

5:10であった。また、特発性正常圧水頭症患者54例中30例でV-P shunt後に症状の改善を認めた。V-P shunt後に1週間と1ヶ月以降に採取された脊髄液はそれぞれ25検体と23検体であった。

髄液中CNP濃度は、Kanekoらの方法に準じてSep-Pak C18 cartridgeにて髄液中のペプチドを抽出した後に、抗CNP抗体を用いたradioimmunoassay法にて定量した。

統計学的有意差の検定にはWilcoxon検定を用い、 $p < 0.01$ を統計学的有意差とした。順相関は相関係数 $R > 0.4$ 、 $p < 0.01$ を有意とした。

結果

A.

培養神経細胞は抗CNP抗体にて陽性、一方培養アストロサイトは陰性であった。培養アストロサイトはCNP添加後に抗cGMP抗体に陽性となった。すなわち、中枢神経におけるCNP産生・分泌細胞は神経細胞であり、その標的細胞はアストロサイトである事が明らかとなった(図1)。

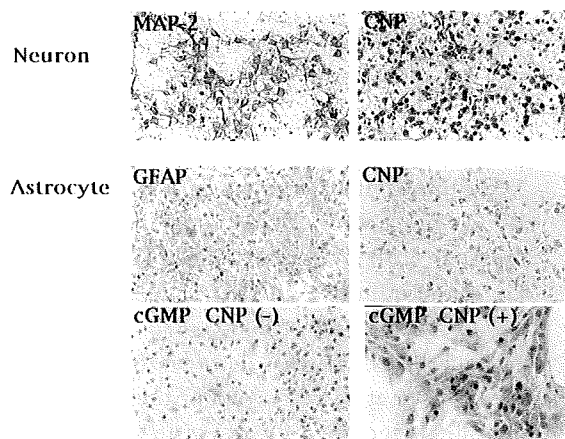


図1

神経細胞培養24時間後の培養液中CNP濃度は培養液中のナトリウム濃度が140mMにて最高値を示し、80mMで最低値を示した(図2)。すなわち、細胞外ナトリウム濃度が高くなるに

従い、培養液中のCNP濃度が高くなる傾向にあった。

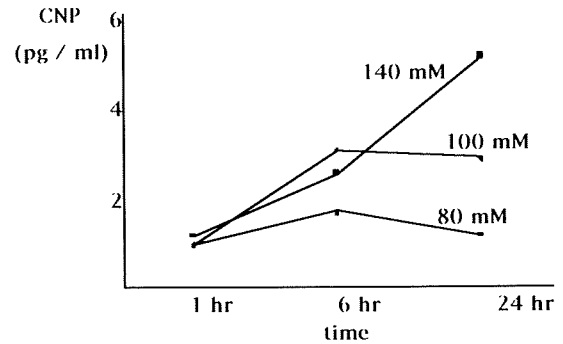


図2

B.

髄液中CNP濃度は、対照群: 4.31 ± 1.36 pg/ml、特発性正常圧水頭症患者: 7.83 ± 2.45 pg/mlであり、特発性正常圧水頭症患者のCNP濃度は対照群に比し統計学的有意($p < 0.0001$)に高値であった(図3)。特発性正常圧水頭症患者のうちshunt有効例のCNP濃度は 8.28 ± 2.53 pg/mlで、わずかに高い傾向にあったが、shunt無効例との間に統計学的有意差は認めなかった。

shunt後1週以内と1ヶ月以降の髄液中CNP濃度はそれぞれ 6.88 ± 1.85 pg/ml と 6.94 ± 1.75 pg/mlで、術前より低値である傾向であったが、統計学的有意差は認めなかった(図4)。

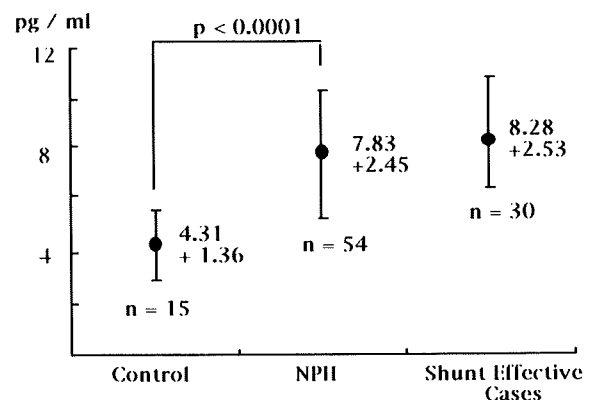


図3

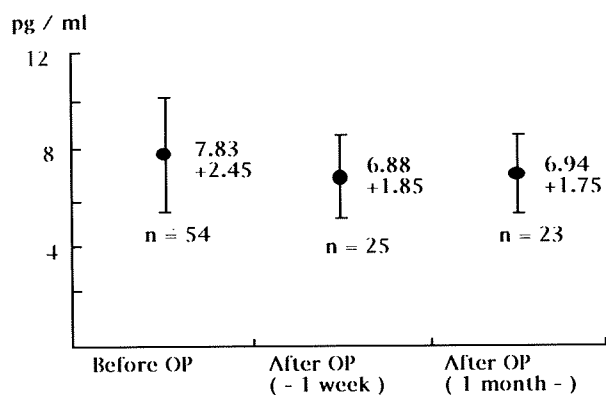


図 4

考察

Deschepper らは、脳の部位により CNP の効果の違いを明らかにした。すなわち、間脳由来の培養アストロサイトは、大脳皮質由来の培養アストロサイトに比べ、CNP 作用後の cGMP の産生能が 2 倍以上であると報告している³⁾。この事は間脳は大脳皮質に比べ、脳の水分電解質代謝に関与している事が推定される。

ナトリウム利尿ペプチドの生理機能として、最近 Kourie らはナトリウム利尿ペプチドの Ion transport のメカニズムについて言及している⁴⁾。ナトリウム利尿ペプチドはさまざまな Ion transport 蛋白のリン酸化に関与し、(a) calcium-activated K⁺ channels; (b) ATP-sensitive K⁺ channels; (c) inwardly-rectifying K⁺ channels; (d) outwardly-rectifying K⁺ channels; (e) L-type Ca²⁺ channels; (f) Cl⁻ channels; (g) Na⁺-K⁺2Cl⁻ co-transporter; (h) Na⁺-K⁺ATPase; (i) Na⁺ channels; (j) stretch-activated channels; (k) water channels を調節している。ATP-sensitive K⁺ channels と stretch-activated channels はナトリウム利尿ペプチドの分泌にも関与している事が明らかにされている。CNP の中枢神経系に対する生理作用として、Touyz らは CNP は cGMP を介して、アストロサイトの Na⁺/H⁺ exchanger を抑制する事を明らかにした⁵⁾。

今回の我々の実験結果と合わせ考察すると、CNP は神経細胞周囲の水分電解質の変化により、

神経細胞にて合成分泌され、標的細胞であるアストロサイトに作用して、水分電解質を調節している事が明らかになった。

Kaneko らは、ヒトの血中および髄液中の ANP, BNP, CNP 濃度をそれぞれの特異抗体を用いて測定し、ANP と BNP は主に血中に存在するのに対し髄液中には微量しか存在しない事、逆に CNP は髄液中に存在し、血液中にはほとんど存在しない事を報告した⁶⁾。今回我々の測定した対照群の髄液中 CNP 濃度は Kaneko らの報告した髄液中 CNP 濃度とほぼ等しい濃度であった。Tulassay らは水頭症患児の、福島はカオリン水頭症動物の髄液中の ANP 濃度を測定し、対照群に比べ水頭症群では髄液中の ANP 濃度は高値を示す事を報告した^{7,8)}。しかし、これらの報告は CNP が発見される以前の業績で、髄液中には ANP はごく微量にしか存在しない事、彼等の報告した対照群の髄液中 ANP 濃度は、Kaneko らの報告した髄液中 CNP 濃度とほぼ等しい事より、ANP の定量に使用した抗 ANP 抗体が CNP と交差反応を示していた可能性が示唆される。

今回の検索で、特発性正常圧水頭症において、髄液中 CNP 濃度は有意な上昇を認め、特発性正常圧水頭症の補助診断としても有用である事が明になった。しかし、髄液中 CNP 濃度は水頭症の治療の指標にはなるが、水頭症の重症度と治療後の臨床像の改善率との間には有意な相関は認めなかった。

文献

- 1) Sudoh T, Minamino N, Kanbawa K, Matsuo H: C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168:863-870.
- 2) Koller KJ, Lowe DG, Bennet GL, Minamino N, et al: Selective activation of the natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science* 1991; 252: 120-123.
- 3) Deschepper CF, Picard S: Effects of C-type natriuretic peptide on rat astrocytes: regional differences and characterization of receptors. *J Neurochem* 1994 ;62(5): 1974-1982.
- 4) Kourie JI, Rive MJ: Role of natriuretic peptides in ion transport mechanisms. *Med Res Rev* 1999 ; 19(1): 75-94
- 5) Touyz RM, Picard S, Schiffrin EL, Deschepper CE: Cyclic GMP inhibits a

pharmacologically distinct Na⁺/H⁺ exchanger variant in cultured rat astrocytes via an extracellular site of action. J Neurochem 1997;68(4): 1451-1461.

6) Kaneko T, Shirakami G, Nakao K, et al: C-type natriuretic peptide(CNP) is the major natriuretic peptide in human cerebrospinal fluid. Brain Res 1993;612:104-109.

7) Tulassay T, Khoor A, Bald M, et al: Cerebrospinal fluid concentrations of atrial natriuretic peptide in children. Acta Paediatr Hung 1990;30:201-207.

8) 福島庸行：犬カオリン水頭症における髄液中 Atrial Natriuretic Peptide および cyclic GMP の経時的変動 脳神経 1992;44:457-462.

図説明

1. MAP-2 免疫染色で陽性となる培養細胞は Neuron で、この培養細胞は CNP 陽性であった。一方 GFAP 免疫染色陽性培養細胞はアストロサイトで、この細胞は CNP 陰性であった。この細胞は 10⁻⁵M CNP 添加後に cGMP 陽性となった。
2. 神経細胞を培養液中ナトリウム濃度をそれぞれ 80mM、100mM、145mM で培養した。培養 24 時間後の培養液中 CNP 濃度は培養液中のナトリウム濃度が 140mM にて最高値を示し、80mM で最低値を示した。
3. 髄液中 CNP 濃度は、対照群: 4.31 ± 1.36 pg/ml、特発性正常圧水頭症患者: 7.83 ± 2.45 pg/ml、特発性正常圧水頭症患者のうち shunt 有効例の CNP 濃度は 8.28 ± 2.53 pg/ml であった。
4. shunt 後 1 週以内と 1 ヶ月以降の髄液中 CNP 濃度はそれぞれ 6.88 ± 1.85pg/ml と 6.94 ± 1.75pg/ml で、術前より低値である傾向であったが、統計学的有意差は認めなかった。

正常圧水頭症モデルとしての慢性脳血流低下砂ネズミ

工藤 喬¹⁾、車谷隆宏¹⁾、美馬達夫²⁾、武田雅俊¹⁾

I. はじめに

正常圧水頭症 (NPD) は歩行障害、痴呆、尿失禁を3徴候とし、*treatable dementia* のひとつと考えられているが、その病態生理については不明である。この背景には、確立された動物モデルが存在しないことも一因と考えられる。これまで、先天性水頭症をきたした動物や化学物質を投与し水頭症をおこさせた動物などがモデルとして使用されてきたが、実際の病態とかなりかけ離れている感否めない。NPDの病態機序として脳実質の循環不全が起因となるという仮説がある。我々は、以前より砂ネズミを用いて特殊なクリップにて総頸動脈に狭窄を加え、慢性的に脳血流を低下せしめる動物の作成に成功している。本モデル動物については、これまでいくつかの知見が集積されている^{1,2,3)}。異なるいくつかの方法により、脳血流が低下していることが示されており、水素クリアランス法では大脳皮質局所脳血流量が正常対照群の約75%に低下していることが示されている。このモデル動物の行動については、ステップダウン方式受動回避反応課題に対する学習獲得の障害が示されている。神経伝達物質の変化としては、高速液体クロマトグラフィーを用いた脳内モノアミン定量により前部大脳と後部大脳皮質におけるドーパミンの有意な低下が認められている。神経病理学的には、大脳皮質におけるニューロフィラメントH蛋白やグリア線維性酸性蛋白の染色性増加と微小管不随蛋白であるMAPの染色性低下が認められており、慢性脳血流低下状態により神経細胞の脱落を惹起しない部位での細胞骨格蛋白の変化が示唆されている。また、本モデル動物の特徴的な病変として脳室拡大と白質粗鬆化などの白質変化を主体とする病変が高頻度に出現することが明らかにされている。本研究では、この脳室の拡大と白質の粗鬆化といったNPDに似た変化に注目し、このモデルの白質病変の形成過程を検討し、NPHモデルとしての妥当性について検討した。

II. 方法

慢性脳血流低下モデル動物の作成

成熟砂ネズミ (11週齢、雌、体重60-80 g、日本S L C社) の片側総頸動脈をペントバルビタール

(70 mg/kg) 麻酔下に露出し、直径0.1mmのステンレス・ワイヤを内径0.2-0.3mm、1ピッチ0.5mm、全長2.5mmに加工したコイル状クリップを装着した。1週間後に他側の総頸動脈にも同様の手技によりコイル状クリップを装着した。両側の総頸動脈にコイル状クリップを装着した砂ネズミを温度・湿度を一定にした環境にて12時間の明暗周期のもとで飼育した。飲水・食餌は自由に与えた。このような条件で一定期間飼育した動物を慢性脳血流低下群として。一方、同様の麻酔下でコイル状クリップを総頸動脈に触れる操作だけの偽手術を行ったものを対象群とした。実験群と対象群について、1週、2週、1カ月、及び2カ月後に実験を行った。

脳ホモジェネートの作製

断頭直後に氷冷下で脳を摘出し、白質を切り出した後、4倍容のホモジェネートバッファー (0.2mM phenyl-methylsulphonsulphate/1mM EDTA/1mM EGTA/10mM Tris buffer (pH7.2)) を加えてホモジェネイター (Masuda/HS 90) にて作製した。

ELISA

対照群 (N=12)、1週群 (N=10)、2週群 (N=12)、1カ月群 (N=13)、および、2カ月群 (N=15) の計5群について、白質ホモジェネート中のMBP、NFHをELISAにより測定した。dilution buffer (1% normal goat serum/0.2% Tween-20/10 μ M leupeptine/2 μ g/ml aprotinin/1 μ g/ml pepstain A) により総蛋白濃度を0.02 μ g/ μ lとなるように希釈した白質の各ホモジェネートを試料とし、マイクロタイタープレート (Nunc社/Maxisorp) 上にて、モノクロナル抗MBP抗体を固相化抗体 (100 μ l/ウエル)、ポリクロナル抗MBP抗体 (DAKO社; 100 μ l/ウエル) を第1抗体とし、第2抗体にはアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギIgG (100 μ l/ウエル) を用いたサンドウィッチ法により定量した。ウエルの洗浄には washing buffer (0.02% Tween-20/100mM Tris-HCL buffer (pH7.6)) を用い、発色は p-nitrophenyl phosphate (Sigma社; 100 μ l/ウエル) で行った。Corona/MTP-120により各ウエルの吸光度を計測した。NFHの測定は白質ホモジェネートを総蛋白濃度を0.5 μ g/ μ lとなるように希釈し、モノクロナル抗NFH抗体、ポリクロナル抗NFH抗体 (Chemicon社) を用い、その他はMBPのELISA系に準じた。

大阪大学大学院医学系研究科生体統合医学神経機能医学講座¹⁾、高知医科大学脳神経外科²⁾

Key Words: 正常圧水頭症、白質障害、脳虚血、ピンスワングー病

Ⅲ. 結果

ELISA法によりMBPとNFH量の検討

脳血流低下1週、2週、1ヶ月、2ヶ月の各群について対照群と比較したMBP量の変化を示す。脳血流低下群のMBP量は脳血流低下1週から既に減少傾向を示し、1ヶ月では有意に減少していた。これに対して脳血流低下群のNFH量は脳血流低下状態で1週、2週では全く減少傾向を示さず、脳血流低下2ヶ月で初めて有意な減少を示した。脳血流低下群におけるMBPとNFHの経時的变化を比較すると、MBP量の減少がNFH量の減少に先行することが明らかになった (Figure 1)。

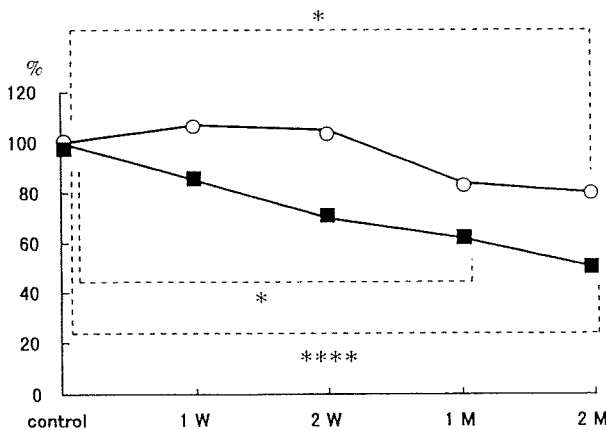


Figure 1. Time course of the changes in MBP and NFH levels under chronic cerebral hypoperfusion. The levels of MBP and NFH in the white matter homogenates from a control and four experimental groups (1-week [n=12], 2-week [n=10], 1-month [n=12], and 2-month groups [n=15]) were measured with a newly developed ELISA system. The relative levels compared with that of the control group are indicated. The MBP level was significantly reduced in the 1-month and 2-month groups, while the NFH level significantly decreased only in the 2-month group. ○ indicates NFH; ■, MBP. * $P < 0.01$, **** $P < 0.05$.

Ⅳ. 考察

進行性に脳室拡大を来す本モデルは、臨床に近いNPH動物モデルと考えられる。本モデルに特徴的な変化は、灰白質ではなくむしろ白質に認められた。これまでの本モデル動物についての神経病理学的な検討でもクリップ装着後8週間で白質の変化が増加することが示されている³⁾。本研究では、このような血流低下状態の持続と共に増加する白質病変の形成機序について検討し、脳室拡大との関連を検討した。

MBPは神経軸索のミエリン鞘を構成する主要な蛋白であり、オリゴデンドロサイトにより産生される。従って今回の結果の原因として、血流低下の持続が何らかの理由でオリゴデンドロサイトのMBP産生量を低下させることが考え得る。オリゴデンドロサイトはストレスに対して脆弱であるという幾つかの報告^{4,5,6)}があり、また血流低下状態によっても他の神経関連細胞と比較して障害を受けやすいことが指摘されている^{7,8)}。本モデル動物における脳血流低下の程度は、神経細胞に対しては広範

な細胞脱落を惹起しないが、オリゴデンドロサイトには広範な障害を与え、MBPの産生が低下している可能性が考えられる。実際低酸素状態における培養オリゴデンドロサイトでは可逆的なMBP産生低下が報告されている⁹⁾。また、MBPが減少する機構としては蛋白代謝の亢進、あるいは、病的課程によるMBPの分解の可能性も考慮しなければならない。虚血状態においてカルシウム依存性の酵素の活性化^{10,11,12,13)}が知られており、本モデル動物においても類似のメカニズムによってMBPの分解が亢進した可能性が考えられる。脳虚血状態、軸索の損傷、脱髄疾患などでは、障害によって活性化されたミクログリアが細胞障害性の酸素や窒素中間代謝物を放出することが報告されている¹⁴⁾。一過性脳虚血においては、再環流後の酵素フリーラジカルによって多価不飽和脂肪酸が酸化を受けることによりミエリンの障害が起こされる可能性が指摘されているため^{15,16,17)}、本モデル動物におけるMBPの障害にフリーラジカルが関与する可能性をあげることができる。

神経軸索の主要蛋白であるNFHについて検討した結果、クリップ装着2ヶ月後のモデル動物では約80%に減少していた。さらに、ELISA法による経時的な検討から、脳血流低下状態の持続によりNFHが減少することが明らかになった。今回の検討では、MBP量は1ヶ月で有意に減少したのに対し、NFHは2ヶ月で初めて有意に減少しており、MBPの減少がまず起こり、それに引き続いてNFHの減少が認められた。このことから、慢性脳血流低下状態下では先ずより脆弱であるオリゴデンドロサイトの障害が生じ、それに引き続きニューロフィラメントの障害が生じている可能性が考えられる。末梢神経ではミエリン鞘がニューロフィラメントやそのほかの基質のリン酸化調節を通じて神経軸索の構造と機能に直接関与していることを示す報告がある¹⁸⁾。ニューロフィラメントのリン酸化はニューロフィラメントの重合・脱重合、あるいは、他の細胞骨格繊維や膜との相互作用に影響を及ぼす。軸索内に配列するニューロフィラメントはリン酸化レベルの変動により容易に脱重合し軸索輸送により軸索内から排除される。このような事実を考えあわせると、ミエリン鞘の障害により神経軸索が2次的に障害されるためにNFHが減少しているものと考えることができよう。

近年、NPHの病因は単なる脳脊髄液の循環不全ばかりでなく脳実質の循環不全によるもの考え方があり、ピンズワングー病との類似性が示唆されている。本動物モデルの結果から、NPHの脳室拡大の機序を考えると、まず実質の循環不全が、白質のミエリンに障害を起こし、それは軸索の神経細胞障害を起こす。このようにして障害を受けた白質は弾性をなくし、脳室の脳脊髄液のパルス波を吸収できなくなり、脳室の拡大を引き起こす。この

拡大でますます白質に圧力がかかり、白質障害が助長され、悪循環となり、NPHとなると考えられる。

文献

- 1) Kudo T, Tada K, Takeda M et al: Learning impairment and microtubule-associated protein 2 decrease in gerbils under chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* 21:1205-9(1990)
- 2) Kudo T, Takeda M, Nishimura T et al: Neuropathologic changes in the gerbil brain after chronic hypoperfusion. *Stroke* 24:259-65(1993)
- 3) Hattori H, Takeda M, Kudo T et al: Cumulative white matter changes in the gerbil brain under chronic cerebral hypoperfusion. *Acta Neuropathol Berl* 84:432-42(1992)
- 4) Feigin I, Popoff N: Neuropathological changes late in cerebral edema: the relationship to trauma, hypertensive disease and Binswanger's encephalopathy. *J Neuropath Exp Neurol* 22:500-11(1963)
- 5) Sluga E: Observations on the white matter in human brain edema. In *Brain edema*, ed. by Klatzo I et al., pp223-39, Springer, Berlin-heidelberg-NY(1967)
- 6) Watanabe I, Tomita T, Rengachary S: Vacuolations of oligodendroglia in neoplastic perifocal edema. *Acta Neuropathol Berl* 35:1-12(1976)
- 7) Hirano A, Levine S, Zimmerman HM: Experimental cyanide encephalopathy: electron microscopic observations of early lesions in white matter. *J Neuropathol Exp Neurol* 26:200-213(1968)
- 8) Kennedy PG: Postmortem survival characteristics of rat glial cells in culture. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 50:798-800(1987)
- 9) Qi Y, Dawson G: Hypoxia induces synthesis of a novel 22-K Da protein in neonatal rat oligodendrocytes. *J Neurochem* 59:1709-16(1992)
- 10) Bazan NG: Arachidonic acid in the modulation of excitable membrane function and at the onset of brain damage. *Ann NY Acad Sci* 559:1-16(1989)
- 11) Choi DW: Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11:465-9(1988)
- 12) Farooqui AA, Horrocks LA: Excitatory amino acid receptors, neural membrane phospholipid metabolism and neurological disorders. *Brain Res Rev* 88:91-105(1991)
- 13) Seubert P, Lynch G: Plasticity to pathology: brain calpains as modifiers of synaptic structure. In *Intracellular calcium-dependent proteolysis*, ed. by Mellgren RL, Murache T, pp251-63, Boca Raton, FL: CRC(1990)
- 14) Banati RB, Gehrmann J, Schubert P et al: Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7:111-8(1993)
- 15) Konat GW, Wiggins RC: Effect of reactive oxygen species on myelin membrane proteins. *J Neurochem* 45:1113-8(1985)
- 16) McCord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312:159-63
- 17) Mickel HS, Kempinski O, Feuerstein G et al: Prominent white matter lesions develop in Mongolian gerbils treated with 100% normobaric oxygen after global brain ischemia. *Acta Neuropathol* 79:465-72(1990)
- 18) de Waegh SM, Lee VMY, Brady ST: Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cell. *Cell* 68:451-63(1992)

ABSTRACT

The animal model with cerebro-hypoperfusion as hydrocephalus model

Takashi Kudo*, Takahiro Kurumatani*, Tatsuo Mima**, Masatoshi Takeda*

Department of Clinical Neuroscience, Osaka University, Graduate School of Medicine*

Department of Neurosurgery, Kochi Medical School**

An animal model for normal pressure hydrocephalus (NPH) is essential to understand its pathophysiology. We developed an animal model of chronic cerebral hypoperfusion with coiled clips applied to both carotid arteries of adult Mongolian gerbils for between 1 week and 2 months. In the brain of this animal model, rarefaction of white matter with dilatation of the ventricles was frequently observed. To better understand the mechanism of white matter alteration under cerebral hypoperfusion, the chronological sequence of molecular changes in the cerebral white matter of the animal model was determined. Specially designed coiled clips were placed around both carotid arteries of

Mongolian gerbils to create stenosis without occlusion. Changes in levels of myelin basic protein(MBP)as a marker of myelin, Neurofilament H(NFH)as a marker of axonal proteins, and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in astroglia after 2 months of cerebral hypoperfusion were analyzed with Western blotting and enzyme-linked immunosorbent assay. The time course of MBP and NFH changes determined with enzyme-linked immunosorbent assay revealed that the change of MBP preceded that of NFH. In the present study it was shown that the damage to myelin precedes that to the axon in the white matter in a chronic cerebral hypoperfusion animal model, suggesting that the change in myelin is the primary pathological event in the cerebral white matter under chronic hypoperfusion. The present study may help in understanding the mechanisms of white matter pathology in NPH .

Key Words; normal pressure hydrocephalus, White matter lesion, Brain ischemia

慢性脳血流低下砂ネズミモデルに於ける脳微小血管の変化

大河原重雄*、益子敏弘*、工藤喬**、美馬達夫***、
森惟明***、間藤方雄*、****

I 緒言

脳血管性痴呆は出血性あるいは虚血性病変により生じた神経組織病変に起因する痴呆症で、最近の画像診断技術の進歩により、脳血流量の測定が容易となり、その病態が徐々に明らかとされつつある。

脳血管性痴呆の詳細な病態解明のためには、適切な動物モデルが不可欠で、最近、工藤等は砂ネズミの両側総頸動脈にコイル状のクリップを装着し、総頸動脈の狭窄を生じさせ、慢性脳血流低下モデル動物を作製した。クリップを装着後、一定期間後には脳皮質局所血流量が低下、学習能の低下、脳内モノアミン代謝の変化が観察された。更に神経病理学的には脳室の拡大、白質の粗鬆化、皮質の萎縮が認められ、それと同時に微小管関連蛋白、ニューロフィラメントH、グリア線維酸性蛋白の低下が観察されている¹⁾。しかし、今まで、このモデル動物脳に分布する微小血管系に関する研究は見当たらない。

脳実質に分布する細動脈は一層の内皮細胞とその外側に位置する1~2層の血管平滑筋細胞からなり、更に同領域に於ける、Virchow Robin腔には、中枢神経系に特異なマクロファージ系細胞である蛍光性顆粒周囲細胞(Fluorescent Granular Perithelial: FGP Cell: MATO)が常在し、同細胞は血管腔側からの、或いは神経組織側からの余剰物質を処理し、血管壁・神経組織の恒常性の維持に努めている細胞で、生理的条件下における脳実質内の唯一のスカベンジャー細胞である²⁾。

本研究は、工藤等の方法により、砂ネズミの両側総頸

動脈にコイル状クリップを装着し、総頸動脈の狭窄により慢性脳血流低下が生じた時、FGP細胞を含む脳細動脈に如何なる形態学的変化が引き起こされるかを検討したものである。

II 材料と方法

ペントバルビタール麻酔下に、成熟砂ネズミ(雄、体重60~50g)の片側総頸動脈を露出し、コイル状クリップ(直径0.1mmのステンレスワイヤーを内径0.2~0.3mm、1ピッチ0.5mm、全長2.5mmに加工したもの)を装着した。1週間後に他側の総頸動脈にも同様の手技でコイル状クリップを装着し、8週後に動物を固定した。

実験群3匹、対照群3匹を3群に分けた。1群はエーテル麻酔下に心臓から冷生理食塩水を灌流後、直ちに燐酸緩衝液でpH7.4に調整した2%パラフォルムアルデヒドと2.5%グルタルアルデヒドの混合液を灌流し、脳を摘出後、厚さ約1mmの前額断標本を作製し、実体顕微鏡下で観察後、同固定液で更に10時間固定し、光顕、電顕標本を作製した。2群は灌流固定2時間前に大腿静脈から0.3mlの生理食塩水に10mgの割合でHRP(horse radish peroxidase, Type IV, Sigma Chemical Co.)を溶解した液を投与し、上記と同様の方法で灌流固定をした。脳を摘出後、前額断標本を作製し、更に4時間固定した後、燐酸緩衝液に移し、厚さ約70 μ mのピプラトーム切片を作製し、ジアミノベンチジン法によりHRPを発色した。一部の標本をスライドガラスに貼付し、脱水後光顕で観察した。3群は冷生理食塩水を心臓から灌流後、直ちに脳を摘出し、海馬を含む前額断標本の一部は上記固定液で浸漬固定を行った。前方部の脳皮質はくも膜を剥離後、細切し、MatoとOokawaraの方法³⁾により伸展標本を作製した。伸展標本は扇風機で十分に乾燥後、56 $^{\circ}$ C、5分間或いは42 $^{\circ}$ C、3分間パラフォルムアルデヒドガスにより

自治医科大学解剖学講座*

大阪大学大学院・生体統合医学神経機能医学講座**

高知医科大学脳神経外科学講座***

国際医療福祉大学・保健学部****

Key Words: 慢性脳血流低下モデル、スナネズミ、
FGP細胞(Mato)、NPH、Binswanger病

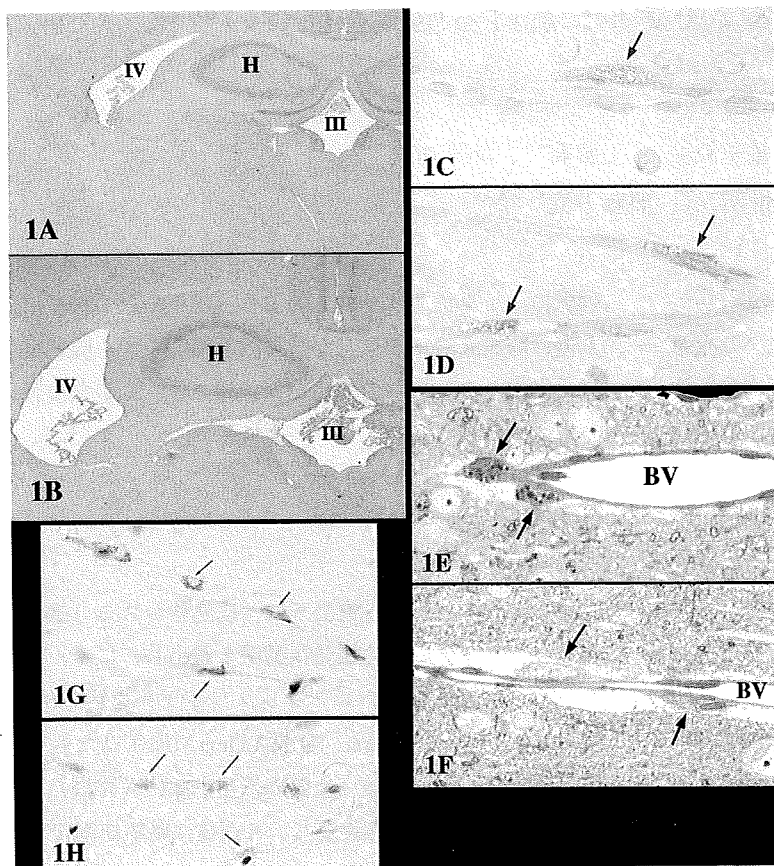


図1. A,B: 脳前額断のヘマトキシリン・エオジン染色。対照群(A)と実験群(B)を比較すると第三脳室(III)と側脳室(IV)の拡張が実験群に於いて認められる。C,D: 伸展標本のPAS染色。対照群(C)ではFGP細胞(矢印)のPAS反応性が、実験群(D)に比し弱い。E,F: エボン包埋トルイジンブルー染色標本。対照群(E)の血管壁は明瞭であり、付属するFGP細胞(矢印)の細胞内顆粒は明瞭に観察されるのに対し、実験群(F)では血管壁は薄く、FGP細胞も淡い染色性を呈する。G,H: HRPの静脈内投与実験。対照群(G)ではHRPを良く取り込み、細血管に沿ってFGP細胞(矢印)が観察される。実験群(H)ではHRPの取り込みが弱い。

固定した。

1群の一部の標本はアルコール系列で脱水後、パラフィンに包埋し、薄切後、3群の伸展標本と同様、HE染色、PAS反応を行い、光顕で観察した。1, 2, 3群の一部の標本は、オスミウム酸で後固定の後、アルコール系列で脱水し、エボンに包埋した。超薄切片を酢酸ウランと水酸化鉛で電子染色を行った後、JEM-2000EX型電子顕微鏡で観察した。

Ⅲ. 結果

1) 光学顕微鏡による観察

パラフィン切片にH-E染色を施し概観を観察すると、実験群では対照群に比し、第三脳室・側脳室の拡大が観察された(図1A, 1B)。また、実験群に於いて白質の粗鬆化が観察され、海馬に於いては、歯状回、CA1領域の神経細胞が変性に陥り、神経細胞の脱落が認められた。

PAS反応でFGP細胞を観察すると、対照群のFGP細胞は一般的にPAS反応が弱かったのに対し、実験群では強

いPAS反応が観察された(図1C,1D)。エボン包埋厚切り切片をトルイジンブルー染色で観察すると、対照群では血管壁は比較的厚く、血管内腔は良く保たれていた。血管壁に接するFGP細胞はやや円形で、細胞質内にはトルイジンブルーで染色される大小の円形顆粒を含み、その外側は淡い染色性を示す星状膠細胞で裏打ちされていた。神経細胞を含む周辺組織の配列は密であった(図1E)。実験群では血管内腔は狭小化し、血管壁は非薄化しているものが多かった。実験群に於けるFGP細胞では対照群で観察された細胞内顆粒は観察されず、細胞質内は淡い不定形物質で満たされている場合が多かった。血管周囲組織は拡大し、神経組織の染色性は著しく低下し、神経組織間には多数の小空隙が観察された(図1F)。

HRPを静脈内に投与し、DAB反応を施した例に於いては、対照群のFGP細胞はDAB反応陽性顆粒を多数含んでいるのに対し(図1G)、実験群のFGP細胞ではHRPの反応産物は少なかった(図1H)。

2) 電子顕微鏡による観察

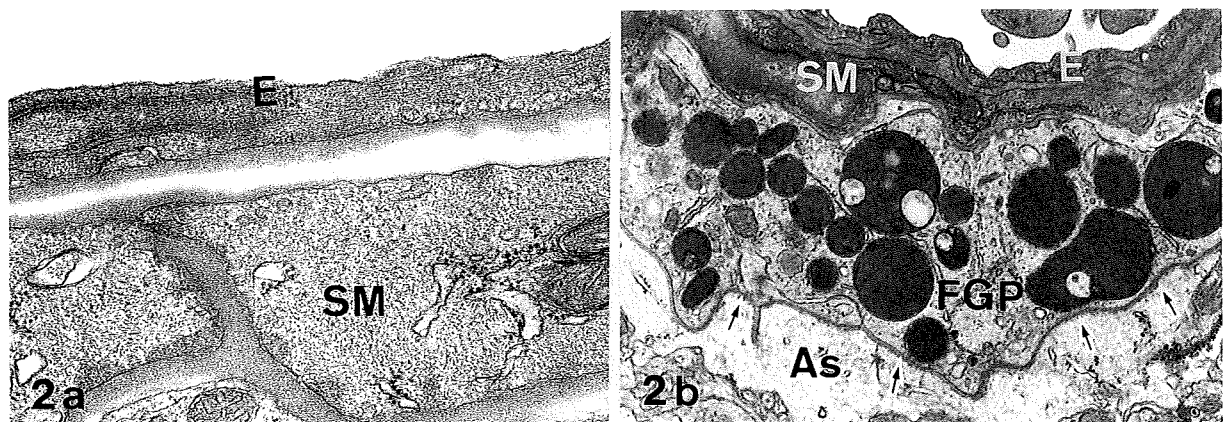


図2. 対照群の血管壁(a)とFGP細胞(b)の電子顕微鏡写真。内皮細胞(E)は扁平で基底膜に裏打ちされている。血管平滑筋細胞には豊富な筋原線維が認められる。FGP細胞

は電子密度の高い大小の円形顆粒を多数含んでいる。グリカリア境界膜(矢印)は明らかである。As;星状膠細胞。

対照群に於ける脳皮質微小血管壁はtight junctionで連なる一層の内皮細胞とそれを裏打ちする基底膜および平滑筋細胞層とから成り立っていた。内皮細胞は扁平で内腔に向かって時に細胞質突起を出すのが概ね平滑で飲小胞は殆ど観察されない。クリスタが明瞭で比較的大型のミトコンドリア、細線維状構造物、遊離リボソーム等が観察された。平滑筋細胞は紡錘形で筋原線維に富んでいた。細胞周囲は基底膜で被われていた(図2A, B)。Virchow Robin腔にはFGP細胞が観察された。FGP細胞は紡錘形からやや円形を呈し、核周辺クロマチンに富んだ核を有していた。FGP細胞内に特異な細胞内顆粒は様々な形状を呈していた。即ち、大型電子密度が高い円形顆粒、大型で顆粒内に電子密度が低い小空胞を含む顆粒、小型の円形乃至楕円形顆粒等が含まれていた。また、時に空胞状の液胞が認められる場合もあった。その他少量のミトコンドリア、滑面・粗面小胞体、飲小胞が観察された(図2B)。グリカリア境界膜を挟んで星状膠細胞が位置するが、同細胞の電子密度は低く、少量のアストロファイバーが認められた。

実験群に於けるはその障害の程度が動物により異なっていた。障害の程度が著しい動物の内皮細胞では電子密度は低下し、管腔側の細胞膜は波状を呈し、その二重膜構造が不明瞭となっていた。また内皮細胞の基底側には多数の飲小胞が観察された。内皮下腔は拡大し電子密度の高い物質で満たされていた。この様な細血管に付属する平滑筋細胞は電子密度が低下し、筋原線維が殆ど認め

られなかった。グリコーゲン顆粒が増加していた(図3A)。障害の程度が軽度の動物に於けるは、内皮細胞は扁平で、その細胞内小器官の分布は対照動物のそれと比較的類似していた。平滑筋細胞はやや変形し、一見多層化している様に観察されたが、平滑筋細胞内の筋原線維は対照に比し粗で、数も減少していた。細胞間隙はやや拡大していた。この様な細動脈に付属するFGP細胞は、細胞質の電子密度の低下と共に、細胞内顆粒の電子密度が低下し液胞状に観察され、顆粒は互いに癒合する傾向があった(図3B)。クリスタが明瞭なミトコンドリア、少数の飲小胞が含まれていた。また、ある場合にはゴルジ装置が発達し、ゴルジ小胞が増加している例も散見された。星状膠細胞のグリカリア境界膜は概ね明瞭であるが、時に著しく乱れている部位も観察された。星状膠細胞は一般に明るくミトコンドリア、アストロファイバーを含んでいた。

障害が著しい例に於けるFGP細胞は、顆粒の電子密度は著しく低下し、かつ互いに癒合し、細胞質の大部分を占めていた(図3C)。FGP細胞と星状膠細胞の間隙は狭くなり、グリカリア境界膜は不鮮明となり、星状膠細胞との境界が不明瞭となっていた(図3D)。また、星状膠細胞の位置に細胞質の電子密度が著しく上昇したミクログリアと思われる細胞が密接していることもあった。星状膠細胞はその電子密度が著しく低下していた。

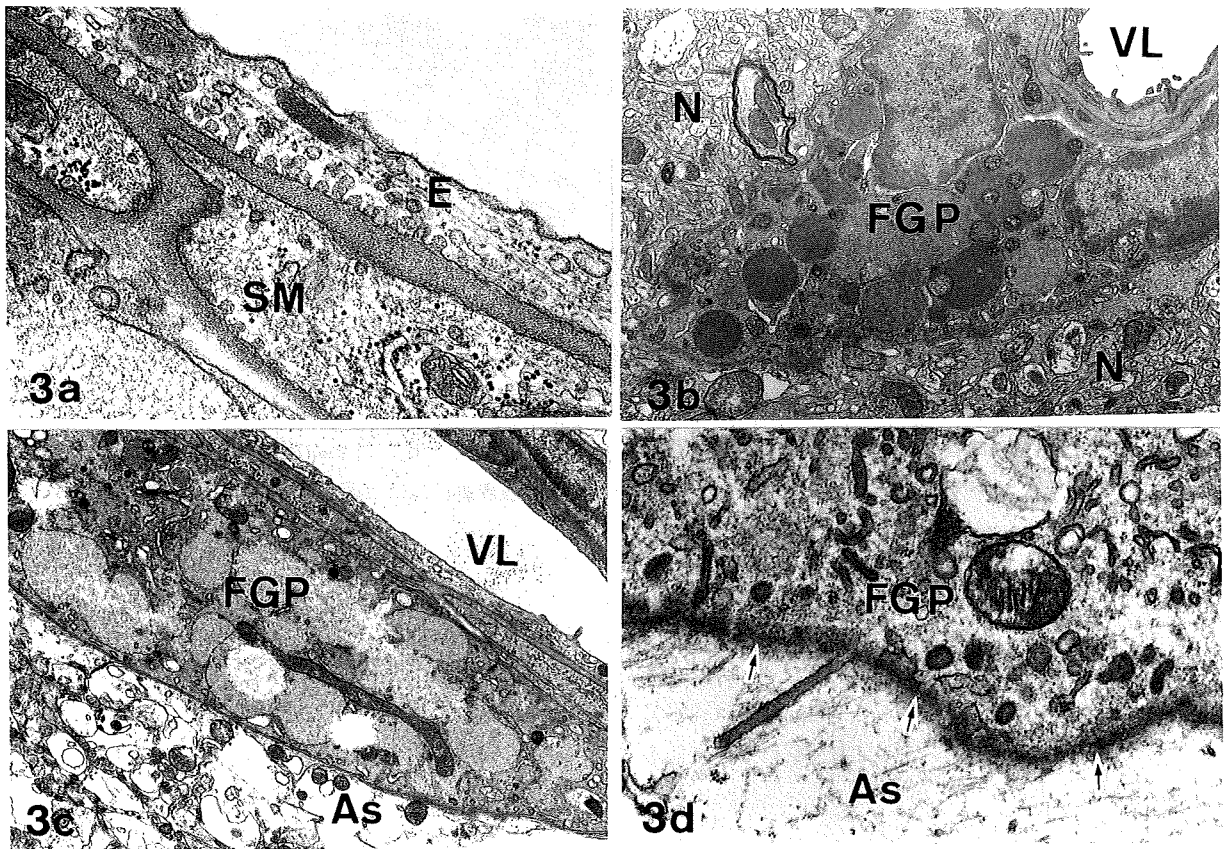


図3. 実験群の電顕写真。3a;内皮細胞(E)は明るく、飲小胞を多数含んでいる。内皮下腔は拡大している。平滑筋細胞(SM)も明るく、筋原線維は減少している。3b;FGP細胞全体の電子密度が上昇している。細胞内顆粒の電子密度は低下し、顆粒は互いに癒合している。N;

神経組織。3c;FGP細胞の細胞内顆粒の電子密度は著しく低下し、顆粒は相互に癒合し、細胞質の大部分を占めている。As;星状膠細胞、VL;血管腔。3d;FGP細胞と星状膠細胞(As)の境界を示す。グリア限界膜(矢印)はその構造が乱れている。

IV 考案

ヒトに於ける正常脳圧水頭症の病態生理はヒト剖検例の少なさ、適切な実験動物が得られないことから、その詳細を検討することは困難であった。近年、大浜等²⁾により脳底部動脈の中等度～高度のアテローム硬化を伴い、さまざまな程度の大脳白質の萎縮と側脳室・第三脳室の拡大を認めるBinswanger病とNPHの病理学的類似点が見られ、慢性脳血流低下とNPHの発症との関連が指摘されるに至っている。

一方、工藤等は砂ネズミ総頸動脈にコイル状のクリップを装着することにより、脳を長期間に亘り血流低下状態に置き、脳室拡大を伴うBinswanger病に類似した病変

を作製することに成功した。このモデルは砂ネズミに於いては椎骨動脈系と内頸動脈系に吻合が弱いから、認められないことに注目し、総頸動脈をコイル状のクリップで狭窄することにより内頸動脈領域の脳血流を制御し、慢性脳血流低下動物の作製を可能としたものである。

本研究に於いても、工藤等の報告に見られる様に、海馬に於ける神経細胞の脱落、白質の粗鬆化、脳室の軽度拡大を示す変化が観察された。本研究では、このような条件下に於けるFGP細胞を含む脳皮質細動静脈を中心に観察した。

光顕、電顕所見から、慢性脳血流低下砂ネズミモデルに於いては、FGP細胞に浮腫性的変化が出現すると共に、細血管内皮細胞・平滑筋細胞に著しい形態変化が観察さ

れた。即ち、内皮細胞には著しい飲小胞の増加、平滑筋細胞には筋原線維の減少に伴う細胞質の明調化が認められた。このような内皮細胞・平滑筋細胞・FGP細胞細胞の変化は、慢性的な脳血流の低下は血液・脳関門の破綻を招き、脳に浮腫性の変化が引き起こされたことを示すものと理解された。実験群のFGP細胞のPAS反応が強く示されたことは同細胞が血管壁を透過した血漿蛋白を多量に取り込んだ結果と考えられた。また、平滑筋細胞はその外形が変化し、筋原線維は減少し、細胞間隙は拡大していた。このような筋細胞の変化はFGP細胞の浮腫性変化、退行変化の著しい部位に強く観察される。血管壁細胞の構造とFGP細胞の機能との関連について、疋島と間藤¹⁰⁾は老化ラットに於ける所見から、FGP細胞の異物摂取能・形態が正常に保たれている細血管壁の筋細胞・内皮細胞にはその構築に変化が少くないことを報告している。即ち、FGP細胞の活性維持は血管壁細胞の構造維持に連なるものであり、本観察に於いて認められた内皮細胞・筋細胞の変化はFGP細胞の機能低下により引き起こされた可能性があるとも考えられた。

本研究に於いては、ヒトBinswanger病或いは老化先天性水頭症(HTX)ラットに於いて観察された様な血管周囲隙に於ける線維成分の沈着は少なかった。血管周囲隙の線維成分はFGP細胞の退行、或いは線維芽細胞様細胞の出現に伴い屢々出現する傾向がある。本研究に用いた慢性脳血流不全砂ネズミに於いては、FGP細胞は浮腫性の変化を示すものの、未だある程度の機能を有していることが伺われた。即ち、静脈内に投与されたHRPは対照動物と比べると少量であるが、FGP細胞に取り込まれていることから、FGP細胞の機能廃絶には至っていないと考えられた。更に、長期間慢性脳血流低下状態に置けば、FGP細胞の機能破綻を招き、線維芽細胞様細胞が出現し、血管周囲に膠原線維が沈着すると思われる。

最後に、本研究で用いた砂ネズミのFGP細胞の細胞内顆粒の特徴について述べる。PAS染色に対し、ラット(Wistar系)やマウスの細胞内顆粒は濃染し、脂質性の物質は老化時に至り出現することが今までの研究から明らかである。しかし、今回用いた対照群砂ネズミに於いては、FGP細胞の細胞内顆粒のPAS染色性が低く、かつoil red O染色陽性の脂質性顆粒が多数出現した。その生理的意義については今後の研究が待たれるが、砂ネズミを実

験動物として使用する際、注意すべき問題であろう。

V. まとめ

工藤等の方法に従い、砂ネズミ総頸動脈にコイル状クリップを装着し、慢性脳血流低下動物モデルを作製し、FGP細胞(MATO)が付属する脳微小血管を形態学的に観察した。観察した術後8~9週後のモデルに於いて、第三脳室・側脳室の拡大が認められると共に大脳白質の粗鬆化、海馬歯状回・CA1領域に神経細胞の変性が観察された。大脳皮質、海馬等に分布する細動静脈を観察すると、血管腔は狭小化を示し、血管壁を構成する内皮細胞には飲小胞の増加が、平滑筋細胞の変性像が認められた。血管周囲隙に存在するFGP細胞の細胞内顆粒の電子密度は著しく低下し、また相互に癒合していた。慢性的な脳血流の低下は血管透過性を変化せしめ、血管壁構築の変化をもたらす、FGP細胞に機能障害がもたらすことが本実験から伺えた。FGP細胞に変化が少ない場合には血管壁構築の変化も乏しい事から、FGP細胞の機能維持は血管壁細胞の機能維持とも関連すると考えられた。また、星状膠細胞のグリア限界膜は不鮮明となっていた。この現象も脳脊髄液の循環を障害するものと推察された。

文献

- 1) Kudo T, Tada K, Takeda M, Nishimura T: Learning impairment and microtubule-associated protein 2 decrease in gerbils under chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke*, 21: 1205-1209, 1990
- 2) Kudo T, Takeda M, Tanimukai S, Nishimura T: Neuropathologic changes in the gerbil brain after chronic hypoperfusion. *Stroke*, 24: 259-265, 1993
- 3) Kurumatani T, Kudo T, Takeda M, Nishimura T: Changes of monoamine metabolism in the animal brain under cerebral hypoperfusion. *Annals of Psychiatry*, 5: 15-22, 1995
- 4) Hattori H, Takeda M, Kudo T, Nishimura T: Cumulative white matter changes in the gerbil brain

under chronic cerebral hypoperfusion. *Acta Neuropathol (Berl)*, 84: 437-442, 1992

5) Mato M, Ookawara S, Mato TK, et al: An attempt to differentiate further between microglia and fluorescent granular perithelial (FGP) cells by their capacity to incorporate exogenous protein. *Am J Anat* 172: 125-140, 1985

6) Mato, M, Ookawara S, Kodama T, et al: Involvement of specific macrophage lineage cells surrounding arterioles in barrier and scavenger function in brain cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3269-3274, 1996

7) Ookawara S, Mitsuhashi U, Mato M, et al: Study on distribution of pericyte and fluorescent

granular perithelial (FGP) cell in the transitional region between arteriole and capillary in rat cerebral cortex. *Anat Rec* 244:257-264, 1996

8) Mato M, Ookawara S: A simple method for observation of capillary nets in rat brain cortex. *Experientia*, 35: 501-503, 1979

9) 大浜栄作他：Binswanger病と特発性正常脳圧水頭症の神経病理学的比較検討。特発性正常脳圧水頭症の病態と治療指針 森惟明編集。1998 ニューロン社、東京。

10) 正島ひろみ、間藤方雄：ラット脳における血管老化に関する研究 —すべての脳血管は同時に老化するか—。脳と神経、42: 929-944, 1990

老化HTXラットに於ける水頭症の発現とFGP細胞(MATO)の役割に関する研究

大河原重雄*、益子敏弘*、美馬達夫**、森惟明**、間藤方雄*、***

I. はじめに

正常脳圧水頭症(NPH)はくも膜下出血後等に生じる続発性水頭症と異なり、脳脊髄液(CSF)の流路障害(中脳水道、第四脳室正中口・外側口の閉塞等)を伴わずに、徐々に脳室拡大を来す慢性疾患であることが知られている。

脳微小血管と神経組織の接点であるVirchow-Robin腔はCSFの一流路として重要な間隙であり、同腔には中枢神経系に固有のマクローファージ系細胞である蛍光性顆粒周囲(FGP)細胞(MATO)が生理的条件下で存在し、CSF循環の一翼を担っている^{1) 2)}。水頭症下に於ける、FGP細胞を含むVirchow-Robin腔を検索することはNPHの発生メカニズムを解明する上で重要な事柄であると考えられる。

水頭症のモデル動物として先天性水頭症(HTX)ラットが知られており、同動物は約三割の割合で、周産期に水頭症を発症する。その原因は中脳水道上皮細胞の過形成による中脳水道閉塞に起因するとされている³⁾。しかし、水頭症を発症しなかった同系幼弱ラットを観察したところ、FGP細胞内のライソソームの形態学的異常、FGP細胞の異物摂取能の低下、星状膠細胞のグリア限界膜の狭小化が観察され、Virchow-Robin腔に於けるCSFの循環障害を思わせる所見が得られた⁴⁾。

この様な所見を基に、本研究に於いては周産期に水頭症発症を免れたHTX系ラットを長期間飼育したら、交通性水頭症が発現しないか?との観点から、動物の長期間飼育を試み、1)交通性水頭症が発現するか? 2)発現し

た場合FGP細胞を含むVirchow-Robin腔に如何なる変化がもたらされるか?を形態学的立場から検討した。

II. 材料と方法

周産期に水頭症の発現を免れたHTX系ラットを1年6か月から2年間飼育した全6例を検索した。動物はエーテル麻酔下で心臓から冷生理食塩水を灌流した後、更に固定液を灌流した。固定液は緩衝液でpH7.2に調整された2%パラフォルムアルデヒドと2.5%グルタルアルデヒドの混合液を用いた。固定液の緩衝には目的に応じて0.1M磷酸緩衝液或いは0.1Mカコジル酸緩衝液を用いた。また、一部のラットには固定2時間前にhorseradish peroxidase (HRP; Sigma, typeIV)を大腿静脈から投与した。

灌流固定後、脳を直ちに摘出し、厚さ約1mmの前額断標本を作製し、実体顕微鏡下で観察した。その後、標本を上記固定液中で更に4時間乃至10時間再固定した。4時間固定した標本は、緩衝液で洗浄後ビブラトーム切片を作製し、Gomori法による酸フォスファターゼの検出、ジアミノベンチジン法によるHRPの検出を行った。一部の切片をスライドガラスに添付し、光学顕微鏡で観察した。残りの切片は、1%オスミウム酸で後固定を行った後、エポンに包埋し、電子顕微鏡による観察を行った。10時間固定した一部の標本は緩衝液で洗浄後、上昇エタノール系列で脱水し、パラフィンに包埋した。また残りの一部の標本は1%オスミウム酸で後固定したのちエポンに包埋し、電子顕微鏡観察に供した。

パラフィンに包埋した標本は薄切後、ヘマトキシリン・エオジン(H-E)染色、過ヨウ素酸シッフ(PAS)反応を施し光学顕微鏡で観察した。またエポンに包埋した標本は厚さ1 μ mの厚切り切片にトルイジンブルー染色を施し、光学顕微鏡下で適切な部位を選択し、超薄切片を作製後、酢酸ウランと水酸化鉛による二重電子染色を行ったのちJEM-2000EX型電子顕微鏡で観察した。

自治医科大学解剖学講座*

高知医科大学脳神経外科学講座**

国際医療福祉大学・保健学部***

Key Words : 老化先天性水頭症(HTX)ラット、水頭症、FGP細胞(Mato)、脳微小血管。

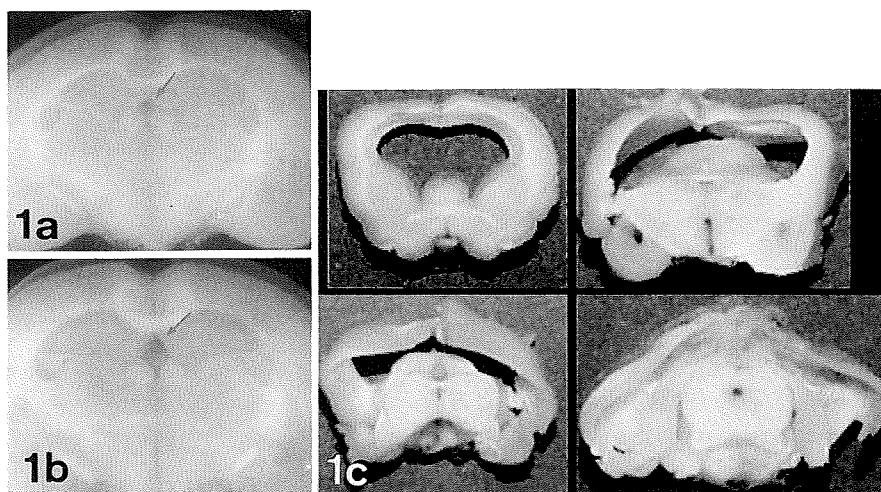


図1。1Aは対照Wistar系ラットの、1Bは老化HTXラットの前額断標本。第三脳室の拡大が認められる(矢印)。図1Cは著しい脳室拡大を示す老化HTXの前額断標本。前頭部から後頭部までの断面を示す。

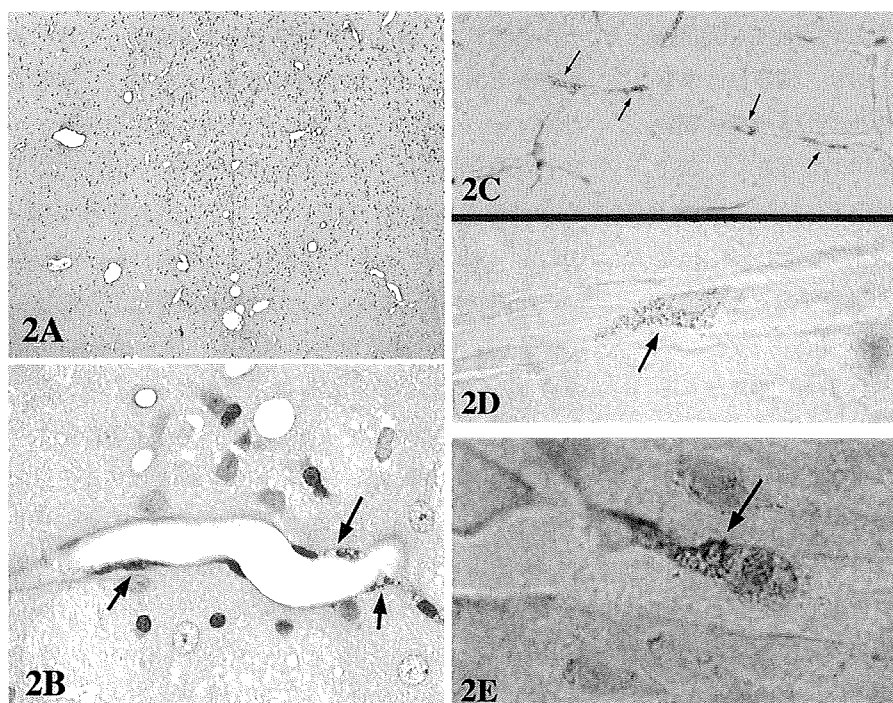


図2。光学顕微鏡所見。2A;PAS染色の弱拡大像。拡張した血管が多数観察される。2B;拡張した血管壁に接して、PAS反応陽性顆粒を有するFGP細胞が観察される(矢印)。2C;HRPの摂取を示す。血管壁に沿って、淡く染色されたFGP細胞が観察される。2D;Cの拡大像。HRPの取り込みは少ない。2E;ACCase反応。顆粒の周辺に反応産物が沈着している。

Ⅲ. 結果

1. 肉眼的および実体顕微鏡による観察

老齢HTXラットに於いては、全例(6個体)に於いて、第三脳室、中脳水道の軽度拡大を示す症例(図1B、1Aは対照)と、著しい脳室拡大を示す症例(図1C)が観察された。この症例では、透明中隔は欠損し、左右側脳室は交通し、著しく拡大していた。図1Cに示すように、前頭部大脳皮質の非薄化は軽度であったが、後頭部皮質で

は著しく高度であった。大脳基底核、視床、海馬、中脳等に萎縮が認められるが、その基本構造は保たれていた。脳室系の閉塞は観察されず、交通性水頭症であった。

2. 光学顕微鏡による観察

パラフィン切片にH-E染色を施し観察すると、くも膜、脳実質等には炎症性的変化は認められなかった。拡大した脳室壁は概ね扁平な脳室上衣細胞で被われていた。ごく一部の領域に於いて上衣細胞の多層化が観察されたが、

CSFの流路を閉鎖する所見はなかった。大脳皮質のみならず大脳基底核、視床、海馬、中脳等、観察したすべての領域において、微小血管の血管壁は薄く、血管腔は著しく拡大し、血管は蛇行していた(図2A)。血管壁に付属するFGP細胞は小型で円形を示すものが多く、大多数のFGP細胞は小型のPAS陽性円形顆粒が充満し、大型で、空胞状の細胞内顆粒は乏しかった(図2B)。これ等の所見は動物による脳室拡大の多寡に拘わらず共通に観察された。大腿静脈からHRPを投与し、FGP細胞の異物摂取能を検討したところ、HRPの反応産物は少なく、異物摂取能の低下が伺われた(図2C,D)。Gomori法により酸フォスファターゼ活性を検出すると、FGP細胞内には細顆粒状の反応産物が観察された(図2E)。

3. 電子顕微鏡による観察

脳微小血管の内皮細胞は概ね扁平で、核は不規則な切れ込みを有し、核周囲クロマチンに富んでいる。細胞質はやや暗調で、遊離リボソーム、ミトコンドリア、時にゴルジ装置が観察された。内皮細胞相互はtight junctionで連なり、屢々、管腔側或いは基底側の細胞膜

に沿って飲小胞が認められた(図3a)。内皮下腔はやや拡大し、中等度の電子密度を有する不定形物質で占められていた。血管平滑筋細胞はその厚さを減じていたが、筋原線維は比較的保たれていた。平滑筋相互間の細胞間隙は拡大している場合もあった。時に、平滑筋細胞内にグリコーゲン顆粒が多数出現した。

血管平滑筋基底膜と星状膠細胞の限界膜の間に位置するFGP細胞を観察すると、やや膨化を示すもの(図3b,c)、細胞質の電子密度が上昇し退行変性に陥りつつあるFGP細胞(図4a,b)、線維芽細胞様の形態を示す細胞等(図3a)が観察された。やや膨化したFGP細胞では、核は楕円形で核周囲クロマチンに富んでいた。FGP細胞内のライソソーム性の顆粒の大きさは大小様々で、顆粒の電子密度は低い傾向にあった。時に蜂の巣状構造を呈するやや大型の脂質性顆粒が含まれていた(図3b)。また、小vesicleが細胞膜に接して或いは細胞質内に広く分布していた。細胞の一極に細胞膜陥凹が観察されることがあり、細胞膜陥凹に挟まれた細胞質は細胞内小器官が少なく、細線維状物質で占められ、偽足状構造物であることが伺われた。星状膠細胞のグリア限界膜は極めて不鮮明で幅も狭

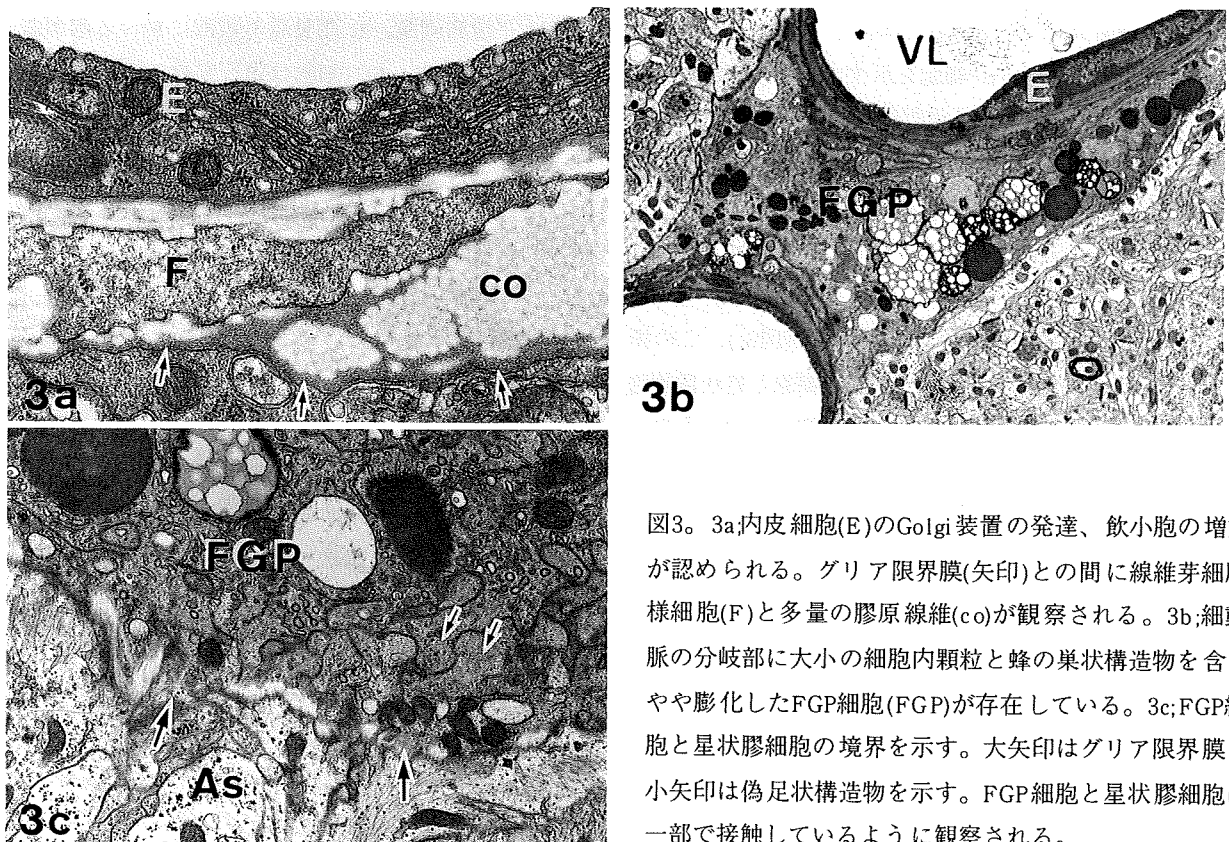


図3。3a;内皮細胞(E)のGolgi装置の発達、飲小胞の増加が認められる。グリア限界膜(矢印)との間に線維芽細胞様細胞(F)と多量の膠原線維(co)が観察される。3b;細動脈の分岐部に大小の細胞内顆粒と蜂の巣状構造物を含むやや膨化したFGP細胞(FGP)が存在している。3c;FGP細胞と星状膠細胞の境界を示す。大矢印はグリア限界膜を小矢印は偽足状構造物を示す。FGP細胞と星状膠細胞は一部で接触しているように観察される。

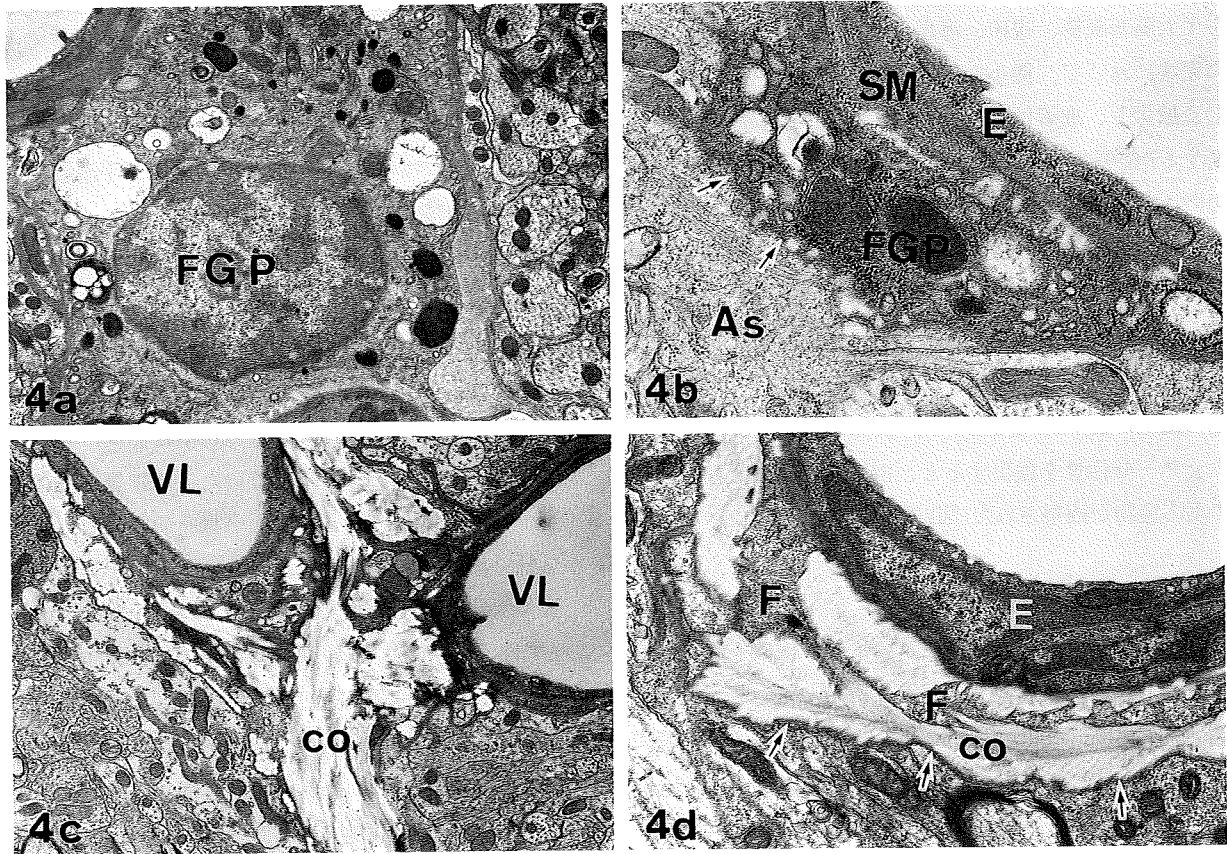


図4。4a;細胞質の電子密度が上昇し、大小の空泡をふくむ退行性変化を示すFGP細胞を示す。小型の顆粒にHRPが取り込まれている。4b;退行変性に陥ったFGP細胞と星状膠細胞(As)の接触を示す(矢印)。星状膠細胞にはアストロファイバーの増加が観察される。E;内皮細胞、

SM;平滑筋細胞。4c;細動脈分岐部に於ける膠原線維(co)の増加を示す。FGP細胞は退行変性している。VL;血管腔。4d;細血管周囲に増加した膠原線維を示す。E;内皮細胞、F;線維芽細胞様細胞、矢印はグリア限界膜。

く、両細胞の境界が不鮮明となっていた(図3c)。この所見は細胞質の電子密度が上昇したFGP細胞と星状膠細胞の間でも観察された(図4b)。星状膠細胞は一般に細胞質の電子密度が低く明るい細胞として観察された。グリア限界膜に近い細胞質内にはミトコンドリアが多数分布していた。またアストロファイバーの増生、グリコーゲン顆粒の出現が認められた(図3c)。

退行変性に陥りつつあるFGP細胞、また線維芽細胞様細胞の周囲には電子密度の低い線維構造物が増生していた(図3a,4c,d)。場所により膠原線維に特徴的な周期的横紋が観察された。

IV 考察

本研究で示された様に、周産期に水頭症の発症を免れたHTXラットを長期間飼育したところ、第三脳室、中脳水道の軽度拡大を示す症例から、周産期に認められたのと同程度の高度水頭症を発現したラットまで観察された。高度水頭症が認められた症例に於いても、脳室系の交通は保たれており、交通性水頭症であった。

これ等老化水頭症HTXラットのFGP細胞を含むVirchow-Robin腔を形態学的に観察したところ、FGP細胞のACase活性は低下し、異物摂取能は異常を示し、多くのFGP細胞は退行変性を示していた。

FGP細胞はED2, Ia抗原、酸化LDLに対するスカベンジャーレセプター等マクロファージと共通のエピトープを有し、Virchow-Robin腔に生理的条件下に於いて常在する脳固有のマクロファージ系細胞である。Mato等を中心とした研究から、同細胞は静脈内に投与されたHRPをその特異なライソソーム性顆粒に取り込むことから血液・脳関門の一翼を担っている細胞である。また、脳室内に投与されたHRP、フェリチンなどの蛋白性のトレーサーはまずFGP細胞に取り込まれる。この事は生理的条件下に於いて、FGP細胞はCSFの流路に於いてCSFの循環を調節している細胞であることが考えられる。更に、FGP細胞の特異な細胞内顆粒は強い酸性フォスファターゼ活性を示し、FGP細胞内に取り込まれた物質の処理に当たっている¹⁻³⁾。今回観察した老化水頭症HTXラットに於いて、FGP細胞のACPase活性の低下、HRPの取り込みが減少している所見、多くのFGP細胞に退行性的変化が観察されたことは、同動物のFGP細胞の機能が著しく低下し、CSFの血管腔への排出を阻害しているものと考えられた。

更に、Virchow-Robin腔に於けるCSFの流路障害をもたらす所見として、FGP細胞周囲、或いは線維芽細胞様細胞の周辺に多量の線維性成分の沈着があった。FGP細胞は老化に伴い⁴⁾或いはビタミンE欠乏食で長期間飼育し⁷⁾、同細胞が退行変性に陥ると、FGP細胞周辺に膠原線維の沈着が観察され、更に高度になると細血管周囲のVirchow-Robin腔が線維成分で占められることが観察されている。また、FGP細胞の退行変化に伴い、軟膜由来の線維芽細胞様細胞の増加が観察され、同細胞も線維形成に与るものと考えられている。老化HTXラットに於ける細血管周囲の膠原線維の出現も同様の機序で生じるものと考えられた。

次いで、FGP細胞と星状膠細胞との接触について考察する。正常状態では、FGP細胞の細胞膜は星状膠細胞の細胞膜とグリア限界膜を挟んで相対している。しかし、FGP細胞に刺激が加わると、グリア限界膜に構造の乱れが生じ、FGP細胞の細胞膜と星状膠細胞の細胞膜が相接するようになる。FGP細胞から、TNF、インターロイキン、プロテアーゼ等の組織障害物質が放出され、グリア限界膜に作用する可能性がある。事実、細菌性リポポリサッカライドを投与した場合、FGP細胞内にはTNF、IL-1 β

等が証明され、グリア限界膜は消失し、FGP細胞と星状膠細胞或いは活性化されたミクログリアとの接触が観察されている⁸⁾。FGP細胞の機能変化が星状膠細胞或いはミクログリアの機能変化をもたらす可能性が予測される所見であり、更に詳細な研究が必要となろう。また、グリア限界膜の変化はCSF循環を阻害することが予測され、水頭症の発現を招きやすくする事が考えられた。

本研究に於いて、微小血管の著しい拡張が観察された。坂本等⁹⁾はライソソーム顆粒に機能異常があるページュマウスを経年的に観察し、老年ページュマウスの脳皮質微小血管の著しい拡張を観察している。FGP細胞のライソソーム機能の低下は血管壁のトーンズを変化させ、血管拡張をもたらされるものと推察している。本研究の条件下でも、FGP細胞のACPase活性の低下、HRPの取り込み能の低下が観察され、FGP細胞に機能不全がもたらされていることが推察された。水頭症マウスに於いても老化水頭症マウスと同様の機序が働いて、血管拡張がもたらされたものと考えられる。

V. まとめ

周産期に水頭症の発現を免れた先天性水頭症HTXラットを1年6か月から2年飼育したところ、交通性水頭症が観察された。これ等水頭症動物のVirchow-Robin腔を観察したところ、1) FGP細胞のACPase活性は低下し、異物摂取能は異常を示し多くのFGP細胞は退行変性を示していた。退行変性に陥ったFGP細胞周辺には膠原線維の沈着が認められた。2) 星状膠細胞のグリア限界膜は構造が乱れ、ある部分では消失し、FGP細胞と星状膠細胞は密接し、両細胞間は著しく狭小化していた。3) 脳実質内微小血管に拡張・蛇行が観察された。以上の所見は、FGP細胞の機能不全に起因するものと考えられ、同細胞の機能不全はCSFの循環障害もたらし、老化HTXラットに水頭症が生じたと推察された。

文献

- 1) Mato M, Ookawara S, Mato TK, et al: An attempt to differentiate further between microglia and fluorescent granular perithelial (FGP) cells by their capacity to

- incorporate exogenous protein. *Am J Anat* 172: 125-140, 1985
- 2) Mato, M, Ookawara S, Kodama T, et al: Involvement of specific macrophage lineage cells surrounding arterioles in barrier and scavenger function in brain cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3269-3274, 1996
- 3) Ookawara S, Mitsuhashi U, Mato M, et al: Study on distribution of pericyte and fluorescent granular perithelial (FGP) cell in the transitional region between arteriole and capillary in rat cerebral cortex. *Anat Rec* 244:257-264, 1996
- 4) Oi S, Yamada H, Sato O, Matsumoto S: Experimental models of congenital hydrocephalus and comparable clinical problems in the fetal and neonatal periods. *Child's Nerv Syst* 12: 292-302, 1996
- 5) 大河原重雄、美馬達夫、森惟明、間藤方雄：先天水頭症ラット(HTX)大脳皮質微小血管の変化。厚生省特定疾患難治性水頭症調査研究分化会、平成9年度報告書 1998; 76-80
- 6) Mato M, Ookawara S, Aikawa E, Kawasaki K: Studies on fluorescent granular perithelium (F.G.P.) of rat cerebral cortex - especially referring to morphological changes in aging. *Anat Anz* 149: 486-501
- 7) Mato M, Ookawara S, Kurihara K: Regression of granular pericytes in cerebral fine vessels of rats after administration of a vitamin E deficient diet. *Experientia* 36:1112-1113
- 8) Mato M, Sakamoto A, Ookawara S, Takeuchi K, Suzuki K: Ultrastructural and immunohistochemical changes of fluorescent granular perithelial cells and the interaction of FGP cells to microglia after lipopolysaccharide administration. *Anat Rec* 251:330-338, 1998
- 9) 坂本敦司、劉子娟、間藤方雄：老年Beigeマウスの大脳皮質微小血管に関する研究。脈管学 32: 1277-1285, 1992

研究成果の刊行に関する一覧表