

スナネズミの一過性前脳虚血における海馬グリア細胞の変化 発達段階を中心として

山本 理江¹⁾, 朴 真紗美²⁾, 中嶋 康彦¹⁾, 森 渥視¹⁾

1) 滋賀医科大学外科学第二講座

2) 滋賀医科大学解剖学第一講座

The glial reactions after transient ischemia in developing gerbil hippocampus

Rie YAMAMOTO M.D.¹⁾, Masami PARK M.D.²⁾, Yasuhiko NAKAJIMA M.D., Ph.D.¹⁾,
Atsumi MORI M.D., Ph.D.¹⁾

1) Second Department of Surgery, Shiga University of Medical Science

2) First Department of Anatomy, Shiga University of Medical Science

Abstract: In animal models of transients ischemia, selective vulnerability and delayed neuronal death (DND) in the hippocampus have been extensively described. It is well known that the developing brains have tolerance to damage. In the present study, we investigated the critical stage of the damage of DND in the developing gerbils and the differences of glial reactions within a week after transient ischemia in two groups with and without DND. The gerbils suffered from transient ischemia in various postnatal days were all perfused at 10 weeks-old(adult). Histopathological evaluation of DND was performed by cresil violet staining. DND was not seen before 3 weeks-old. Glial reactions were examined immunohistochemically by the antibodies against GFAP, Mac-1 and CNPase, for astrocyte, microglia and oligodendrocyte, respectively. The most interesting reactive changes were observed in GFAP immunostaining. Computer image analysis showed that area fraction of GFAP-positive structures in CA1 region was significantly increased in both ischemic cases with or without DND compared with each sham group. Especially in animals with DND in 3 days after ischmia, the numerous astrocytes were observed even in the lateral half of st. pyramidalis, in which DND was just occurring, as estimated in cresil violet staining. The findings suggest that the astrocytes play an important role in neuronal survival and death after iscemia in both cases with and without DND.

キーワード: 遅発性細胞死, 海馬 CA1, グリア, 発達段階, スナネズミ

Received September 30, 1998: Accepted after revision December 8, 1998

Correspondence: 滋賀医科大学外科学第二講座 山本 理江 〒520 2192 大津市瀬田月輪町

緒 言

脳神経細胞は血流障害に対し極めて脆弱で、なかでも海馬 CA1 領域の錐体細胞は一過性の虚血後、エネルギー状態は速やかに回復するにも関わらず¹⁾ 数日後に細胞死に陥るため遅発性細胞死と呼ばれているが²⁾、そのメカニズムにはまだ解明されていない点が多い³⁾。CA1 領域は記憶に強く関与しており、臨床的にも老人の痴呆との関係が注目されている⁴⁾。一方、グリア細胞は神経細胞と形態的にも機能的にも極めて密接な関係を有しており、脳に何らかの侵襲が加わった後の神経細胞の生死を決める上で非常に重要な役割を担っている^{5,6,7)}。

一般に、発達途上の脳は神経細胞死を起こしにくいと報告されている⁸⁾。また遅発性細胞死はアポトーシスのモデルと考えられ、椎骨動脈との交通を欠く成熟スナネズミを用い多く検討されている^{1,2,9)}。

今回、我々は生後 1 か月以内に一過性前脳虚血をおこしたスナネズミにおいて、海馬に遅発性細胞死をおこす発達上の臨界期を調べ、また遅発性細胞死をおこす際のグリア反応の経時的変化を検討し、前に我々が観察した成熟スナネズミのそれと比較⁹⁾した。

方 法

生後 2 日から 10 週の雌雄スナネズミ (体重 3 ~ 70 g) を 43 匹用い、動物実験はすべて滋賀医科大学動物実験に関する指針に従った。1 ~ 2 % ハロセンにて全身麻酔をかけ、脳温の測定用プローブを側頭筋に挿入し⁶⁾、温度可変装置のマット上に固定した。頸部正中切開後、手術用顕微鏡下に両側総頸動脈を露出した。温度可変装置に乗せて脳温を 37 ± 0.5 に安定させた後、脳外科用動脈瘤クリップにて露出した両側総頸動脈の血流を遮断した。10 分間の虚血後、遮断を解除し頸動脈の血流の再開を確認の後、頸部正中創を縫合閉鎖した。処置後のスナネズミは至適環境下 (室温 24 °C, 夜間消灯) で飼育し、次の如く灌流固定をした。灌流固定は、ネブタール (0.1 ml/100 g) にて麻酔をかけ、0.01 M リン酸緩衝食塩水 (0.01 M PBS) にて左室より脱血、続いて

4 % パラホルムアルデヒド、0.2 % ピクリン酸、0.35 % グルタルアルデヒドを含んだ 0.1 M リン酸緩液 (0.1 MPB) で灌流固定 (4 時間) を行った後、グルタルアルデヒドを含まない同液で 2 日間後固定した。15 % ショ糖液に数日間 (4 週間) 保存し、クリオスタット (Reichert-Jung CRYOCUT 1800) にて 20 μm あるいはマイクロスライサー (DOSAKA, DTK 3000) にて 40 μm の厚さの切片を作成した。

灌流固定を行う時期は以下の 2 群 (A, B 群) に分けて行った。(図 1)

(A) 臨界期を調べる群

生後第 1 週から第 5 週まで各週 3 ~ 4 匹のスナネズミに虚血処置を行い、すべて灌流固定を生後 10 週目に行った。作成した切片をゼラチンスライドグラスに張り付けた後、クレジールバイオレット (CV) で染色した。間脳が含まれてレベルの前頭断面を 4 等分し、それぞれのレベルから 1 切片ずつ選びだし、CA1 全領域における正常錐体細胞数を数え、対照群 (sham operation を行い、同時期に灌流固定をしたもの) の同レベルの切片の錐体細胞数との比を求めた。

(B) 経時的変化を見る群

(A) 群の結果から臨界期前の生後第 1 週から第 3 週までの群 (B 1 群) と臨界期後の生後第 4 週、第 5 週の群 (B 2 群) に分け、B 1 群としては生後 14 日に、B 2 群としては生後 30 日に虚血処置を行ったものを記載した。虚血処置の 1 日後、3 日後、7 日後に灌流固定を行い対照群としては sham operation の 1 時間後、1 日後、3 日後、7 日後に灌流固定を行ったものを用いた。各日 3 匹、対照群は各 1 匹の計 26 匹のスナネズミを用い、CV 染色を行った。細胞数に関する数値は (A) 群と同様、対照群との比である。グリア細胞に対する免疫組織化学としては次の如く行った。

作成された切片を 0.3 % トリトンを含む 0.1 M PBS に 4 日以上浸漬し、5 % の normal serum を 30 分間作用させた。1 次抗体として星状膠細胞 (アストログリア) には抗 Glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体 (Chemicon) の、稀突起膠細胞 (オリゴデンドログリア) には抗 CNPase 抗体 (Quarttet) の 10,000 倍希釈液に 4 日間、小膠細胞 (ミクログリア) には抗 Mac-1 抗体 (Beringer) の 2,000 倍希釈液に 24 時間、いずれも 4

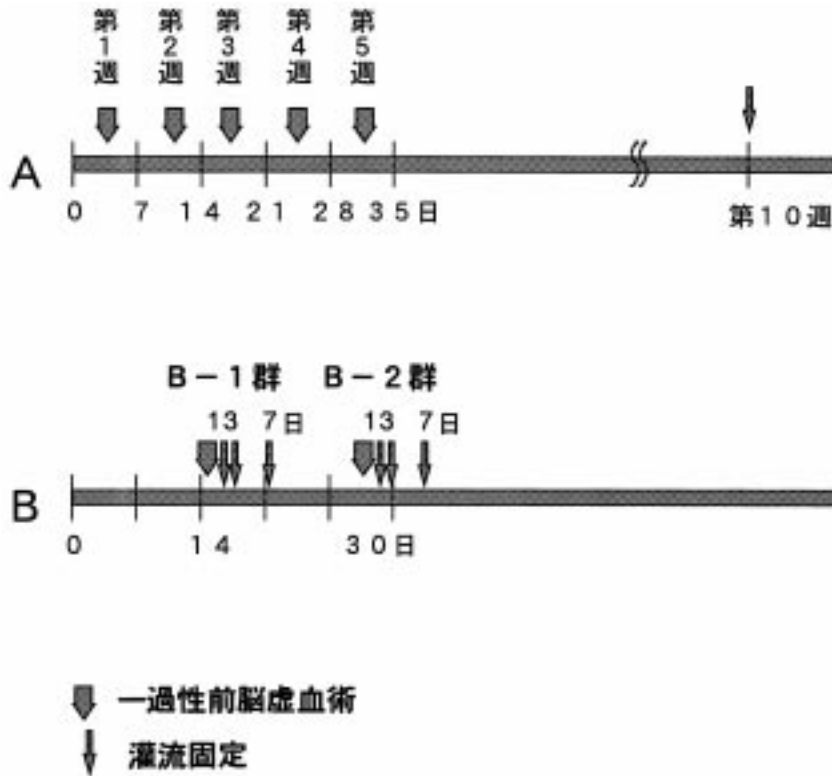


図1

において、2次抗体としてGFAP, CNPaseには抗マウスIgG (Vector)を、Mac-1には抗ラットIgG (Vector)を1,000倍希釈で1時間室温にて振盪した。次いで avidin-biotin-peroxidase complex (Vector)を2,000倍希釈し室温で1時間浸漬した。そして0.01%3,3'-ジアミノベンチジン (DAB) (Sigma), 1%硫酸ニッケル(II)アンモニウムと0.0003%過酸化水素水で発色させた。

また、CA1領域における星状膠細胞の占める面積比の経過時的变化を、コンピューター画像分析機 (LUZAX (Nikon), OPTIPHOT-2マイクロスコープ (Nikon), 3 CCDカメラ (Panasonic))を用い、CA1中心部 (全層を含む)において、選択した領域の全ピクセルに対する、GFAP免疫陽性細胞でおおわれているピクセルの数比で求めた。

結 果

A 群

1. CV 染色

CA1領域の錐体細胞数の変化を図2に示した。生後第3週目と第4週目の間に明らかな臨界期が存在することを認めた。対照群を1とした時の細胞数の比率は、生後第1週目 (生後2~6日)では 0.82 ± 0.14 , 第2週目 (生後7日~13日)は 0.76 ± 0.13 , 第3週目 (生後14日~20日)は 0.95 ± 0.11 , 第4週目 (生後21日~27日)は 0.13 ± 0.05 , 第5週目 (生後28日~)は 0.09 ± 0.04 となり生後3週目まではCA1領域の錐体細胞は脱落し難いのにに対し、生後4週以降錐体細胞の脱落が著名であった。実際の顕微鏡写真を図3 a eに示した。

B 群

1. CV 染色

B 1群の錐体細胞数には一過性虚血後の1週間の間に変化は見られなかった。一方B 2群

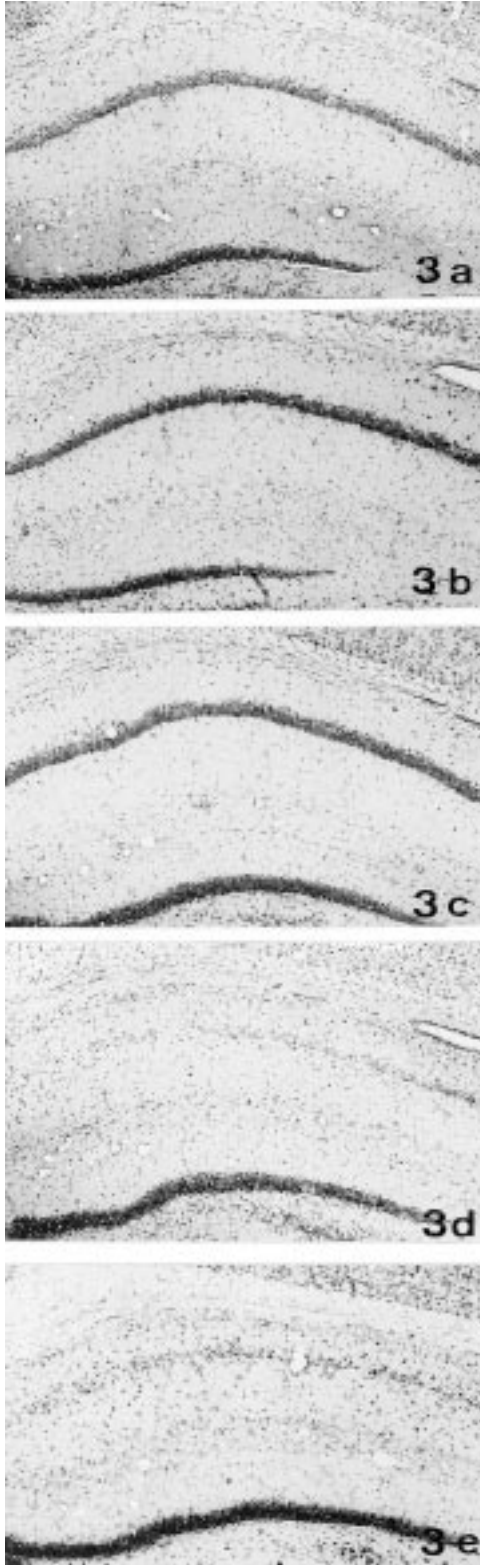


図3

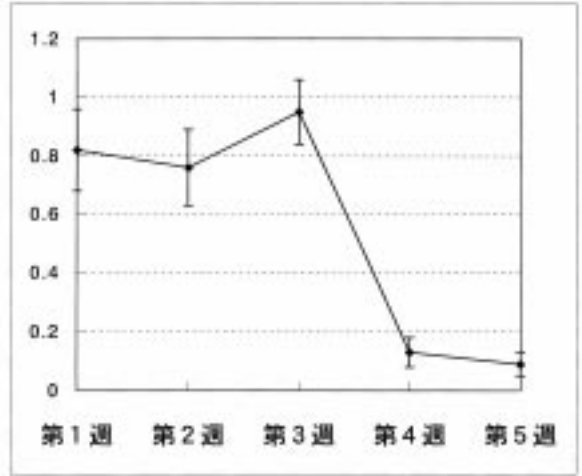


図2

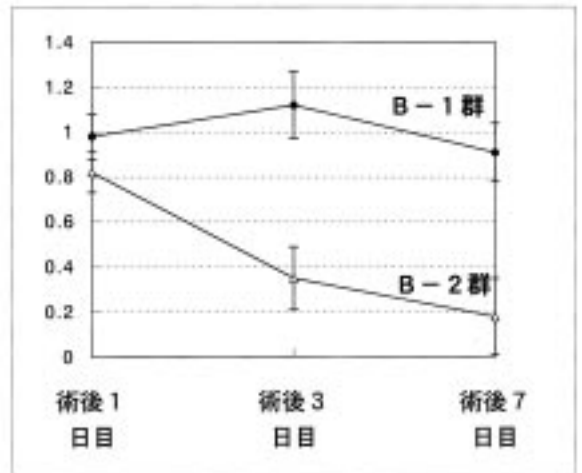


図4

は、虚血処置後1日目にはCA1錐体細胞に変化は見られなかったが、3日後にはCA1領域の内側半の錐体細胞が著しく減少していた。7日目にはCA1の全領域において細胞が顕著に減少した。(図4, 5 1, 5 2)

2. 神経膠細胞の免疫染色

星状膠細胞 (GFAP 免疫陽性細胞)

B 1群の第1日目において、CA1領域の多形細胞層 (st. ori.) のGFAP 免疫陽性となった星状膠細胞は肥大を示した。分子層 (st. rad.) におけるいくつかの免疫陽性細胞は、ほとんど対照

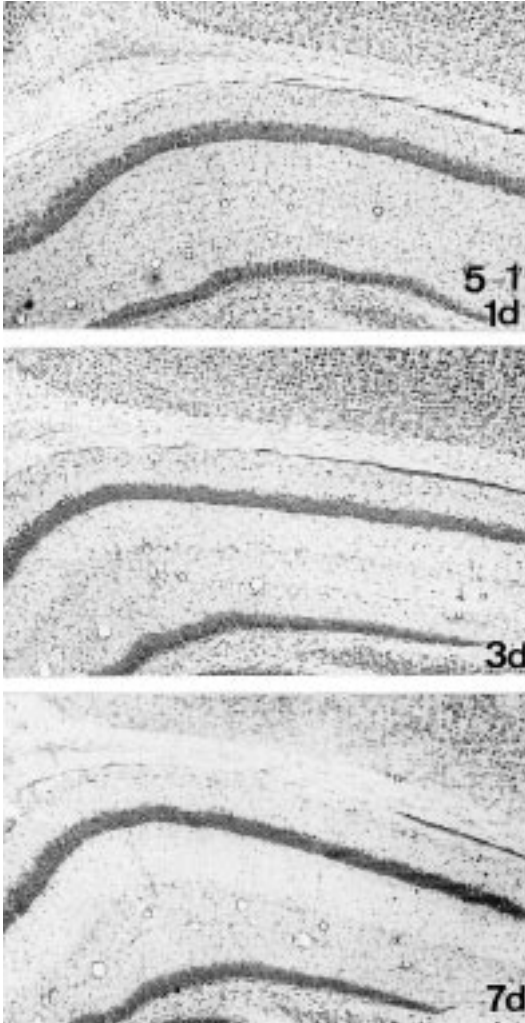


図5 1

なみであった．錐体細胞層（st. py.）には免疫陽性細胞体は見られなかった．第3日目において，st. ori.は1日目と変化はなかったが，st. rad.で反応性のもが増加した．st. py.には変化がなかった．第7日目において，st. ori.とst. rad.の両層で免疫陽性度が低下した．st. py.は，第1，3日と同様に陽性細胞体を認めなかった．（図6 1）

B 2群の第1日目に免疫陽性となった細胞は，B 1群に比べ核が大きく，免疫陽性の突起も太く，長くなっていた．st. ori.とst. rad.の細胞が同程度に活性化され，st. py.はGFAP免疫陽性の星状膠細胞体は認めなかったが，突起が増えていた．第3日目は，st. ori.とst. rad.の全星状膠細胞が同程度に活性化し，核周囲の細胞体が肥大す

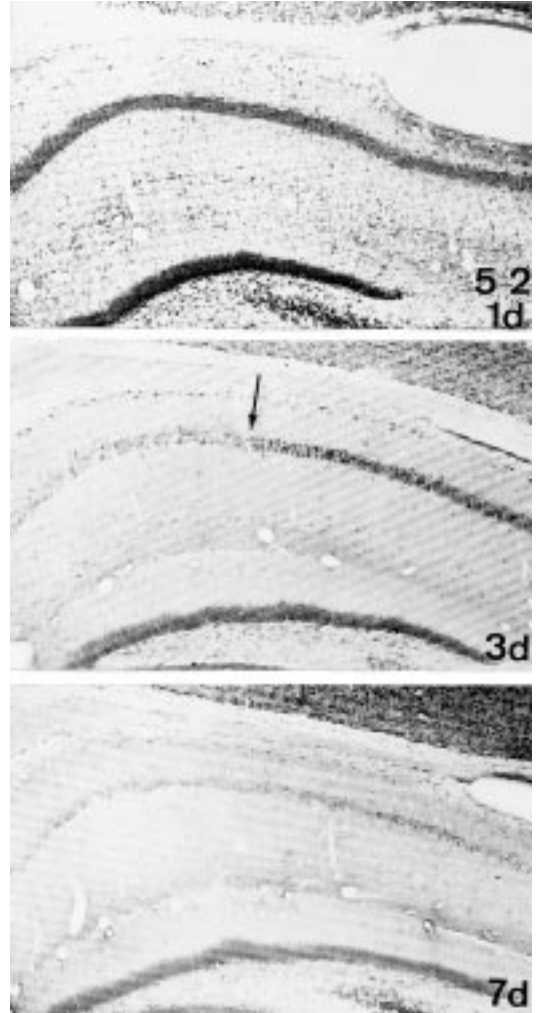


図5 2

るのみならず，突起がGFAP免疫強陽性となるので細胞間が染まって見えた．st. py.の内側半はst. ori.とst. rad.との境界が不明となり，その境界領域にGFAP免疫強陽性細胞や突起が増えていたが，外側半では，st. py.の全体にGFAP免疫強陽性細胞が多く認められた．従って，弱拡大では海馬CA1領域は内外2部に分かれて見え，外側半ではst. ori.，st. rad.，st. py.は全層にかけてGFAPで強く染まる細胞に満たされるが，内側半では錐体細胞層（st. py.）が抜けてみえた．第7日目になると内側半と外側半に差はみられず，st. ori.とst. rad.の両層とも細胞間の染色がわずかに落ち，かつst. py.のGFAP免疫陽性細胞は消失し，錐体細胞層（st. py.）は抜けてみえた（図7 1）

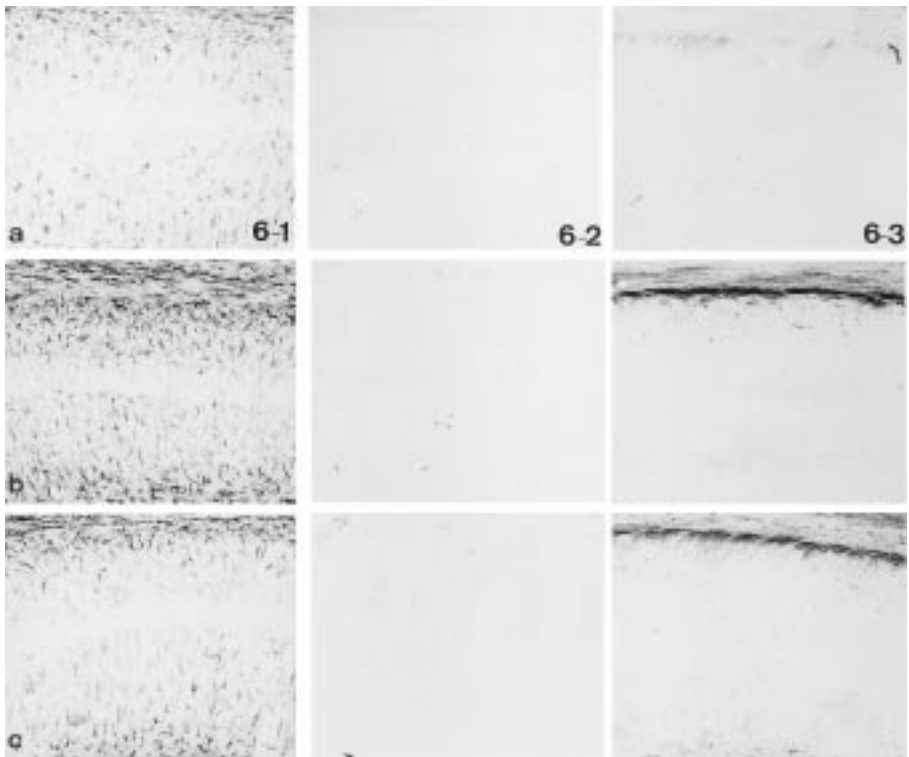


图6

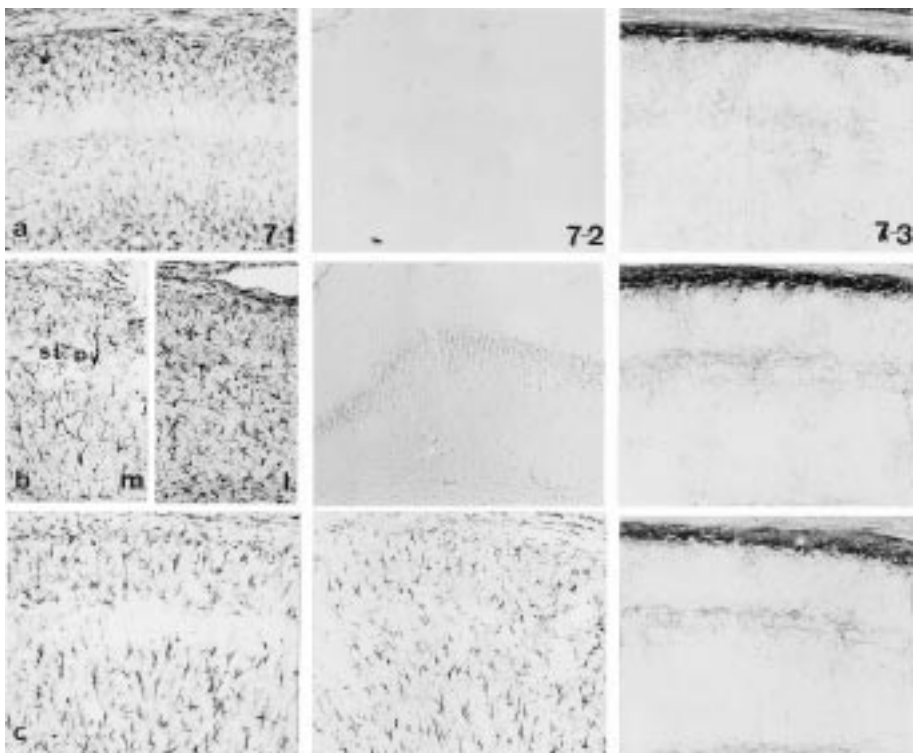


图7

小膠細胞（ミクログリア, Mac-1免疫陽性細胞）

B 1 群では第1日, 第3日, 第7日ともすべて陰性であった(図6 2)。B 2 群でも1日目は陰性であったが, 3日目においてCA1の内側の st. py. に弱く免疫陽性細胞が表われた。7日目には, st. ori. と st. rad. の全小膠細胞が活性化し, 核が大きく突起も長くなっていた。st. py. の外側半に陽性細胞を多く認め, 全体としてB 2 群の3日目のGFAP 陽性細胞の分布によく似ていた。(図7 2)

稀突起膠細胞（CNPase 免疫陽性細胞）

抗 CNPase 抗体で可視化されるのは突起のみであり, すべての層に膠細胞の細胞体は認めなかった。st. py. では細胞層に平行(横方向)に走行する線維が目立ち, st. ori. と st. rad. ではそれと垂直に走行するものがみられた。

B 1 群の CA1 領域は, 第1日, 第3日, 第7日目とも対照群とほとんど同じであった。(図6 3)

B 2 群の第1日, 3日目では, 対照との差はなかった。第7日目では, 全層において減少した。(図7 3)

3. 星状膠細胞（GFAP 免疫陽性細胞）の面積比

B 1 群は, 9.1 ± 1.0 (虚手術群) 10.5 ± 1.5 (第1日目), 10.2 ± 1.8 (第3日目), 13.4 ± 3.3 (第7日目)と変化した。

B 2 群は, 9.4 ± 1.4 , 14.7 ± 3.4 , 24.1 ± 1.5 , 35.9 ± 1.8 と変化した。

この変化は上に述べた定性的な変化を定量的に確かにしたものであるが, とくに細胞死の起こら

ないB 1 群では定量的には星状膠細胞が肥大による面積比の増大を認めなかった。(図8)

考 察

発達段階にある脳は虚血に強いとされ, ヒトにおいても, 新生児あるいは幼児期は虚血障害を受けにくいことが臨床上知られている⁸⁾。本研究によりスナネズミ脳においても, 生後第3週目までは一過性脳虚血による遅発性細胞死がおこりにくいことが明らかになった。このような研究は今迄にも多くなされているが, 細胞数を正確に数え, 発達段階における臨界期を明らかにしたのは本研究が初めてである。

スナネズミは総頸動脈の閉塞で前脳の血流を完全に遮断できるので, 虚血モデルとしてよく用いられる動物であり¹⁰⁾, とくに海馬CA1は数日後より遅れて細胞死がおこることがよく知られている²⁾。このCA1の遅発性細胞死の機序の1つとして現在広く認められているのは, 虚血により多量のグルタミン酸が放出され, ひき続き N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体を介して細胞のカルシウムイオンの流入が起こり, 細胞死に至るとするグルタミン酸神経細胞毒性仮説である^{5, 11)}。またこの細胞死は虚血時間により障害に差異があることが報告されているが^{8, 12)}, 虚血時間を5~10分としている報告が多く^{2, 9)} 3分の虚血ではむしろ虚血耐性ができるといわれている¹²⁾。また, 低体温による脳の保護効果も考えられるので^{5, 9, 13)}, 本研究は体温を一定とするよう努めた。

先に Nakajima らは成熟スナネズミを用いて低脳温下で一過性虚血を行うとCA1の錐体細胞は脱落しないが, 反応性の星状膠細胞が出現することを述べている⁹⁾。本研究でも最も興味ある変化を示したものは星状膠細胞であった。生後4週を過ぎる(B 2 群)と一過性虚血に対して海馬CA1は著名に錐体細胞を脱落させるが, その遅発性細胞死は内側半から起こり, 外側へ移行し, CA1全域に至ることが明らかとなったが, 星状膠細胞の反応もまさにこれに応じて起こった。さらに興味深いのは遅発性細胞死のみられなかった生後3週までの動物(B 1 群)では星状膠細胞の反応が見られなかったことで

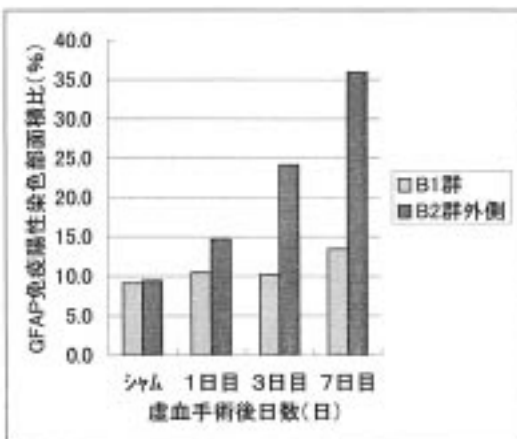


図8

ある。Nakajima ら⁹⁾は、本研究で用いた同様の方法で GFAP 細胞の面積比を求め、温度の違いにより細胞死を起こした群と、起こさなかった群で、虚血処置 1 週間後の GFAP の反応が明らかに違うことを示している。今回我々の結果では、虚血後 1 週間の間での変化を調べた。細胞死を起こさなかった B 1 群では、定性的には星状膠細胞の反応を認めたが、定量的には変化を認めなかった。B 2 群の外側半では CV 染色で遅発性細胞死がおこる直前の細胞に、GFAP 免疫陽性細胞が最も多く st. py. にまで認めたことから、星状膠細胞がより細胞障害そのものに関与する可能性が大きいと考えられる。また、発達期と成熟期の反応の違いからも虚血処置後の遅発性細胞死に星状膠細胞が大きく関与していることは確かである。

ミクログリアには強い貪食能を有するアメボイドミクログリアと休止状態のラミファイドミクログリアがあり、抗 Mac 1 抗体はアメボイドミクログリアを標識するとされる¹⁶⁾。B 1 群は細胞変性がなく貪食も起こらなかった。また、ラットやマウス脳では、アメボイドミクログリアは妊娠 3 週で出現が認められ、生後 2 週間以内にはほぼ完全に消失し、以後ラミファイドミクログリアが現われると報告されており^{17,18)}、今回も生後 14 日に行った対照 (sham) 群にも周産期のアメボイドミクログリアを認めなかった。Mac 1 陽性細胞が認められたのは B 2 群の 3 日目 (CA1 の内側) と 7 日目のみであることから、CV 染色で細胞変性が認められる時期でのみ貪食が行われていると言える。しかし、場所的には細胞死が起こるところに限られる訳ではなく、3 日目の内側半の st. py. に現われ初めた Mac 1 陽性細胞が 7 日目には CA1 領域の st. ori. と st. rad. に広く分布し、st. py. ではむしろ認めなかった。ミクログリアは移動性の細胞ではあるが、なぜこのような動きをするかは今後の課題であろう。

稀突起膠細胞は B 1 群の 3 日目より減少していたが、それは神経細胞の軸索の変性に伴うためと考えられる。3 日目の外側も内側と同程度に減少していたことより、細胞体に明らかな変性が見られるよりもはやく、軸索鞘を形成する稀突起膠細胞が消失したものと考えられる。

グリアと神経細胞死の研究は始まったばかりである。現在受け入れられている、グルタミン細胞毒説

仮説にこれらのグリアから放出される様々なサイトカインやメディエーターがどのように関連しているか将来すこしずつ解明されいこう。また同じ手術でも小児と成人とでは予後が異なることは臨床ではしばしば経験することであり、ヒトにおいても発達上の臨界期を調べることは重要となるであろう。

文 献

- 1) Arai H, Passonneau JV, Luat WD: Energy metabolism in delayed neuronal death of CA1 neurons of the hippocampus following transient ischemia in the gerbil. *Metab. Brain Dis.* 1: 263-278, 1986
- 2) Kirino T: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 239:57-69, 1982
- 3) 桐野高明: 海馬の虚血性神経細胞死について。虚血性神経細胞死 .3 12 東京, 1998
- 4) Scoville WB, Milner B: Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurosurg Psychiatr* 20: 11-21, 1957
- 5) Wahlestedt C, Golanov E, Yamamoto S, et al: Antisense oligodeoxynucleotides to NMDA-R1 receptor channel protect cortical neurons from excitotoxicity and reduce focal ischaemic infarctions. *Nature* 363: 260-263, 1993
- 6) Giulian D, Vaca K, Corpuz M: Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. *J Neurosci.* 13: 29-37, 1993
- 7) Hatten ME, Liem RKH, Schlanski ML, et al: Astroglia in CNS injury. *Glia* 4: 233-243, 1991
- 8) Siebke H, Breivik H, Rod T, et al: Survival after 30 minutes' submission without cerebral sequelae. *Lancet* 1: 1275-1277, 1975
- 9) Nakajima Y, Fujimiya M, Maeda T, Mori A: Morphological investigation of the neuroprotective effects of graded hypothermia after diverse periods of global cerebral ischemia in gerbils. *Brain Res* 765: 113-121, 1997
- 10) American Psychiatric Association, Diagnostic

- and statistical Manual of mental Disorder, 3rd.,
Revised, Washington DC, 1987
- 11) Levine S, Sohn D: Cerebral ischemia in infant
and adult gerbils. Arch. Pathol. 87: 315-317,
1969
- 12) Choi DW: Glutamate neurotoxicity and disease
of the nervous system. Neuron 1: 623-634, 1988
- 13) Kato H, Kogure K, Itoyama Y: Graded expres-
sion of immunomolecules on activated micro-
glia in the hippocampus following ischemia in
a rat model of ischemic tolerance. Brain Res.
694: 85-93, 1995
- 14) Henderson AR: Temple Fay, N.D., unconform-
able crusader and harbinger of human refrig-
eration. J Neurosurg 20: 627-634, 1963
- 15) D. Giulian: reactive glia as rivals in regulating
neuronal survival. Glia 7(1993) 102-110
- 16) D. Giulian, K. Vaca, M. Corpuz: Brain glia re-
lease factors with opposing actions upon neu-
ronal survival. J Neurosci. 13: 102-111, 1993
- 17) 藤田哲也: ミクログリアの本態. 神経科学レビ
ュー 5, 医学書院
- 18) Imamoto K, Leblond CP: Radioautographic in-
vestigation of gliogenesis in the corpus callo-
sum of young rats. II. origin of microglial cells. J
Comp Neurol 180: 139-164, 1978
- 19) Ashwell K: Microglia and cell death in the de-
veloping mouse cerebellum. Developmental
Brain Res. 55: 219-230, 1990