

## 脳浮腫液の透過, 移行および吸収に関する免疫組織化学的研究

### 光顕的アプローチ

柴田 尚武・福嶋 政昭・陣内 敬文・森 和夫

## *Leakage, Migration, and Absorption of Autoserum Protein in Experimental Cerebral Edema*

### *Light Microscopic Immunohistochemical Study*

Shobu SHIBATA, Masaaki FUKUSHIMA, Takafumi JINNOUCHI and Kazuo MORI

*Department of Neurosurgery, Nagasaki University, Nagasaki*

### Abstract

Evans blue, horseradish peroxidase (HRP), and lanthanum have long been used as tracers in experimental brain edema, but these substances appear to modify *in vivo* reactions. In this study, to exclude such foreign body reactions, ischemic and traumatic cerebral edema was produced in rats previously inoculated with HRP, and leakage of anti-HRP antibodies from microvessels and their migration into brain tissue, as well as absorption of edema fluid by the ventricular lining were observed. Wistar rats were immunized with four HRP booster shots in four weeks. Ischemic and traumatic cerebral edema were produced by means of transcarotid embolization and cold injury techniques, respectively. Immunohistochemical techniques were used to observe the location of anti-HRP antibodies. Three hours after embolization, no leakage of anti-HRP antibodies from capillaries was observed in the ischemic lesion and surrounding brain tissue. However, 24 hours after embolization, leakage of anti-HRP antibodies from venules and capillaries in the ischemic lesion was clearly detected. Uptake of anti-HRP antibodies by neurons and glial cells was also noted. Anti-HRP antibodies migrated along the nerve fibers in the white matter and reached the subependymal layer of the lateral ventricle. The drainage sites for anti-HRP antibodies were those not protected by the blood-brain barrier, that is, the subfornical region at the root of the choroid plexus of the lateral ventricle, the pineal body at the root of the choroid plexus of the third ventricle, the hypophysis and its vicinity, and the choroid plexus itself. The findings in the cold injury model were similar to those in the ischemic model at 24 hours after embolization.

**Key words:** cerebral edema, immunohistochemistry

### I はじめに

従来, 実験脳浮腫における浮腫液の血管透過, 移行および吸収の検討には, Evans blue, horseradish peroxidase (以下 HRP), lanthanum などのトレーサーが用いられているが, これらはすべて生体にとって異物であり, 生体内反応

を修飾すると考えられる。そこで, このような異物反応を除き, より自然な状態での観察のため, HRP の皮下注により前もって抗 HRP 抗体を産生させておいたラットを用い, 塞栓法や凍結損傷法により脳浮腫を作製し, 摘出した脳に酵素抗原法による免疫組織化学的染色を行い, 自己血漿蛋白 (抗 HRP 抗体) をトレーサーとして, 浮腫液の血管

長崎大学脳神経外科

Address reprint requests to: S. Shibata, M.D., Department of Neurosurgery, Nagasaki University, 7-1 Sakamoto-machi, Nagasaki 852.

受稿 1986年4月23日 受理 1986年10月30日

透過のみならず、その後の移行および吸収について光顕、電顕で観察した。本報では、まず光顕所見について報告する。

## II 実験方法

雄の Wistar ラットを用い、HRP 1 mg を 1 週間ごとに計 4 回、背部の皮下に注入し、約 1 ヶ月後、Ouchterlony 法にて抗 HRP 抗体の産生を確認したラットのみを用いた。ついで、右側内頸動脈からシリコン円柱を注入して明らかな虚血性脳浮腫モデルを作製した(10匹)。また別に、右頭頂部に 4×4 mm の穿頭を行い、硬膜上に凍結用探子を -50°C で 5 秒間当て、外傷性脳浮腫モデルを作製した(10匹)。虚血性脳浮腫モデルでは 3 時間および 24 時間後に、外傷性脳浮腫モデルでは 24 時間後に脳を 4% パラホルムアルデヒドにて灌流固定し、凍結切片作製後、酵素抗原法により免疫組織化学的染色を行った。さらに、メチル・グリーン核染色を行い光顕標本を、超薄切片法により電顕標本作製した。

観察事項としては、光顕標本では抗 HRP 抗体の毛細血管透過、白質の神経線維間の移行、神経細胞やグリア細胞内への取り込み、上衣接着帯を通して脳室内への吸収、あるいは上衣下層や脈絡叢の有窓毛細血管からの吸収などについてである。電顕標本では、毛細血管や細静脈における抗 HRP 抗体の透過、神経細胞やグリア細胞内における取り込みと細胞形態の変化、上衣下層や脈絡叢の有窓毛細血管からの吸収、あるいは上衣接着帯を経て脳室内への吸収についてである。本報では前述したごとく光顕所見について報告し、電顕所見については別報で報告する。

## III 結 果

### 1. 虚血性脳浮腫

塞栓 3 時間後で患側半球に浮腫がみられたが、抗 HRP 抗体の漏出はみられなかった(Fig. 1)。24 時間後では、虚血巣皮質の血管周囲腔を含む細胞間隙に瀰漫性に抗 HRP 抗体の漏出がみられた(Fig. 2)。抗 HRP 抗体の血管外漏出は、毛細血管よりも、やや口径の大きい細静脈でさらに著明であった(Fig. 3)。また、虚血巣皮質の神経細胞やグリア細胞内にも比較的濃い HRP 抗体の染まりがみられた(Fig. 4)。ついで、抗 HRP 抗体は白質の神経線維の間を脳室壁へ向かって拡がっていた。そして、患側の側脳室上衣下層に特に濃く染まって集積がみられた(Fig. 5)。一部の側脳室脈絡叢にも抗 HRP 抗体の染まりがみられた(Fig. 6)。

### 2. 外傷性脳浮腫

凍結損傷 24 時間後では、対側半球の皮質および白質には

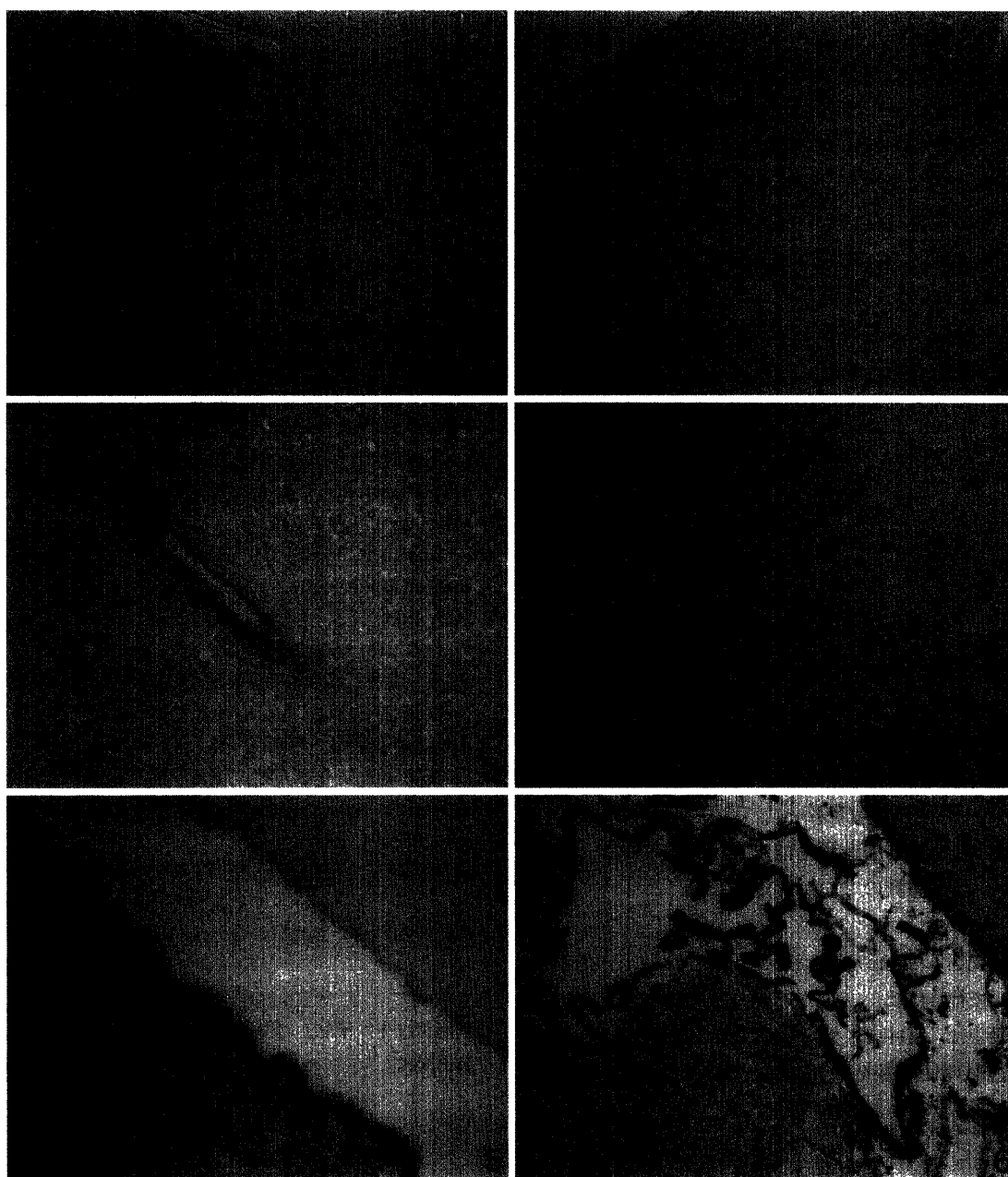
抗 HRP 抗体の漏出を認めず、神経細胞やグリア細胞内にもみられなかった。一方、患側では損傷部皮質の毛細血管周囲腔を含む細胞間隙に瀰漫性に抗 HRP 抗体の漏出がみられた。毛細血管よりやや口径の大きい細静脈において、抗 HRP 抗体の血管外漏出が著明であった。損傷部皮質の神経細胞やグリア細胞内にも抗 HRP 抗体を認めた。抗 HRP 抗体は神経線維に沿って脳室壁に向かって拡がり、脳室上衣下層に達していた。側脳室および第三脳室の上衣下層に抗 HRP 抗体の濃染が認められた。一部の側脳室脈絡叢上皮細胞内に抗 HRP 抗体が染まっているのがみられた。

## IV 考 察

虚血性脳浮腫においては、虚血後早期には cytotoxic edema が主体であり、vasogenic edema は遅れて出現してくると言われている<sup>2,6)</sup>。私どもの結果でも、塞栓 3 時間後では虚血巣の血管から自己血漿蛋白である抗 HRP 抗体の漏出はみられず、vasogenic edema の所見は認められなかった。しかし、塞栓 24 時間後では虚血巣を中心に抗 HRP 抗体の漏出が瀰漫性に生じ、特に細静脈からの漏出が著明であった。この所見は凍結損傷による外傷性脳浮腫モデルと類似した所見であり、vasogenic edema を示していると考えられた。

また、漏出した抗 HRP 抗体が白質内の神経線維の間を脳室壁へ向かって移行する、いわゆる routed protein migration がみられた。従来、生体にとって異物であるトレーサーを用いた場合には明瞭にしえなかった protein migration を本法によって証明しえた訳であり、篠原ら(1985)も同様の所見を報告している<sup>4)</sup>。また、Reulen ら(1977)<sup>5)</sup>も人工髄液を直接白質に注入した場合、一度脳浮腫により細胞外腔が拡大すると、浮腫が bulk flow により脳室方向に進展すると報告している<sup>8)</sup>。

さらに、漏出した抗 HRP 抗体の移行経路にある神経細胞やグリア細胞内への抗体の取り込みがみられ、特に神経細胞への取り込みは臨床症状の発現との関連において興味深い所見であると考えられる。神経細胞へ取り込まれる経路としては、障害された細胞体膜を通して直接侵入していくルートと、軸索周囲腔に流れ込んだ浮腫液が障害された軸索膜から逆行性に流れ込んでくるルートの二つが考えられ、現在、電顕で観察中である。また、グリア細胞内への取り込みがみられたことは、浮腫液からエネルギーを与えられた正常アストロサイトが細胞分裂を促されることによって反応性アストロサイトとなって移動能を獲得し、浮腫病巣内に生き残った神経細胞や血管などを再び被覆することによって修復を完了するという生田ら(1983)<sup>3)</sup>の見解と



- Fig. 1 Three hours after embolization, there was no leakage of anti-horseradish peroxidase (HRP) antibodies from capillaries within the ischemic lesion. Methyl green,  $\times 100$ .
- Fig. 2 Twenty-four hours after embolization, anti-HRP antibodies were seen in the ischemic lesion and surrounding brain tissue. Methyl green,  $\times 100$ .
- Fig. 3 Leakage of anti-HRP antibodies from venules was detected in the ischemic lesion. Methyl green,  $\times 100$ .
- Fig. 4 Uptake of anti-HRP antibodies by neurons and glial cells was observed. Methyl green,  $\times 460$ .
- Fig. 5 Anti-HRP antibodies were present in the subependymal layer. Methyl green,  $\times 200$ .
- Fig. 6 Anti-HRP antibodies were found in the choroid plexus. Methyl green,  $\times 460$ .

照らし合せて興味深い。竹本ら(1986)<sup>7)</sup>は、抗 BrdU 抗体をマーカーとした免疫組織化学的方法を用いて、梗塞 3 日後には周辺アストロサイトの多くは DNA 合成期に移行することを明らかにした。

浮腫液の吸収については、脳室上衣下層および脈絡叢に

抗 HRP 抗体の濃染が観察される所見から、上衣下層まで流れ込んできた浮腫液が上衣接着帯を通して脳室内へ流入する経路以外に、最寄りの脈絡叢を含む脳室周囲器官の静脈性有窓毛細血管から内大脳静脈—ガレン大静脈へと吸収されていく経路が考えられる。橋本ら(1985)<sup>1)</sup>も毛細血管

から漏出した蛋白成分は細胞間隙に留まり、髄液の流れに乗って運ばれ、髄液の一部として最寄りの脳室周囲器官から静脈系に吸収されると述べている。

自己血漿蛋白をトレーサーとして用いる免疫組織化学的手法のうち、本法は血漿中の免疫グロブリンをトレーサーとする酵素抗原法であり<sup>9)</sup>、最近ではアルブミンをトレーサーとする標識酵素抗体法や非標識酵素抗体法も用いられている。酵素抗原法では血漿蛋白中60%を占めるアルブミンでなく、わずか10%の免疫グロブリンの、さらにその一部を染めているにすぎないこと、また内在性のペルオキシダーゼと外来性の HRP が観察上混同される恐れがあることなどの欠点があり、今後は両者を組み合わせて利用することが望ましい。

## V ま と め

1. 虚血3時間後では、抗 HRP 抗体の血管外漏出はみられなかった。

2. 虚血および凍結損傷24時間後では、抗 HRP 抗体は病巣部皮質から白質神経線維に沿って拡がり、側脳室上衣下層まで達していた。

3. 病巣部皮質の神経細胞、グリア細胞への抗 HRP 抗体の取り込みがみられた。

4. 抗 HRP 抗体の吸収経路として、上衣下層—上衣接着帯—脳室内と上衣下層有窓毛細血管—脈路叢静脈—内大脳静脈—ガレン大静脈の二つが考えられた。

本研究は、文部省科学研究費特定研究「神経難病の発生機構」の一部を用いて行われた。

本論文の要旨は、第44回日本脳神経外科学会総会(1985年10月、長崎)および第11回日本脳卒中学会総会(1986年4月、福岡)にお

いて発表した。

## 文 献

- 1) 橋本一成, 後藤隆洋, 市村孝雄, 中谷利夫, 高須伸夫: 脳浮腫発生機序の微細形態学的三側面. 文部省特定研究神経難病の発生機構 昭和59年度研究業績集. 1985, pp 583-588
- 2) Ignelzi RJ: Cerebral edema: Present perspectives. *Neurosurgery* 4: 338-342, 1979
- 3) 生田房弘, 大浜栄作, 吉田泰二, 武田茂樹, 小柳清光: 病巣内 astrocyte の mitosis —反応性 astrocyte の出現と病巣修復に果たすその役割—. 神研の進歩 27: 839-856, 1983
- 4) 大須賀等, 田中真紀子, 篠原幸人: 各種脳血管障害モデルにおける routed protein migration の検討. 第28回脳循環代謝研究会抄録集. 1980, pp 61-62
- 5) Reulen HJ, Graham R, Spatz M, Klatzo I: Role of pressure gradients and bulk flow in dynamics of vasogenic brain edema. *J Neurosurg* 46: 24-35, 1977
- 6) Shibata S, Hodge CP, Pappius HA: Effect of experimental ischemia on cerebral water and electrolytes. *J Neurosurg* 41: 146-159, 1974
- 7) 竹本 理, 吉峰俊樹, 早川 徹, 藤田敏晃, 生塩之敬, 種子田護, 最上平太郎: 梗塞巣周辺脳組織における細胞増殖の研究—抗 BrdU 抗体による DNA 合成核の検出—. 第11回日本脳卒中学会総会抄録. 1986, p 112
- 8) 露無松平, 平塚秀雄, 稲葉 稔, 伊藤梅男, Reulen HJ: Vasogenic brain edema の発生・吸収に関する研究. 脳神経外科 14: 287-294, 1986
- 9) 渡辺慶一, 渡辺 昌, 相羽元彦, 大石隆夫, 影山圭之: 免疫グロブリンを tracer とした血管透過性の形態学的観察. 血と脈管 6: 107-112, 1975

〔別刷請求先: 〒852 長崎市坂本町7-1, 長崎大学脳神経外科, 柴田尚武〕