第22回日本神経外傷学会、福岡、1999

Alteration of LC neurons in size



Shrinkage of locus coeruleus neurons in diffuse brain injury model

Toshiyuki Fujinaka, Eiji Kohmura, Takamichi Yuguchi, Toshiki Yoshimine

Department of Neurosurgery, Osaka University Medical School

Address correspondence to : Toshiyuki Fujinaka, M.D.
Department of Neurosurgery, Osaka University Medical School
2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, JAPAN
Tel: +81-6-6879-3652 Fax: +81-6-6879-3659

Introduction

It is generally known that central noradrenergic system is closely related to spontaneous motility and level of consciousness.^{1,8)}

Protracted disturbance of consciousness is one of major problems in patients with diffuse brain injury. However, the mechanism of disturbed consciousness in this type of injury is not fully understood.

In this study, morphological change of locus coeruleus (LC) neurons was examined in a diffuse brain injury model to understand the effect of the injury on the central noradrenergic system.

Materials and Methods

Diffuse Brain Injury Model

The diffuse brain injury model in rats developed by Marmarou et al.^{4,5)} was used with slight modifications. Sixty two adult male Sprague-Dawley rats weighing 450-500 g were anesthetized with chloral hydrate (300 mg/kg, i.p.) and placed in prone position on a foam bed with spontaneously breathing. Impact-acceleration brain injury was produced with weight-drop device. A brass weight (450 g) was dropped freely by gravity from a height of 1.5 m onto a metallic helmet fixed to the skull vertex of the rat. The rat was moved away immediately following initial impact to prevent a second impact and then observed for several minutes. The size of helmet disc was 20 mm in diameter and 1.5 mm thick. We have initially employed smaller helmet (10 mm in diameter) and 2 m weight drop as described in the original report.^{4,5)} It resulted in high mortality and frequent skull fracture. Therefore, we adopted 20 mm helmet and 1.5 m weight drop.

Brain Fixation and Immunohistochemistry

At 24 h, 48 h, 7 days and 14 days after injury, two animals each from the experimental and control groups were anesthetized and perfused intracardially with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1M phosphate buffer (PB). The brains were removed and postfixed with the same fixative for 24 h. After immersed in 30% sucrose in 0.01M phosphate buffered saline (PBS), the brains were embedded in Tissue-Tech and stored at -80°C. Fixed brains were sliced into 12 μ m serial coronal sections from 8 mm to 11 mm posterior to the bregma including LC on a freezing cryostat and processed for immunohistochemistry.

Immunohistochemistry was done for dopamine- β -hydroxylase and neurofilament. Sections were washed in PBS and permeabilized with acetone at -20°C for 10 minutes, and then incubated with 0.3% hydrogen peroxide for 30 minutes. After washes in PBS, blocking of nonspecific binding was achieved with 2% normal horse serum in buffer (0.1% Triton X-100 and 5% sucrose in PBS) for 20 minutes, and sections were finally incubated overnight at 4°C with primary antibodies (anti-neurofilament 68-kD mouse monoclonal antibody diluted 1:50, Boehringer Mannheim Biochemica, anti-dopamine- β -hydroxylase rabbit polyclonal antibody diluted 1:1000, Eugene Tech International). VECTASTAIN Elite ABC Kit (Universal) was appropriated to visualize immunolabeled structures according to the manufacturer's recommendation. The precipitate formed by DAB was enhanced with NiCl₂.

Measurement

Every fifth of serial coronal sections immunostained with anti-dopamine- β -hydroxylase (DBH) was assessed by using image analysis program (Scion Image). To evaluate the change of cellular size, cross sectional area of each stained neurons containing nucleus was measured. It was averaged throughout the sections and displayed as a percentage of control animals.

Result

Sixty two rats underwent diffuse brain injury, and immediate mortality was 19%. Post traumatic seizure was observed in 40 (63%) animals through the experiment and in 24 (48%) survivors. Recovery from anesthesia was protracted in injured animals compared with control animals. Spontaneous motility in the survivors was reduced immediately after recovery from anesthesia and was gradually improved in two weeks. Gross pathological observation showed subarachnoid and intraventricular hemorrhages commonly. No skull fracture nor contusion were observed in any animals. Immunohistochemistry for anti-neurofilament 68-kD showed extensive axonal injury particularly in the brain stem at one or two days after injury. (Fig.1)

LC neurons immunostained with DBH were increased by 15% in size at 24 h after injury and were decreased by 20% at 7 days. Number of LC neurons did not decrease significantly. Axons of LC neurons and dorsal catecholamine bundle, projecting pathway of noradrenergic neurons, were swollen at 24 and 48 h after injury and dwindled in 7 days. (Fig.2,3,4)

Discussion

Locus coeruleus is located in the tegmentum of the upper pons and consists mainly pigmented nerve cells which contain norepinephrine.^{1,8)} The noradrenergic pathways originating from LC influence neural activity in many regions.^{1,7,8)} In animal brain injury models, previous study indicated that central norepinephrine concentration was decreased and spontaneous activity of LC neurons is reduced.^{2,6)} On the other hand, it was reported that the biosynthesis of norepinephrine in LC might not be affected by experimental moderate brain injury.³⁾

The present study revealed alteration of LC neurons in size in a diffuse brain injury model. LC neurons were first increased in size at 24 h after injury and were decreased at 7 days after injury. Axons of noradrenergic neurons were swollen and then dwindled. These results suggest that focal impairment of axonal anterograde transport due to diffuse brain injury may cause the shrinkage of LC neurons and play important role in the pathophysiology. Further studies should be made about the relation between the effect of diffuse brain injury on the central noradrenergic system and complex brain functions such as cognition, learning, memory consolidation, attention and so on.

Acknowledgment

This work was supported by grant for Research on Brain Science from Ministry of Health and Welfare.

Reference

- 1) Amaral DG, Sinnamon HM (1977). The locus coeruleus neurobiology of a central noradrenergic nucleus. *Prog Neurobiol* 9, 147-196.
- 2) Arakawa S, Nakamura S, Kawashima N, et al (1995). Antagonizing effects of VA-045 on reduced activity of rat locus coeruleus neurons following head injury or intravenous injection of clonidine. *Life Sci* 57, 1803-1810.
- 3) Carbary T, Dhillon HS, Scheff SW, et al (1996). Immunohistochemistry of tyrosine and dopamine- β -hydroxylases after experimental brain injury in the rat. *Neurosci Res* 18, 79-85.
- 4) Foda MA, Marmarou A(1994). A new model of diffuse brain injury in rats, Part II: Morphological characterization. *J Neurosurg* 80, 301-313.
- 5) Marmarou A, Foda MA, Van Den Brink W, et al(1994). A new model of diffuse brain injury in rats, Part I: pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg* 80, 291-300.
- 6) Prasad MR, Ramaiah C, McIntosh TK, et al (1994). Regional levels of lactate and norepinephrine after experimental brain injury. *J Neurochem* 63, 1086-1094.
- 7) Swanson LW, Connelly MA, Hartman BK(1976). Ultrastructural evidence for central monoaminergic innervation in paraventricular nucleus of hypothalamus. *Brain Res* 136, 166-173.
- 8) Tomonaga M (1983). Neuropathology of the locus ceruleus: a semi-quantitative study. *J Neurol* 230, 231-240.

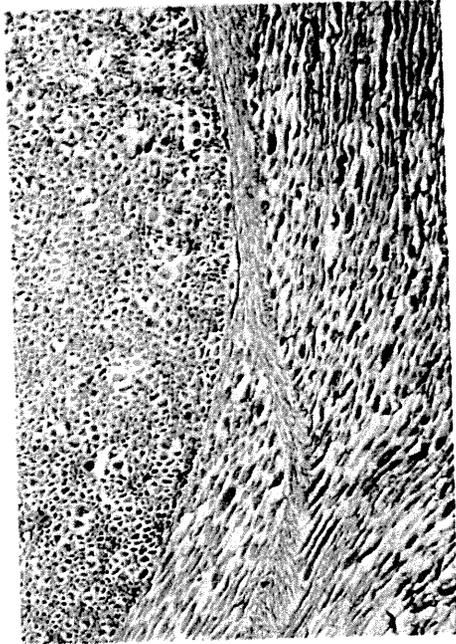
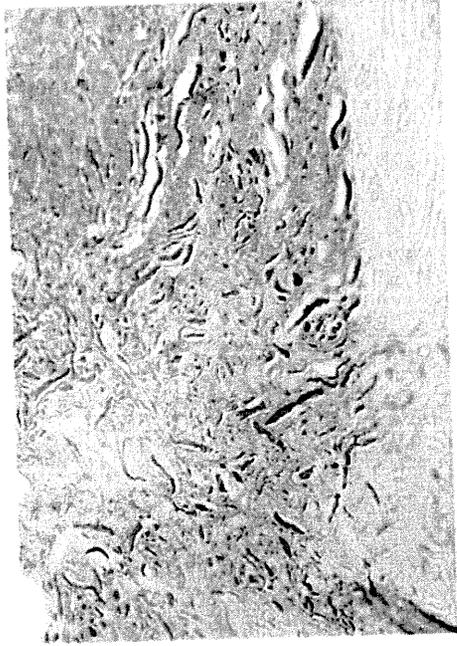
Figure legends

Fig.1. Photomicrographs of brain sections immunostained with anti-neurofilament 68-kD at 48 h after injury. Diffuse axonal swelling was observed in the reticular formation of upper pons (left), in the rubrospinal tract and trapezoid body (right).

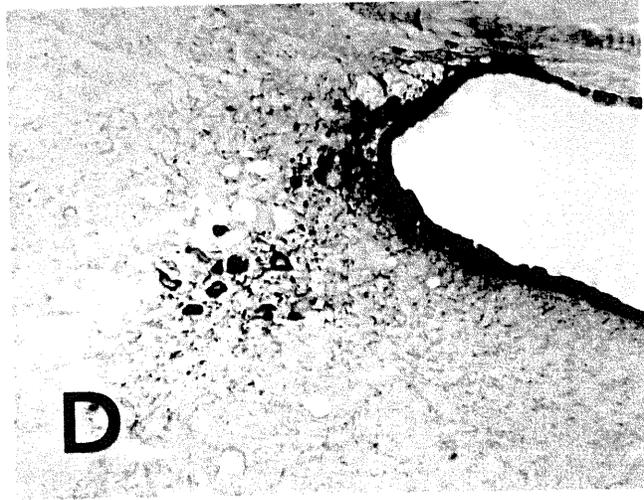
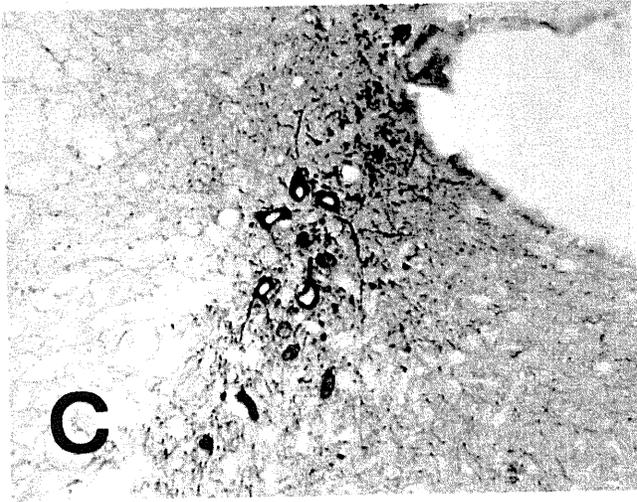
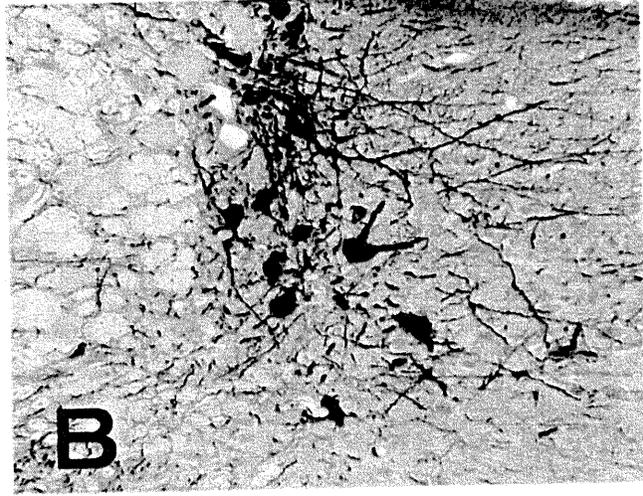
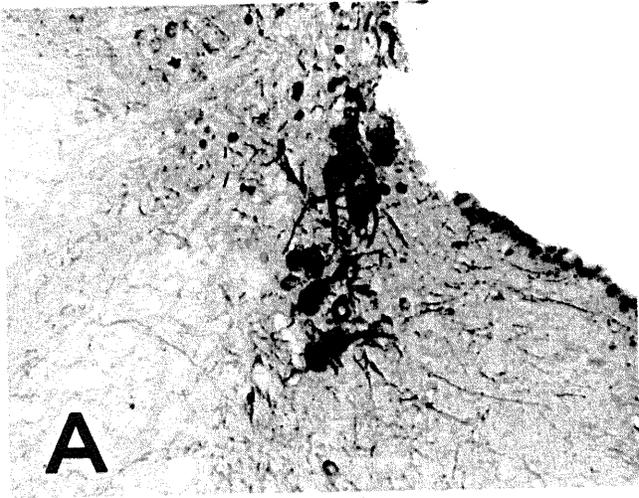
Fig.2. Photomicrographs of locus coeruleus (LC) immunostained with anti-dopamine- β -hydroxylase in control animal (A), 24 h after injury (B), 1 week after injury (C), 2 weeks after injury (D). Significant shrinkage of LC neurons was observed at 1 and 2 weeks after injury. Axons of LC neurons were swollen at 24 h after injury compared with those of control animals.

Fig.3. Photomicrographs of axons immunostained with anti-dopamine- β -hydroxylase in the dorsal catecholamine bundle. Axons were swollen at 24 h after injury (right) compared with those of control animals (left).

Fig.4. Cross sectional area of locus coeruleus neurons displayed as a percentage of control animals.



-甲村图1-



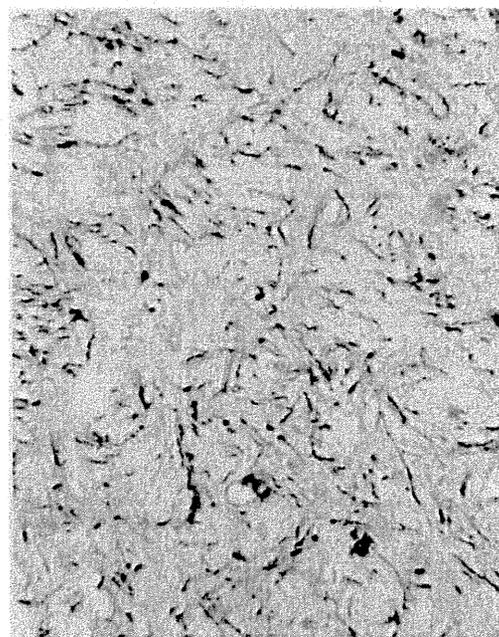
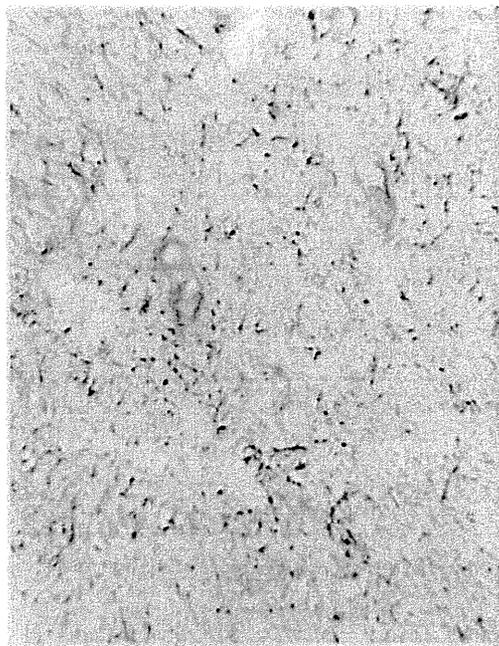
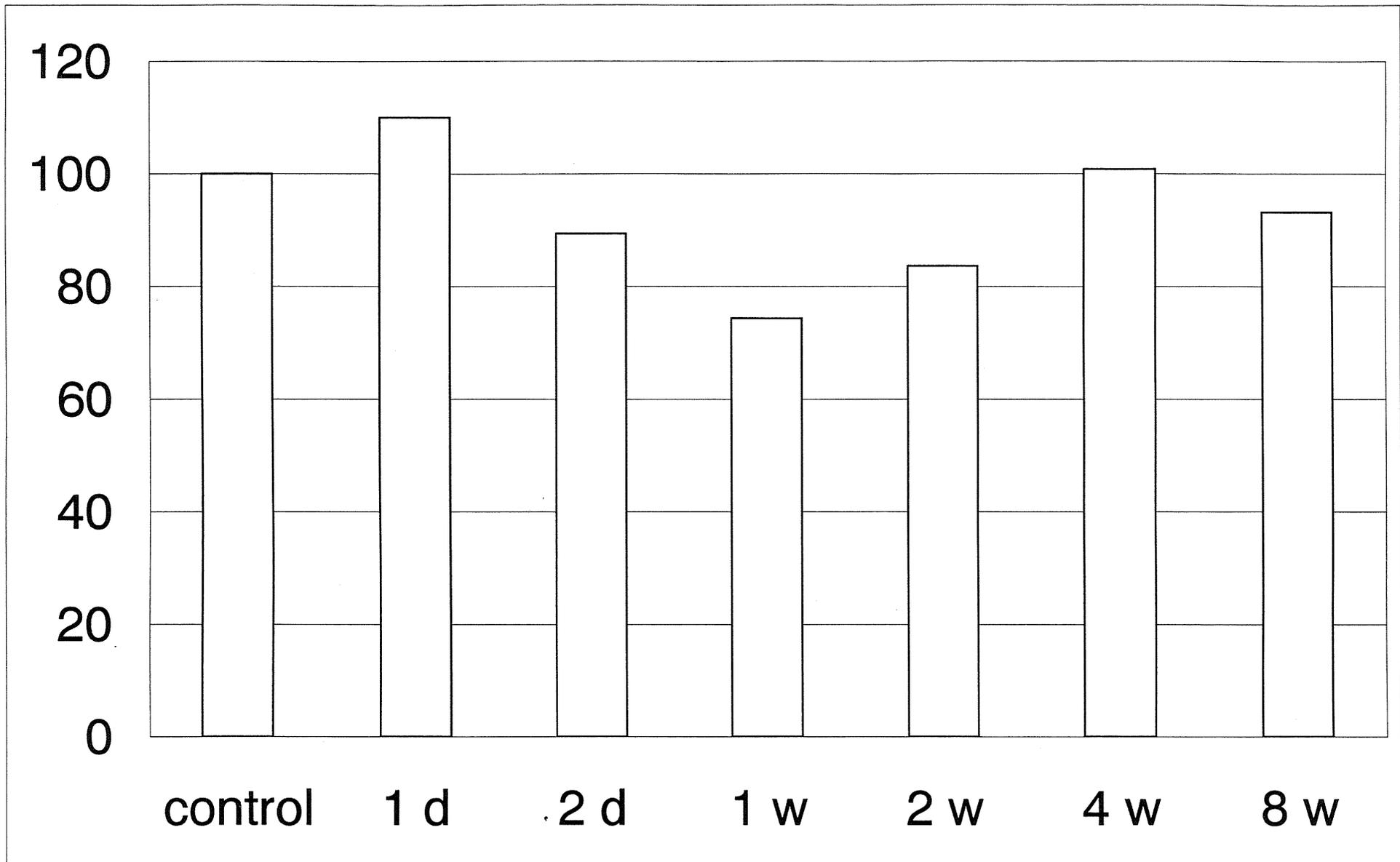


Fig 4



-甲村图4-

