

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脳皮質内, 側脳室内, クモ膜下腔および脳皮質 cavity 内への移植

滋賀医科大学脳神経外科

京 崑 和光, 松田 昌之, 半田 譲二

〔原稿受付: 平成 3 年 9 月 17 日〕

Growth of the Graft and Astrocytic Reaction Following Transplantation of Fetal Brain to Adult Rat's Brain

Part I: Tissue Transplantation into Cerebral Cortex, Lateral Ventricle, Subarachnoid Space and Cerebral Cortical Cavity

KAZUMITSU KYOSHIMA, MASAYUKI MATSUDA and JYOJI HANDA

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

Brain transplantation has been examined as one of the therapeutic methods in the animal models of Alzheimer's disease. Among a lot of problems inherent to therapeutic brain transplantation, we have investigated implanting techniques and methods.

Small pieces of fetal basal forebrain tissue containing cholinergic neurons were transplanted into adult rats' cerebral cortex, lateral ventricle, subarachnoid space, and the cerebral cortical cavity which had been made 10 days before transplantation (delayed cavity technique). Two to 3 months after transplantation, growth of the grafts, neurites elongation and astrocytic reaction were observed by Nissl staining, histochemical staining for acetylcholinesterase and immunocytochemical staining for glial fibrillary acidic protein (GFAP).

Intracortical grafts were small and surrounded by thick glial scar formation, but there was found a partial lack of glial scar and host-graft neuronal integration was also observed.

Both intraventricular and subarachnoid grafts grew relatively well. GFAP-immunoreactive cells had a tendency to gather near the margin of the graft and perivascularly. These facts seemed to suggest that reactive astrocytes were also taking part in support of the homeostasis of environments in the graft tissue.

By delayed cavity technique, better growth of the grafts was observed, but dense glial and connective tissue scar tissues developed and prevented the outgrowth of neuronal processes. Nevertheless, hyperinnervation from graft to host cortex was partially noticed. It should be stressed that although the hyperinnervation may be effective for recovery of the host from the central nervous system damages, it may possibly damage the host's neuronal circuits.

Key words: Brain transplantation, Implanting methods, Neuronal regeneration, Reactive astrocytes, Subarachnoid space.

索引語: 脳移植, 移植手技, 神経再生, 反応性アストロサイト, クモ膜下腔.

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

I はじめに

パーキンソン病やアルツハイマー病などの脳の変性疾患に対する治療法は、いろいろな問題を含み困難なことが多い。近年、L-dopa 療法が効かなくなったパーキンソン病患者に自己の副腎髄質や流産胎児の黒質細胞を用いた脳内移植療法が試みられ、一部有効性が報告されている^{4,13,17-19,22)}。

一方、アルツハイマー病に対しては、Meynert 核を中心とす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が指摘され²⁶⁾、かつ、これらニューロンの生存維持にその標的部位で産生される神経成長因子 (Nerve Growth Factor: NGF) が重要な役割を演じていることがわかり^{14,28)}、『アルツハイマー病に NGF を投与してみてはどうか?』という考えが提出され、具体化する動きとなってきた²³⁾。

しかし、アルツハイマー病ではコリン作動性ニューロンの変性だけでなく、ノルアドレナリン系やセロトニン系など多種類の神経伝達物質やそれらのレセプターに異常が見られており^{1,2,7,8)}、NGF のみの投与で良いものかという疑問が生ずる。ここにアルツハイマー病に対しても各種の神経伝達物質や栄養因子の補充によって神経細胞変性の進行を食い止め、痴呆の改善が得られる可能性があり、脳移植の応用が考えられる^{9,12,15,16)}。

脳移植の臨床応用に際し、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、移植方法・手技の確立も必要となってくる。本研究ではアルツハイマー病に対する脳内移植療法における移植手技の確立を目指し、その手始めとして、まず、ラット胎仔前脳基底部組織をドナーとして、成ラットの脳の相異なる部位に移植を試み、移植片の成育、再生線維の伸長につき検討し、それらを左右すると考えられるアストロサイトの動態について調べてみた。

II 実験方法

1) 移植手技

ホストには成雄 Sprague-Dawley ラット (220~280 g) を用い、ペントバルビタール 50 mg/kg の腹腔内注射にて麻酔し、固定台に固定した。頭皮を正中切開し、右頭頂部に小開頭を施した。

移植細胞は、同種の胎齢15~17日胎仔ラットを母獣へのペントバルビタール 30 mg/kg 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

をバンチアウトして準備した。

20ゲージ腰椎穿刺針を用いて作製した内筒および外筒よりなる移植針を用い、移植組織を体積約 1 mm³ の小塊として、以下の部位に移植した。

- ① 大脳皮質内に挿入。
- ② 側脳室内に挿入。
- ③ 硬膜、クモ膜を注意深く切開後、大脳皮質上に接触。
- ④ 移植の10日前に大脳皮質を吸引して小腔を作製しておき、この腔内に挿入 (delayed cavity technique)。

2) 組織学的検討

2~3か月後、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、20 μ m の凍結切片を作製し、cresyl violet による Nissl 染色、acetylcholinesterase (AChE) 染色、グリア線維性酸性タンパク glial fibrillary acidic protein (GFAP) 免疫染色にて組織学的に観察した。

AChE 染色は Tago ら²⁵⁾ の方法に準じ、まず 0.1% H₂O₂ を含む 0.1 M リン酸緩衝液に20分間 incubate し、内因性 peroxidase 活性を除いた後、0.1 M リン酸緩衝液、続いて 0.1 M sodium hydrogen maleate 緩衝液 pH 6.0 で洗浄、40 μ M CuSO₄、50 μ M sodium citrate、5 μ M potassium ferricyanide、18 μ M acetylthiocholine iodide を含む maleate 緩衝液に室温で1時間反応させた。0.05 M Tris-HCl 緩衝液 pH 7.6 で洗浄し、0.04% diaminobenzidine-4HCl (DAB)、0.3% nickel ammonium sulfate、0.003% H₂O₂ を含む Tris-HCl 緩衝液で発色させた。

GFAP 免疫染色は H₂O₂ で内因性 peroxidase 活性を除いた後、1次抗体 (rabbit anti GFAP, Chemicon) に 4°C 2日間、続いて2次抗体 (anti-rabbit IgG) に室温で2時間それぞれ作用させ、ABC法を用い、DABで発色させた。methyl green で counter stain を追加した。

III 結 果

①では生着した移植片の体積は相対的に小さく、移植片周囲に厚いグリア性瘢痕が形成され、移植片内の再生神経線維の伸展が阻止された。しかし、部分的には瘢痕が軽度でホスト側と良く接している個所も観察された (Fig. 1A-C)。

②では生着した移植片は成育の良いものが多く、多

くの神経細胞や再生神経線維が観察された。脳室上衣細胞と接する部位には GFAP 陽性アストロサイトは少なく、脳室腔に面した周辺部に多数認められた (Fig. 2A-C)。脳室上衣を介して神経線維がホストに innervate している所見はほとんどの移植片で見られ

なかったが、Monro 孔を閉塞し水頭症を来していた例で、側脳室腹側部に生着した移植片からホストへ hyperinnervate しているものが認められた (Fig. 2D)。

③でも移植片の成育は良好で、AChE 陽性の神経細胞や線維が豊富に観察された。ホストの脳表軟膜接触

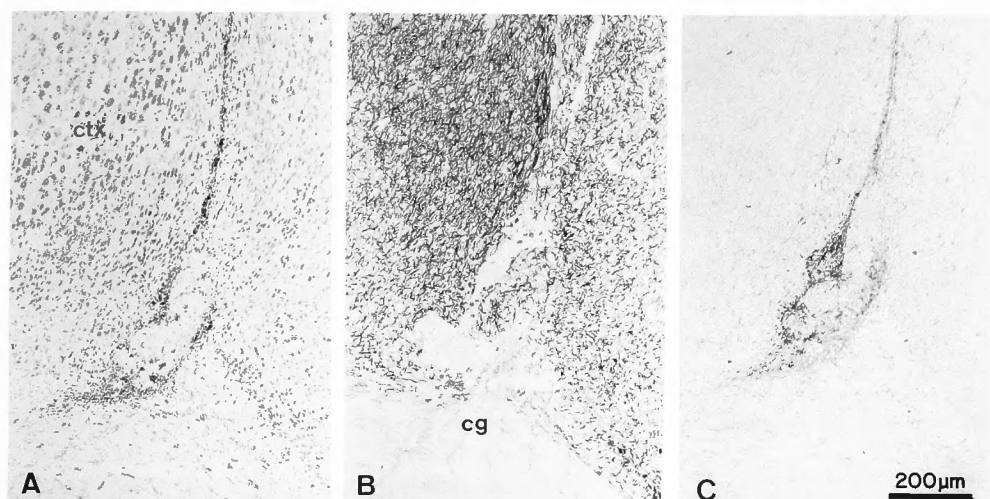


Fig. 1 Transplantation into the cerebral cortex. A: Nissl stain, B: AChE stain, C: GFAP stain.

Thick glial scar is formed around the transplanted tissue, preventing the outgrowth of regrowing neurites. Nevertheless, graft-host connection is partially noticed. ctx: cerebral cortex, cg: cingulum, bar=200 μ m.

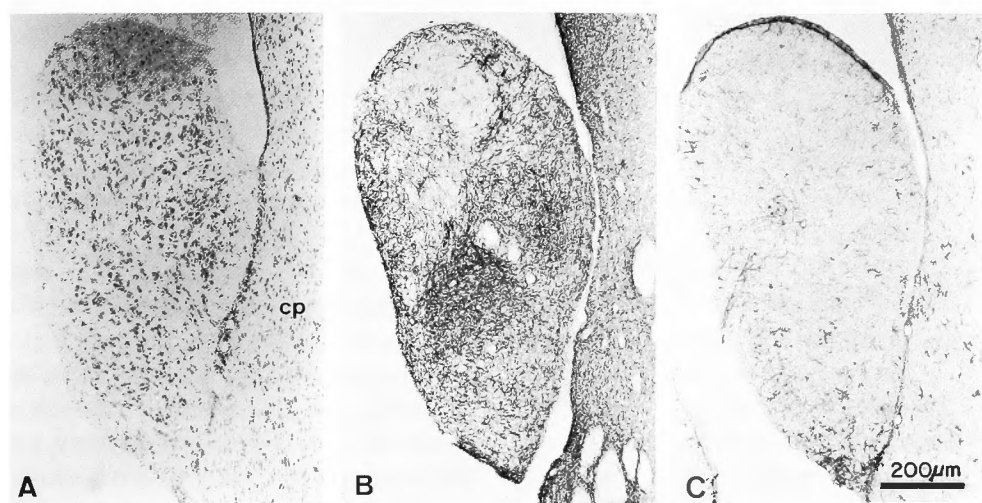


Fig. 2 Transplantation into the lateral ventricle. A: Nissl stain, B: AChE stain, C: GFAP stain.

The grafted tissue grows relatively well. Graft-host connection beyond the ependym is hardly seen. GFAP-immunoreactive cells concentrate in outskirts of the graft and perivascularly within the graft. cp: caudate-putamen, bar=200 μ m.

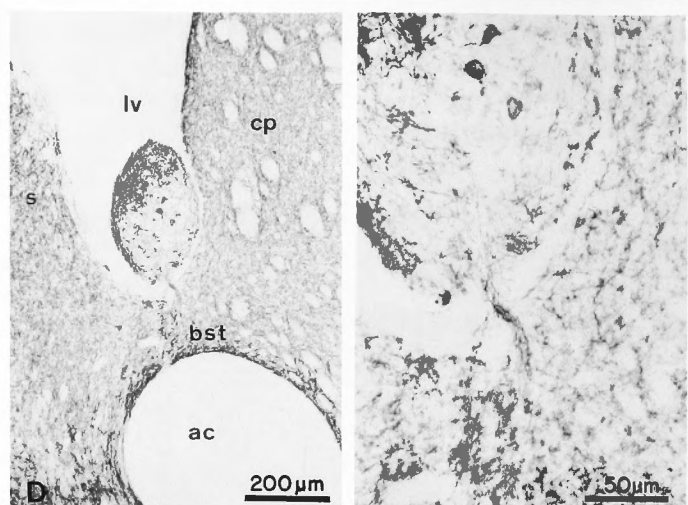


Fig. 2 D: Another sample of the transplant into the lateral ventricle. AChE stain.

This rat developed a marked hydrocephalus due to obstruction of the foramen of Monro. Obvious graft-host connection is noticed, considering the hyperinnervation from graft to host. ac: anterior commissure, bst: bed nucleus of stria terminalis, cp: caudate-putamen, lv: lateral ventricle, s: septal nucleus, bar=left; 200 μm, right; 50 μm.

部では GFAP 陽性アストロサイトはごく少数で、クモ膜下腔に面する周辺部や血管周囲に集簇する傾向にあった (Fig. 3A-C). 手技的にはクモ膜下腔の血管や脳表を損傷しないように硬膜およびクモ膜を切開し、移植片を挿入することは容易ではなかった。

④では移植片とホストとの間に著明なグリア性および結合組織性癒着形成が見られ、ホストへの線維進入が阻止された (Fig. 4A, B) が、部分的ではあるにしる束になった神経線維がホスト側へ hyperinnervate しているのが多数の例で観察され、その線維群の先端部あたりに GFAP 陽性アストロサイトが比較的多数認められた (Fig. 4C, D).

IV 考 察

脳移植は、神経細胞の分化・線維の伸長・標的細胞の認識・シナプス形成および再生のメカニズムの研究手段として、近年めざましく発達している。さらに、障害された脳機能の回復を目指す治療手段としての研究も進められており、臨床的にも大いに注目されている。

神経移植が成功するためには、移植操作により損傷され、低酸素・低栄養状態に陥ったドナー細胞が、いち早く酸素・栄養供給を受け、再生線維を伸展しやす

い環境が形成されなければならないし、ホスト側では移植操作によるダメージを最小限に留める工夫が必要である。その上で、最終的にホストの要求に応じ、かつその調節下に、グラフトが育成し、ホストに好影響をもたらすことが望まれる。

脳実質内移植は、ターゲットに移植できる最大の利点を有するが、酸素・栄養供給が良好とは言えず、周囲からの組織圧やグリア性癒着形成のため育成も制限され、移植細胞が壊死に陥る率も高いと思われる。それらの欠点を克服する方法として、組織をトリプシンなどで酵素処理した後ビベッティングで細胞をばらばらにし、その浮遊液を注入する cell suspension 法が考案され^{5,6)}、期待が持たれている。しかし、移植前操作による細胞の傷害や媒体となる液の組成、注入量や漏れなどの技術的問題を解決しなければならない。

脳実質内移植よりも生着のよい方法として、脳実質の一部を吸引して cavity を作成し、その中に移植する方法がある。さらに、cavity 作成直後に移植するよりも、内因性の栄養因子が増えてくる1週目から2週目の間に移植するとさらに結果が良くなるという (delayed cavity technique)^{20,21,27)}。しかし、cavity を作るために脳に大きな傷害を与えてしまう点が最大の欠点であり、delayed cavity technique では2度の手術を

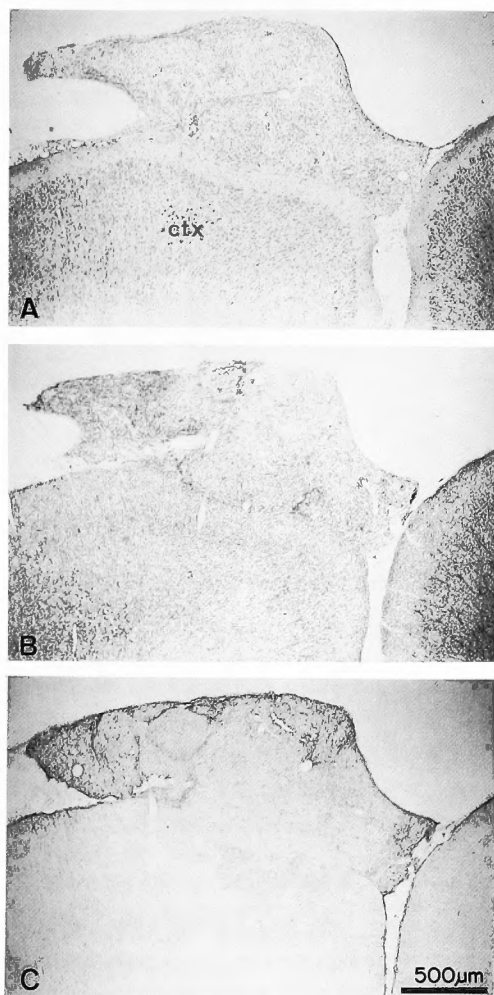


Fig. 3 Transplantation into the subarachnoid space.

A: Nissl stain, B: AChE stain, C: GFAP stain.

The growth of the graft and astrocytic reaction in the graft resemble to those of transplantation into the lateral ventricle, but hyperinnervation is not found. ctx: cerebral cortex, bar=500 μ m.

必要とすることも難点である。また、場合によってはホストへの著明な hyperinnervation が起こり得るが、これがホスト脳の機能回復に有効であるのか、または逆にホストの神経回路網に重大な障害をもたらす危険があるのかも明らかでない。これは脳内移植で最も危惧される問題の1つと思われるが、これまでにこのような指摘はほとんど見られない。

脳内移植に伴うグリア性瘢痕形成については、著明

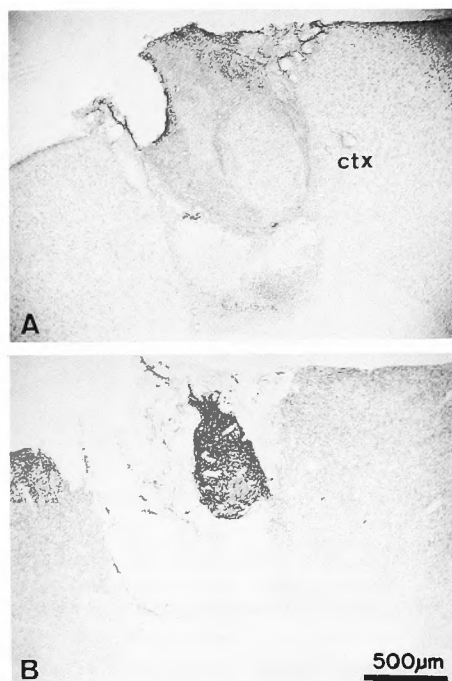


Fig. 4 Transplantation into the cerebral cortex by delayed cavity technique. A: Nissl stain, B: AChE stain.

The dense glial and connective tissue scar is formed, preventing the outgrowth of neuronal processes. ctx: cerebral cortex, bar=500 μ m.

な瘢痕が形成され、神経線維の伸張が阻止されたという報告から、瘢痕形成がほとんど無く、グラフトーホスト境界のはっきりしないほどよく着生したという報告までさまざまである^{3,11,24}。移植操作によるホスト脳の損傷の程度やドナー組織の違いによる免疫学的反応の差などが関係していると考えられる。われわれは同種の胎仔脳組織を用いているが、同一移植片であってもグリア性瘢痕が強く形成されている部位と、それが弱い部位とが混在して認められた。delayed cavity technique では髄膜からの結合組織性瘢痕も加わり、瘢痕形成はさらに強く認められたが、部分的にホスト脳内に hyperinnervate している所があり、その先端部に GFAP 陽性アストロサイトが認められた。これらアストロサイトが胎仔由来なのかホスト由来なのか、どんな役割を担っているのかは解っていない。Emmett らは ³H-thymidine でラベルしたアストロサイトを移植し、その移動能を調べているが、移植部位から

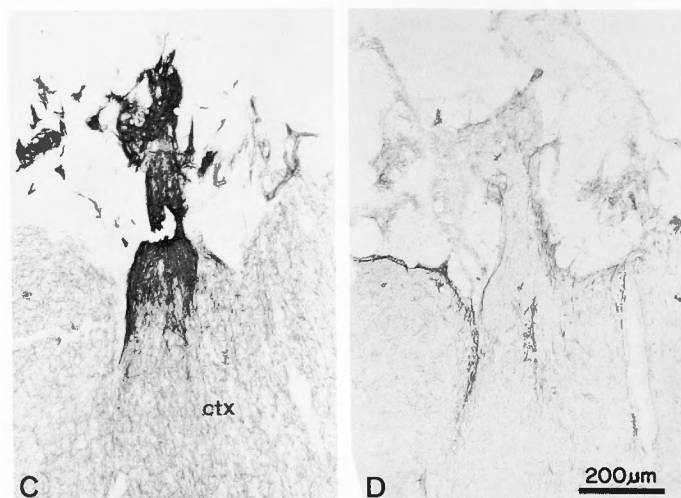


Fig. 4 C and D: Another sample of transplantation by delayed cavity technique.

C: AChE stain, D: GFAP stain.

Hyperinnervation from graft to host cortex is partially noticed, and GFAP-immunoreactive astrocytes are found at the front of neuronal innervation. bar=200 μ m.

かなり離れた所まで移動し得るという。また、その移動は血管に沿っていく可能性が考えられるという¹⁰⁾。また、最近のグリア細胞の発生・分化と機能についての多くの研究から、胎児期後半から新生児期にはグリア細胞は活発に分化・増殖し、特にアストロサイトは神経細胞の移動や神経線維の伸長の誘導に関与していると考えられている。したがって、ここで認められたアストロサイトは胎仔由来の可能性があり、瘢痕形成に与るのではなく、再生神経線維の伸長を誘導しているのではないかと推察された。

脳室内移植では、髄液や脳室上衣細胞から酸素・栄養供給を受けて成育しやすい利点があるが、神経線維は上衣層を通過し難く、また、生着、成育したグラフトによって髄液の通過障害を生じる危険がある。

クモ膜下腔には髄液があり、豊富な軟膜血管とも接しているため、酸素・栄養供給は良好と考えられる。脳の皮質以外のターゲットからは離れること、一塊の組織としての発育スペースに乏しいなど欠点はあるが、場所を選べば移植部位として考慮され得る。脳表に軟膜があるため、ホストへの innervation は妨げられることが予想されるが、軟膜を穿通する血管に沿って、ホスト内に線維が伸展される可能性もある。ただ、delayed cavity technique で見られたような hyperinnervation の所見は認められなかった。

脳室内および脳表上の移植片とも、移植片内の GFAP 陽性アストロサイトは、髄液腔に面した周辺部や、血管の周囲に多数観察された。これらアストロサイトは、神経細胞の支持に加えて、移植片内の内部環境の恒常性維持に関わっているものと推察される。

V ま と め

アルツハイマー病に対する脳内移植療法が動物実験において検討され始めている。そこには解決されねばならない問題が数多く存在するが、その1つに移植手技がある。本研究ではコリン作動性神経の起始核を含む前脳基底部を胎仔から得て、成ラットの大脳皮質内、脳表クモ膜下腔、脳室内および delayed cavity technique にて大脳皮質内にそれぞれ移植した。

皮質内移植では、酸素・栄養供給や発育スペースおよびグリア性瘢痕形成のため、移植片の成育はあまり良くなかった。

脳室内と脳表の移植片の成育は良好で、髄液に面するその辺縁部や血管周囲に GFAP 陽性アストロサイトの集簇を認め、これらアストロサイトは移植片内の内部環境の恒常性維持に関わっている可能性が推察された。

delayed cavity technique では移植片がグリア性および結合組織性瘢痕により取り巻かれるが、部分的にホ

ストへの hyperinnervation が観察され、幼若アストロサイトのマイグレーションに誘導されている可能性が考えられた。ホストに対してはしかし、この innervation が神経回路に重大な障害を及ぼす危険性もはらんでいることを指摘しておきたい。

文 献

- 1) Adolfsson R, Gottfries CG, Roos BE, et al: Changes in the brain catecholamines in patients with dementia of Alzheimer type. *Br J Psychiat* 135: 216-223, 1979.
- 2) Arai H, Kosaka K, Iizuka R: Changes of biogenic amines and their metabolites in postmortem brains from patients with Alzheimer's-type dementia. *J Neurochem* 43: 388-393, 1984.
- 3) Azmitia EC, Whitaker PM: Formation of a glial scar following microinjection of fetal neurons into the hippocampus or midbrain of the adult rat: an immunocytochemical study. *Neurosci Lett* 38: 145-150, 1983.
- 4) Backlund EO, Granberg PO, Hamberger B, et al: Transplantation of adrenal medullary tissue to the striatum in parkinsonism. First clinical trials. *J Neurosurg* 62: 169-173, 1983.
- 5) Björklund A, Stenevi U, Schmidt RH, et al: Intracerebral grafting of neuronal cell suspension. Survival and growth of nigral cell suspensions implanted in different brain sites. *Acta Physiol Scand (Suppl)* 522: 1-18, 1983.
- 6) Björklund A, Gage FH, Stenevi U, et al: Survival and growth of intrahippocampal implants of septal cell suspensions. *Acta Physiol Scand (Suppl)* 522: 49-58, 1983.
- 7) Bondareff W, Mountjoy CQ, Roth M: Loss of neurons of origin of the adrenergic projection to cerebral cortex (nucleus locus coeruleus) in senile dementia. *Neurology* 32: 164-168, 1982.
- 8) Cross AJ, Crow TJ, Johnson JA, et al: Studies on neurotransmitter receptor systems in neocortex and hippocampus in senile dementia of the Alzheimer-type. *J Neurol Sci* 64: 109-117, 1984.
- 9) Dunnett SB, Tonzio 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.
- 10) Emmett CJ, Lawrence JM, Seeley PJ, et al: Studies of the behaviour of purified rat astrocytes after transplantation into syngeneic adult brain. *Prog Brain Res* 78: 383-386, 1988.
- 11) Eng LF, Reier PJ, Houle JD: Astrocyte activation and fibrous gliosis: glial fibrillary acidic protein immunostaining of astrocytes following intraspinal cord grafting of fetal CNS tissue. *Prog Brain Res* 71: 439-455, 1987.
- 12) 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.
- 13) Freed CR, Breeze RE, Rosenberg NL, et al: Therapeutic effects of human fetal dopamine cells transplanted in a patient with Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 82: 715-721, 1990.
- 14) Hefti F: Nerve growth factor (NGF) promotes survival of septal cholinergic neurons after fimbrial transections. *J Neurosci* 6: 2155-2162, 1986.
- 15) 板倉 徹, 中井三量, 亀井一郎, 他: 末梢神経節の脳内自家移植—パーキンソン病, アルツハイマー病の治療を目的として— *神経進歩* 32: 808-817, 1988.
- 16) 金 哲: 脳移植と治療の展望. *実験医学* 4: 1014-1018, 1986.
- 17) Lindvall O, Backlund EO, Farde L, et al: Transplantation in Parkinson's disease: Two cases of adrenal medullary grafts to the putamen. *Ann Neurol* 22: 457-468, 1987.
- 18) Madrazo I, Drucker-Colin R, Diaz V, et al: Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease. *N Engl J Med* 316: 831-834, 1987.
- 19) Madrazo I, Leon V, Torres C, et al: Transplantation of fetal substantia nigra and adrenal medulla to the caudate nucleus in two patients with Parkinson's disease. *N Engl J Med* 318: 51, 1988.
- 20) Nieto-Sampedro M, Lewis ER, Cotman CW, et al: Brain injury causes a time-dependent increase in neuronotrophic activity at the lesion site. *Science* 217: 860-861, 1982.
- 21) Nieto-Sampedro M, Manthorpe M, Barbin G, et al: Injury-induced neuronotrophic activity in adult rat brain: Correlation with survival of delayed implants in the wound cavity. *J Neurosci* 3: 2219-2229, 1983.
- 22) Penn RD, Goetz CG, Tanner CM, et al: The adrenal medullary transplant operation for Parkinson's disease: Clinical observations in five patients. *Neurosurgery* 22: 999-1004, 1988.
- 23) Phelps CH, Gage FH, Growdon JH, et al: Potential use of nerve growth factor to treat Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 10: 205-207, 1989.
- 24) Smith GM, Silver J: Transplantation of immature and mature astrocytes and their effect on scar formation in the lesioned central nervous system. *Prog*

- Brain Res 78: 353-361, 1988.
- 25) 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.
- 26) 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.
- 27) Whittemore SR, Nieto-Sampedro M, Needels DL, et al: Neuronotrophic factors for mammalian brain neurons: Injury induction in neonatal, adult and aged rat brain. *Dev Brain Res* 20: 169-178, 1985.
- 28) Williams LR, Varon S, Peterson GM, et al: Continuous infusion of nerve growth factor prevents basal forebrain neuronal death after fimbria fornix transection. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 9231-9235, 1986.