

脳内貪喰細胞, 特にミクログリアの カルミン貪喰の態度について

京都大学医学部外科学教室第1講座 (主任 荒木千里教授)

井 戸 信 一

〔原稿受付 昭和33年12月16日〕

PHAGOCYTES OF THE BRAIN WITH SPECIAL REFERENCE TO THE ATTITUDE OF PHAGOCYTOSING CARMINE BY MICROGLIAS

by

NOBUICHI IDO

From the 1st Surgical Division, Kyoto University Medical School
(Chief: Prof. Dr. CHISATO ARAKI)

It has been affirmed since 1921 by HORTEGA and later by many others that microglia are capable of phagocytosis. Most of the authors, however, only showed the microscopic specimens stained with Nissl's method or hematoxylin and eosin, in which foreign bodies were seen to have been taken in the cells presumably of microglial origin. The reason why the specimens were stained by the above-mentioned methods may be explained by the fact that, when microglia are stained by silver impregnation, the foreign bodies, if present, might be obscured by the simultaneous presence of silver particles. With the staining methods other than silver impregnation, on the other hand, the phagocytic cells thus demonstrated can hardly be identified definitely as microglia with the characteristic processes.

SASAKI (1955) from our laboratory injected india ink directly into the cerebral parenchyma of rabbit and observed, as the time went on, the attitude of phagocytosis by intracerebral phagocytes. He demonstrated that histiocytes in the perivascular sheath of the brain, microglia and monocytes actually phagocytosed ink particles. And the histiocytes in and around the puncture canal and in the pia mater as well as the microglia in the cerebral parenchyma finally transformed themselves into granule cells, though both showing somewhat different phagocytic attitudes.

SASAKI described that microglia appeared light cobalt blue in color when they were stained with silver impregnation superadded by gold, while ink particles revealed themselves jet black. The differentiation between the microglia and ink particles was, therefore, not hazardous. But, ink particles of small amount taken in may sometimes be confused with silver particles in microglia.

In the aim to make this point clearer, the author injected carmine in the cerebral parenchyma of rabbit and studied the attitude of phagocytosis of carmine

by phagocytes in the brain. In order to check the fading away of the color of carmine due to silver impregnation as far as possible, HORTEGA's staining method was used in modified form to be mentioned in the following:

The sections are washed in the ammonium solution not more than 1-2 minutes, washed in water, stained with silver carbonate solution for 15 seconds, reduced by 1% neutralized formaline solution and then toned in gold chloride.

The histological findings were as follows:

1. 16 hours after the injection it was found that microglia had for the first time evidently phagocytosed the carmine given (Figs. 2, 3, 4 and 5). The ink particles in SASAKI's experiment appeared markedly earlier (4 hours after the injection). For this may be responsible that the carmine phagocytosed of small amount in the earlier period probably fades away and can not be evidenced even by the staining method as stated above.

2. The microglia around the puncture canal began to change the form and shape several hours after the puncture. 10 hours later, the changes were already pronounced (Fig. 1). That is to say, the processes were seen to have thickened and shortened, the number being decreased. In the cytoplasm were occasionally formed vacuoles. Such changes became more and more remarkable as the time elapsed (Figs. 6, 7, 8, 9 and 10).

3. Granule cells appeared 16 hours after the injection of carmine (Figs. 4 and 5). They showed themselves more evidently day by day after the injection until the 3rd day when they were innumerable found. And a great majority of those granule cells actually had phagocytosed the carmine.

4. It was recognized that there were two types of granule cells. The one was of microglial origin and the other of histiocytic nature. The former could clearly be identified, since there was visible the transitional form between the granule cell and the microglia (Figs. 4 and 5). In the latter case, the histiocytes of the perivascular sheath and in the subarachnoid room which had taken the carmine were seen to have emigrated toward the central portion of the injected part (Fig. 14).

From the findings written above, the following conclusions are drawn out:

1. Microglia which have phagocytosed the carmine generally undergo considerable deformation. Since a series of deformations, from almost normal or slightly obese microglia to markedly deformed microglia, may be uncovered, the cells which have taken the carmine in can definitely be considered as microglia.

2. It is believed that microglia never move around and displace. At least, it has not been observed that microglia in the places far apart had emigrated toward the central portion of the injured part.

3. The phagocytes of the perivascular sheath and in the subarachnoid room, i. e., histiocytes, are capable of phagocytosis, as the microglia are so. However, the attitude of phagocytosis is somewhat different among the two types of cells. Histiocytes have much stronger phagocytic activity than microglia do. Anyhow, it seems certain that there are present 2 kinds of phagocytes in the brain.

4. In comparison of the histologic pictures of SASAKI's experiment using india ink and those of the author's own with carmine, proliferation of microglia at the same time interval after the injection was less marked in the carmine cases than in the india ink cases. It is, therefore, presumed that carmine is less irritable to the brain tissue than india ink is.

第1章 緒 言

ミクログリアの食能については Hortega (1921) 以来多数の学者により肯定されて来た。然し多くは Nissl 染色又はヘマトキシリン・エオジン染色等によつて、ミクログリアと推定される細胞内に異物が貪食されている像を提示しているに過ぎない。ミクログリアの特殊銀染色を行えば、之等異物が銀粒子の為に見えなくなるからである。他方銀以外の染色では、証明された貪食細胞が、特有の突起を有するミクログリアであるとの確証を得難い缺点がある。

先に当然教室の佐々木は家兎大脳実質内に墨汁を直接注入して、時間的経過を追つて脳内貪食細胞の墨粒子の貪食状態を主として Hortega 染色により観察した結果、血管壁組織球、ミクログリア並びに血液単球は墨粒子を貪食し、且つ穿刺中心部、近接部及び軟脳膜における組織球と、脳実質内にあるミクログリアとが夫々異なつた貪食態度を示しつゝ、遂には何れも顆粒細胞に転化する事実を示した。

佐々木は墨粒子が漆黒の色を呈するに反し、銀染色後鍍金した標本中のミクログリアは淡青紫色に着色され、両者の鑑別は容易であるとしたが、ごく少量貪食された墨粒子ではミクログリアの銀粒子とまぎらわしいことがある。

私はこの点を明らかにする目的で、鮮明な色調を有する種々の色素を家兎大脳実質内に注入して後、主として Hortega 染色を行つて検した結果、カルミンが確実に脳内ミクログリア並びにその他の貪食細胞に貪食される像を得た。且つその結果を墨粒子の場合と比較検討した結果、佐々木の実験と略々同様の成績を得た。

第2章 実験方法および材料

主として体重2kg以上の正常成熟家兎を使用した。家兎の頭頂部を消毒して皮膚に切開を加え頭蓋骨を露出し、正中線より僅かに外側の骨膜を剝離し、錐で小孔を穿ち、その小孔を通じて細注射針によりカルミン

液を0.05cc大脳実質内に注入した。一定時間後家兎を出血死させ、直ちに注入点を含んだ脳部分を厚さ約3mmに切り出し、Hortega 固定液に1~3日固定し、厚さ15μの凍結切片又はカーボワックス包埋の後、厚さ8μの切片を作製し、次の染色法を施した。

- 1) Hortega 染色法。
- 2) ヘマトキシリン染色法。

Hortega 染色法は注入したカルミンの褪色を防ぐ為に、アンモニア液で洗う時間を極めて短く1~2分以下とした。軽く水洗後アンモニア銀液で約15秒染色、1%中性フォルマリン液で還元、金鍍金を施した。

カルミン注入液調製について。

Karmin reinst Nakarat Merck を乳鉢で細砕し、少量の滅菌生理的食塩水を加えてよく攪拌し、直ちに注射器にとつて家兎大脳内に注入した。

第3章 組織学的所見

カルミン注入後4, 10, 16時間、更に1, 2, 3日のもの各々数匹の家兎の標本を作製した。その組織学的所見を時間の経過を追つて述べる。記述に当つては部位を、(1)穿刺中心部、それより外側に向つて順次(2)近接部、(3)周辺部とに分ち、更に摂取細胞を(1)ミクログリア、(2)軟網膜下腔及び血管周囲の組織球の2種に分かつことにした。

- 1) 注入後4時間のもの。

穿刺中心部には注入されたカルミンは細胞に摂取されていないで、そのまま存在する。又銀染色ではそこにほとんど細胞成分を検出出来ず、僅かに細胞の破壊断裂したものを見る。

近接部では少数のミクログリアの僅かに突起の肥大しているものが認められる。

軟網膜下腔並びに血管周囲の組織球がカルミンを貪食している像が見られる。

- 2) 注入後10時間のもの。

穿刺中心部では注入されたカルミンが細胞体内に摂取されたものはほとんど見られず、大部分は細胞外に

遊離して存在する。ミクログリアは中心部に於ては破壊されていて、その断片が見られるに過ぎない。多核白血球が多数認められ、その一部はカルミンを体内に摂取している。

近接部及び周辺部のミクログリアは変形しているのが認められる。突起は肥大して短くなり、且つその数を減じている。原形質内には空泡を形成しているものがある。(第1図)然し未だこの時期にはカルミン粒

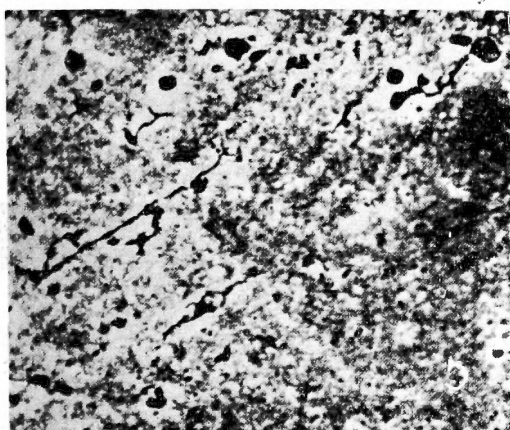


Fig. 1 カルミン注入後10時間。近接部における変形せるミクログリア。突起は肥大して短くなり、且つその数を減じている。原形質内に空泡を形成しているものが見られる。C: 穿刺中心部

子を食喰しているミクログリアは認められない。上記のミクログリアの変化は中心部を遙かに遠ざかつたところでは最早認められず、ミクログリアは正常型を示す。一般に中心部に近いもの程変化が著しい。顆粒細胞も未だこの時期には出現していない。

標本中のカルミンはヘマトキシリン染色で鮮明に見られる場合でも、連続切片で作った隣りの切片の銀染色ではカルミンの赤色がかなり褪色しているので、銀染色操作中にカルミンの色調が失なわれて行く訳である。

佐々木の所見によれば墨粒子は既にこの時期には食喰されているので、カルミンも食喰されていてよいと想像されるが、褪色の為であろうか、カルミンを食喰したミクログリアは発見出来なかつた。

蜘蛛網下腔の組織球並びに血管周囲の組織球は穿刺中心部及びその附近においてカルミンを食喰している。

3) 注入後16時間のもの。

穿刺中心部は10時間のものと略々同様でミクログリ

アの破壊断片、遊離カルミン顆粒、白血球が見られる。

近接部に於ては明らかにカルミンを細胞体内に摂取している細胞を見る。それらの細胞の形には種々のものがある。

(1) ミクログリアと明らかに判るもの。

特有な突起が残存しているので、一見してミクログリアと確認しうる。(第2図)又突起が僅かに存在しているが、カルミンを大量に細胞体内に摂取して、変形の程度が強いものがある。(第3図、第4図)

(2) 突起をほとんど失つたもの。

細胞体は球型に近づく。細胞体は銀によく染つている。(第5図A)

(3) 突起が無く細胞体が銀にほとんど染まらないもの。(第5図B)

以上の3型を区別出来るが(2)型及び(3)型は共に顆粒細胞に相当するものと考えられる。カルミン摂取の程度が進んで順次(1)型より(2)型に移行するものと考えられる。この2型間の移行型が多数認められる。(3)型については後述するが、組織球性の食喰細胞と考える。尚近接部に於てカルミンを食喰していないミクログリアにも著明な変化が見られる。(第6図、第7図)

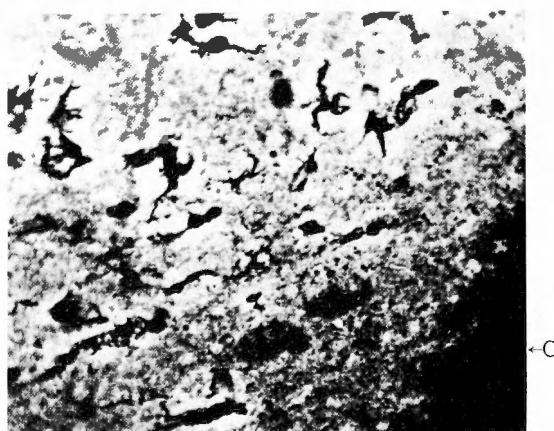


Fig. 6 カルミン注入後16時間。近接部における変形せるミクログリア。C: 穿刺中心部

即ち突起の肥大短縮、突起の数の減少、原形質内の空泡形成等が著明である。これらの変化は中心部を遠ざかるにつれて順次その程度を減じ、遂には正常型を示すに致る。又これらの変化と同時に著明なミクログリアの増殖像が認められる。

蜘蛛網下腔並びに血管周囲の組織球も穿刺中心部に近い所ではカルミンを著明に食喰している。之ら組織

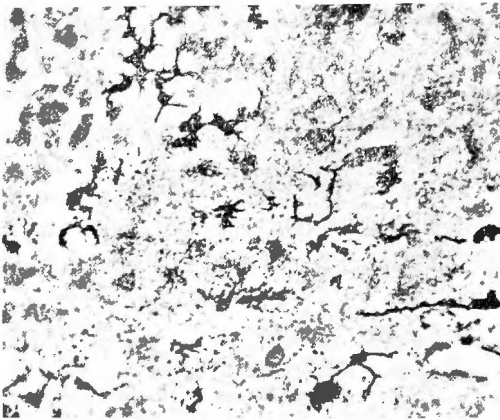


Fig. 7 カルミン注入後16時間。近接部より周辺部への移行部。

球はミクログリアに比較すると、銀の染色度が淡く、突起を有するものは見当らない。之は丁度近接部におけるカルミン貪食細胞(3)型と同じ所見を呈している。

4) 注入後24時間のもの。

穿刺中心部に於ては多核白血球が認められ、之の中にはカルミンを貪食しているものがある。然し大部分のカルミン顆粒は細胞外に遊離して認められる。ミクログリアは見られない。

近接部に於ては16時間のものと同様に、カルミンを貪食したミクログリアが認められる。ミクログリアの変形の程度は16時間のものより更に進んで、突起の肥大は更に高度となり、アメーバ型を呈するものも多数認められる。原形質内に空泡を有するものも16時間のものに比べ一層著明である。(第8図) 穿刺中心部よ

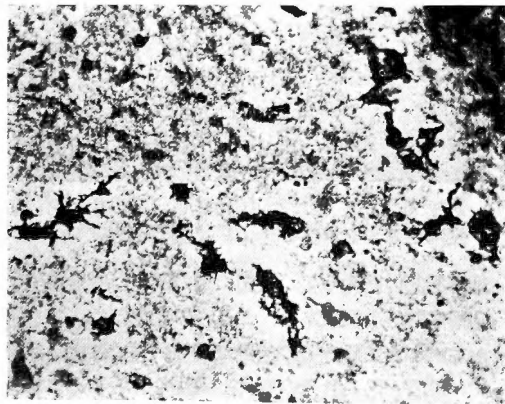


Fig. 8 カルミン注入後24時間。近接部における変形せるミクログリア。
(C: 穿刺中心部。

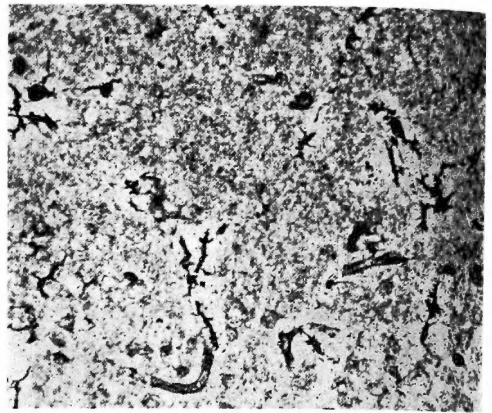


Fig. 9 カルミン注入後24時間。周辺部におけるミクログリア。Fig. 8 に比し変化の程度は弱い。

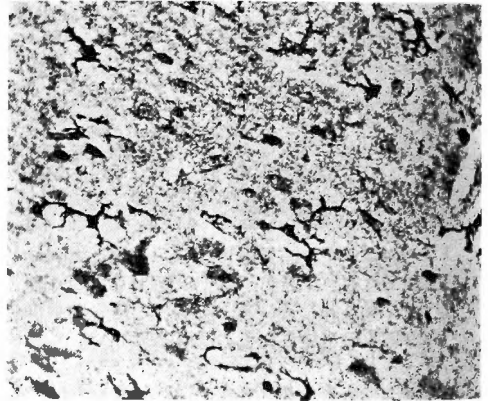


Fig. 10 カルミン注入後24時間 Fig. 9 の更に周辺部におけるミクログリア。漸次正常型に移行する。

り相当離れた範囲にわたつて、ミクログリアは肥大型を呈しており、漸次更に遠ざかるにつれて正常型に移行している。顆粒細胞も、ミクログリアの増殖も又著明である。之等諸型間の移行型も又多数認められる。

周辺部に於てもミクログリアの突起の肥大、減少、短縮が相当広範囲に認められるが、中心部を遠ざかるにつれて漸次正常型に移行する。之等周辺部のミクログリアはカルミンを貪食していない。(第9図、第10図)

蜘蛛網膜下腔及び血管壁組織球もカルミンを貪食している。

4) 注入後2～3日のもの。

この時期になると穿刺中心部に球型の顆粒細胞が多数出現して来る。著しいものでは穿刺孔は顆粒細胞で充滿している像を認め得るに至る。穿刺部蜘蛛網膜下腔

の組織球と之ら円型顆粒細胞とは甚だよく似ている。又之ら細胞中にはカルミンを食食しているものが認められる。

近接部のミクログリアも24時間のものと略々同じ程度にカルミンを食食している。これら食食ミクログリアと穿刺中心部の顆粒細胞との間には又移行型と見られるものが存在する。この点は佐々木がミクログリアも組織球も何れもが顆粒細胞になると認めたが、私も又その事を再確認した。近接部のミクログリアの変形の程度は更に顕著であり、空泡形成も著しい。ミクログリアの増殖も近接部並びに周辺部に及び、周辺部はるか遠方までミクログリアは著しい肥大型を呈し、漸次正常型に移行する。

髄質内の神経繊維の間に存在するミクログリアは変形の程度が少く、食食像を呈するが(第11図)、之に反し皮質内に存するミクログリアは、皮質が破壊軟化して、髄質に存するものよりも早期に強く変形するものと思われる。

蜘蛛網膜下腔並びに血管壁組織球も又著明にカルミンを食食している。(第12図，第13図，第14図)

第4章 考 察

1. ミクログリアの態度について。

Penfield (1925) は脳損傷後2～3日にしてミクログリアの変形を認め、Hortega (1939) は12時間にして変化を認めたといい、Belloni (1928) は48時間後肥大したミクログリアの原形質内に色素顆粒を認めている。佐々木は注入後数時間にして既に活潑な墨粒食食の像を認め、1～2日にして典型的なミクログリアの種々な変形が見られる事を示したが、私はカルミンを注入後16時間にして明瞭にミクログリアが食食している像を認めた。墨粒に比して食食像の見られるのが少々おそいが、之はカルミン顆粒の摂取がごく少量の時には、銀染色操作中に消失してしまう為であろう。更に2～3日以後の所見では、ミクログリアの強度の肥大増殖と、注入境界部に於て多量にカルミンを食食した多数の顆粒細胞の出現が見られ、又ミクログリアより顆粒細胞までの一連の移行像を認めることが出来た。佐々木の言うように、顆粒細胞の中にはミクログリア由来のものが含まれている事は確かである。

又佐々木は Hortega 染色と同時に脂肪染色を行い、之ら食食細胞に墨粒と同時に中性脂肪を証明して、大型円形の墨粒食食細胞は脂肪顆粒細胞に外ならぬことを認めている。別報する私の脂肪注入実験に於

て対照として行つた、単なる熱針による刺傷の場合にも、刺傷中心部附近に於て、2～3日にして多数の脂肪顆粒細胞の出現を認めたが、之はカルミン注入時現われた顆粒細胞と位置並びに形態が全く同一であるので、カルミン食食顆粒細胞も又脂肪顆粒細胞に外ならぬものと認められる。

2. 血管壁並びに蜘蛛網膜下腔の食食細胞について。

穿刺近接部における血管壁並びに蜘蛛網膜下腔には、カルミンを多量に食食した円形の細胞を多数認めることが出来た。これら細胞はミクログリアに比し注入後早期より食食能が認められる。且つ細胞には何れも突起が認められず、銀の染まりの程度がミクログリアに比し一般に淡い。又之等細胞の周囲には未だ変化のみられないミクログリアが存在し、両者の間には何等移行型を認めない。以上の諸点より之等の食食細胞はミクログリアとは異なるもので、組織球と考えられる。

之等組織球性のカルミン食食細胞は漸次増殖し穿刺中心部に進入して顆粒細胞となる。その態度は佐々木の墨粒食食組織球と全く同じである。(第14図)

3. ミクログリアの食食能について。

Glees によれば Cerletti (1907) 及び Forster (1908) は最初に動物の脳に実験的に墨汁を注入し、脳組織並びに血管系のどの部分が墨粒を食食するかを検して、顆粒細胞とグリア細胞との間には何等かの関係があるならんと論じた。当時は未だミクログリアの特殊染色が行われていなかったのであるが、ミクログリアの食食能について示唆したものと思われる。

その後多数の学者が trypan blue, lithium carmine 等の色素を動物の脳に直接注射し、若しくは蜘蛛網膜下腔に注射して、それら色素の食食せられる状態を調べたが、確実にミクログリアが食食した像を提示し得た者は少いようである。例えば Testa (1928) はミクログリアのみが pyroll blue と lithium carmine 顆粒を食食すると述べたが、Ramirez Corria (1927, 1929) や de Robertis (1928) は否定している。

Dorothy Russell (1928) は trypan blue を術前3時間に兎腹腔中に注射して、大脳に刺創を作り、以後24時間毎に同色素を腹腔中に反覆注射して、顆粒細胞中に大量の trypan blue が食食されているのを見た。又 Russell は顆粒細胞はミクログリアより生ずるとした。然しながら Bratianu と Guerriero (1930) は、ミクログリアは血球や組織破壊産物を食食し、且つ脂肪顆粒細胞となるが、生体染色の色素は、正常並びに病的状態に於ても摂取しないという。

三宅川 (1933) は墨汁を20日間にわたり毎日兎の耳静脈内に注射して、極めて少数のミクログリアが僅かに墨粒を摂取したと述べた。石川(1932), 長沢(1932) Mogilnitzky (1932) 等もミクログリアがカルミンを摂取したと述べている。石川は兎の脳刺傷後耳静脈内よりカルミンを注射して、ミクログリアがカルミンを摂取すると記載し、Mogilnitzky 等は trypan blue, カルミン等を直接脳実質内並びに腹腔内に蛋白質等と共に注射して、ミクログリアが之ら色素を摂取したと報告した。長沢 (1932) は石松子末を以て実験的に脳軟化を起さしめ、之にカルミン生体染色を施すと、軟脳膜細胞、血管壁細胞、結合組織細胞、肥大したミクログリア等がカルミンを摂つたと述べた。

上記諸研究者の記載からも、ミクログリアの食喰能については未だ確証に乏しいことが判る。その原因の主なもの、ミクログリアの特殊染色を行わんとすれば、上記諸種生体色素が失われてしまうので、食喰細胞がミクログリアであると決定しにくい故であろう。佐々木は上記の点を考慮して墨汁を使用して墨粒とミクログリアとを明瞭に区別する染色法に成功して、ミクログリアのあらゆる変形が注入された墨粒を食喰しつゝ次第に変化してゆく状態を遂一観察する事が出来、ミクログリアの食喰能を実験的に証明した。佐々木は墨粒と鍍金した銀粒子との鑑別は容易であるとしたが、細胞体内に食喰されたごく少量の墨粒子とミクログリアの銀粒子とはまぎらわしい。

私はこの点を更に明確にする為に鮮明な色調を有する種々の色素の中、銀染色過程中に失われないものを検索した結果、カルミンを使用し、且つ銀染色による

カルミンの消失を比較的軽度止め得る染色法に成功して、ミクログリアの食喰能を実験的に明確になし得たものと考えられる。

4. ミクログリアの位置移動性について。

Hortega は脳に刺傷を加えた際には、ミクログリアは活潑に移動して、障害の中心に密集するとした。Metz 及び Neubrüger, 三宅川は之に反してミクログリアの位置移動性を否定した。私の標本の所見よりしても、ミクログリアが位置を移動する事はないように考えられる。

第5章 結 論

1) 食喰せるミクログリアは一般に変形が著しい。正常又は軽度に肥大したミクログリアから著しい変形までの一連の移行型が見られるので、食喰せる細胞はミクログリアであると言ひ得る。即ちミクログリアの肥大型、ミクログリア由来の顆粒細胞が食喰する。

2) ミクログリアが位置移動をすることはないと思われる。少くとも遠方のミクログリアが外傷中心部に遊走して来るという事はないものと考えられる。

3) 血管周囲並びに蜘蛛網膜下腔の食喰細胞即ち組織球はミクログリア同様に食喰能を有するが、その食喰態度は異なる。組織球の食喰能力は強いが、ミクログリアの食喰能はそれほど強くはない。併し脳内に2種類の食喰細胞が存在することは確実と思われる。

4) カルミンは墨程強くミクログリアの増殖を誘起しない。墨に比し脳組織に対する刺激が弱いものと考えられる。

文

献

- 1) Hortega, P. del. Rio. : 'Microglia.' In Penfield's cytology and cellular pathology of the nervous system. 2, 483-534, 1932.
- 2) Sasaki, S.: Experimental studies on phagocytes in the brain. Folia Psychiat. et Neurol. Jap., 9, 283-303, 1955.
- 3) Hortega, P. del. Rio and Penfield, W.: Cerebral cicatrix. Reaction of neuroglia and microglia to brain wounds. Johns Hopkins Hosp. Bull., 41, 278-303, 1927.
- 4) Glees, P.: Neuroglia morphology and function. 69-89, 1955.
- 5) Russell, D. S.: Intravital staining of microglia with trypan blue. Am. J. Pathol., 5, 451-457, 1929.
- 6) 三宅川廉平: ほるてが氏細胞の研究. 京府医大誌, 11, 99-146, 1934.
- 7) Ishikawa, K.: On the genesis of Hortega cells. Fol. Anat. Jap., 10, 229, 1932.
- 8) 長沢政隆: 脳軟化の実験的研究に就て. 金大十全会雑誌, 37, 2747, 1932.
- 9) Mogilnitzky, B. N., Marcuse, K., Schdanow, I.: Die Einwirkung der Sensibilisierung auf die Mesoglia und das retikuloendotheliale System. Frankf. Ztschr. f. Pathol., 46, 210, 1934.
- 10) Creutzfeld, H. G. and Metz, A.: Über Gestalt und Tätigkeit der Hortegazellen bei pathologischen Vorgängen. Z. f. d. ges. Neurol. u. Psychiat., 106, 18-53, 1924.
- 11) 清野謙次: 生体染色研究の現況及其検査術式. 4, 1921.

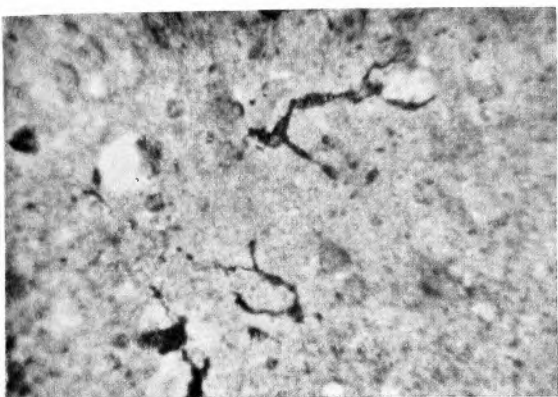


Fig. 2

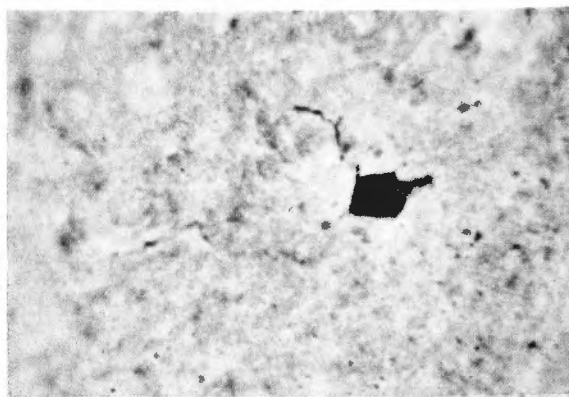


Fig. 3

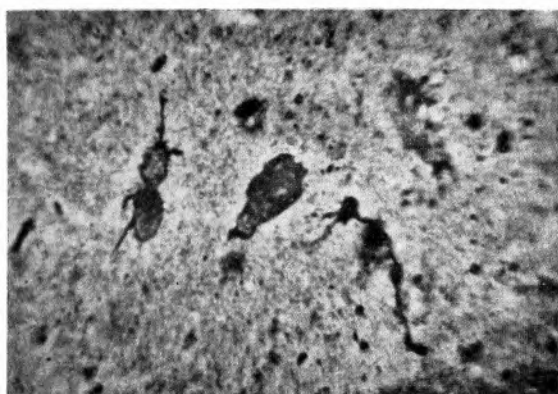


Fig. 4

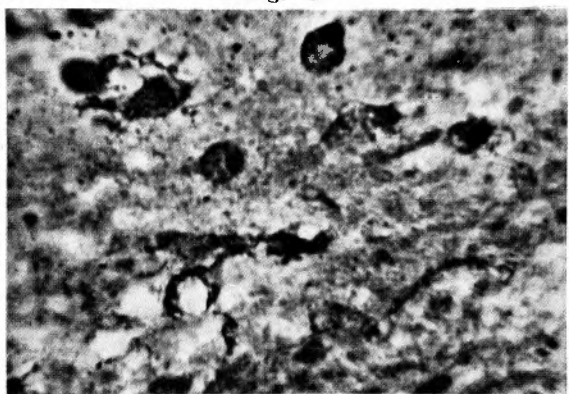


Fig. 5

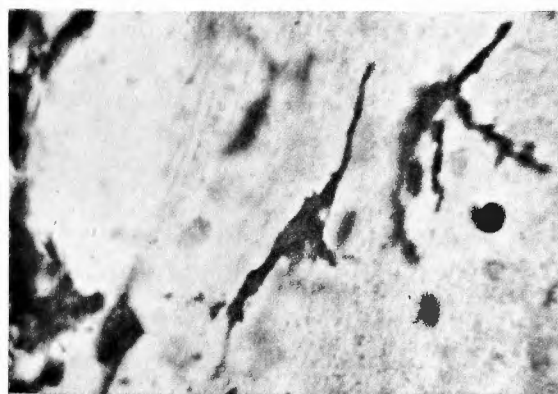


Fig. 11

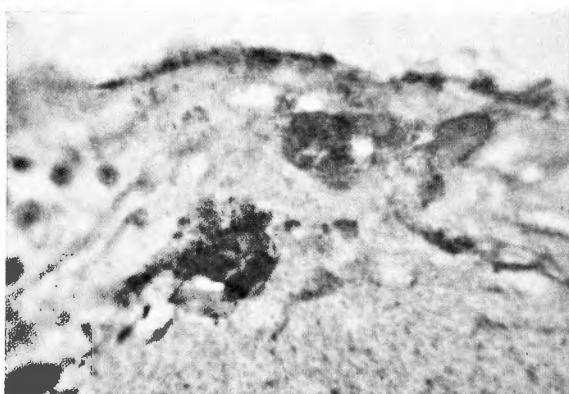


Fig. 12

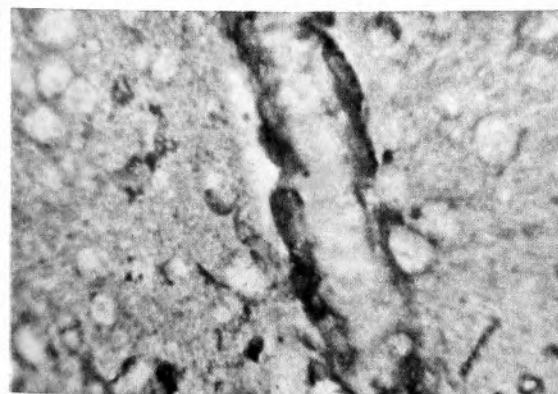


Fig. 13

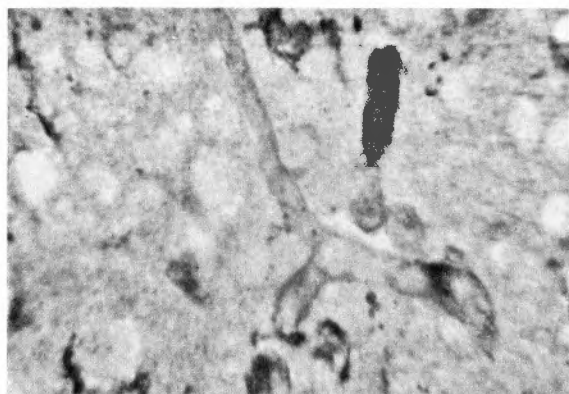


Fig. 14

附 図 の 説 明

- Fig. 2** カルミン注入後16時間、近接部におけるカルミンを貪食せるミクログリア。
Fig. 3 カルミン注入後16時間、近接部におけるカルミンを貪食せるミクログリア。原形質は肥大し、突起は少くなる。
Fig. 4 カルミン注入後16時間、近接部におけるカルミンを貪食せるミクログリア。顆粒細胞への移行型。
Fig. 5 カルミン注入後16時間、A：ミクログリア由来の顆粒細胞、B：組織球由来の顆粒細胞。
Fig.11 カルミン注入後3日、髄質中神経繊維の間のミクログリア。変形の程度が弱い。
Fig.12 カルミン注入後3日、蜘蛛膜下腔の組織球。
Fig.13 カルミン注入後3日、血管壁周囲の組織球。
Fig.14 カルミン注入後3日、血管壁周囲より遊出しつゝある組織球性顆粒細胞。