

クモ膜下腔へのラット胎仔前脳基底細胞の移植 —前脳基底細胞破壊による受動的回避学習障害の改善—

滋賀医科大学脳神経外科

京嶋 和光, 松田 昌之, 半田 譲二

〔原稿受付：平成5年3月26日〕

Transplantation of Basal Forebrain Cells of Fetal Rats into the Subarachnoid Space: Improvement of Disturbance of Passive Avoidance Memory due to Injury of Basal Forebrain

KAZUMITSU KYOSHIMA, MASAYUKI MATSUDA and JOYOJI HANDA

Department of Neurosurgery, Shiga University of Medical Science, Seta, Ohtsu, Shiga

The memory disturbance of senile dementia of Alzheimer type has been thought to associate with marked degeneration and loss of cholinergic neurons of the basal forebrain (nucleus basalis of Meynert, NBM). Electrical or chemical destructin of the NBM causes memory deficits in rats.

After unilateral lesioning of the NBM in adult rats with excitotoxic amino acid, kainic acid, basal forebrain cells of fetal rats were transplanted through a microsyringe needle, the tip of which was transcortically inserted to the subarachnoid space. Eight weeks after the transplantation, passive avoidance response test was performed, and the response was compared with those of non-transplanted lesioned rats and of non-operated control rats. Although acquisition impairment did not improve, retention impairment was significantrly ameliorated in the transplanted rats. Transplanted fetal neurons survived and grew very well over the cortical surface and exhibited facilitated neuritic elongation (acetylcholinesterase staining), but the neurites penetrating the intact pia mater were not verified. Choline acetyltransferase-immunoreactive neurons were found along the needle tract as well as in the subarachnoidal graft. The innervated neurites from the needle tract were rare.

The results indicate that the re-innervation from the graft to the host cortex is not necessarily indispensable for improvement of memory deficit due to injury of the NBM. We suppose that the diffusional supply of neurotransmitters and/or their synthetic enzymes and some kinds of neuronotrophic factors is more important. Moreover, we emphasize the participation of astroglia, which are simultaneously transplanted with neurons, in produciton of neuronotrophic factors.

Key words: Alzheimer's disease, Basal forebrain, Brain transplantation, Subarachnoid space, Passive avoidance memory

索引語: アルツハイマー病, 前脳基底細胞, 脳移植, クモ膜下腔, 受動的回避学習

Present address: Department of Neurosurgery, Shiga University of Medical Science, Seta, Ohtsu, Shiga-ken, 520-21.

はじめに

アルツハイマー病の病因は依然不明ではあるが、近年その病態解明は急速に進歩してきている。アルツハイマー病での痴呆症状は、大脳皮質や海馬へ広範に投射している前脳基底部のコリン作動性ニューロンの著明な変性脱落によることが指摘されている¹⁻³⁾。特にMeynert 基底核の変性が顕著であるという。動物実験でも、この前脳基底部を興奮性アミノ酸や電気凝固で破壊すると、学習記憶障害が生ずる。また、前脳基底部の中隔核から海馬への連絡路を切断すると、特に空間的記憶に障害を来す。このようにして記憶障害モデルラットを作成し、脳移植によって改善を得た報告が散見されるようになり⁴⁻⁶⁾、アルツハイマー病に対する脳内移植療法の可能性が考えられている。

脳移植の臨床応用に際しては、患者の選択やドナー細胞の選択、移植免疫などの問題に加え、移植細胞の生存・成育やホストへの効果あるいは危険性などを考慮して、移植手技を開発し、移植部位を選択する必要がある⁹⁾。これまでわれわれは胎仔ラット脳細胞浮遊液をクモ膜下腔に移植し、良好な生着および成育を認めている¹⁰⁾が、今回は本法が学習記憶障害の改善に有効であるかについて検討した。

実験方法

1) 記憶障害モデルラットの作成

成雄 Sprague-Dawley (SD) ラット (体重230~260 g) を用い、ペントバルビタール 50 mg/kg の腹腔内注射で麻酔し、脳定位固定装置に固定した。0.2 M リン酸緩衝液に溶解したカイニン酸 (kainic acid 0.1 μg/0.5 μl, 0.2 M phosphate buffer) を、左側前脳基底部の2か所 (①AP; bregma より 0.4 mm, L; 正中より 2.6 mm, D; 硬膜より 7.3 mm, ②AP; 1.2 mm, L; 3.4 mm, D; 7.0 mm) に各々5分以上をかけて注入した。

2) 移植手技

胎齢15~17日の同種ラット胎仔を、母獣へのペントバルビタール 30 mg/kg の腹腔内投与下に摘出し、氷冷したリンゲル液中で前脳基底部を含む部位を摘出、金属メッシュを通した後、ピペッティングにて浮遊細胞化した。

前脳基底部破壊7日後に、同様に麻酔し脳定位固定装置に固定した宿主ラットの左側頭頂部に小開頭を施し、bregma 後方約 1.0 mm, 正中より外側約 2.8 mm で、脳表の比較的太い血管を避けて、外側に向けて

45°の角度で刺入したマイクロシリッジ針を通して、 1×10^5 cells/μl, 7 μl を注入移植した。

ラットは受動的回避学習の実験期間を除いて、12時間の明暗サイクルの飼育室で飼育し、飼料および水は自由に与えた。

3) 受動的回避学習

実験群を以下の3群に分けた。

- ①正常対照群 (normal control group; NC): 処置ラットとはほぼ同一月齢の非手術ラット (n = 10)
- ②移植群 (transplanted group; TR): 移植後8週目 (n = 12)
- ③破壊対照群 (lesioned control group; LC): 前脳基底部破壊後9週目 (n = 11)

受動的回避学習装置は、床がステンレススチール製の21本のグリッドからなる縦×横×高さが30 cm×30 cm×35 cmの暗室と、蛍光灯で照明する10 cm×25 cm×30 cmの明室からなり、その間を8 cm×8 cmのギロチンドアで仕切られたstep-through式のもの(明暗箱)(室町機械)を用いた。

第1日: 馴化: まずラットを明暗箱に入れ、5分間自由に明室・暗室を行き来させた。その後、24時間各ケージごとに蛍光灯で照明できる飼育室に移し、照明下に置いた。

第2日: 獲得試行: ラットを明暗箱の明室へ入れて、ラットがギロチンドアに背を向けたところでドアを開放し、ストップウォッチを押した。ラットの四肢が完全に暗室に入ったところで時間測定をし(S₀), 0.5 mA, 3秒間の電気ショックを床のグリッドから与え、直ちに取り出しケージに戻した。10~15分ごとに再試行を同様にして行ない、“明室に5分(300秒)以上留まると学習完了”(基準反応潜時300秒)とし、試行回数を記録した。その後は再び照明ケージに戻した。

第3日: 再生試行 (S₂₄): 獲得試行の24時間後、同様の測定方法で反応潜時を記録した。反応潜時は最大300秒とし、暗室へ入っても電気ショックは与えなかった。

第4日: 再生試行 (S₄₈): 24時間後の再生試行と同様に、48時間後においても反応潜時の測定を試みた。

測定結果は各群間で集計し、Mann-Whitney U-test または Fisher test で統計学的に検討した。

4) 組織学的検討

受動的回避学習終了後、4% paraformaldehyde, 0.5% glutaraldehyde を含む0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4, 4°C) で経心的に灌流固定し脳を摘出、15% ショ

糖を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4, 4°C) に浸漬した後, 40 μ m の冠状断凍結切片を作製した. cresyl violet による Nissl 染色, Tago らの方法¹¹⁾ に準じた acetylcholinesterase (AChE) 染色に加え, choline acetyltransferase (ChAT) 免疫染色にて組織学的に検討した.

一部のラットは AChE の阻害剤である diisopropyl-fluorophosphate (DFP) を灌流固定の15時間前に 1.5 mg/kg 筋注し, 再び産生されてくる AChE を染色した¹²⁾.

ChAT 免疫染色は, H₂O₂ で内因性 peroxidase 活性を除いた後, 1次抗体 (rabbit anti-ChAT polyclonal antibody 1:4000; Chemicon international) に 4°C 4日間, 続いて2次抗体 (anti-rabbit IgG 1:1000) に室温で2時間それぞれ作用させ, ABC法を用い, diaminobenzidine-4 HCl で発色させた.

結 果

1) 受動的回避学習の獲得

受動的回避学習の獲得を基準反応潜時達成までの試行回数で比較すると, 移植群, 破壊群ともに平均2.5回を要し, 正常対照群の平均1.1回に比べ有意に悪かった (Table 1).

獲得試行の24時間後および48時間後の記憶保持に関しては, 平均の反応潜時で比較すると, 24時間後では正常群, 移植群, 破壊群それぞれ273 \pm 55秒, 277 \pm 41秒, 133 \pm 114秒, 48時間後ではそれぞれ247 \pm 83秒, 178 \pm 100秒, 47 \pm 31秒で, 破壊群で有意に潜時の短縮を認めた. 一方, 移植群では正常群と有意差はなく, 受動的回避学習の保持効果が認められた (Fig. 1). ま

Table 1 Passive avoidance acquisition trials

The acquisition trial was repeated every 10 to 15 minutes until the rat did not enter the dark compartment within 300 seconds. Almost all normal control (NC) rats no longer entered the dark compartment after the first trial, but not only NBM lesioned control (LC) rats but also transplanted (TR) rats needed 2.5 trials on an average.

	mean	\pm standard deviation	
NC (N = 10)	1.1	0.3	*]
TR (N = 12)	2.5	0.5	
LC (N = 11)	2.5	0.7	

p < 0.001 (Mann-Whitney U-test)

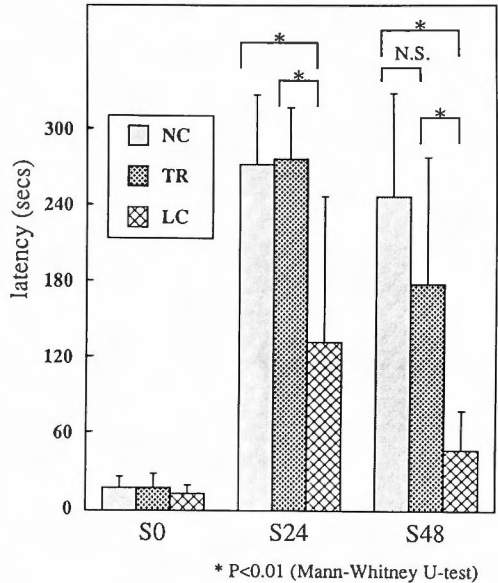


Fig. 1 Passive avoidance retention test

The latency to enter the dark compartment was recorded, up to a maximum time of 300 seconds, at 24 hours (study 24, S₂₄) and 48 hours (S₄₈) after the 1st acquisition trial (S₀). Vertical bars indicate standard errors of the means.

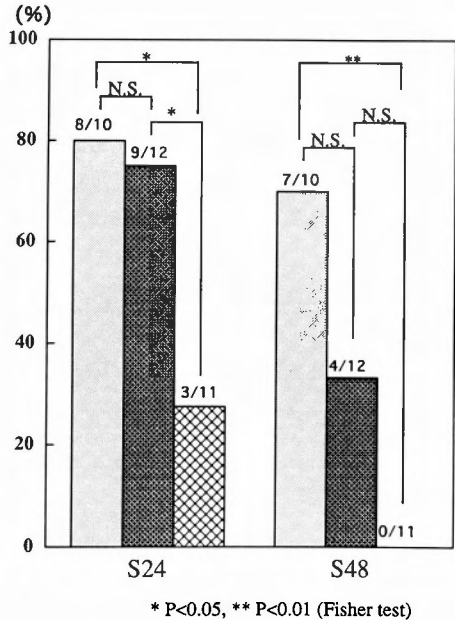


Fig. 2 The rate of rats which reached the criterion of not entering dark compartment within 300 seconds.

た、基準反応潜時300秒達成ラットの率で比べると、24時間後および48時間後ともに破壊群で有意に低率であったが、移植群では正常対照群との間に有意差は認めなかった。ただし48時間後では有意差はなかったものの、達成率の低下傾向が見られた (Fig. 2)。

2) 組織学的検討

前脳基底部へのカイニン酸の注入により、Meynert 核を含んで淡蒼球腹側部や無名質に長径約 2 mm にわたり gliosis が生じ、そこに散在するコリン作動性ニューロンは大多数が変性脱落して、同側大脳皮質の AChE 陽性線維の減少 (あるいは染色性の低下) を示した。

移植ラットでは脳表に沿って移植細胞が育成し、豊富な神経線維が AChE 染色にて観察された (Fig. 3)。ChAT 陽性細胞も散見され (Fig. 4)、皮質内の針入路にも認められた。再生線維は刺入路を介し宿主皮質内へもわずかの距離進入していた (Fig. 4 B, D)。DFP を筋注すると AChE の著明な低下が生じるが、時間の経過とともにニューロンの細胞体で産生され、

神経線維を末梢へ輸送される。特にコリン作動性ニューロンでその回復が早いと言われている。適当な時間経過でラットを灌流固定し AChE 染色を行なうと、コリン作動性と考えられるニューロンの細胞体と線維が際立って染色されてくる。脳表に生着したニューロンから非常に長く再生神経線維が伸びているのが認められたが、正常軟膜を貫通して宿主皮質内へ進入する線維は確認されなかった (Fig. 5A)。ただし、針入路からは太く染色される移植ニューロンからの再生線維と考えられる神経線維が宿主皮質内へわずかに進入し、特に血管壁に沿って伸びている線維が確認された (Fig. 5B)。結局、本モデルでの胎仔前脳基底部細胞のクモ膜下腔への移植では、グラフトから軟膜下や針入路を介した著明な hyperinnervation や、宿主脳自身の AChE 陽性線維の増加 (あるいは染色性の増強) が生じるという明らかな所見は認められなかった。

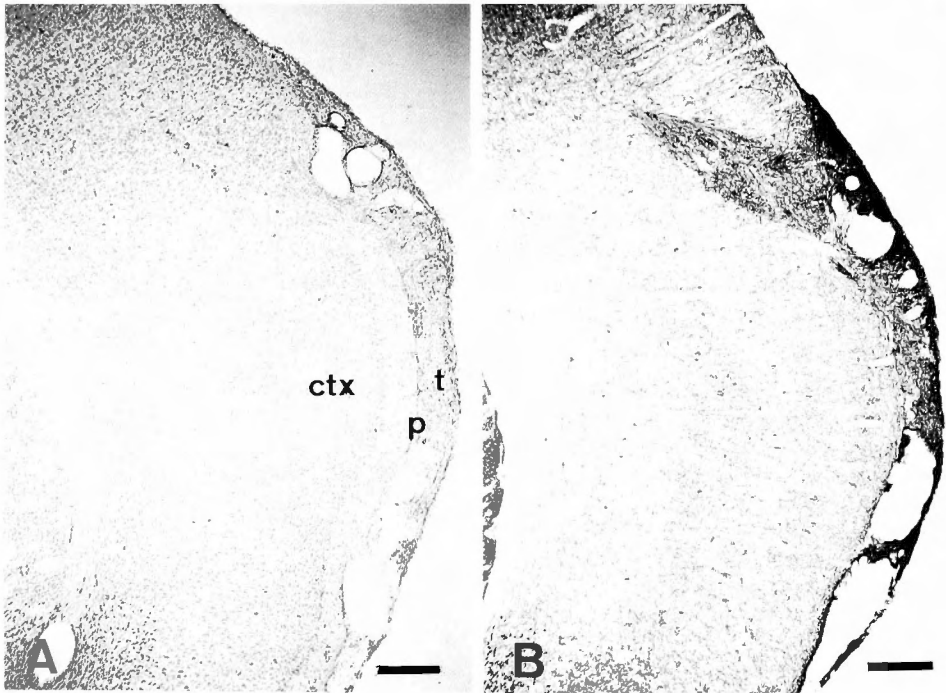


Fig. 3 Nissl staining by cresyl violet (A) and acetylcholin-esterase (AChE) staining (B) about 2 months after grafting fetal basal forebrain cells into the subarachnoid space of basal forebrain lesioned rat. Transplanted fetal neurons grow very well over the cortical surface and exhibit facilitated neuritic elongation in the graft tissue. ctx: cerebral cortex, p: pia mater, t: transplanted tissue, bar = 400 μ m.

考 察

Meynert の基底核 (nucleus basalis of *Meynert*) を含む前

脳基底部 (basal forebrain) は、広く大脳皮質や海馬へ
投射するアセチルコリン (ACh) 作動性ニューロンを
高密度に含有する。脳内 ACh 系は、ヒトを含む哺乳

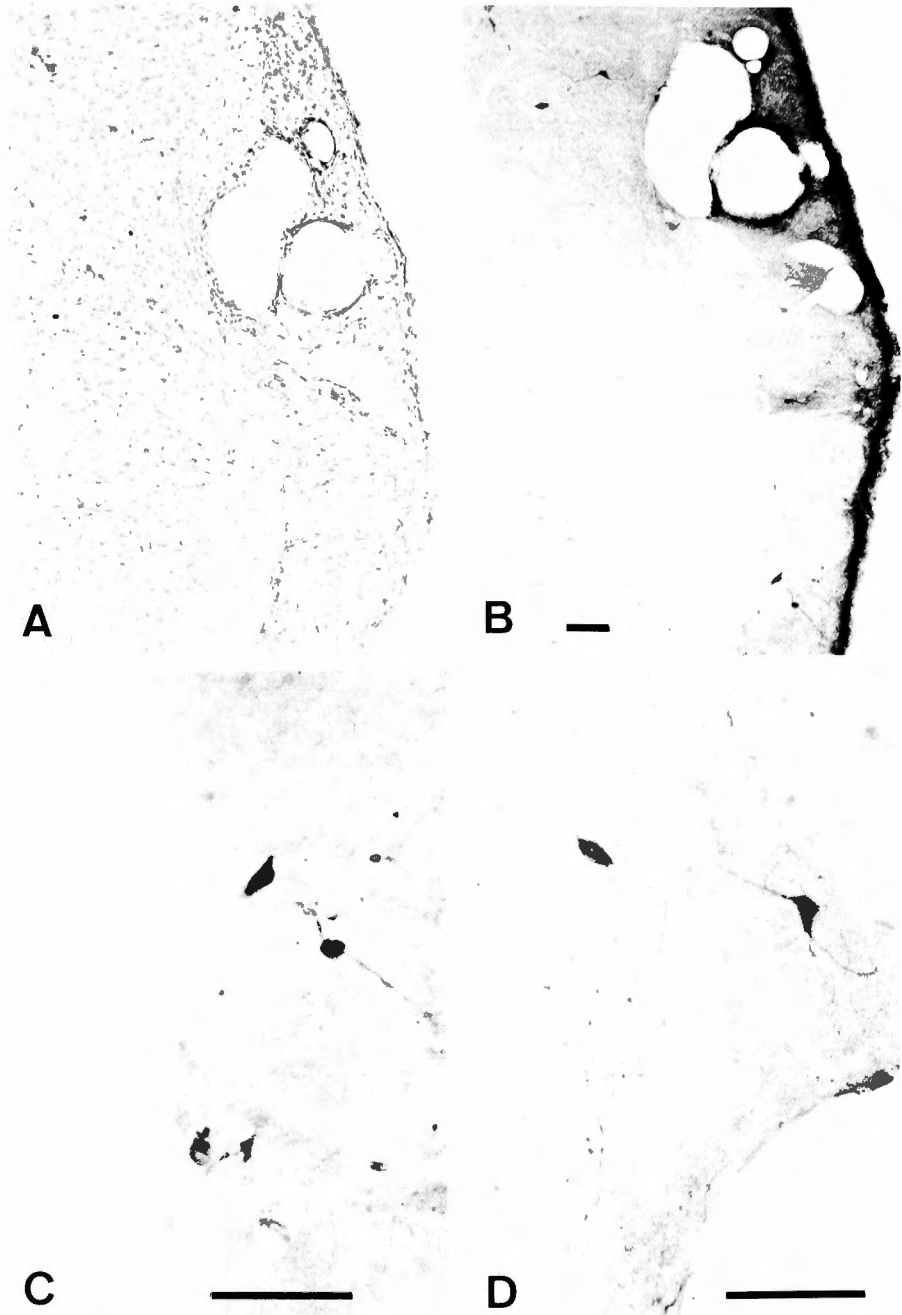


Fig. 4 Nissl staining (A) and choline acetyltransferase (ChAT) immunocytochemical staining (B-D). Some ChAT-positive neurons are found along the needle tract (D) as well as in the subarachnoid graft (C). bar = 120 μ m.

動物における学習記憶機能に重要な役割を果していると考えられており、アルツハイマー病患者では、大脳皮質や海馬での ACh の合成酵素である ChAT 活性の顕著な低下が認められ^{1,2,13)}、また、*Meynert* 基底核のコリン作動性ニューロンの著明な変性脱落が報告されている¹⁻³⁾。

前脳基底部を興奮性アミノ酸で破壊して作成した記憶障害モデルラットを用いて、*Fine* ら^{6,7)} は同種胎仔ラットの前脳基底部細胞浮遊液を、*Itakura* ら⁸⁾ は自家迷走神経下神経節 (末梢神経ではあるが多数のコリン作動性ニューロンを含む) を小塊として、いずれも大脳皮質内に移植し学習記憶障害が改善したことを報告している。また、前脳基底部破壊によって大脳皮質の ChAT 活性は30~40%に低下するが、移植によって60~70%まで回復したという⁷⁾。*Fine* らはさらに、グラフトの辺縁から約 2 mm 離れた宿主脳内まで AChE 陽性線維の進入を見ており、しかも正常に近い

laminar pattern を示していたと報告している⁷⁾。しかし、その所見はグラフトからの神経線維の進入が主体ではなく、グラフトからの AChE の拡散性の供給により宿主神経線維に取り込まれたものが染色された可能性もあると思われる。

今回のわれわれの実験結果は、学習獲得障害の改善はなかったものの、24時間および48時間後の記憶保持障害は有意な改善を示した。改善の理由としては、クモ膜下腔への移植とはいうものの経皮質的移植であるため、グラフトからの主にコリン作動性入力がこの刺入路を介して宿主大脳皮質になされた可能性も考えられるが、組織学的検討からみれば、宿主大脳皮質内へと進入する神経線維は *Fine* らの結果とは異なっており、むしろ神経伝達物質やそれらの合成酵素、各種の神経栄養因子などが移植されたニューロンやグリア細胞で産生され、髄液や組織液を介して、また、一部は血管新

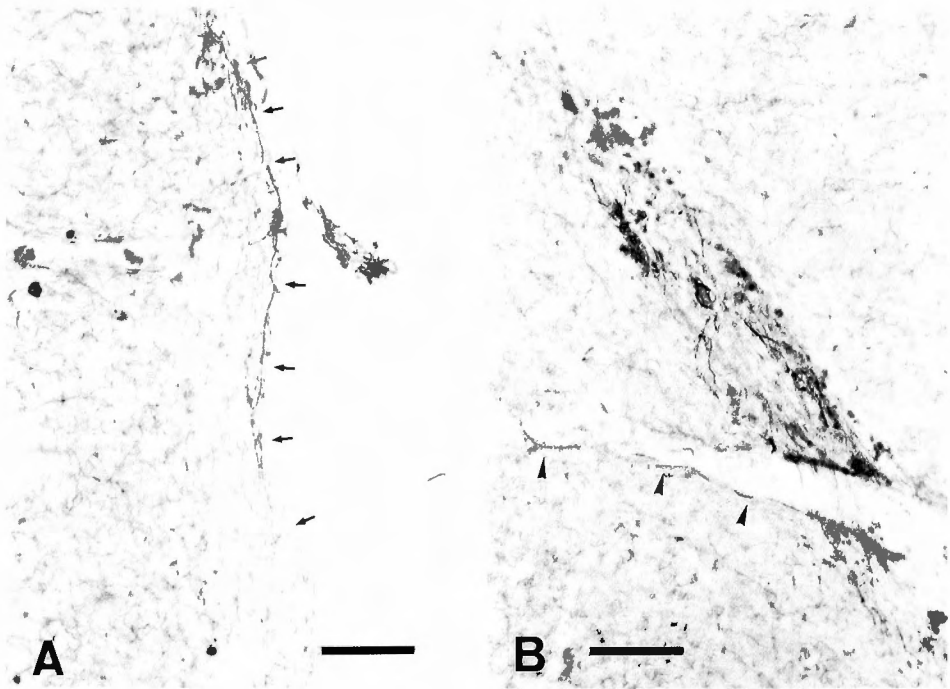


Fig. 5 Acetylcholinesterase staining, The rat was killed 15 hours after systemic injection of diisopropylfluorophosphate.

(A) A transplanted fetal AChE-positive neuron elongates its neurites well on the cortical surface (arrows), but the neurites penetrating the intact pia mater are not verified.

(B) AChE-positive fetal neurons and some neurites are also found in the cerebral cortex along the needle tract. Neurite outgrowth to the host cortex is rare and short, but some neurites elongating along the vessel wall are noticed (arrowheads). bar = 120 μ m.

生を伴って血液を介して、拡散性に供給されたことによる可能性が大きいと思われる。Fisher ら¹⁴⁾は老齡ラットの脳室内に神経成長因子 (nerve growth factor, NGF) を投与し、萎縮していた前脳基底部のコリン作動性ニューロンが大きくなり、かつ、空間的記憶能が改善されることを、また、Hefti¹⁵⁾やKramer¹⁶⁾は中隔核—海馬間の神経路切断により生ずる中隔核コリン作動性ニューロンの変性脱落が、NGFの脳室内投与によって防止されることを報告している。脳移植によってもNGFの持続投与と同様の効果が期待される。

脳移植とその効果に関するこれまでの研究では、主にニューロンの生着と線維の伸張、あるいはシナプス形成や神経伝達物質の合成などに関するものが多く、同時に移植されるグリア細胞にはほとんど着目されなかった。近年、グリア細胞、殊にアストロサイトの機能に関して、生理学的ならびに分子生物学的に活発に研究されるようになり、ニューロンを支持するだけでなく、神経回路がスムーズに働くよう微小環境を整え、さらにニューロンの損傷時にはNGFや塩基性線維芽細胞成長因子などの神経栄養因子を産生・分泌して直接、間接にニューロンを保護し、引き続いて起こる神経再生に重要な役割を演じているものと推定されている^{17,18)}。Emmett らは³H-thymidine でラベルしたアストロサイトを移植し移動能を調べた結果、移植部位からかなり離れたところまで移動し得ることを認めた¹⁹⁾。今回の実験での移植されたアストロサイトの作用についてはほとんど不明であるが、クモ膜下腔に生着した移植ニューロンの支持や細胞外マトリックスの形成、グラフト内の微小環境の維持などに関わっているほか、宿主脳内を移動しNGFなどの神経栄養因子の産生を介して、宿主のコリン作動性ニューロンの生存や sprouting に影響を及ぼしていることも考えられる¹⁰⁾。

今回のモデルでは、前脳基底部のコリン作動性ニューロンの破壊によって、その投射野である大脳皮質では、ある時期には post-synaptic (or receptor) hypersensitivity の状態になっていることが考えられ、比較的少量のAChの供給でもニューロンの機能的改善につながったのかもしれない。その意味では本モデルは、徐々にニューロンが変性・脱落していくアルツハイマー病とは病態が相当に異なると思われ、より臨床に近い動物モデルの開発が望まれる。そのようなモデル動物を用いた移植実験でも症状の改善が証明されれば、脳移植は変性疾患に対する一つの治療手段として

考慮され得ると思われる。

ま と め

興奮性アミノ酸であるカイニン酸を用いたラット前脳基底細胞破壊による受動的回避学習障害は、胎仔前脳基底細胞のクモ膜下腔への移植によって、24時間および48時間後の保持障害に関して有意な改善を示した。改善の理由は不明であるが、グラフトからの神経線維の宿主大脳皮質内への進入とシナプス形成の可能性は低く、神経伝達物質やそれらの合成酵素、各種の神経栄養因子などが移植されたニューロンやグリア細胞で産生され、髄液や組織液を介して、また一部は血管新生を伴って血液を介して、拡散性に供給されたことによる可能性が大きいと思われる。

グラフトの成育環境からみるとクモ膜下腔は適した移植部位と考えられ、アルツハイマー病などの脳の変性疾患の治療手段の一つとしてクモ膜下腔への脳移植が考慮され得ると思われる。

追 記

本研究は文部省科学研究費補助金奨励研究 (A) (課題番号 04770981) の補助を受けた。

文 献

- 1) Davies P, Maloney AJF: Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* ii: 1403, 1976.
- 2) Perry EK, Perry PH, Blessed G, et al: Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet* i: 189, 1977.
- 3) Whitehouse PJ, Price DL, Clark AW, et al: Alzheimer's disease: Evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann Neurol* 10: 122-126, 1981.
- 4) Dunnett SB, Low WC, Iversen SD, et al: Septal transplants restore maze learning in rats with fornix-fimbria lesions. *Brain Res* 251: 335-348, 1982.
- 5) Dunnett SB, Tonolilo G, Fine A, et al: Transplantation of embryonic ventral forebrain neurons to the neocortex of rats with lesions of nucleus basalis magnocellularis. II. Sensorimotor and learning impairments. *Neuroscience* 16: 787-797, 1985.
- 6) Fine A, Dunnett SB, Björklund A, et al: Cholinergic ventral forebrain grafts into the neocortex improve passive avoidance memory in a rat model of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 5227-5230, 1985.
- 7) Fine A, Dunnett SB, Björklund A, et al: Transplan-

- tation of embryonic ventral forebrain neurons to the neocortex of rats with lesions of nucleus basalis magnocellularis. I Biochemical and anatomical observations. *Neuroscience* 16: 787-797, 1985.
- 8) Itakura T, Umemoto M, Kamei I, et al: Autotransplantation of peripheral cholinergic neurons into the brains of Alzheimer model rats. *Acta Neurochir (Wien)* 115: 127-132, 1992.
 - 9) 京嶋和光, 松田昌之, 半田譲二: 脳移植における移植組織の成育とアストロサイトの反応性. Part I. ラット胎仔脳組織塊の大脳皮質内, 側脳室内, クモ膜下腔および大脳皮質 cavity 内への移植. *Arch Jpn Chir* 61: 19-26, 1992.
 - 10) 京嶋和光, 松田昌之, 半田譲二: 脳移植における移植組織の成育とアストロサイトの反応性. Part II: 細胞浮遊法によるラット胎仔脳細胞のクモ膜下腔への移植. *Arch Jpn Chir* 61: 27-34, 1992.
 - 11) Tago H, Kimura H, Maeda T: Visualization of detailed acetylcholinesterase fiber and neuron staining in rat brain by a sensitive histochemical procedure. *J Histochem Cytochem* 34: 1431-1438, 1986.
 - 12) Lynch GS, Lucas PA, Deadwyler SA: The demonstration of acetylcholinesterase containing neurons within the caudate nucleus of the rat. *Brain Res* 45: 617-621, 1972.
 - 13) White P, Hiley CR, Goodhardt MJ, et al: Neocortical cholinergic neurons in elderly people. *Lancet* i: 668-670, 1977.
 - 14) Fisher W, Wictorin K, Björklund A, et al: Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor. *Nature* 328: 65-68, 1987.
 - 15) Hefti F: Nerve growth factor (NGF) promotes survival of septal cholinergic neurons after fimbrial transections. *J Neurosci* 6: 2155-2162, 1986.
 - 16) Kromer LF: Nerve growth factor treatment after brain injury prevents neuronal death. *Science* 235: 214-216, 1987.
 - 17) Furukawa S, Furukawa Y, Satoyoshi E, et al: Synthesis and secretion of nerve growth factor by astroglial cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 136: 57-63, 1986.
 - 18) Logan A, Frautschy SA, Baird A: Basic fibroblast growth factor and central nervous system injury. *Ann NY Acad Sci* 638: 474-476, 1991.
 - 19) Emmett CJ, Lawrence JM, Seeley PJ, et al: Studies of the behavior of purified rat astrocytes after transplantation into syngenic adult brain. *Prog Brain Res* 78: 383-386, 1988.