

砂ネズミ前脳虚血モデルにおける海馬 CA1 sector 星状膠細胞の 経時的超微細構造変化

奈良県立医科大学第2外科学教室

平松 謙一郎

SEQUENTIAL ULTRASTRUCTURAL CHANGE OF ASTROCYTE FOLLOWING FOREBRAIN ISCHEMIA IN THE GERBIL HIPPOCAMPUS CA1 SECTOR

KEN-ICHIROH HIRAMATSU

The 2nd Department of Surgery, Nara Medical University

Received July 28, 1989

Summary: Transient forebrain ischemia in gerbils was produced by a 5-minute occlusion of the bilateral carotid arteries. This model produces selective delayed neuronal death (SDND) in the hippocampus CA1 sector with high reproducibility. Changes in the hippocampal and cortical astrocytes and neurons at 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48, 96 hours after ischemia were evaluated by electron microscopy, and quantitative estimations of increases in cytoplasmic area and the number of mitochondrial profile were performed.

In areas of the hippocampus with SDND, cytoplasm-soma ratio increased 32.8 % in control to 49.1 % at 1 hour after ischemia ($p < 0.01$) and 42.2 % at 96 hours ($p < 0.05$). The number of mitochondrial profiles in astrocytic perikarya rose significantly at 48 hours ($p < 0.05$) and 96 hours ($p < 0.01$) postischemia. Paired nuclei which are regarded as a reactive change of astrocyte were observed at 12 hours postischemia.

In the area of the parietal cortex, no significant morphological change was observed in either neurons or astrocytes. Even in the final evaluation (at 96 hours), neurons, astrocytes and the surrounding neuropils were morphologically intact.

In the early phase (<6 hours), the cytoplasmic swelling of astrocytes suggests the protective activity for hyperexciting neurons. But in the late phase (>6 hours), the configurational change of the nucleus, paired nuclei and swelling of astrocytes suggest increased metabolic activity in the renovation of brain tissue.

Index Terms

gerbil, delayed neuronal death, hippocampus, electron microscopy, astrocyte

緒 言

脳は虚血や低酸素侵襲に対して極めて脆弱であることはよく知られている。臨床的にも、実験的にも、ごく短時間の虚血負荷で不可逆的变化が起こることが、多くの研究で証明されている。虚血負荷によって、脳は最終的

には壊死組織へと変性・破壊されるが、その経時的な病理組織変化は、近年の灌流固定法の確立によって、詳細に検討され、いわゆる Ischemic neuronal damage なる概念が¹⁾ほぼ普遍化されるにいたっている。これによると皮質や海馬の神経細胞は、虚血後5分から15分ですでに microvacuolation すなわちミトコンドリアの膨化が

出現し、その後 ischemic cell change, incrustation, homogenizing cell change を経て、細胞死にいたるといふ。この全経過わずか数時間の変性行程が神経病理学における虚血神経細胞傷害の基本概念となっていた。

しかし、1982年 Kirino²⁾ は、砂ネズミにおいて、脳虚血負荷後 48 時間を経て、初めて光学顕微鏡上明かな変化が出現するという、極めて緩徐に進行する特異的病態を発見し、これを遅発性神経細胞壊死(Delayed Neuronal Death, DND) と称し発表した。これとほぼ同時期に、Pulsinelli et al.³⁾ はラットを用いた脳虚血モデルでやはり遅発性神経細胞壊死が出現することを発表した。それ以後これらモデルを用いた研究が単に病理学的分野に留まらず、代謝学ならびに生理学的分野でも爆発的に展開されるようになった。

この砂ネズミモデルの特徴は、変性行程が緩徐に進むということだけでなく、海馬 CA1 (conus ammonius sector 1) という脳の極めて限局された部分にしか出現せず、かつ、死にいたるのは神経細胞のみで、神経膠細胞や血管内皮細胞などは生存するという、いわゆる選択的脆弱性を呈する性質も合わせもっている点でもある。今回著者は、脳虚血時における神経組織を構成する各細胞の虚血に対する反応性の差異、および脳虚血によって発生する一連の病態での各細胞間の関連性を明らかにする目的で、砂ネズミの遅発性神経細胞壊死モデルを用いて、海馬および大脳皮質を電子顕微鏡学的に観察し、星状膠細胞の経時変化と、同時期の神経細胞の変化とを対比検討し、その形態的ならびにその量的変化の意義について考察を加えた。

実験方法

実験動物としては、大阪ケアリ K.K. から購入し、当教室で室温 20—25°C、湿度 50—70% のもとに、同一家系で繁殖させた 10—15 週齢、体重 60—90 g の砂ネズミ (Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*) 67 匹を雌雄の別なく使用した。

1. 実験モデル作製法

麻酔は 3% ハローセン吸入で導入し、その後 1% ハローセン吸入で維持した。

(1) 手術法

砂ネズミは仰臥位で実験台に固定し、頸部正中に約 2 cm の縦切開を加え、両側の総頸動脈を周囲組織から剝離、露出した。zen 式血管クリップを用いて両側総頸動脈を 5 分間閉塞して脳虚血負荷を行った後、クリップを解除して直視下に血流が再開するのを確認した。皮膚縫合後、完全に麻酔から覚醒し動き回るまで、保温し、監視

した。

(2) 対照群作製

同系砂ネズミ 10 匹を用いて、皮膚切開、頸動脈剝離を行ったのち、頸動脈は閉塞せず、他は同じ手術操作を加えた対照群を作製した。

(3) 再現性の確認実験

当教室で繁殖させた同系の砂ネズミにおいて、両側頸動脈 5 分間閉塞による遅発性神経細胞壊死の再現性を確認するため、同系砂ネズミ 25 匹を用いて、前記の方法に準じて脳虚血を負荷した後、96 時間後に断頭して脳を取り出し、光学顕微鏡標本を作製し、海馬領域を観察した。

2. 光顕標本作製

脳を取り出した後、10% ホルマリン溶液で 48 時間浸透固定した。上昇系エタノールで脱水し、キシレンで置換した後、パラフィン包埋し、背側海馬を通る冠状断面で、6 μm 厚の切片を作製した。ヘマトキシリン-エオジン染色を施し、光顕的に観察した。

3. 電顕標本作製

両側頸動脈 5 分間閉塞した砂ネズミをそれぞれ 4 匹づつの 8 群に分け、各群を脳虚血負荷後 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48, 96 時間後にエーテル麻酔のもとに開胸し、経心的灌流固定を行った。灌流液には 2.5% グルタルアルデヒド、2% ホルマリン-0.1M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) を用い、灌流圧は 130 cm 水柱圧とした。断頭した頭部を 4°C で約 12 時間保存後、脳を取り出し、Loskota et al.⁴⁾ の砂ネズミ脳解剖図譜に従って背側海馬を通る面で約 1 mm 幅の冠状切片を作製した。この切片から実体顕微鏡下に海馬 CA1 sector および頭頂葉皮質の 1 mm×1 mm 大の標本を切離し、採取した。その後 1% オスミウム酸で 90 分、後固定し、上昇系エタノールで脱水し、プロピレン置換後、Epok 812 に包埋した。これを Reichert 社製 Ultracut で 70 μ の超薄切片を作製し、酢酸ウラニール、クエン酸鉛による二重染色を行った。観察および撮影には日本電子 JEM-1200 EX を使用した。また対照群も同様の方法で検索した。

4. 定量的画像解析

経時的な形態学的変化を定量的に検討するため、電子顕微鏡で撮影したフィルムを Canada Imaging Research 社製 MCID システムで定量解析を行った。すなわち細胞質の膨化を定量するため、個々の星状膠細胞の核 (nucleus) および細胞体 (soma) の面積を測定し、soma と nucleus の面積差を細胞質面積 (cytoplasm) とし、さらに cytoplasm と soma の面積比 (cytoplasm-soma ratio) を算出した。また星状膠細胞の全体像が得られるフィルムを選出し、そのプロフィールからミトコ

ンドリアの数を算定した。各時間毎の断頭した動物数は4匹で、個々の動物から5ないし6枚のフィルムを定量法に使用した。

各群間の統計学的な検定には Student's t-test を用い、危険率5%以下をもって有意差を持つと判定した。

結 果

1. 再現性の確認

光顕的観察の結果、虚血負荷96時間後の25匹総ての砂ネズミにおいて、海馬CA1 sectorの選択的な神経細胞の壊死が観察され、当教室で繁殖させた砂ネズミにおける、本実験系の極めて高い再現性が確認された。(Photo 1a, b)。海馬を除く他の脳組織には病理学的な変化は認めなかった。

2. 脳虚血負荷による神経学的所見

虚血負荷後約60分で、動物は完全に麻酔から覚醒し走り回るようになり、その後も特に神経学的異常なく生存し続けた。同系の砂ネズミ3匹につき脳虚血負荷後、継続飼育したところ、13ヵ月、15ヵ月および16ヵ月と長期にわたって生存することが観察され、本脳虚血負荷が生命予後に影響を与えないことが確認された。また従来から砂ネズミは脳虚血によって全身痙攣が誘発され易いと報告されているが、本実験系においては痙攣は認めなかった。

3. 海馬CA1 sectorにおける超微細構造所見

(1) 対照群

海馬における神経細胞は紡錘形ないし錐体形でCA1 sectorの錐体層(stratum pyramidale)において密に集

簇し、大多数のものは電子密度の薄い細胞質から成り立っていた。核は一様な真正染色質から成り、明瞭な核小体が認められた。粗面小胞体は発達が乏しく、その配列にも方向性はなかった。4個ないし6個のmonoribosomeからなるロゼット状のpolyribosomeがよく発達していた。その他少数のゴルジ装置やミトコンドリアや神経細管などが細胞小器官を形成していた(Photo 2)。星状膠細胞は錐体層では密な神経細胞間に介在し、起始層(stratum oriens)および放射層(stratum radiatum)にもほぼ均一に分布していた。細胞質は乏しく、少量のグリコーゲン顆粒、神経膠線維、ミトコンドリアなどが認められ、全体として神経細胞よりさらに低い電子密度を呈していた。核は神経細胞と同様真正染色質が主体であるが、核膜に接して電子密度の高いchromatin rimが認められた(Photo 3)。核の形態は卵円形ないし楕円形で、対照群の砂ネズミでは核膜の突出、陥凹などの核変形はみられなかった。核小体は殆どどの細胞で認めなかった。

(2) 脳虚血負荷群

電顕的観察での主な所見をFig.1にまとめ、以下、各経過時間毎の変化を述べる。

① 1時間後

神経細胞はpolyribosomeが離開しmonoribosomeとなり、細胞質全体に散在するようになるが、その他の細胞小器官に著明な変化は認められない(Photo 4)。これに対し星状膠細胞では、著しい細胞質の膨化を呈し、核周囲腔および粗面小胞体内腔の開大が認められた(Photo 5)。核に関してはその形状や染色質に変化はみ

Time after ischemia (hours)		1	2	3	6	12	24	48	96
Neuron	ribosome	dispersion							necrosis
	rough ER			mild increase		moderate increase	remarkable increase		
Astrocyte	cytoplasmic swelling	remarkable	moderate	mild				mild	moderate
	nucleus					change in figure	paired nuclei		
	mitochondria			swelling			mild increase	moderate increase	remarkable increase
	others	widening of rough ER and perinuclear space				whorl formation			

rough ER : rough endoplasmic reticulum

Fig. 1. Summary of sequential ultrastructural change in the hippocampus CA1 sector. There were four animals in each group.

られなかった。

② 2時間後

神経細胞の変化はやはり ribosome の所見のみに留まり、その他の小器官に変化はなかった。星状膠細胞では、依然粗面小胞体内腔や核周囲腔の開大が認められたが、細胞質膨化はやや軽減していた (Photo 6)。

③ 3時間後

星状膠細胞の細胞質膨化は軽減し、粗面小胞体内腔や核周囲腔の開大は消失した。しかし、ミトコンドリアの腫大および intercrystal space の開大が認められた (Photo 7)。また、神経細胞は ribosome の所見に加えて、粗面小胞体がわずかながら増生し、細胞質全体がやや高い電子密度を呈していた (Photo 8)。

④ 6時間後

神経細胞では3時間後と比較して著変は認めなかった。星状膠細胞では細胞質膨化およびミトコンドリアの腫大を軽度ながら認めたが、その他の細胞小器官に大きな変化はみられなかった。しかし、毛細血管周囲の星状膠細胞血管小足においては、2重膜が螺旋状に多重配列し、中心にミトコンドリア様物質を含んだ特有の構造物が、散在してみられた (Photo 9)。

⑤ 12時間後

神経細胞では粗面小胞体の増生がやや進行し、全体に電子密度が高くなっていた。星状膠細胞ではミトコンドリアの軽度増生が認められ、また核膜の突出、陥凹が出現し始め、細胞によっては、著しい核変形を示すものもあった (Photo 10)。

⑥ 24時間後

神経細胞においては、粗面小胞体が著しく増加してお

り、しかもその配列は特徴的な層状構造を呈していた (Photo 11)。星状膠細胞の核変形はこの時期にも存在し、また複核 (paired nuclei) を持った細胞も認められた (Photo 12)。

⑦ 48時間後

神経細胞における粗面小胞体の層状増生はさらに増加し、錐体層のほぼすべての神経細胞でこの所見が得られた。星状膠細胞では、軽度ながら細胞質膨化が再び現れ、またミトコンドリアの増加が著明となった (Photo 13)。

⑧ 96時間後

神経細胞はすでに死滅した所見を呈していた。すなわち、核は電子密度の高い無構造物質となり、細胞小器官はその構造が判別できなかった。また神経絨 (neuropil) も変性、膨化し境界膜も判別できなかった。それに比し星状膠細胞では、細胞質の膨化は存在するものの、核および細胞小器官などの構造はよく保たれていた (photo 14)。乏突起膠細胞や血管内皮細胞などもほぼ正常の形態を保っていた。

4. 頭頂葉皮質における超微細構造所見

(1) 対照群

頭頂葉皮質における神経細胞および星状膠細胞は神経絨 (neuropil) の中に散在して認められた。この部の神経細胞は海馬のものと比較して、やや小型で、全体として楕円形ないし卵円形を呈していたが、核および細胞質を構成する細胞内小器官の構造は、海馬の神経細胞と差は認めなかった。星状膠細胞も基本構造は海馬のものと同様であった。

(2) 脳虚血負荷群

神経細胞では全経過を通じて、その細胞内小器官を含

Table 1. The sequential change of cytoplasm-soma ratio and mitochondrial counts in astrocyte of the hippocampus CA1 sector. Values are mean±SD. There were four animals in each group; 5 to 6 astrocytes were photographed in each animal

	Control	1 Hr	2 Hr	3 Hr
Cytoplasm-Soma ratio (%)	32.8±8.1	49.1±11.8	42.3±8.7	38.7±7.2
Numbers of mitochondrial profiles per perikaryon	11.5±3.2	13.1±1.7	8.2±1.8	9.9±3.3
	6 Hr	12 Hr	24 Hr	48 Hr
	35.7±3.8	34.1±5.3	35.9±6.0	38.8±6.6
	10.3±3.8	13.0±4.3	14.1±3.1	16.3±4.9
				96 Hr
				42.2±7.5
				48.0±13.4

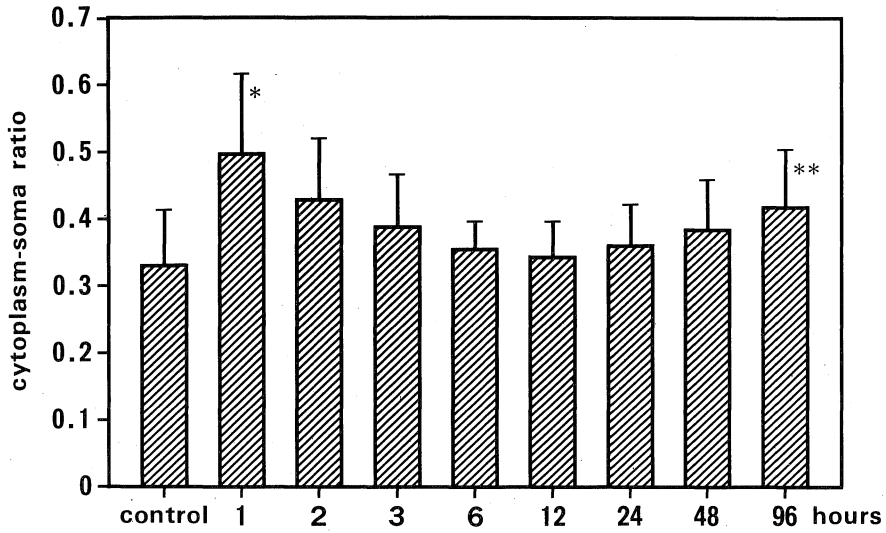


Fig. 2. Sequential change of cytoplasm-soma ratio in astrocyte of the hippocampus CA1 sector. Values are mean±SD. There were four animals in each group; 5 to 6 astrocytes were photographed in each animal.
* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ statistically significant by unpaired t-test as compared with control group.

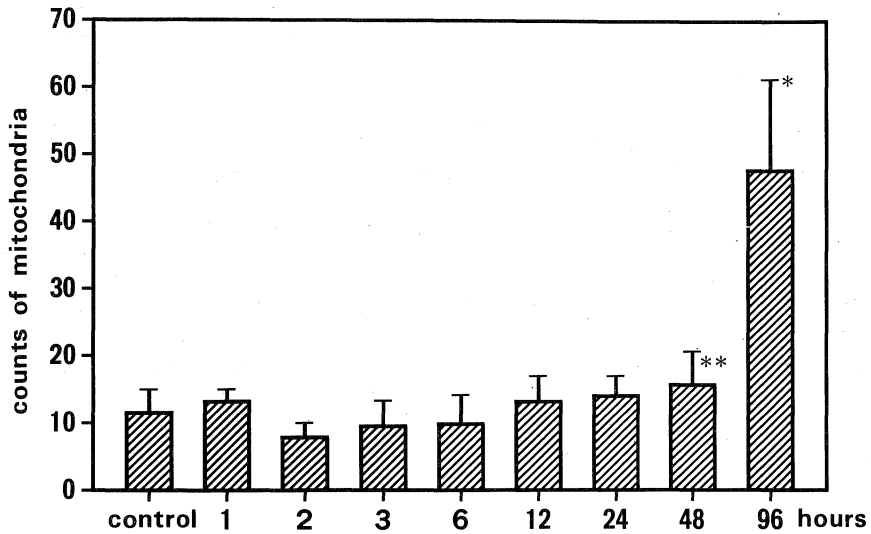


Fig. 3. Sequential change of mitochondrial counts in astrocyte perikaryon of the hippocampus CA1 sector. Values are mean±SD. There were four animals in each group; 5 to 6 astrocytes were photographed in each animal.
* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ statistically significant by unpaired t-test as compared with control group.

めて全く変化を認めなかった。星状膠細胞では虚血1時間後に、ごく軽度の細胞質の軽度膨化を認めたが、その後短時間で膨化は消退し、その後の経過でも海馬 CA1 sector でみられたような変化は出現せず、96時間後でもなお正常構造を示していた (Photo 15)。

5. 海馬 CA1 sector 星状膠細胞の定量的画像解析

電子顕微鏡で観察された星状膠細胞の、細胞膨化およびミトコンドリア増生の経時的変化の有意性を定量的に評価した。

(1) Cytoplasm-soma ratio

Cytoplasm-soma ratio すなわち海馬 CA1 sector における星状膠細胞の細胞質膨化の時間的推移を Table 1 および Fig. 2 でしめす。虚血負荷1時間後の早期から著明な膨化が出現し ($p < 0.01$)、その後12時間後には一旦軽快するが、24時間後から再び膨化が現れ、96時間後には有意な細胞質膨化が認められた ($p < 0.05$)。

(2) Mitochondrial profile

海馬 CA1 sector における星状膠細胞の単位細胞あたりのミトコンドリア数の時間的推移を、同じく Table 1 および Fig. 3 で示した。これらの図表から明かなように、48時間後からミトコンドリアの有意な増加 ($p < 0.05$) がみられ、96時間後には顕著な増加が認められた ($p < 0.01$)。

考 察

脳全体に一定の虚血負荷がかかると (全脳虚血, Global ischemia), ある特定の部位に組織障害が出現することは良く知られており、特に大脳皮質 (第3, 5, 6層), 海馬 (CA1, CA4), 小脳 (プルキンエ細胞) などが虚血に対して極めて脆弱であることが Brierley & Graham⁶⁾ によって示されている。中でも海馬 CA1 sector は虚血負荷のみならず、痙攣重積状態の際にも不可逆的障害が出現することで⁶⁾, Sommer's sector とも呼ばれ、多くの研究者の興味の対象となった。この選択的脆弱性 (Selective Vulnerability) を説明するのに現在二つの仮説がある。その一つは Spielmeyer⁷⁾ の言う Vascular theory であり、他の一つは, Vogt⁸⁾ の提唱する Pathocllisis theory ないし Topistic theory である。前者は解剖学的に脳各部位毎に血管構築上の差異があるとする説で、海馬の血管構築は、細く長い動脈が屈曲・蛇行して走行するため、血流動態が障害され易く、一見脳全体の均一な虚血であっても、海馬のみが特に強い虚血に陥り、傷害が出現する⁹⁾ というものである。それに対して後者では、虚血の程度そのものには差がないが、細胞自体が元々持つ物理化学的性質に差異があり、虚血に対して脆弱性を反映する

というものである。砂ネズミを用いた本実験系でも検討されているが¹⁰⁾, 現在なおその結論は得られていない。

さらに部位のみならず、脳組織を構成する細胞の種類によっても脆弱性は異なってくる。すなわち神経細胞が虚血に対して最も弱く、次に乏突起膠細胞、その次に星状膠細胞が脆弱であり、逆に血管内皮細胞が最も虚血に対して抵抗性があるとされている¹¹⁾。この細胞毎の脆弱性の差については未だ説明がなされ得てはいないが、少なくとも同部位でも細胞間に脆弱性の差が出現することを考えれば, vascular theory で考えるのは無理があるだろう。

緒言でも述べたごとく、近年の遅発性神経細胞壊死に対する研究は飛躍的に発展しており、虚血性神経細胞障害の中でも確固たる独立した病態として扱われるようになってきている。この爆発的ともいえる研究の展開は、ひとつには本実験系に見られる海馬 CA1 神経細胞壊死の再現性の高さにある。Kirino の報告²⁾ に始まり、その後の他施設での追試¹²⁾ や当教室での成績¹³⁾ および今回の実験結果でもほぼ100%の再現性が認められている。これは砂ネズミが先天的に頸動脈系と椎骨動脈系との間に交通が存在しないという脳血管の解剖学的特徴を有していることに関与している。つまり両側頸動脈閉塞によって前脳の血流量は常に測定不能のレベルにまで低下させることが可能で¹⁴⁾, 脳に一定の虚血条件を負荷することができるためであろう。

また、遅発性神経細胞壊死という新たな考えの導入によって神経組織は虚血ないし無酸素状態に曝されると、その退行変性は数時間のうちに完成されるという、半ば常識化されるにまで至っていた過去における概念が根底から見直されるようになった。したがって、この遅発性神経細胞壊死という極めて緩徐に進行する傷害形式は、いかなる病態から成立しているのかが大きな興味となってきた。現在この機序として、興奮性アミノ酸 (Excitotoxin) の存在が注目されている¹⁵⁾。脳は虚血暴露によって神経伝達物質が多量に放出されるようになるが¹⁶⁾, グルタミン酸やアスパラギン酸などの興奮性アミノ酸は生理学的必要量以上に過量になれば、それだけで神経組織に傷害を与えるようになることが, Olney et al.¹⁵⁾ によって報告されている。一方、海馬 CA1 錐体細胞の樹状突起が、これらの興奮性アミノ酸に対する受容器を高密度に有しているという事実も明らかにされており¹⁷⁾, 海馬 CA1 錐体細胞の遅発性神経細胞壊死は、虚血によって多量に放出されたグルタミン酸が、その樹状突起に興奮毒性を与え、そのため漸次神経細胞壊死に至っていくと考えられる。更にこれを支持する事実として、

本実験と同一の実験系において、虚血後の海馬 CA1 の活動電位の発射頻度が虚血後 7 時間から 24 時間後にむしろ増加するという報告¹⁹⁾、虚血後にグルコースの代謝亢進がみられること¹⁹⁾、さらに虚血によって海馬の細胞外グルタミン酸濃度が上昇すること²⁰⁾などの報告がある。

他の注目されている機序として、細胞内蛋白合成障害が考えられている。本実験系で虚血後 2 時間および 4 時間後に海馬 CA1 錐体細胞のアミノ酸の取り込みが著明に低下していること²¹⁾や、虚血直後から海馬全体に蛋白代謝の障害が出現し、歯状回や CA3 ではやがて回復がみられるのに対して、CA1 では 12 時間後でも回復は認めなかったこと²²⁾などが報告されており、虚血後早期に形態学的にも生理学的にも一見正常に生存しているとみえる細胞においても、実は不可逆的な蛋白合成異常が進行していると考えられている。著者の今回の実験結果で示したように、虚血負荷後 1 時間という、極めて早期の時相においてさえ、錐体細胞ですでに polyribosome の開離という超微細構造上の変化が捉えられている。正常に活動する神経細胞において、蛋白合成が低下する時期では polyribosome は開離して monoribosome 化し、合成能力が復帰すると再び polyribosome を形成するという考え方²³⁾からすれば、本結果は錐体細胞の早期の蛋白合成異常を示唆する形態学的所見であると考えられる。

星状膠細胞の形態学的研究の歴史は神経細胞と同等に永く、その機能に関しても、多くの同意を得られた概念としてはほぼ普遍化しつつある。すなわち星状膠細胞の機能として、1) 神経細胞に対する機械的支持、2) 代謝的支持、3) 機能的絶縁作用、4) 細胞外液環境の維持などが考えられてきており、また近年では神経伝達物質の取り込み²⁴⁾、インターロイキンの放出²⁵⁾、血液脳関門の構築²⁶⁾など新しい考え方も提唱されている。さらに注目すべき知見としてグルタミン酸の取り込み、代謝が報告されており²⁷⁾²⁸⁾、遅発性神経細胞壊死における興奮性アミノ酸の役割を考える上で、極めて興味深い。

このように多様な機能を有する星状膠細胞は脳虚血という大きな侵襲に対していかなる形態変化をきたし、かつ、またいかなる機能を展開するのであろうか。虚血負荷に対する星状膠細胞の変化も古くから知られ、その多くは早期からの細胞膨化とされている²⁹⁾³⁰⁾³¹⁾³²⁾³³⁾³⁴⁾³⁵⁾³⁶⁾³⁷⁾³⁸⁾³⁹⁾。しかし、このいずれもが前述の古典的 Ischemic neuronal damage に伴う変化であり、この場合星状膠細胞も最終的には死滅してゆく運命にある。また神経細胞と同様に星状膠細胞の形態学的変化も急速に進むため、経時的な微細構造変化も今まで十分に捉えることは不可能であった。したがって遅発性神

経細胞壊死という緩徐な進行を辿る新たな病態が認識されるに至って、初めて星状膠細胞の経時的な形態学的研究が可能となった。この種の研究は現在までには、ラットでの一報告を見るのみで⁴⁰⁾、砂ネズミでの研究はいまだ報告されていない。

今回の著者の実験結果でまず明らかにされた経時的変化は、時間的二相性を示す細胞膨化である。極めて早期である虚血負荷 1 時間後での細胞膨化は著明であり、かつ、粗面小胞体内腔、核周囲腔の開大を伴っていた。この所見に関しては、虚血による非特異的変化ないし灌流固定時の人工産物の可能性も考えられるのであるが、同条件下で灌流固定した対照群の海馬でも、また、虚血負荷を加えた砂ネズミの頭頂葉でも、これらの所見は全く得られなかったことを考え合わせれば、やはり灌流固定の人工産物とは考え難く、虚血に対する特異的反応の表現として捉えることもできるであろう。この特異的反応を虚血に対する組織の反応性 satellitosis という概念から考察すると、次のように考えられる。先述のごとく本実験系で、虚血後には興奮性アミノ酸であるグルタミン酸の細胞外濃度が上昇し、活動電位の発射頻度はむしろ増加する、つまり神経細胞は過興奮状態となることが明らかにされている。星状膠細胞の機能として神経細胞に対する機能的絶縁作用が挙げられ、また急性灰白髄炎や軸索切断などの特殊な病的状態においては、星状膠細胞は神経細胞への被覆を多くし、外からのインパルスの影響を少なくして、神経細胞が回復するまで孤立、保護する機能を発揮するとも考えられている⁴¹⁾。したがって、この時相にみられる星状膠細胞の細胞膨化は、細胞外グルタミン酸濃度が上昇し、過興奮に追い込まれようとしている神経細胞をその被覆作用によって守ろうとする、保護機能の表れとも考えることができるであろう。虚血負荷後期の 96 時間後の細胞膨化に関しては、虚血負荷 48 時間後から、神経細胞はすでに活動電位の発射は認めず機能的には活動停止した状態となり、96 時間後では、形態学的にも細胞死を呈していることを考えれば、この時期に、星状膠細胞が神経細胞に対する保護作用を表出しているとは考え難く、むしろ海馬全体の細胞外環境のホメオスタシスおよび組織構築を保つために発生した、組織修復反応の初期変化として捉えるべきであろう。事実、虚血後 1 ヶ月以上を経た動物でその光顕像をみると、海馬 CA1 領域は殆ど総て星状膠細胞で占められ、いわゆるグリオージスの組織像を呈している。また Fig. 2 で示すごとく、細胞膨化はすでに 24 から 48 時間後にかけて出現し始めていると考えられ、これは神経細胞が急速にその自発放電を失う時期と一致している。すなわち、

神経細胞が機能的に活動を停止したことを契機にして、通常の星状膠細胞が反応性星状膠細胞へ転換した姿であると考えられる。Ikuta et al.⁴²⁾ は、星状膠細胞の形態学を考察する場合、その星状膠細胞が正常のものなのか、あるいはなんらかの侵襲が加わった後の反応性のものなのかを区別することが重要であるとしている。彼らは、正常状態にある星状膠細胞がひとたび病的状態に陥った際には、M 期を通過して細胞分裂し、反応性星状膠細胞に移行して組織修復にあたるとしている。この考えからすれば、本結果に示された 24 時間後からの細胞膨化は、反応性星状膠細胞であるとも理解される。本実験で追跡した星状細胞において、虚血 12 時間後に著明な核変化を認め、虚血 24 時間後に paired nuclei を持った細胞が観察された。この所見だけで細胞分裂を推定するのは困難であるが、paired nuclei をもってごく近い過去時相での細胞分裂が推察できるという意見や⁴³⁾、同種の実験でも、同様に paired nuclei の存在で星状膠細胞の核分裂を推定している報告⁴⁰⁾ もみられている。

核変形に続く paired nuclei の出現、細胞膨化、そしてその後のグリオージスを一連の反応性星状膠細胞の形態変化の流れとするならば、その組織修復活動は虚血 12 時間後にすでに始まっていたと考えざるを得ない。本実験モデルにおける虚血 12 時間後という時相は、神経細胞は形態学的に正常で、活動電位も高頻度に発射しており、蛋白合成障害を除けば、少なくとも解剖学的、また生理学的には生存している状態である。したがって、遅発性神経細胞壊死における細胞死のなんらかの情報が、すでに 12 時間後には星状膠細胞に伝わっているであろう。その一つの可能性として、蛋白合成の異常が挙げられるだろう。脳に虚血が加わった場合、正常の蛋白合成は障害されているにもかかわらず、heat-shock protein などの異常な蛋白は合成されることが近年明らかにされ⁴⁴⁾、本機序を考える場合興味深く、将来この面での研究が展開するものと予想される。

本実験でのもう一つの注目すべき結果としてミトコンドリアの増生がある。Fig. 3 で示したように、虚血 48 から 96 時間後にかけて著明なミトコンドリアの増加が認められた。なんらかの侵襲が加わった後の星状膠細胞のミトコンドリア増加はよく知られたところであり、脳虚血だけでなく⁴⁵⁾⁴⁶⁾、温熱傷害⁴⁷⁾、高アンモニウム血症⁴⁸⁾⁴⁹⁾⁵⁰⁾⁵¹⁾、放射線傷害⁵²⁾などでも報告されている。その意義付けに関しては未だ不明な点が多いが、一般的には代謝の亢進状態を表していると考えられている⁴⁰⁾。今回の実験では虚血負荷 12 時間後からの増加が認められており、その時相および先述の考察からして、やはり反応

性星状膠細胞の活発な修復活動を反映しているのであろう。ミトコンドリアの増生様式は従来から、1) 既存のミトコンドリアが分割される、2) 他の何等かの細胞小器官から変化する、3) 全く新しく生成される、などの基本的な考え方があり、それぞれを主張する多くの報告がある。しかし、各々の細胞の種類や環境条件によって増生様式は異なり、画一的なものではないと考えるべきであろう。Pannese⁵³⁾ はこのミトコンドリアの増生様式として membranous whorls という特異構造を記載しており、この報告では鶏胚子の脊髄神経節神経芽細胞において、ミトコンドリアの著明な増加に先行して、この membranous whorl が出現し、新生ミトコンドリアの産生の場であると結論している。今回、著者の実験結果で観察された中心にミトコンドリア様物質を含んだ 2 重膜螺旋状構造は、Pannese が記載した membranous whorl と類似しており、その機能を考察する上で興味深い。

脳虚血性傷害における星状膠細胞の形態変化は古くから知られているが、早期からの細胞膨化という、比較的単純な認識でしかなかった。しかし今回このような、遅発性神経細胞壊死という極めて緩徐な進行を辿る海馬 CA1 の星状膠細胞を経時的に観察してみると、その早期においては過興奮性で危険な状態となっている神経細胞を救出しようとする反応を表し、12 時間後を過ぎれば、反応性星状膠細胞となり組織修復に働くようにと機能の転換がおこる。元来多くの機能が備わっているとされる星状膠細胞であるが、一造の病態のなかにあっても、その時相によって機能は変遷しうるものと推察された。

結 語

1. 両側頸動脈 5 分間閉塞による砂ネズミ海馬 CA1 遅発性神経細胞壊死モデルにおいて、経時的な組織変化を星状膠細胞を中心として、電顕的に検討した。
2. 従来からの報告通り、虚血 96 時間後には海馬 CA1 sector のみに選択的神経細胞壊死が、ほぼ 100% の再現性で認められた。
3. 虚血 1 時間後に著明な星状膠細胞の細胞膨化がみられ、その後 6 時間後までに消退し、これは過興奮の危険に曝されている神経細胞を被覆し、保護する反応と推察された。
4. 虚血 12 時間後から反応性星状膠細胞とみなされる変化が出現し、組織修復作用がすでに始まっているものと推論された。
5. 本病態は、神経細胞の細胞壊死への一連の変化であるが、星状膠細胞はその時相によって、神経細胞に対する保護機能から、組織修復機能へと、機能的な変遷を

辿るものであることが示唆された。

本論文の要旨は、第46回日本脳神経外科学会総会(1987, 東京)、第13回日本脳卒中学会総会(1988, 東京)、第14回日本脳卒中学会総会(1989, 東京)において発表した。稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導、御構閱を賜った恩師内海庄三郎教授に深甚の謝意を捧げるとともに、御指導、御校閲を賜った第2解剖学教室山本浩司教授、第2病理学教室日浅義雄教授に深謝致します。さらに御助言、御指導頂いた第2外科学教室京井喜久男助教授、多田隆興講師に感謝致します。

文 献

- 1) **Duchen, L. W.** : General pathology of neurons and neuroglia. *in* Greenfield's Neuropathology (Adams, J. H., Corselli, J.A.N. and Duchen, L. W., eds.). 4th. ed., Edward Arnold, London, p. 1-52, 1984.
- 2) **Kirino, T.** : Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* **239** : 57-69, 1982.
- 3) **Pulsinelli, W. A., Brierley, J. B. and Plum, F.** : Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann. Neurol.* **11** : 491-498, 1982.
- 4) **Loskota, W. J., Lomax, P. and Verity M. A.** : A Stereotaxic Atlas of the Mongolian Gerbil Brain (*Meriones unguiculatus*). *Ann. Arbor Science, Ann. Arbor*, 1974.
- 5) **Brierley, J. B. and Graham, D. I.** : Hypoxia and vascular disorders of the central nervous system. *in* Greenfield's Neuropathology (Adams, J. H., Corselli, J.A.N. and Duchen, L. W., eds.). 4th. ed., Edward Arnold, London, p. 125-207, 1984.
- 6) **Sommer, W.** : Erkrankung des Ammonshorns als ätiologisches Moment der Epilepsie. *Arch. Psychiatry* **10** : 631-675, 1880.
- 7) **Spielmeyer, W.** : Zur Pathogenese der örtlich elektiver Gehirnveränderungen. *Z. Ges. Neurol. Psychiatrie* **99** : 756-776, 1925.
- 8) **Vogt, O.** : Der begriff der Pathoklise. *J. Psychol. Neurol.* **31** : 245-255, 1925.
- 9) **Uchimura, J.** : Über die Gefäßversorgung des Ammonshornes. *Z. Ges. Neurol. Psychiatrie* **112** : 1-19, 1928.
- 10) **Imdahl, A. and Hossmann, A.** : Morphometric evaluation of post-ischemic capillary perfusion in selectively vulnerable areas of gerbil brain. *Acta Neuropathol.* **69** : 267-271, 1986.
- 11) **Jacob, H.** : CNS tissue and cellular pathology in hypoxemic states. *in* Selective Vulnerability of the Brain in Hypoxemia (Schadé, P. and McMenemey, W. P., eds.). F. A. Davis Co., Philadelphia, p. 153-176, 1963.
- 12) **Rudolphi, K. A., Keil, M. and Hinze, H. J.** : Effect of theophylline on ischemically induced hippocampal damage in mongolian gerbils: A behavioral and histopathological study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **7** : 74-81, 1987.
- 13) **Hiramatsu, K., Kyoji, K., Utumi, S., Okuchi, K. and Kim, Y. K.** : The calcium antagonist, Diltiazem attenuates hippocampal damage following cerebral ischemia in the gerbil. *Jpn. Pharmacol. Ther.* **17** : 1733-1739, 1989.
- 14) **Crockard, A., Iannotti, F., Hunstock, A. T., Smith, R. D. and Harris, R. J.** : Cerebral blood flow and edema following carotid occlusion in the gerbil. *Stroke* **11** : 494-498, 1980.
- 15) **Olney, J. W., Ho, O. L. and Rhee, V.** : Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp. Brain Res.* **14** : 61-76, 1971.
- 16) **Kogure, K., Scheinberg, P., Matsumoto, A., Busto, R. and Reinmuth, O. M.** : Catecholamines in experimental brain ischemia. *Arch. Neurol.* **32** : 21-24, 1975.
- 17) **Monaghan, D. T., Holets, V. R., Toy, D. W. and Cotman, C. W.** : Anatomical distributions of four pharmacologically distinct 3H-L-glutamate binding sites. *Nature* **306** : 176-179, 1983.
- 18) **Suzuki, R., Yamaguchi, T., Li, C. L. and Klatzo, I.** : The effect of 5-minutes ischemia in mongolian gerbils. II. Changes of spontaneous neuronal activity in cerebral cortex and CA1 sector of hippocampus. *Acta Neuropathol.* **60** : 217-222, 1983.
- 19) **Diemer, N. H. and Siemkowitz, E.** : Increased 2-deoxyglucose uptake in hippocampus, globus pallidus and substantia nigra after cerebral ischemia. *Acta Neurol. Scand.* **61** : 56-63, 1980.

- 20) **Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A. and Diemer, N. H.** : Evaluation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* **43** : 1369-1374, 1984.
- 21) **Bodsch, W. and Takahashi, K.** : Selective neuronal vulnerability to cerebral protein- and RNA-synthesis in the hippocampus of the gerbil brain. *in Cerebral Ischemia* (Bes, A., Braquet, P., Paoletti, P. and Siesj1/2, B.K., eds.). Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam, p. 197-208, 1984.
- 22) **Thilmann, R., Xie, Y., Kleihues, P. and Kiessling, M.** : Persistent inhibition of protein synthesis precedes delayed neuronal death in postischemic gerbil hippocampus. *Acta Neuropathol.* **71** : 88-93, 1986.
- 23) **Palay, S. L., Billings-Gagliardi, S. M. and Chan-Palay, V.** : Neuronal perikarya with dispersed, single ribosomes in the visual cortex of *Macaca mulatta*. *J. Cell Biol.* **63** : 1074-1089, 1974.
- 24) **Currie, D. N. and Kelly, J. S.** : Glial versus neuronal uptake of glutamate. *J. Exp. Biol.* **95** : 181-193, 1981.
- 25) **Fierz, W. and Fontana, A.** : The role of astrocytes in the interaction between the immune and nervous system. *in Astrocytes* (Fedoroff, F. and Vernadakis, A., eds.). vol. 3, Academic Press, New York, p. 203-229, 1986.
- 26) **Janzer, R. C. and Raff, M. C.** : Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* **325** : 253-255, 1987.
- 27) **Schousboe, A.** : Glutamate, GABA and taurine in cultured normal glial cells. *in Dynamic Properties of Glial Cells* (Schoffeniels, E., Franck, G., Towers, D. B. and Hertz, L., eds.). Pergamon, New York, p. 173-182, 1978.
- 28) **Schousboe, A., Svenneby, G. and Hertz, L.** : Uptake and metabolism of glutamate in astrocytes cultured from dissociated mouse brain hemispheres. *J. Neurochem.* **29** : 999-1005, 1977.
- 29) **Arsenio-Nunes, M. L., Hossmann, K. A. and Farkas-Bargeton, E.** : Ultrastructural and histochemical investigation of the cerebral cortex of cat during and after complete ischaemia. *Acta Neuropathol.* **26** : 329-344, 1973.
- 30) **Brown, A. W. and Brierley, J. B.** : Anoxic-ischemic cell change in rat brain: light microscopic and fine structural observations. *J. Neurol. Sci.* **16** : 59-84, 1972.
- 31) **Dodson, R. F., Aoyagi, M., Hartmann, A. and Tagashira, Y.** : Acute cerebral ischemia and hypotension. An ultrastructural study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **33** : 400-407, 1974.
- 32) **Dodson, R. F., Chu, L., Welch, K.M.A. and Acher, S.** : Acute tissue response to cerebral ischemia in the gerbil. *J. Neurol. Sci.* **33** : 161-170, 1977.
- 33) **Garcia, J. K., Kalimo, H., Kamijyo, Y. and Trump, B. F.** : Cellular events during partial cerebral ischemia. I. Electron microscopy of feline cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion. *Virchows Arch.* **25** : 191-206, 1977.
- 34) **Kalimo, H., Garcia, J. H., Kamijyo, Y., Tanaka, J. and Trump, B. F.** : The ultrastructure of "brain death." II. Electron microscopy of feline cortex after complete ischemia. *Virchows Arch.* **25** : 207-220, 1977.
- 35) **Kalimo, H., Paljarvi, L. and Vapalahti, M.** : The earliest ultrastructural alterations in the rabbit cerebral and cerebellar cortex after compression ischemia. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **5** : 211-223, 1979.
- 36) **Little, J. R., Kerr, F. W. and Sundt, T. M.** : Significance of neuronal alterations in developing cortical infarction. *Mayo Clin. Proc.* **49** : 827-837, 1974.
- 37) **Little, J. R., Sundt, T. M. and Kerr, F. W.** : Neuronal alterations in developing cortical infarction. *J. Neurosurg.* **40** : 186-198, 1974.
- 38) **McGee-Russell, S. M., Brown, A. W. and Brierley, J. B.** : A combined light and electron microscopic study of early anoxic-ischemic cell change in rat brain. *Brain Res.* **20** : 193-200, 1970.
- 39) **Petito, C. K.** : Early and late mechanisms of increased vascular permeability following experi-

- mental cerebral infarction. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **38**: 222-234, 1979.
- 40) **Petito, C. K. and Babiak, T.**: Early proliferative changes in astrocytes in postischemic noninfarcted rat brain. *Ann. Neurol.* **11**: 510-518, 1982.
- 41) **Hirano, A.**: A guideline to neuropathology. 2nd ed., Igaku-Shoin, New York, p. 70, 1981.
- 42) **Ikuta, F., Ohara, E., Yamazaki, K., Takeda, S., Egawa, S. and Ichikawa, T.**: Morphology of migrating glial cells in normal development, neoplasia and other disorders, *in* *Progress in Neuropathology* (Zimmerman, H. M., ed.) vol. 4, Raven Press, New York, p. 377-405, 1979.
- 43) **Pittella, J.E.H. and Brasileiro-Filho, G.**: The significance of paired astrocyte nuclei in normal human nervous tissue. *J. Anat.* **151**: 101-105, 1987.
- 44) **Kiessling, M., Dienel, G.A., Jacewicz, M. and Pulsinelli, W. A.**: Protein Synthesis in postischemic rat brain: A two-dimensional electrophoretic analysis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **6**: 642-649, 1986.
- 45) **Shay, J.**: Morphometry of an ischemic lesion of cat spinal cord. *Am. J. Pathol.* **72**: 397-402, 1973.
- 46) **Shay, J. and Gonatas, N. K.**: Electron microscopy of cat spinal cord subject to circulatory arrest and deep local hypothermia. *Am. J. Pathol.* **72**: 369-396, 1973.
- 47) **Blakemore, W. F.**: The ultrastructural appearance of astrocytes following thermal lesions of rat cortex. *J. Neurol. Sci.* **12**: 319-332, 1971.
- 48) **Laursen, H. and Diemer, N. H.**: Morphometric studies of rat glial cell ultrastructure after urease-induced hyperammonaemia. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **5**: 345-362, 1979.
- 49) **Norenberg, M. D.**: A light and electron microscopic study of experimental portal-systemic (ammonia) encephalopathy. *Lab. Invest.* **36**: 618-627, 1977.
- 50) **Norenberg, M. D. and Laphman, L. W.**: The astrocytic response in experimental portosystemic encephalopathy: an electron microscopic study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **33**: 422-435, 1974.
- 51) **Zamara, A. J., Cavanagh, J. B. and Kyu, M. H.**: Ultrastructural responses of the astrocytes in portocaval anastomosis in the rat. *J. Neurol. Sci.* **18**: 25-45, 1973.
- 52) **Maxwell, D. S. and Kruger, L.**: The fine structure of astrocytes in the cerebral cortex and their response to focal injury produced by heavy ionizing particles. *J. Cell Biol.* **25**: 141-157, 1965.
- 53) **Pannese, E.**: Structures possibly related to the formation of new mitochondria in spinal ganglion neuroblasts. *J. Ultrastruct. Res.* **15**: 57-65, 1966.

Explanation of photographs

- Photo 1. a. Photomicrograph of normal gerbil's hippocampus in coronal section. Subdivision of conus ammonius (CA) is indicated by its abbreviation. (Hematoxylin-Eosin stain $\times 30$)
b. Photomicrograph of hippocampus 96 hours after transient forebrain ischemia. Note the pyknotic necrosis of pyramidal cells in the CA1 sector. (Hematoxylin-Eosin stain $\times 30$)
- Photo 2. CA1 pyramidal cells (neurons) of the control animal have an oval nucleus with homogeneously dispersed karyoplasm. The cytoplasm contains a few rough endoplasmic reticulum and other organelle. Bar= $5\ \mu\text{m}$.
- Photo 3. CA1 astrocyte of the control animal has an oval nucleus with finely dispersed chromatin and a thin rim of condensed chromatin at the nuclear membrane. The cytoplasm is scant and relatively electron lucent. Bar= $2\ \mu\text{m}$.
- Photo 4. CA1 pyramidal cell 1 hour after ischemia shows dispersed free monoribosomes rather than polyribosomes. Bar= $1\ \mu\text{m}$.
- Photo 5. CA1 astrocyte 1 hour after ischemia. Remarkable cytoplasmic swelling is observed. Bar= $1\ \mu\text{m}$.
- Photo 6. CA1 astrocytes 2 hours after ischemia. Widenings of perinuclear space and cistern of rough endoplasmic reticulum are still seen, but cytoplasmic swelling is relatively decreased. Bar= $2\ \mu\text{m}$.
- Photo 7. CA1 astrocyte 3 hours after ischemia. Swelling of the mitochondria and the widening of its intercrystal space is noted. Bar= $1\ \mu\text{m}$.
- Photo 8. CA1 pyramidal cell 3 hours after ischemia shows moderate increase of rough endoplasmic reticulum and then its electron density of cytoplasm. Bar= $2\ \mu\text{m}$.
- Photo 9. Membranous "whorl" structure that contains mitochondria-like substance is seen within the astrocytic end-foot 6 hours after ischemia. Bar= $2\ \mu\text{m}$.
- Photo 10. CA1 astrocyte 12 hours after ischemia shows a marked configurational change of the nucleus. Bar= $2\ \mu\text{m}$.
- Photo 11. CA1 pyramidal cell 24 hours after ischemia. A parallel stack of the granular endoplasmic reticulum occupies the perikarya. Bar= $5\ \mu\text{m}$.
- Photo 12. CA1 astrocyte 24 hours after ischemia demonstrating the "paired nuclei" pattern. Bar= $1\ \mu\text{m}$.
- Photo 13. CA1 astrocyte 48 hours after ischemia revealing moderate cytoplasmic swelling and the increase of the number of mitochondria. Bar= $5\ \mu\text{m}$.
- Photo 14. CA1 sector 96 hours after ischemia. Although the pyramidal cell (N) shows almost entire destruction of its structure, the astrocyte (A) is still intact. Bar= $2\ \mu\text{m}$.
- Photo 15. Parietal cortex 96 hours after ischemia. Both the neuron (N) and the astrocyte (A) preserve their structures. Bar= $5\ \mu\text{m}$.

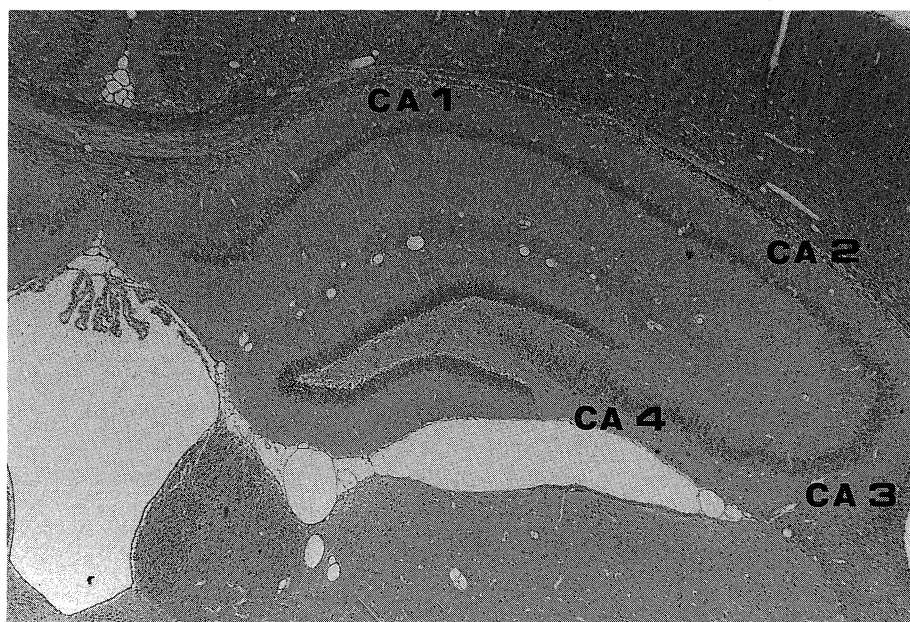


Photo 1a.



Photo 1b.

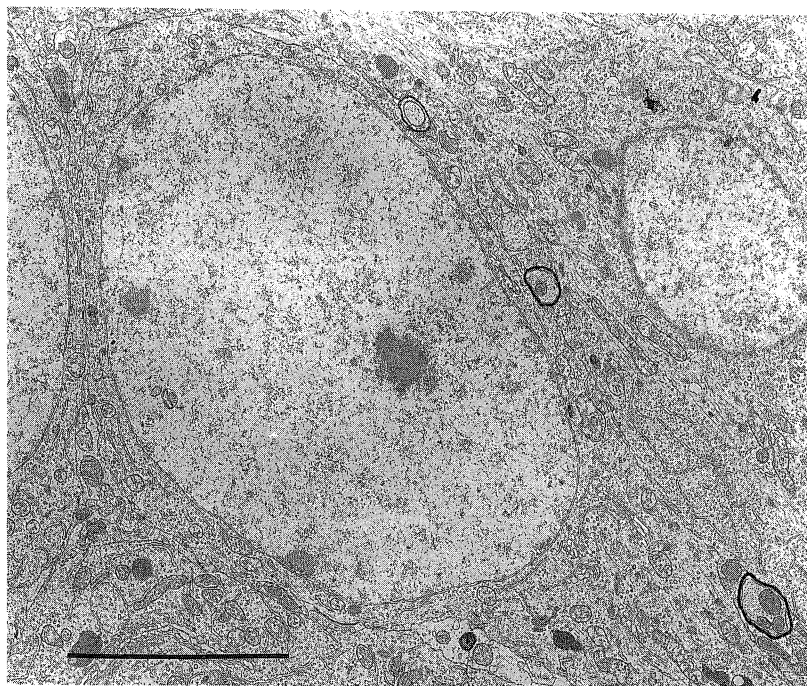


Photo 2.

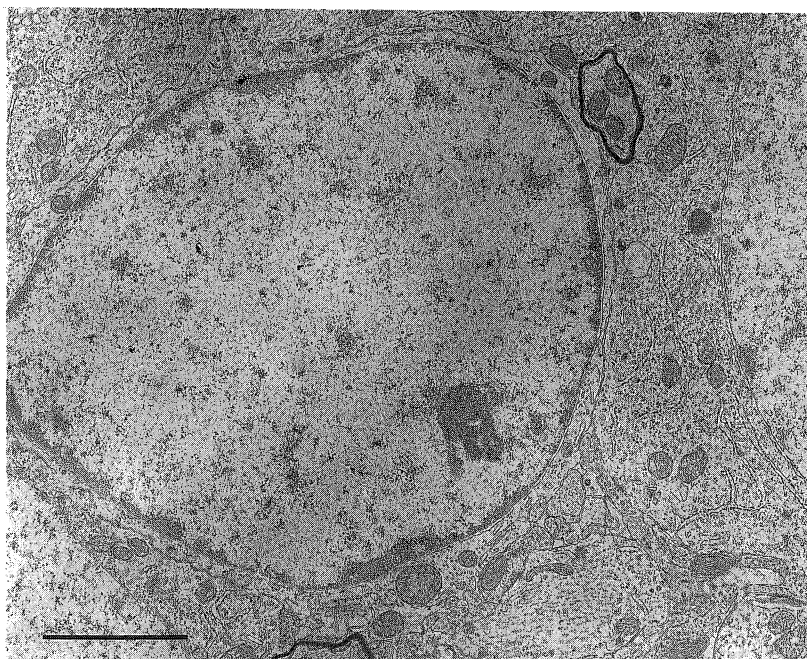


Photo 3.

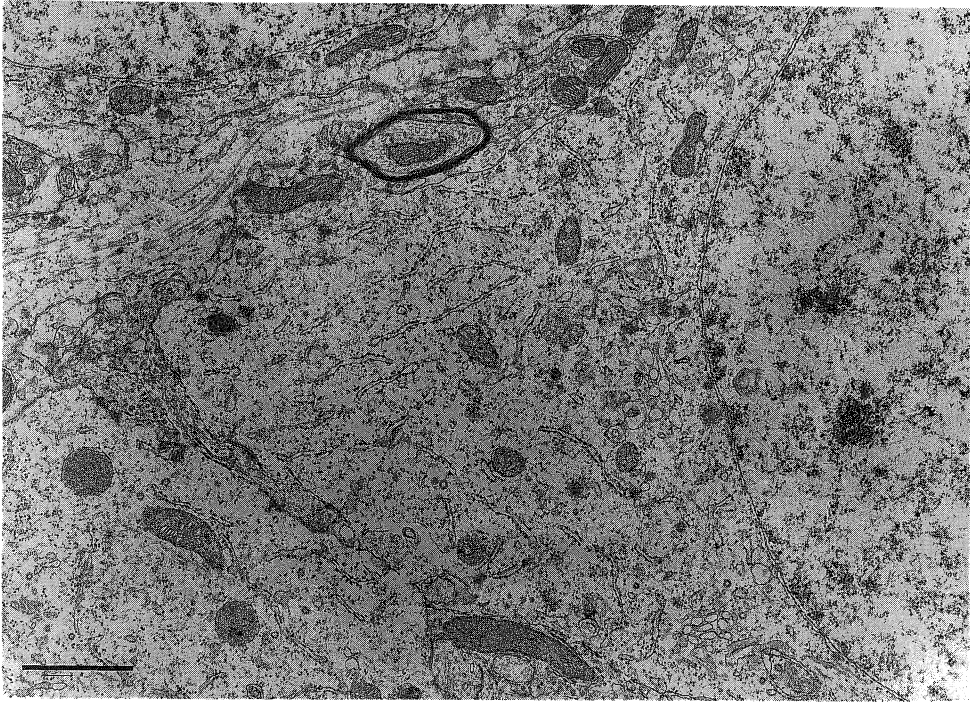


Photo 4.

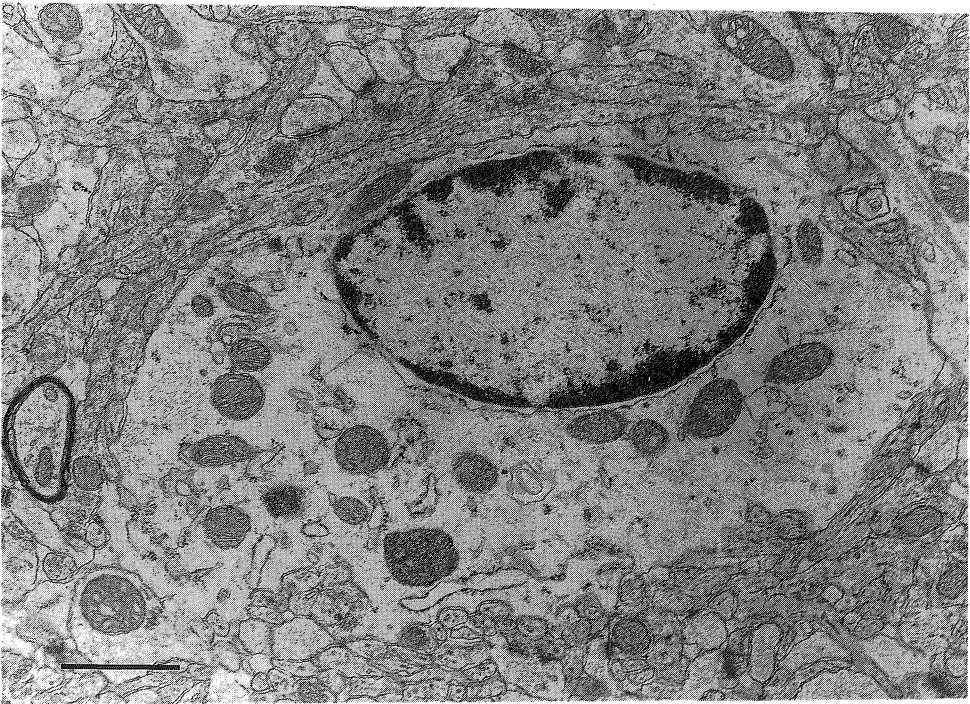


Photo 5.

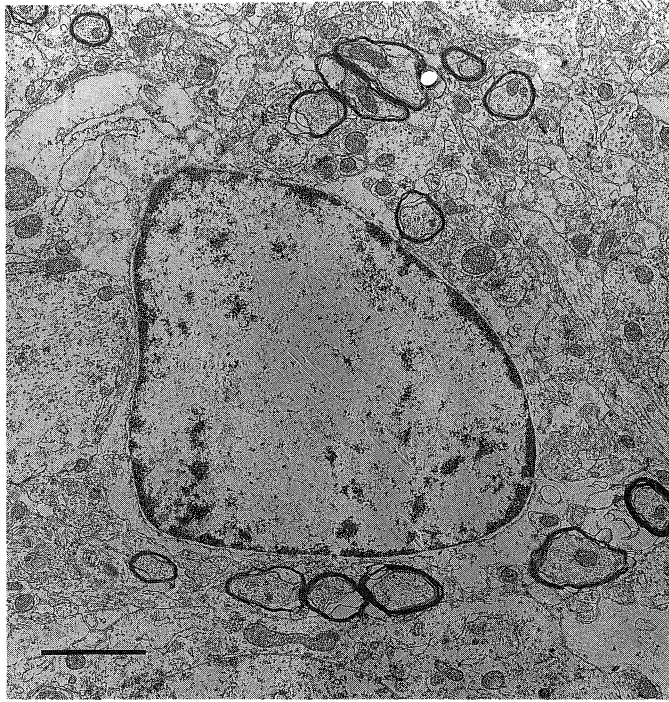


Photo 6.

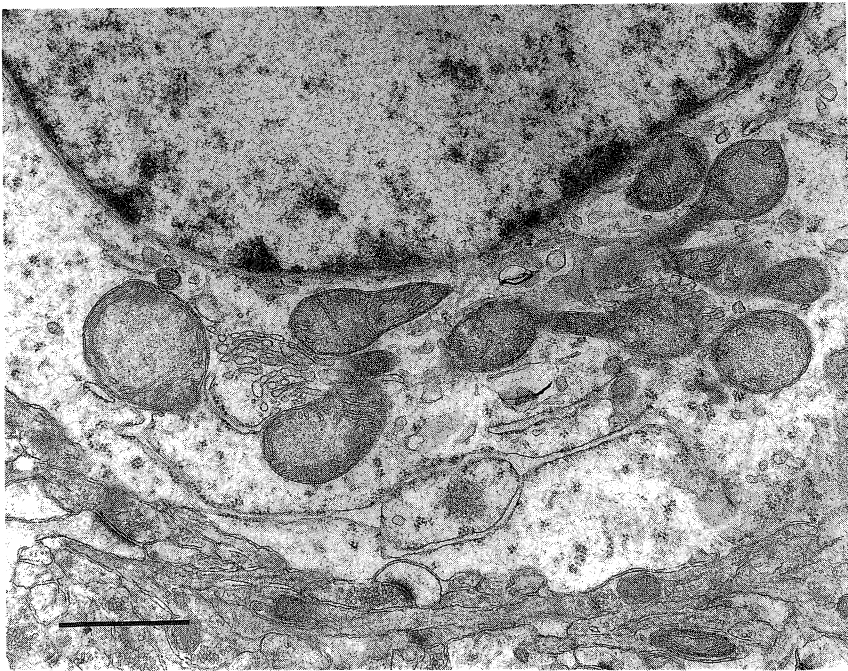


Photo 7.

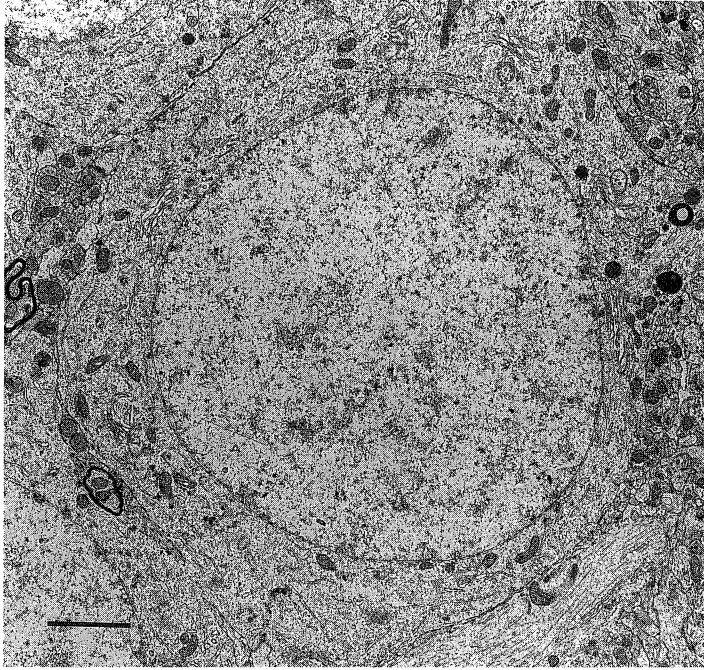


Photo 8.

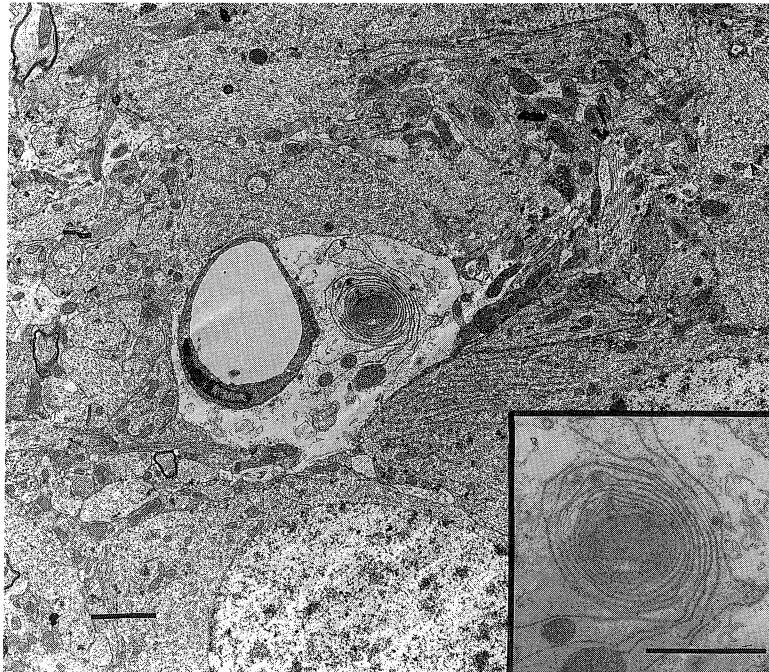


Photo 9.

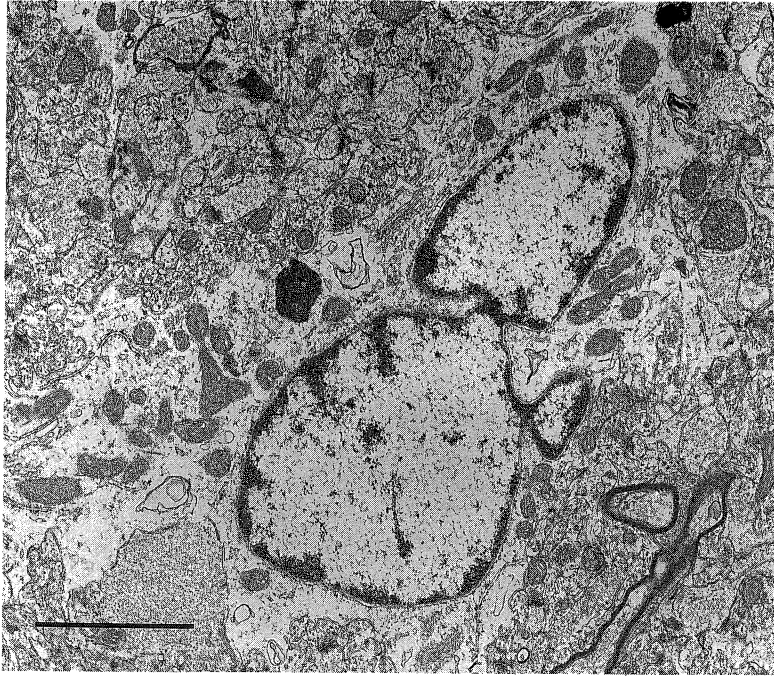


Photo 10.

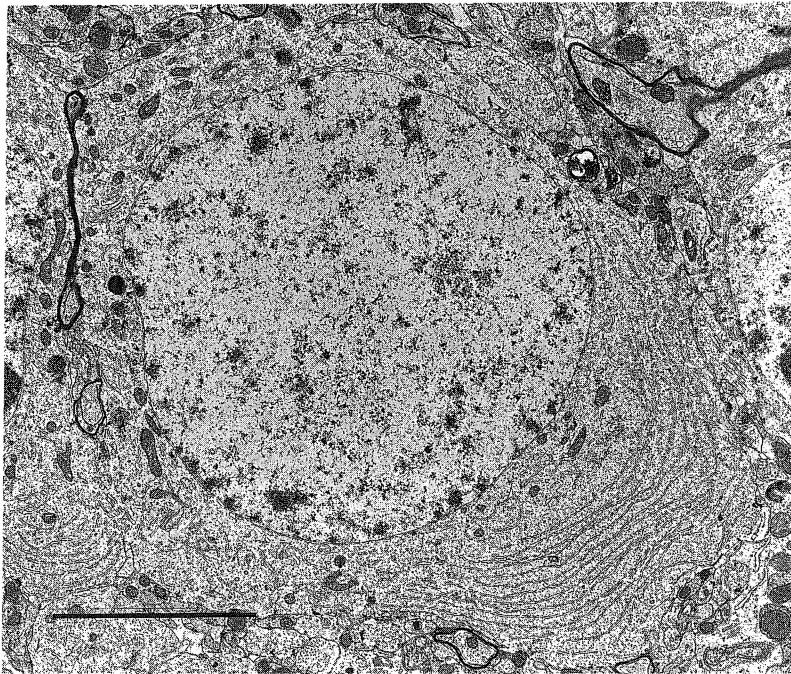


Photo 11.

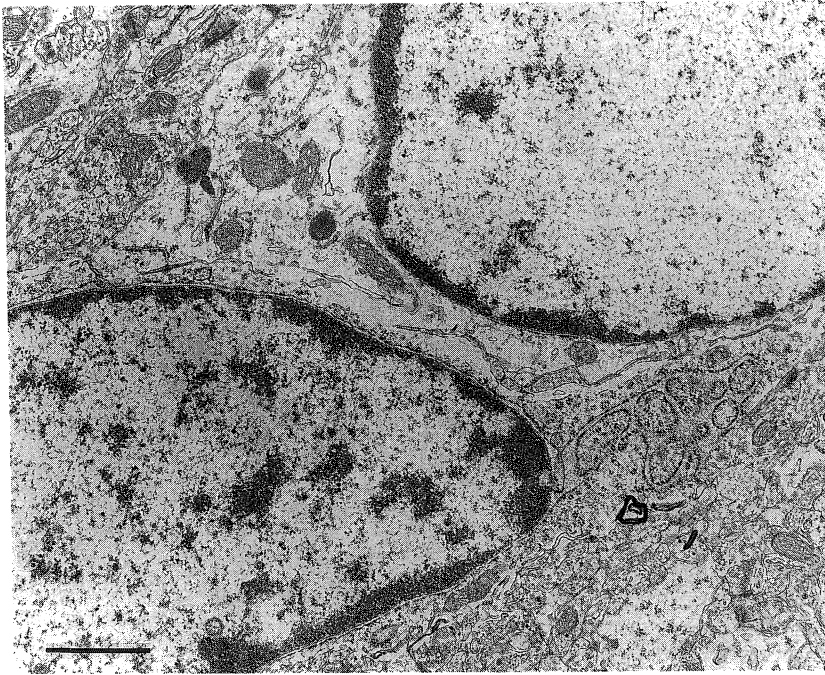


Photo 12.

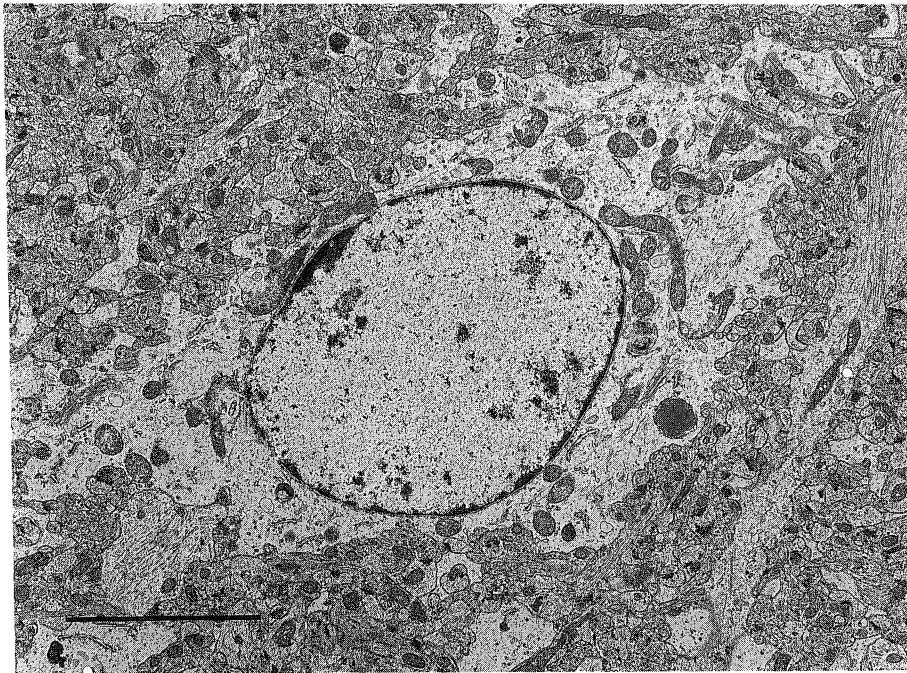


Photo 13.

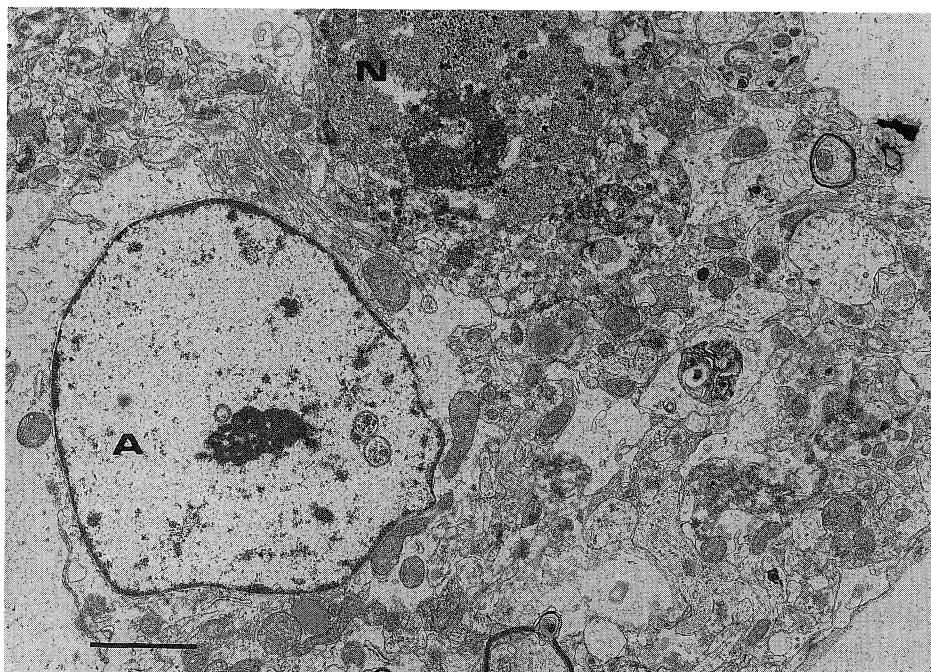


Photo 14.

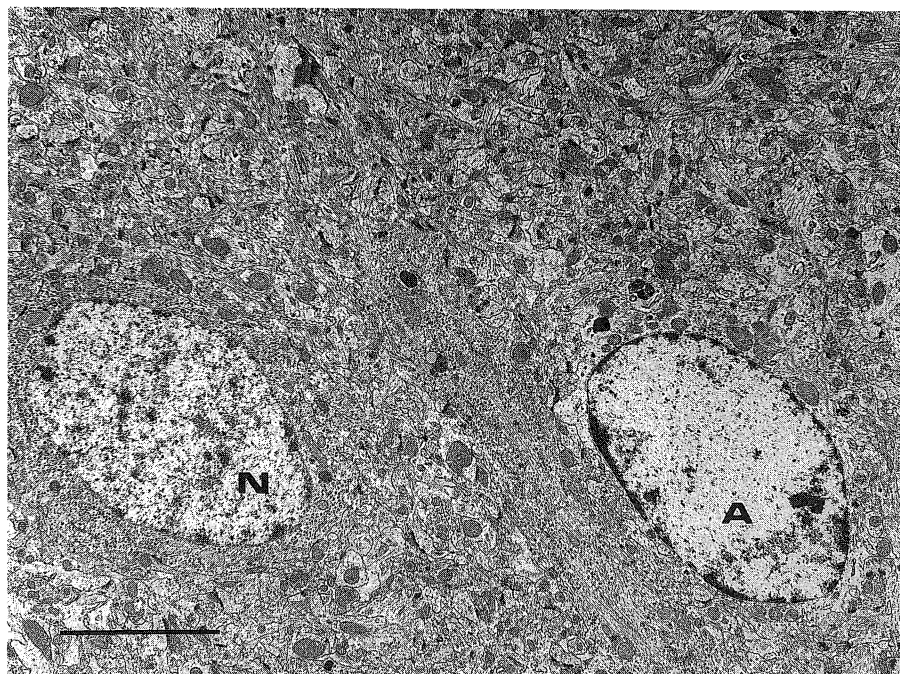


Photo 15.