

実験的脳虚血における脳内カテコラミンの変動 ——組織化学的検索——

京都大学医学部脳神経外科学教室（主任：半田 肇教授）

阿 波 根 朝 光

〔原稿受付：昭和55年8月9日〕

Histochemical Changes of Brain Catecholamines in Cerebral Ischemia in Gerbils

ASAMITSU AHAGON

Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director : Prof. Dr. HAJIME HANDA)

Fluorescence histochemical method of FALCK et al was applied to 50 gerbils with the ligation of unilateral common carotid artery for investigating the alteration of brain catecholamines in the cerebral ischemia. The distribution of catecholamine terminals and cell bodies in gerbils was the same as in other mammals. Fifteen symptomatic gerbils exhibited a large area of ischemic changes demarcated by neuronal vacuolation band at the medial border in the ipsilateral hemisphere. Most dopamine-terminal-rich areas were included by such ischemic areas. One hour later, in the ligated hemisphere, diffuse green fluorescence of dopamine terminals showed only slight decrease in intensity comparing to the non-ligated hemisphere, but the white matter and the bundles of myelinated fibers adjacent to and in the dopamine-terminal-rich areas came to have an intense green fluorescence in contrast to the non-ligated hemisphere where they were normally non-fluorescent. This finding is considered to indicate the extraneuronal leakage and diffusion of dopamine. Intensity of such extraneuronal green fluorescence was especially high in glial cells. Occasionally there was also an unusual green fluorescence in the lumen of small vessels. Visual appearance of varicose green fluorescence of noradrenaline terminals showed a considerable variability in case by case since noradrenaline-terminal-rich areas such as hypothalamus were frequently spared from the ischemia. However, such varicose fluorescences, when involved by the ischemia, were constantly decreased in both number and intensity. Ischemic involvement of dopamine cell bodies in the substantia nigra was observed and

Key words : Cerebral ischemia, Catecholamine, Histochemistry, Gerbil.

索引語：脳虚血，カテコラミン，組織化学，砂ネズミ。

Present address : Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto, University, Sakyo-ku, Kyoto, 606, Japan.

then resulted in reduction of fluorescence in themselves.

In 2 or 3 hours of the ischemia, there was a marked reduction or disappearance of the catecholamine fluorescence in the ischemic area. It may be in part attributed to further diffusion of the extraneuronal leaked catecholamines. So-called pile-up phenomenon was observed at the periphery of ischemic area in 1 as well as 2 or 3 hours of the ischemia.

Another 15 transiently symptomatic gerbils were investigated 3, 7, 14 or 28 days later. Ischemic foci were confined to ipsilateral hippocampus in most cases except for two cases where caudate nucleus and cerebral cortex were involved. Seven days or more later unusual large varicose fluorescences with intervarticose fluorescence were seen in bilateral dentate gyri. This appearance looked like the peripheral sympathetic nerves. In caudate nucleus and cerebral cortex involved by the ischemia, swollen varicose fluorescences were scattered and, occasionally, delicate fluorescent fibers could be traced back to them. Such findings seemed to indicate the postischemic nerve regeneration.

I. は じ め に

脳虚血の病態に関する研究は、現在多方面からなされているが、脳虚血が神経伝達物質に及ぼす影響についての知見は、未だ充分ではない。神経伝達物質は、神経細胞、または神経細胞と他細胞間の情報伝達にあずかるだけでなく、それ自体、種々の薬理作用を持った物質であるので、その動向は、脳虚血の病態生理に深い関連を有するものと思われる。正常脳において神経伝達物質がたどる運命は、神経細胞へ供給された前駆物質からの合成、軸索輸送、神経終末での貯蔵、神経刺激に呼応した放出、受容体への作用、神経終末への再取り込み、分解であるが¹¹⁾、これらの過程はエネルギー依存性であるので、虚血脳においてエネルギー源としての酸素、ブドウ糖などの供給が絶たれた時、変化を来すであろうことは容易に想像できる。

従来、実験動物を用いて脳虚血を作製するには、比較的煩雑な手技を要し、非生理的な条件下に置くことが多かった。しかし、Mongolian gerbil (砂ネズミ) は、一側総頸動脈の結紮という容易な手技で、その30～60%に同側大脳半球の広範囲な虚血を作製でき、わずかな侵襲で脳梗塞が作製可能という点で画期的であった^{2,26,31)}。

現段階で、神経伝達物質候補の中で、最も確かであり、それについての知見も豊富に得られているのは、Catecholamine (CA) 類 (Dopamine (DA), Noradre-

naline (NA), Adrenaline) であると思われる。近年、gerbil や他動物の虚血モデルを用い、虚血脳におけるCAの動向が、種々の方向から研究されているが、その殆んどが生化学的見地からのものであり、かつ、報告間に少なからず不一致が見られる^{18,20,28,30,35,36,37,45,47)}。

これらの不一致を統一する一助として、今回、gerbil の一側大脳半球虚血モデルを用い、CAの変動を、組織化学的に検索した。

II. 材料及び方法

体重60～80gのgerbil 50匹に、エーテル麻酔を施し、左総頸動脈を手術用顕微鏡下に露出し、近接する迷走神経や内頸静脈から注意深く剥離し、二重結紮後、切断した。その後、Kahnの記載に基き²⁶⁾、明らかな神経症状を持続的に呈したgerbilを、Symptomatic groupとし、手術から30分、1時間、2時間、3時間後に断頭屠殺し、脳虚血急性期の変化の検索にあてた。神経症状が軽度で、しかも一過性にとどまった例を、borderline groupとして、手術から3日、1週間、2週間、4週間後に断頭屠殺した。手術後、速やかに覚醒し、神経症状を示さなかった例をasymptomatic groupとして、上記の各時期に断頭屠殺した。全例で、速やかに脳を摘出し、前額断で4ブロックに切断し、各ブロックをFalck & Hillarpのモノアミン蛍光組織化学法¹⁶⁾に準じて凍結乾燥後10μに薄切し、Zeissの透過型蛍光顕微鏡にて観察した。一次フィルターと

して Schott BG 12, 二次フィルターとして Zeiss 50 を用い, CA を緑色蛍光として観察することができた。通常と異なる部位に緑色蛍光をみとめた場合は, 紫外線照射や水素化硼素ナトリウム (NaBH_4) 添加後, 著明に減弱ないしは消失することによって, CA 由来と判断した¹²⁾。なお一部の例で, 屠殺20分~1時間前に, 2% Evans blue 0.1 ml/100 mg を静注し, その赤色の蛍光をもって血管内腔の指標とした。切片の一部を Klüver Barrera 法にて染色し, 虚血の程度, 範囲の検索にあてた。また4匹で sham-operation を施行し, 1時間, 3時間, 1週間, 3週間にそれぞれ一匹ずつ断頭屠殺し, 上記と同様に, Falck-Hillarp 法にて処理し検索した。

なお無処置の gerbil 3匹, および Nialamide 200 mg/kg i.p. を8時間前に, L-dopa 20 mg/kg i.v. を2時間前に負荷した gerbil 3匹を, やはり Falck-Hillarp 法にて処理し, 前者で正常 gerbil 脳における CA 蛍光の分布状態を確認し, 後者で DA 蛍光と NA 蛍光の鑑別を試みた⁹⁾。

Ⅲ. 結 果

左総頸動脈結紮後, 50匹中15匹が Symptomatic group として分類された。これらの gerbil は Kahn らが記載した如く²⁶⁾, 終始, 両側とも閉眼し体幹は側屈したまま静止した傾眠状態を呈した。これに突発的に, 反時計回りの回転性歩行, 全身痙攣, rolling fit²⁾ などが加わったが, さらに一部の例で後肢で跳ね回る hopping 様の運動も見られた。borderline group は15匹であり, 手術後30分以内に無症状となった。残る20匹には明らかな神経症状をみとめなかったのので, asymptomatic group とした。

1. 組織学的変化

凍結乾燥標本から得られたパラフィン切片の一部に, Klüver-Barrera 法に従がい, 髓鞘・ニッスル小体染色を施した。freeze artifact のため, 微妙な虚血性変化を検索することは困難であったが, neuronal shrinkage, perivascular edema, neuropil vacuolation などの著しい変化は, 非結紮側と対比することにより, 容易に認識できた。

Symptomatic group のうち, 30分の虚血例では明らかな変化をみとめなかったが, 1時間の例では, 結紮側大脳半球内側に, 断続的に連なる帯状の神経網の空胞化をみとめ, これは, 海馬, 大脳基底核, 視床においても最も著明で, 視床下部では, 一部の例を除い

て明らかでなかった。この断続的な空胞帯より外側では, 極く軽度ながら, neuronal shrinkage, perivascular edema などの変化がみとめられた。

2~3時間の虚血例では, 大脳半球内側における断続的な神経網の空胞化は顕著化し, その大きさを増して互いに癒合し, 大脳半球を縦走する帯状の連なりを示していた。その走行は視床において最も正中に接近し, そこから尾側・吻側・腹側・背側へ進む程, 正中から離れる傾向が見られた (Fig 1)。しかし正中からの距離は, gerbil によってバラツキが見られ, 視床下部の大部分, 時には, 視床の一部を回避している例も見られた。この空胞帯より外側では, 著明な neuronal shrinkage, perivascular edema をみとめ, 1時間例と同様, このような変化は, 海馬, 基底核, 視床において最も著明であった。空胞帯より内側部と, 非結紮側大脳半球においては, 明らかな虚血性変化は見られなかった。

Borderline group の虚血果は, 殆んど全例で, 海馬の一部 (特に, 吻側外側部) に限られたが, 1週目1例, 4週目1例で, 尾状核, 内包, 大脳皮質内に, 限局性の小虚血果をみとめた。

Asymptomatic group では, 明らかな虚血性変化をみとめなかった。

2. 組織化学的变化

無処理 gerbil における CA 神経系の脳内分布は, 既に詳細に報告されている rat のそれと^{13,17,40)}, ほぼ同じであった。すなわち, 延髄・橋において, ①青班核 (A_6) を代表とする A_1 から A_7 , ②中脳黒質から腹側被蓋野に分布する A_8 から A_{10} , ③視床下部に分布する A_{11} から A_{13} の各神経細胞群をみとめることができた。また神経終末群については, ④脳幹, 視床下部を中心に瘤状の緑色蛍光を, ⑤尾状核・嗅脳を中心にび漫性の緑色蛍光をみとめた。モノアミン酸化酵素阻害剤である Nialamide と, DA の前駆物である L-dopa の投与により, ②と⑤の蛍光は著明に増強したので DA 由来と判断し⁹⁾, 殆んど増強を示さなかった①と④の蛍光を NA 由来と判断した。

DA 神経終末由来のび漫性蛍光の分布領域の殆んどが, 前項で述べた虚血領域に含まれたのに対し, NA 神経終末由来の瘤状蛍光の多い視床下部, 特に内側半分は, 虚血領域から, はずれていた。

1) 脳虚血における CA 蛍光の変化

i) Symptomatic group (15匹)——急性期——

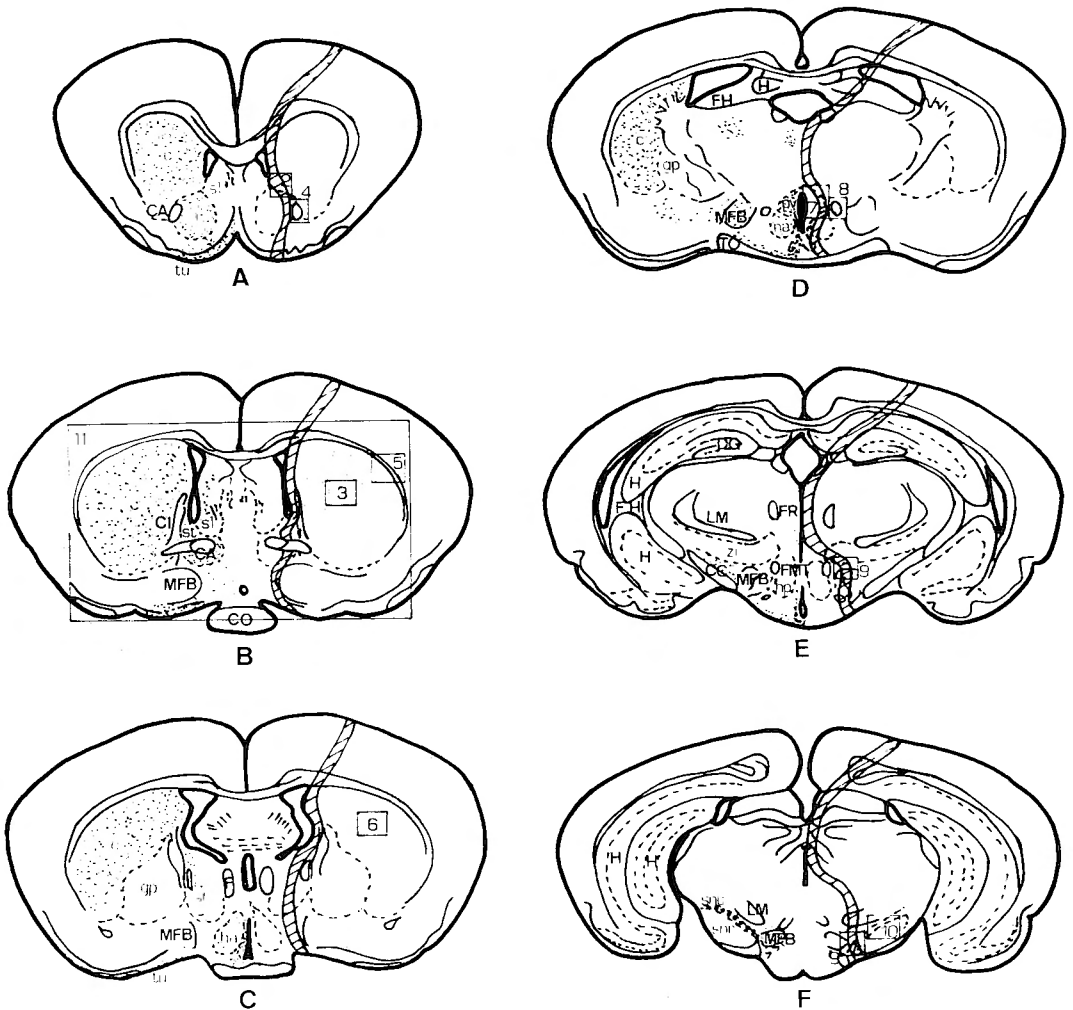


Fig. 1 Symptomatic group で見られた典型的な虚血領域。前額断で、A-F の順に尾側へ進む³³⁾。傍正中部の斜線帯は神経網空腔帯の典型的走行を示す。これより外側部が虚血領域に相当する。左半球の・印と●印は、それぞれ CA 神経終末と細胞体を示す。方形 2-10 は、以下の虚血急性期の写真 2-10 の場所を示す。

a: 側坐核 c: 尾状核 CA: 前交連 CC: 大脳脚 CI: 内包 CO: 視交叉 DG: 齒状回 F: 脳弓 FH: 海馬采 FMT: 乳頭視床束 FR: 反屈束 gp: 淡蒼球 H: 海馬回 ha: 視床下部前核 hp: 視床下部後核 LM: 内側毛帯 sl: 外側中隔核 st: 終界条間質核 sinc: 黒質 pars compacta snr: 黒質 pars reticulata TO: 視索 tu: 嗅結節

30分虚血 (3匹): CA 螢光の明らかな変化をみとめなかった。

1時間虚血 (6匹): 神経網空腔帯より外側、即ち虚血領域においては、多かれ少かれ CA 螢光の減弱をみとめたが、その程度は、神経症状が重篤な例ほど著しかった。神経網空腔帯の内部では、最も螢光の減弱が著しく、殆んど消失している例もみられた (Fig. 7-

B)。神経網空腔帯が未だ充分に形成されていない例では、細い断続的な空腔帯の外側に接し、帯状の螢光の減少が見られた (Fig. 2)。各例とも、DA 神経終末の螢光は、NA 神経終末に比し減弱の程度が大であった。

DA 神経終末のび慢性綠色螢光の減弱が軽度であった例では、以下に述べる如く興味ある所見が得られ

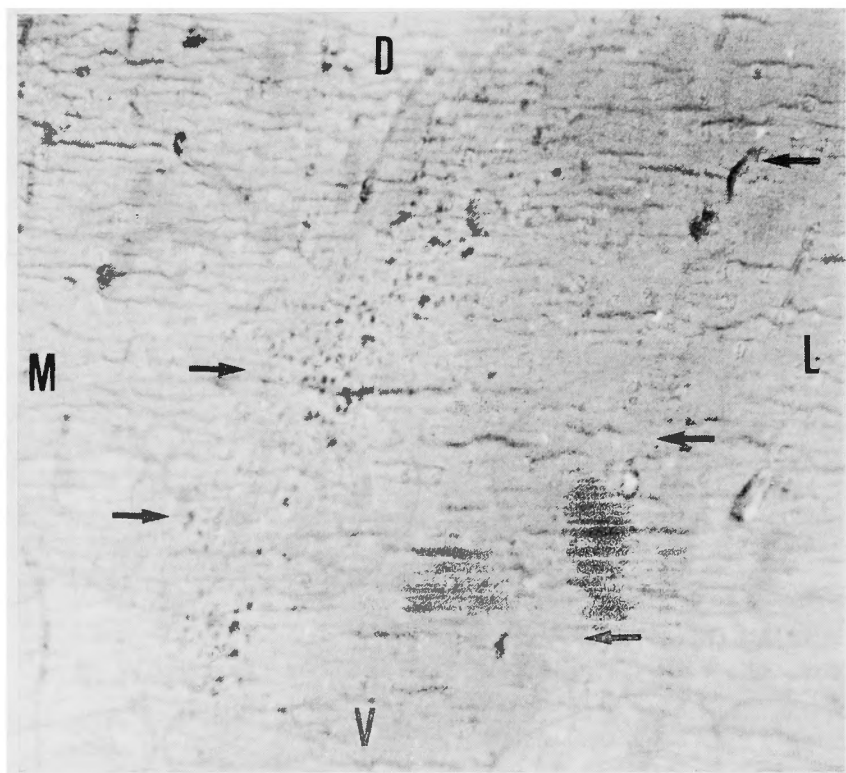


Fig. 2 Symptomatic group. 1時間虚血. $\times 40$. 虚血巣内側縁の帯状の螢光の低下を示す (3本矢印).
その更に内側に断続的な神経網の空腔化をみとめる (2本矢印).

D: 背側 V: 腹側 M: 内側 L: 外側

た. すなわち尾状核は, 正常例においてはDA神経終末由来のび慢性緑色螢光の中に無螢光の有髓線維束が散在する像を呈するが, 1時間の虚血例の非結紮側ではこの正常像を呈しているのに対し (Fig. 3-A), 結紮側の尾状核では, 螢光の減弱は軽度であるが, 本来無螢光なはずの有髓線維束にも顕著な螢光をみとめ, 殆んど, 周囲のDA神経終末領域から区別できない程であった (Fig. 3-B). この有髓線維束内の緑色螢光は, 2~3分間の短時間の紫外線照射で, 著明に減弱したので (Fig. 3-C), CA由来, 中でも, 解剖学的な関係からDA螢光と考えられた. また有髓線維束内でも, 全体に緑色螢光を呈しているため, 本来無螢光な黒点として見えるはずのグリア細胞も識別できず, 短時間の紫外線照射で線維束の螢光がほぼ消失した後も, グリア細胞内には明らかな緑色螢光が残存していた. さらに長時間の紫外線照射や NaBH_4 添加でこの螢光も減少したので, 周りの有髓線維束よりも, ある

程度高濃度にグリア細胞内に蓄積されたCA (ここではDA) に由来する螢光と考えられる. このグリア細胞に関する所見は, 側坐核内で, やはりDA神経終末に囲まれた前交連前脚において, 一層明らかな形で観察することができた (Fig. 4). このような緑色螢光は, 尾状核に接する皮質下白質にも軽度ながら見られ, 時に尾状核の辺縁を識別し難い程であった (Fig. 5). また正常尾状核内において, 毛細血管は無螢光の点 (横断像), あるいは短かい曲線 (縦断像) として容易にみとめられるが (Fig. 3-A), 虚血尾状核では, これらの毛細血管も, 全体を被う緑色螢光のためか, あるいは血管自体が収縮しているのか, 即座にはそれとみとめ難くなっていた (Fig. 3-B). 一部の細動脈サイズの小血管内腔にも螢光がみとめられ, これも紫外線照射や, NaBH_4 添加で, ほぼ完全に消失した (Fig. 6).

視床下部においては, 1時間の虚血例では組織学的

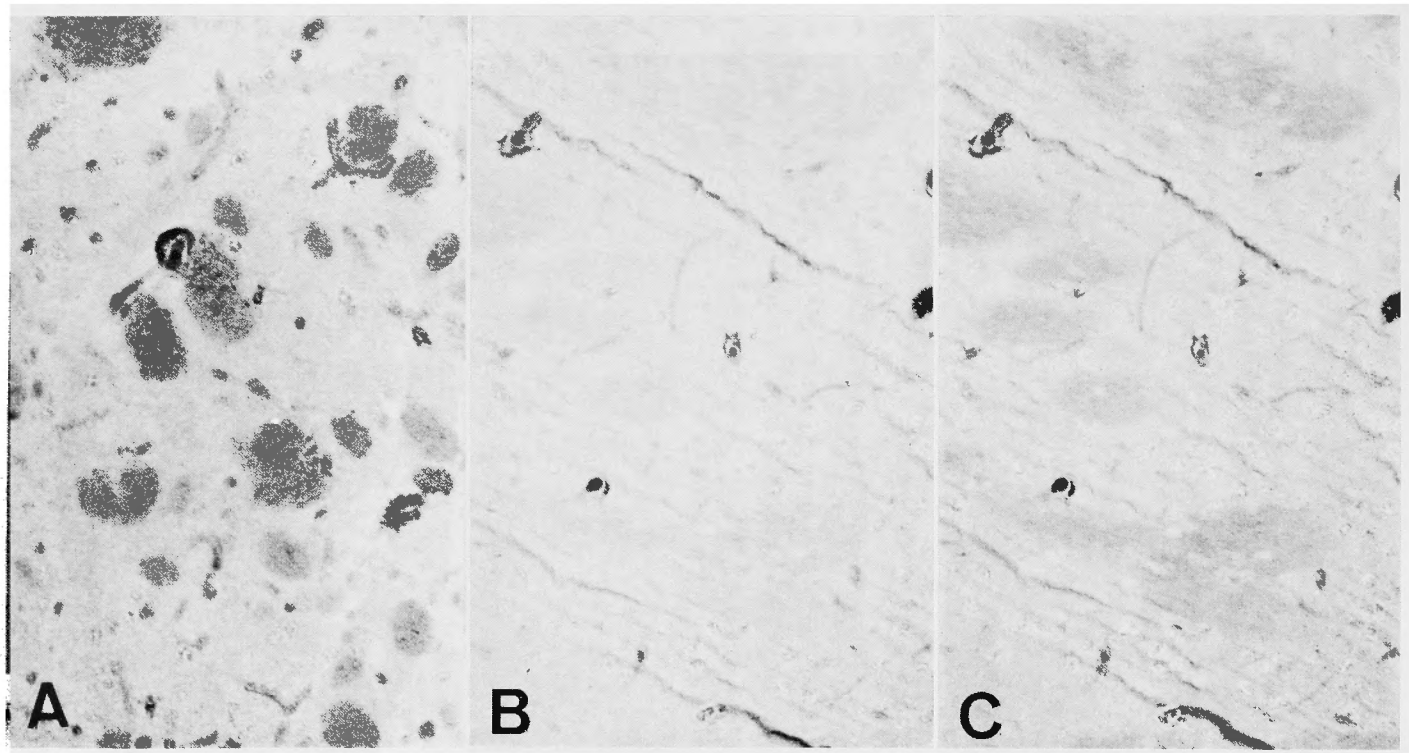


Fig. 3 Symptomatic group 1時間虚血. 尾状核×80 A) 非結紮側：有髄線維束・毛細血管・細胞体などを，無蛍光として識別できる． B) 結紮側：全体に蛍光を呈し，上記構造を識別できない． C) 結紮側：短時間の紫外線照射後，再び無蛍光として見えて来るが，その中のグリア細胞は，まだ蛍光を帯びている．

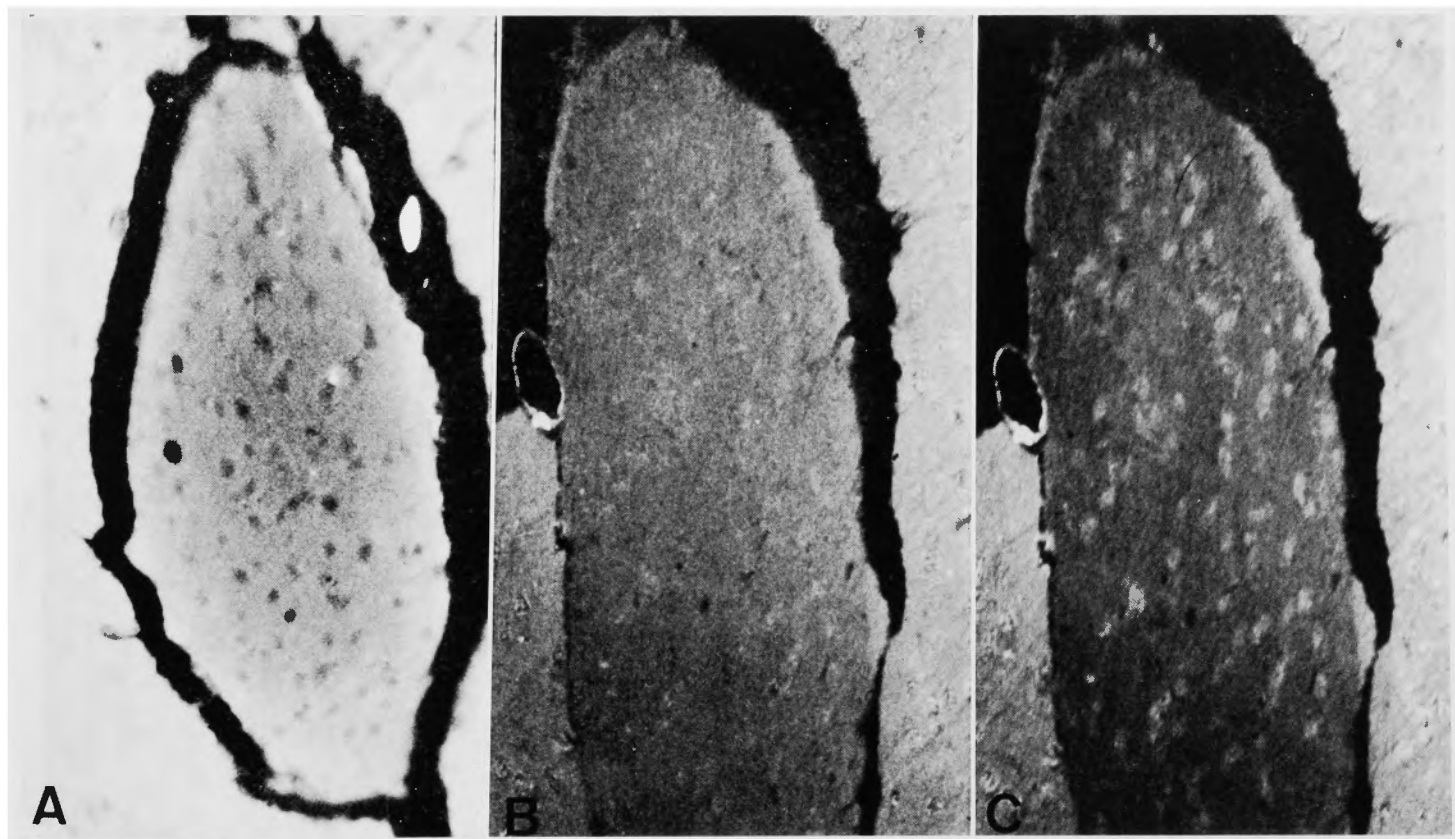


Fig. 4 Symptomatic group 1時間虚血. 前交連前脚×80 A) 非結紮側: 無蛍光な有髄線維束間に, グリア細胞が黒点として見える. B) 結紮側: 全体に蛍光を帯び, グリア細胞を識別できない C) 結紮側: 短時間の紫外線照射後, 周りの有髄線維の蛍光が低下しているが, グリア細胞内にはまだ明らかな蛍光が残っている.

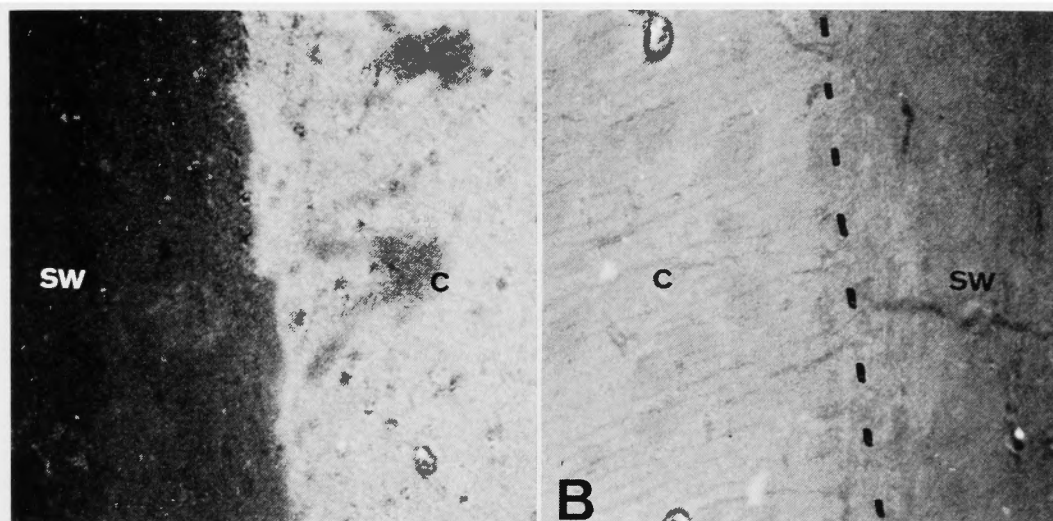


Fig. 5 Symptomatic group 1時間虚血. 尾状核・皮質下白質境界部×40 A) 非結紮側: 境界を境に, 皮質下白質では, ほぼ無蛍光 B) 結紮側: 皮質下白質にも蛍光が見られ, 尾状核の辺縁 (破線) が不鮮明となっている. c: 尾状核 sw: 皮質下白質

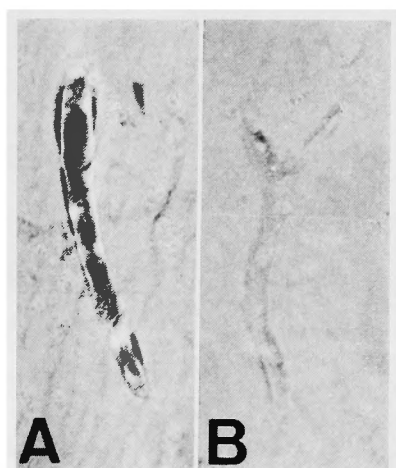


Fig. 6 Symptomatic group 1時間虚血. 尾状核内の小血管. A) 非結紮側: 内腔はほぼ無蛍光. 血管壁の蛍光は黄色の盲蛍光 B) 結紮側: 内腔にも蛍光が充満している.

に明らかな虚血性変化を示さなかった例も多く, 一定の明らかなCA蛍光の変化はみとめ難かった (Fig. 7-A). しかし, 時に視床下部においても, 組織学的に虚血性変化の明らかな例があり, そのような例では, 神経網空胞帯を境に外側で明らかな蛍光の減弱をみとめ, 本来, 瘤状な蛍光がややび慢性の様相を帯び, 周辺の小血管壁にも緑色蛍光がみとめられた (Fig. 7-B).

また脳弓・乳頭視床束など, 視床下部内に存在する有髄線維束や, 細胞体も, 非虚血側では, 無蛍光の構造として, 容易に識別できたが, 虚血側では, 周辺の瘤状蛍光の減少とともに, これらも弱い蛍光を帯び, 識別し難くなっていた (Fig. 8).

1時間虚血6例中2例に, 虚血巣尾側辺縁に接して, 所々 (大脳脚背内側や, Zona incerta 内側など), 通常では見られない, CAの軸索内貯留 (pile-up) を思わせる強力な緑色蛍光がみとめられた (Fig. 9). 神経症状の激しい例では, 黒質 (とくに A₉ 外側 2/3) も虚血領域に含まれ, このような例では, 同部の DA 神経細胞の蛍光に著明に減弱し, 加えて, 尾状核のび慢性緑色蛍光も著明に減弱していた (Fig. 10). 橋以下の脳幹部は, 全例で虚血をまぬがれ, 青斑核を代表とする NA 神経細胞や神経終末の蛍光は, 明らかな変化を示さなかった.

2~3時間虚血 (6例): 大脳半球内側を縦走する神経網空胞帯よりも外側では, 全例 DA 蛍光・NA 蛍光共に著明に減弱し, 殆んど消失する迄になっていた (Fig. 7-C, Fig. 11) が, 空胞帯よりも内側では明らかな蛍光の変化をみとめなかった. また1時間例と同様, 虚血巣尾側辺縁に接し, 強力な蛍光をみとめた (Fig. 9) が, その強度は, 1時間例と比較し, 視覚的にあまり差がなかった.

非結紮側大脳半球の CA 蛍光は, やや減少している

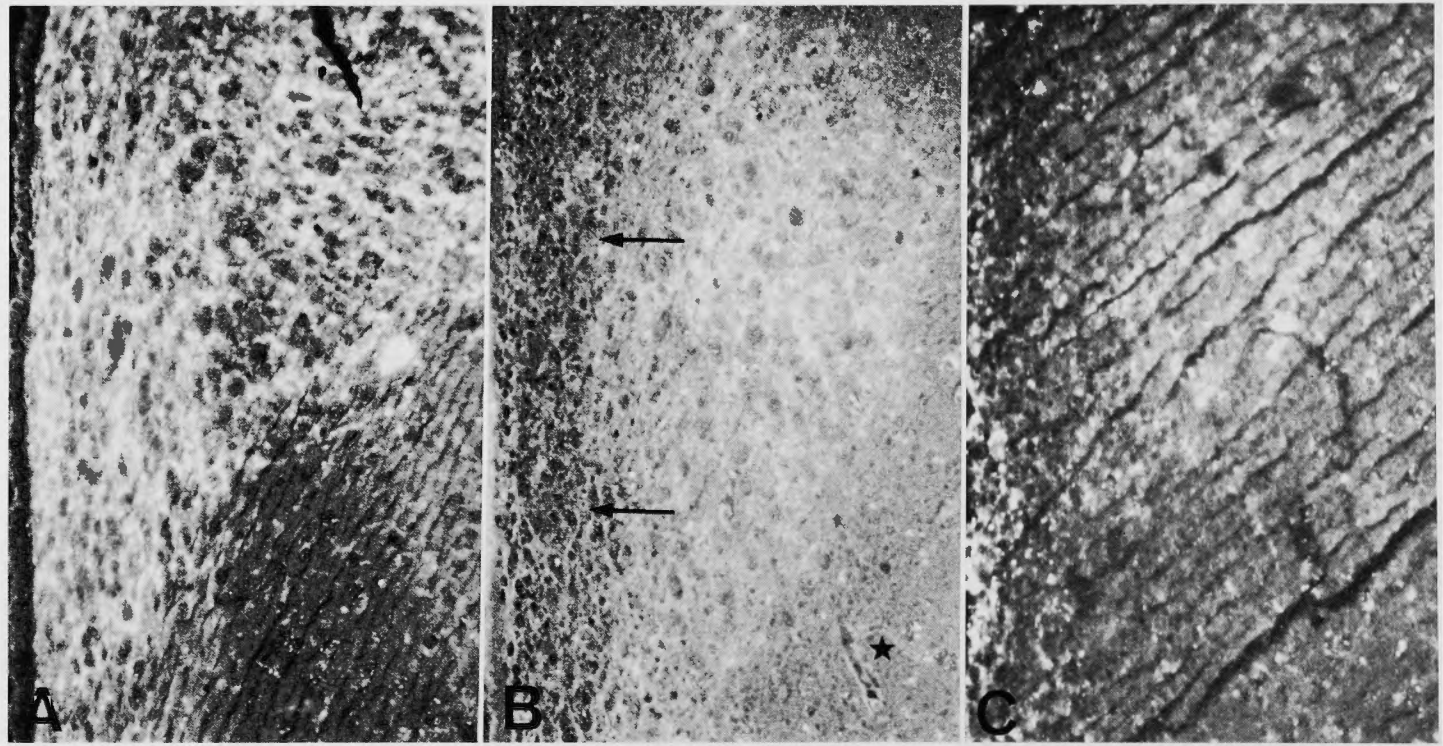


Fig. 7 Symptomatic group 結紮側の視床下部傍室核. $\times 80$ A) 1時間虚血: Symptomatic であったが視床下部に組織学的に明らかな虚血性変化をみとめなかった例. NA 神経終末の瘤状蛍光は変化していない B) 1時間虚血: 組織学的に視床下部にも虚血性変化をみとめた例. 瘤状蛍光はび慢化し, 背景も幾分蛍光を帯び, 一部の血管壁には蛍光が観察される (星印). 左端には神経網空胞帯 (矢印) が形成されており, その中では, 蛍光は消失している. C) 3時間虚血: 蛍光は殆んど消失している.

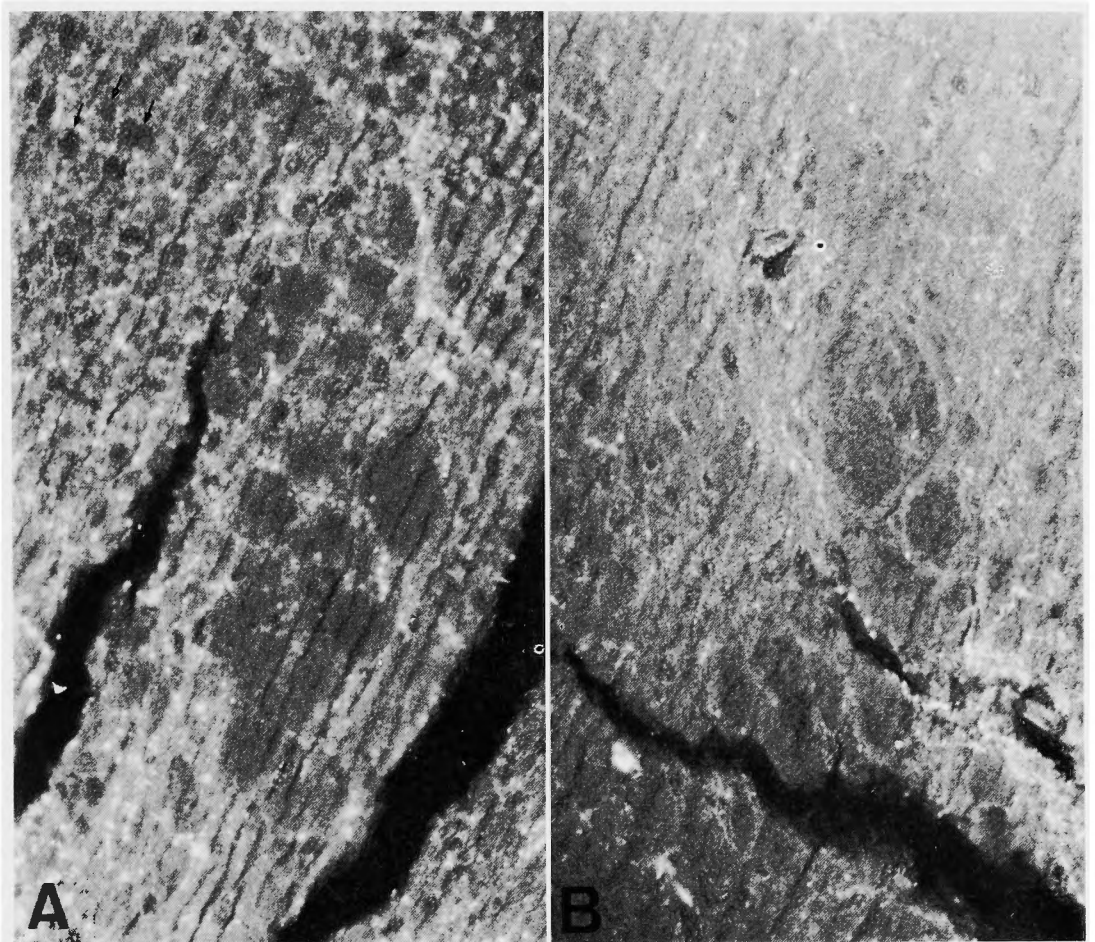


Fig. 8 Symptomatic group 1時間虚血. 視床下部内の乳頭視床束×80 A) 非結紮側：瘤状蛍光をちりばめた背景の中に、乳頭視床束（写真中央）や細胞体（矢印）が、ほぼ無蛍光として見える。B) 結紮側：瘤状蛍光の数は激減し、上記構造も弱い蛍光を帯び、やや識別し難くなっている。

印象を受けたが明らかなものではなかった。

ii) Borderline group (15匹)

海馬については、虚血3日目（3匹）では、明らかな蛍光の変化をみとめなかったが、1週目の4匹中2匹に、齒状回の hilus 部に、少数ながら、大きな強い瘤状蛍光を多数みとめ（Fig. 12）、その一部は、瘤状蛍光間にも、それらを連ねる強い緑色蛍光をみとめ、末梢交感神経線維の蛍光像にも匹敵する程であった。さらにこれらの蛍光の一部は、毛細血管サイズの微小血管に密接に沿って走行している所見も得られた（Fig. 12）。このような所見は結紮側のみならず非結紮側の齒状回にも見られ、2週目（4匹）、4週目（4匹）では、更に数も増し顕著なものとなっていた。

1週目と4週目のそれぞれ1匹ずつで、尾状核・内包・大脳皮質などに虚血巣が見られたが、そのうち1週目では、虚血巣近傍に、大きな強い瘤状蛍光をみとめ、これは、尾状核・内包で、とくに著明に見られた（Fig. 13）。時に、小血管周囲に密に分布する細かい緑色蛍光をみとめた（Fig. 14）。4週目では、上記の大きな瘤状蛍光は小さくなっていたが、それより分岐する細い線維をみとめることができた（Fig. 15）。

iii) Asymptomatic group (20匹)

結紮側・非結紮ともに、明らかなCA蛍光の変化をみとめなかった。

なお以上の記載において、通常とは異なる部位の緑色蛍光は、とくに明記されていなくてもすべて紫外線

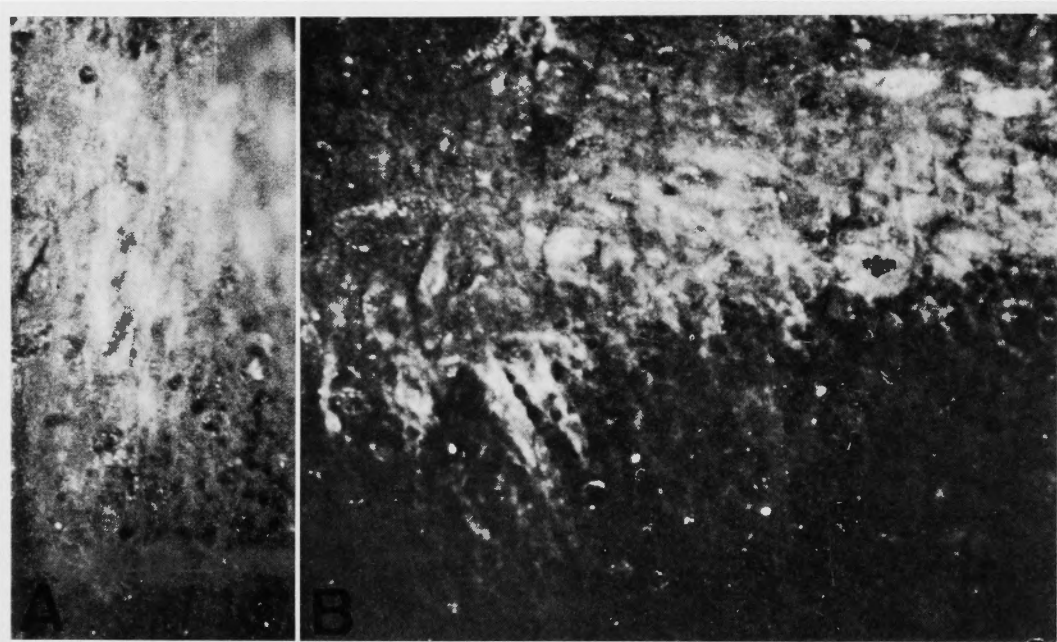


Fig. 9 Symptomatic group 虚血巣尾側辺縁の pile-up 像 A) 1時間虚血: Zona incerta の内側 B) 3時間虚血: 大脳脚背内側部. A), B) 共, 緑色蛍光に接して, 写真下半分に神経網空胞帯(虚血巣辺縁を示す)がみとめられる.

照射や NaBH_4 添加で著明に減弱したので, CA 由来と考えられることを付け加えておく.

Ⅱ. 考 按

Mongolian gerbil は Willis 輪の発達が悪いので, 一側総頸動脈の結紮という容易な方法でその30~60%に同側大脳半球の広範囲な虚血を得ることができる^{2,26,31)}. 脳虚血に陥った gerbil は, 傾眠傾向・片麻痺・異常姿勢・回転性歩行・痙攣・rolling fitsなどの神経症状を呈するので容易に識別できる^{2,26)}. この gerbil の一側大脳半球虚血モデルを用い脳虚血における脳内 CA の変動について, 生化学的定量に基く, 多くの報告がなされている^{18,20,28,30,36,37,38,44,45,47)}. DA については, 大脳半球全体を試料として測定した例では^{20,37,38,47)}, 虚血作製後24時間経過すると, 結紮側大脳半球の DA 含有量は, 非結紮側の約半分⁴⁷⁾に減少し, 究極的には虚血脳において DA が減少することを示している. しかし, 2~3時間の虚血では, 有意な変化を示さないとする報告^{20,47)}と, 明らかに減少するとの報告があり^{37,38)}, 少なからず不一致が見られる. これに対し, 大脳皮質の一部を試料を限定させた場合は, 結紮側大脳皮質の DA 含有量は, 2~3時間でも

減少することでは一致しているようであるが^{35,45)}, 更に早期の一時間以内の虚血例では, 不変・増加・減少と, 再び不一致が見られる^{18,28,35)}. NA の含有量については更に不一致が著しく, 24時間の虚血例でも明らかな変化を示さないと報告もある⁴⁷⁾.

一般に, 同種の動物間でも脳内側副血行路についてかなりの差異があるため, 一定の場所・大きさ・程度の虚血を常に作製することは, 現在の段階では殆んど不可能と言える. Gerbil の一側大脳半球虚血モデルもその例にもれず, 今回も示した如く, 決して大脳半球全体が虚血に陥っている訳ではなく, その場所・広がり・程度にはかなりのバラツキが見られる. 故に大脳半球を試料とした場合, 虚血部のみならず非虚血部も含めて定量することになり, その結果は, 虚血脳における変化を必ずしも適確に表わしているとは思われない. この虚血巣の多様性は, 神経伝達物質のように, ある特定の神経系に沿って, 偏って分布する物質を調べる時に, とくに問題になるものと思われる. 実際, 今回の組織化学的検索では, 虚血領域に含まれた CA 蛍光は, 2~3時間の虚血例のみならず, 1時間の例でも, 確実に減少していた. ただ NA よりも DA 神経終末の蛍光の減少の方が著しい印象を受けたが,

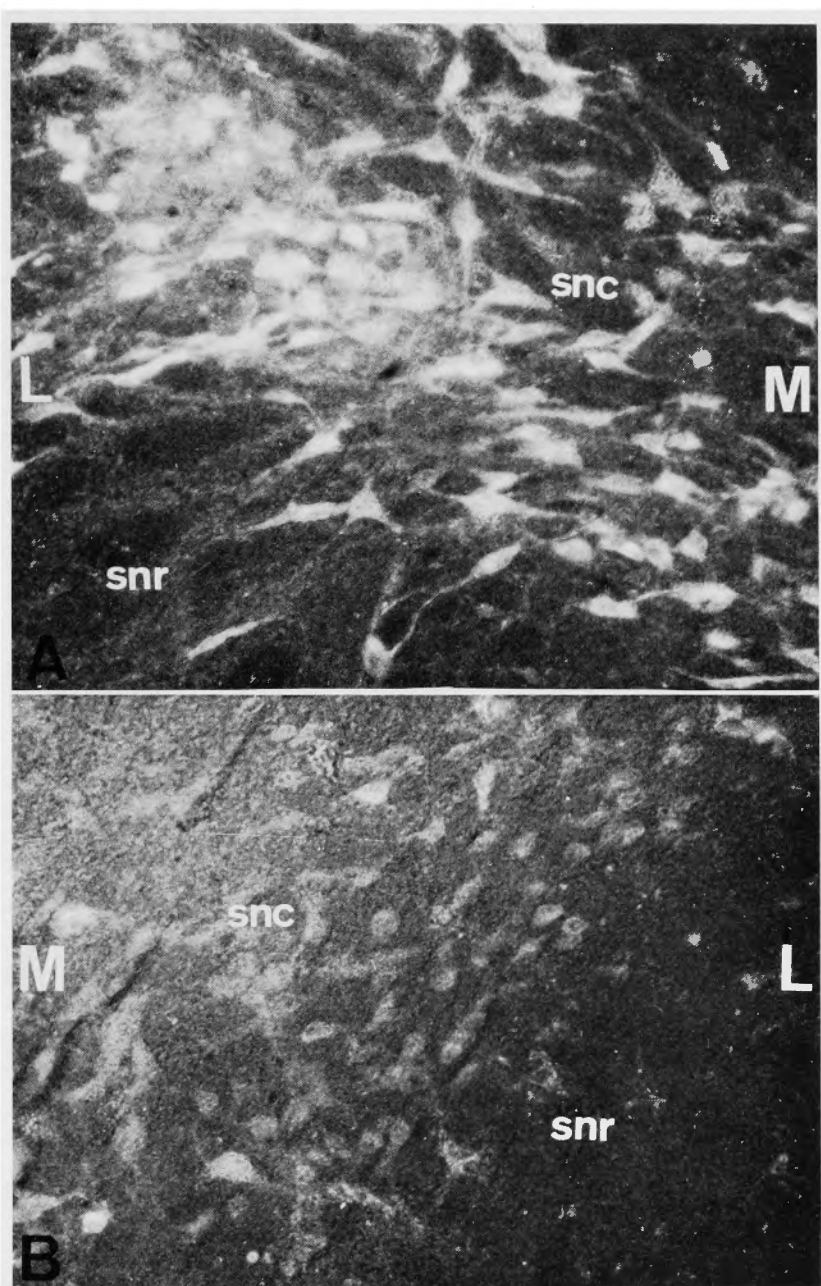


Fig. 10 Symptomatic group 1時間虚血. 黒質×80 A) 非結紮側：蛍光を有した細胞体が多数見える.
B) 結紮側：細胞体内の蛍光は、著明に減弱している. L：外側 M：内側 snc：pars compacta
snr：pars reticulata

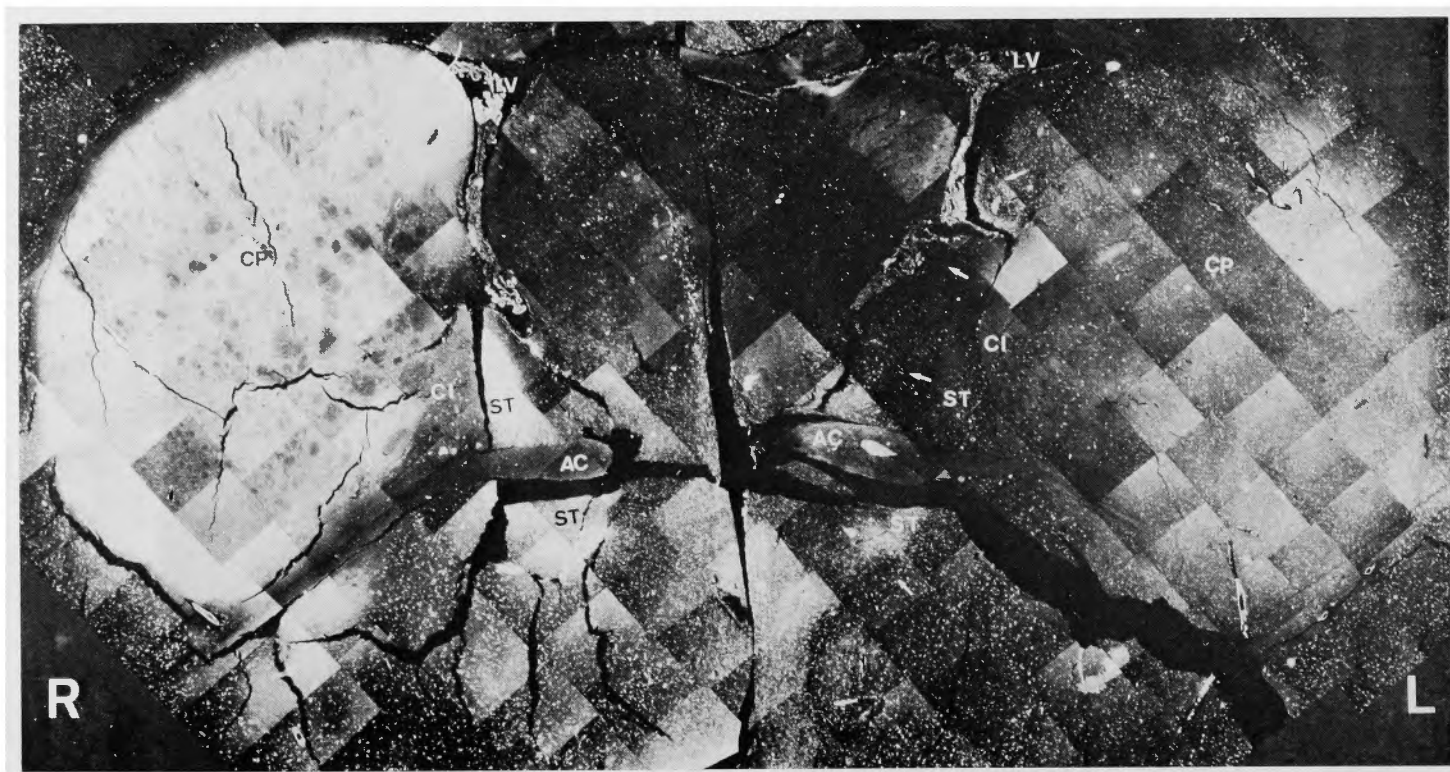


Fig. 11 Symptomatic group 2時間虚血. 前額断モンタージュ写真. 左半球の CA 蛍光は, 神経網空胞帯 (矢印) を境に, 激減している.
 AC: 前交連 CI: 内包 CP: 尾状核 ST: 終界条間質核

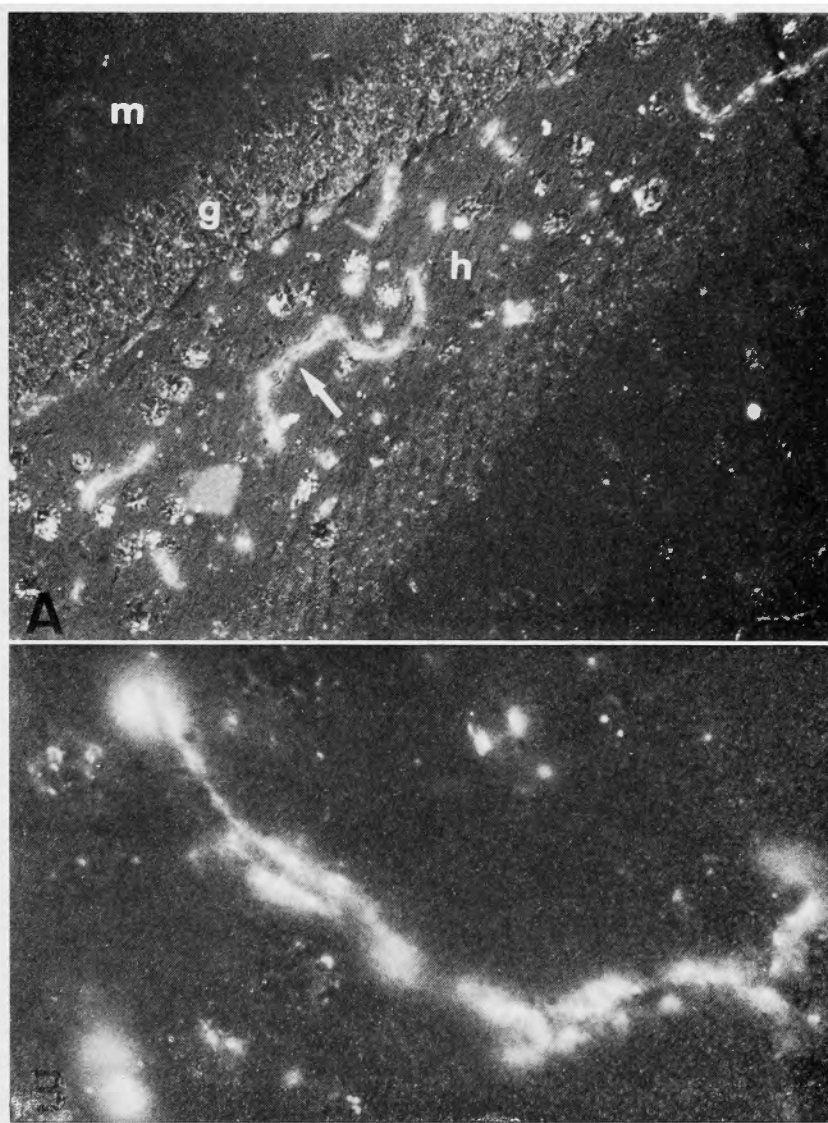


Fig. 12 Borderline group 3 週間, 齒状回 A) $\times 40$ hilus (h) 部に, 強力な瘤状螢光をみとめ, 瘤状構造間にも明らかな強い螢光をみとめる. 一部は, 毛細血管サイズの小血管 (矢印) に密接に沿って走行している. この矢印の構造が血管であることは, 静注した Evans blue の赤色螢光が内腔にみとめられたことで確認された. h: hilus g: granular layer m: molecular layer B) $\times 160$

Kopin ら²⁹⁾ が指摘している通り, 瘤状螢光よりもび慢性螢光の方が, その減少を視覚的にとらえ易いことによるのかもしれない. しかし, 虚血脳において, NA 含有量が有意に減少していないとの報告^{18,47)}もあり, 即断はできない.

大脳皮質は, その内側部と腹側部を除き, Sympto-

matic group の, ほぼ全例において, 組織学的に虚血性変化がみとめられた. 故に, 大脳皮質を試料とした方が, 虚血脳の CA 含有量を定料する手段として, より適確と考えられるが, 大脳皮質自体の CA の濃度が低いので, より精密な定量技術が必要となる.

1時間の虚血例で, 結紮側尾状核内の有髄線維束に

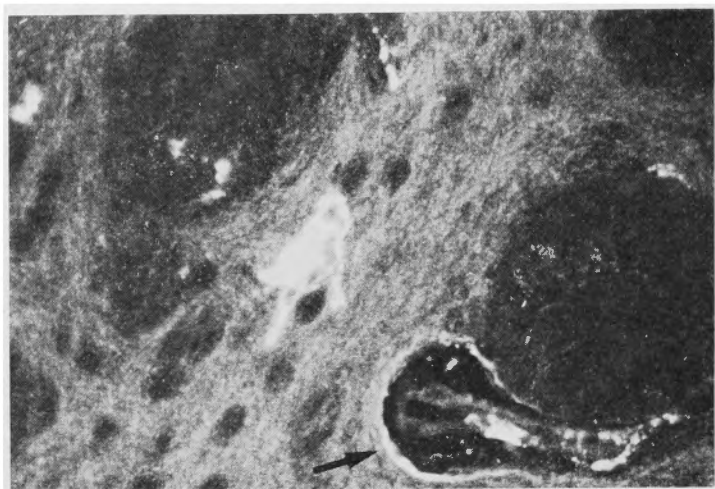


Fig. 13 Borderline group 1 週間. 尾状核 $\times 80$ 写真中央に巨大な瘤状蛍光が存在し、これより太い線維状の蛍光が数本分岐している。その他、小さな瘤状蛍光も幾つか見られる。小血管周囲でも蛍光が増強している (矢印)。

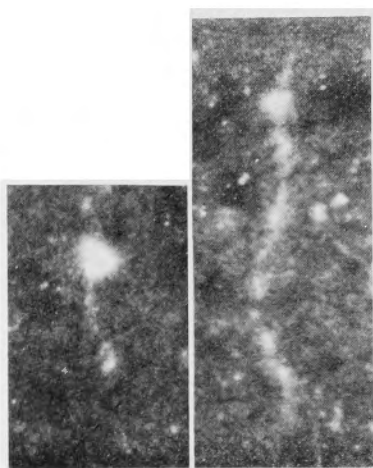


Fig. 14 Borderline group 1 週間. 大脳皮質 $\times 80$ 瘤状蛍光より細い蛍光線維が分岐している。

みとめられた緑色蛍光は、紫外線照射や NaBH_4 添加で¹²⁾速やかに消失したことから、CA 由来の蛍光と考えられ、その解剖学的な位置関係から、周囲の尾状核組織内の DA 神経終末から漏出し拡散して来た DA と考えられる。1時間の虚血脳で、ATP, ADP, p-クレアチニンなどのエネルギー物質は半減すると報告されている^{32,43)}ので、このような早期にでも、神経終末の DA 貯蔵能が障害され、DA が漏出することは、充分に有り得ることと思われる。さらに虚血脳におい

ては血流が極端に減少し、また MAO などのモノアミン分解酵素も阻害されている^{30,37)}ので、漏出した DA は、血流による Wash-out や代謝をまぬがれ、DA の活性を有したままでシナプスの範囲を越えて有髄線維束迄拡散し、そこで緑色蛍光として見えたものと考えられる。過去の生化学的定量に基く報告でも虚血脳における CA の合成・分解共に低下していることから、究極的に生ずる CA 含有量の減少の原因を、CA の漏出に求めている^{30,37)}。しかし何れも、2～3時間以上の虚血例であり、今回のように、1時間という早期に、しかも直接、視覚的に漏出した CA を証明し得た報告はまだない。漏出した CA の拡散についても、過去の生化学的定量では殆んど触れられていない⁴⁴⁾。視床下部の瘤状蛍光のび漫化、乳頭視床束の弱い蛍光も、すべて CA (ここでは NA) の漏出・拡散を示唆するものと考えられる。

一時間以内の虚血例で、虚血側大脳皮質の DA がむしろ増量するとの報告があり^{18,28)}、その原因として、DA から NA への変換を担う Dopamine hydroxylase の阻害などが考えられているが²⁸⁾、今回の結果では、尾状核から皮質下白質、皮質深層へ DA が拡散している像がみとめられた。皮質 DA の増加は、一部には、この拡散して来た DA に依るのかもしれない。

さて、CA 蛍光の強度は、その CA の局所濃度に依存している。換言すれば、同じ量の CA でも分散して

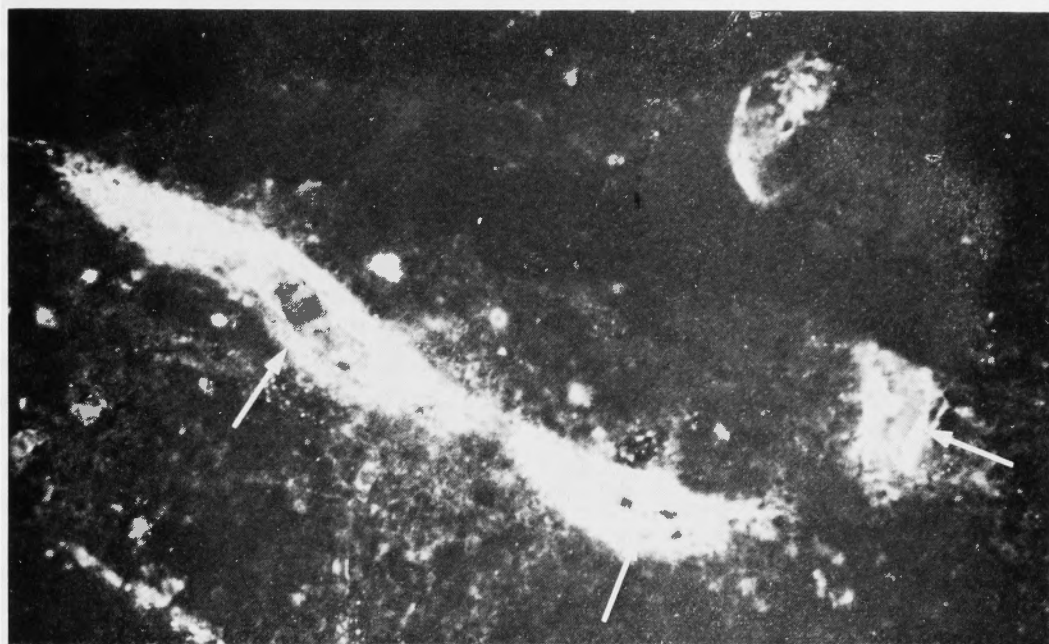


Fig. 15 Borderline group 4週間. 内包 $\times 80$ 小血管周囲に、密に増生した螢光線維. 矢印は血管内腔を示す.

存在すれば螢光として見えにくく、局所に集中して存在すれば、強力な螢光として見えるということである。Kopin らによれば²⁹⁾、尾状核内の DA 含有量が正常値の70%以下に減少しなければ、組織化学上、DA 螢光の減弱として視覚的にとらえることはできないと言われている。今回の Symptomatic group においては、DA 由来のび慢性螢光の分布領域の殆んどが、虚血巣に含まれていたにもかかわらず、過去の生化学的定量では、虚血側大脳半球内の DA 含有量は、3時間の虚血例でも、正常値の70~90%にしか減少していない^{37,38)}。これだけの量の DA が、神経終末内、或いは近傍に集中して存在すれば、充分な強力な螢光として見えるはずであるが、今回の2~3時間の虚血例では、螢光は殆んど消失する迄になっていた。これは取りも直さず、DA の漏出、拡散が更に進み、螢光として観察されにくくなる迄に、その分布密度が稀薄化していることを示唆するものと思われる。実際、今回の組織化学的検索では、1時間の虚血例と、3時間の虚血例で、虚血側大脳半球の DA 螢光の強度には大きな差が見られたが、生化学的定量では、1時間例と3時間例の間で、虚血側大脳半球の DA 含有量は、殆んど新たな減少を示していない³⁸⁾。Harisson ら²⁰⁾は、3.5

時間の虚血例で、虚血側大脳半球の DA 含有量が有意に減少していないことから、DA 系は変動していないと評価しているが、今回の観察結果からすれば、含有量が正常であるからといって、その分布も正常とは限らない。生化学的方法では、神経細胞内のみならず、神経細胞外の CA も定量しているかもしれない、今後の虚血脳における CA 変動の検索にあたって留意すべき点であろう。

このような漏出・拡散といった現象は、今回の検索では証明されていないが、serotonin についても、本質的には同様であると思われる。Jellinger 等²⁴⁾は、急性期脳梗塞患者の剖検脳で、中心壊死巣では、serotonin や、その代謝産物は減少しているが、周囲の浮腫組織では、共に増加していることを報告し、この増加を漏出した serotonin が細胞外に蓄積することに起因すると推定している。人間の虚血脳でも、実験的脳虚血と同じ現象が起こっていることを示唆している。

漏出し拡散した CA は、Wurtman ら⁴⁶⁾が展望的に述べているように、その先々で、周りの神経細胞・グリア細胞・血管などに対し種々の作用を及ぼし、脳虚血の病態を修飾するものと考えられる。これに関し、急性期虚血脳で、CA の second messenger である

cyclic AMP が、一過性に激増していること^{35,43)}は興味深い。また予めCAの量を減らしておくことにより、あるいはCAの作用をブロックすることにより、脳虚血に伴う死亡率²²⁾や低体温の発生率³⁶⁾を低下せしめ得るとの報告もある。

Baboon 脳虚血モデルにおいて、脳内静脈血中の serotonin が増大しており、これは漏出した serotonin によるものと報告されているが⁴⁴⁾、今回、血管腔内や壁内にみとめられた緑色蛍光は、CA についても同様の現象が起こり得ることを示している。漏出した CA が血管壁に作用したり、血流によって運搬され、遠隔部で何らかの作用を及ぼすかもしれない。

漏出拡散して来たCAの蛍光が、グリア細胞内にとくに顕著に見られたということは、漏出したCAが、ある程度、グリア細胞に摂取されることを示唆している。生化学的にも、グリア細胞を多く含む分画がCAに親和性を持つことが報告されており^{19,21)}、組織化学的にも、脳梁内に局所注入された外因性NAが、有髄線維間の希突起グリア細胞に摂取されている像が得られている⁷⁾。又、グリア細胞は、CAの分解酵素であるMAOやCOMTを含有することが示されており⁴⁰⁾、神経細胞外のCAを代謝する場として注目されている。脳虚血においては、少なくとも初期には、神経細胞外へ漏出したCAを摂取し分解する役割をグリア細胞が担っているのかもしれない。

虚血巣辺縁に見られた強い緑色蛍光は、吻側辺縁にはみとめられず、尾側辺縁に限られたことから、さらに尾側の脳幹部上行性CA神経細胞からの軸索流が虚血巣の尾側辺縁でせき止められ、そこに貯溜したCA、すなわちpile-up(軸索内貯溜)と考えられる。CAを含むシナプス小胞を輸送する軸索流の速さは、末梢交感神経で、16mm/hourにも及び⁴¹⁾、中枢神経系においても、少なくとも3~4mm/hour²⁵⁾の速度が記録されている。今回のSymptomatic groupで見られた虚血巣の尾側辺縁は殆んど中脳に近接しており、青斑核や黒質などの脳幹部上行性神経細胞から0.5~2mm位しか離れていないので³³⁾、軸索流の速度と考え併せて、1時間目でも、このようなpile-upは十分に起こり得るものと思われる。また脊髄切断後、その近位端に、数時間後には、組織化学的に観察可能なCA貯溜が見られるとの報告もある⁴⁾。このようなpile-upは蛍光として証明されなくても、多かれ少かれ虚血巣の周囲に起こっていることと考えられ、軸索断端に蓄積したCAが、虚血巣、周囲組織へどのように作用するか興

味深い。

gerbil の一側総頸動脈結紮モデルのSymptomatic groupは、24時間以内に(多くは数時間以内に)、その殆んどが死亡するので、脳虚血慢性期を検索するためには不適當と思われる。そこで、borderline groupで、慢性期の検索を行なったが、虚血巣は小さく、殆んど海馬に限られ、15匹中2匹において、尾状核、内包、大脳皮質に見られるにとどまった。その中で、1週目以降の歯状回で見られた瘤状蛍光は正常gerbilにおいては、Falck-Hillarp法ではみとめられないものであり、また2週目よりも、4週目で最も顕著であったという時間的経過から、CAの軸索内貯溜というよりも、再生したCA神経線維と思われる。ちなみに、一般に、神経線維切断の軸索内貯溜は、1週目を頂点とし、その後著明に減少し、代わって再生線維が著明に増加すると言われている⁶⁾。歯状回は、両側の海馬・中隔部から神経支配を受け、とくにhilus部は中隔や海馬系からの支配が多いとされている⁶⁾。海馬は最も虚血性侵襲に弱い部位であり^{8,23)}、今回のborderline groupでも殆んど例で、結紮側の海馬(とくに海馬吻側外側部から海馬系にかけて)に虚血巣をみとめた。かかる状態では、両側の歯状回はpartial denervationの形になると思われるので、神経線維の再生(sprouting)は、充分に有り得るものと思われる。しかし、一般に中枢神経内で見られるCA系の再生線維は、細く、小さな瘤状構造を有しているのに対し⁴⁾、今回、歯状回で見られた蛍光は、瘤状構造もきわめて大きく、かつ瘤状構造間にも明らかな強い蛍光を有しており、その形状はむしろ末梢交感神経に近かった。中枢神経内で、交感神経支配が見られるのは、松果体³⁹⁾、内側手綱核⁵⁾、下垂体後葉³⁾に限られているので、上記歯状回内の再生神経線維が、末梢交感神経由来とは断定できないが、一側海馬系の切断後、遅くとも2週間目には、両側の歯状回内に末梢交感神経由来の再生神経線維がみとめられたとの報告もある^{34,41)}。これらの変化が歯状回に特異的なものかどうか明らかでないが、再生線維の一部が、毛細血管サイズの小血管に密接に走行していた所見は、脳虚血慢性期における脳内微小血管の神経支配に関して興味深い。

1週目に、尾状核などの虚血巣周囲にみとめられた大きな瘤状蛍光は、4週目には、著明にそのサイズを減じており、先に述べた神経線維切断後の一般的な時間経過から考えても⁶⁾、恐らく、肥大した神経線維断

端と思われる。4週目に見られた、やや縮小した瘤状螢光より分岐する細い線維は、Björklund ら⁴⁾も脊髓切断モデルで報告しているように神経断端からの sprouting と思われる。時折、見られた小血管周囲の密な螢光も、通常は見られないものであり、やはり再生線維と思われる。種々の中枢神経損傷後、同様の脳実質内小血管周囲の再生線維が報告されている^{10,27)}。今回の borderline group は各例によって虚血巣の部位・大きさが異なるため、相互に比較し継続的な変化を明らかにすることは困難であったが、少なくとも、上記所見は、虚血後の神経再生を十分に示唆するものであり、再生したCA線維と、脳内微小血管との関係など、今後の興味あるテーマを含んでいる。

IV 結 語

① Mongolian gerbil の一側総頸動脈結紮モデルを用い、脳虚血における脳内CAの変動を、モノアミン螢光組織化学で検索した。

②急性期虚血脳において、遅くとも1時間以内に、神経終末からCAが漏出し、更に、シナプスの範囲を越えて広範囲に拡散し、一部は、血管腔内にも入ることを証明した。また漏出・拡散したCAを、グリア細胞が摂取することを証明した。漏出した神経細胞外のCAは、周りの神経細胞・グリア細胞・血管などに作用し、脳虚血の病態生理に深く関係するものと考えられる。

③虚血巣辺縁に、1時間という早期から、CAのpile-up(軸索内貯溜)と思われる所見をみとめた。虚血巣周囲の浮腫の伸展と共に、このpile-upされたCAがどのような動きを示すか興味深い。

④脳虚血慢性期において、虚血巣近傍において神経線維の再生と思われる所見を得、歯状回においては、末梢交感神経の形状を呈していた。これらの再生線維の一部は、脳内小血管に密接に沿って走行していた。脳虚血慢性期の脳内微小循環の神経調節という点で、今後の検索が望まれる。

稿を終るに臨み、御指導御校閲をいただきました恩師半田肇教授に、また本研究の場を提供していただきました京都大学医学部薬理学教室高折修二教授に謝意を表します。さらに終始御指導、御討論をいただきました石川正恒博士に感謝致します。

References

- 1) Ben-Jonathan N, Maxson RE, Ochs S : Fast axoplasmic transport of noradrenaline and dopamine in mammalian peripheral nerve. *J Physiol* **281** : 315-324, 1978.
- 2) Berry K, Wisniewski HM, Svartzvein L, Baez S : On the relationship of brain vasculature to production of neurological deficit and morphological changes following acute unilateral common carotid artery ligation in gerbils. *J Neurol Sci* **25** : 75-92, 1975.
- 3) Björklund A : Monoamine containing fibers in the pituitary neurointermediate lobe of the pig and rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **89** : 573-589, 1968.
- 4) Björklund A, Katzman R, Stenevi U, West KA : Development and growth of axonal sprouts from noradrenaline and 5-hydroxy tryptamine neurones in the rat spinal cord. *Brain Res* **31** : 21-33, 1971.
- 5) Björklund A, Owman C, West KA : Peripheral sympathetic innervation and serotonin cells in the habenular regions of the rat brain. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **127** : 577-579, 1972.
- 6) Björklund A, Stenevi U : Regeneration of monoaminergic and cholinergic neurones in the mammalian central nervous systems. *Physiol Rev* **59** : 62-100, 1979.
- 7) Bondareff W, Narotzky R : Uptake of exogenous noradrenaline from corpus callosum by neurones of the cingulate cortex. *Exp Neurol* **34** : 309-315, 1972.
- 8) Brierly JB : In "Greenfield's neuropathology" (Blackwood W, Corsellis JAN ed.), 3rd., pp 55-56, Edward Arnold Publishers, London, 1976.
- 9) Butcher LL, Enge J, Fuxe K : Behavioral biochemical and histochemical analysis of the central effects of monoamine precursors after peripheral decarboxylase inhibition. *Brain Res* **41** : 387-411, 1972.
- 10) Chiba T, Jew JY, Williams TH : Ultrastructural evidence for remodeling in a central noradrenaline pathway following electrolytic lesioning. *Brain Res* **171** : 77-83, 1979.
- 11) Cooper JR, Bloom FE, Roth RH : "The biochemical basis of neuropharmacology", pp 139-143, Oxford University Press, New York, 1974.
- 12) Corrodi H, Jonsson G : The formaldehyde fluorescence method for the histochemical demonstration of biogenic amines. A Review of methodology. *J Histochem Cytochem* **15** : 65-78, 1967.
- 13) Dahlström A, Fuxe K : Evidence for the exis-

- tence of monoamine containing neurones in the central nervous system. *Acta Physiol Scand Suppl* **232** : 1-55, 1964.
- 14) Dahlström A, Fuxe K : Experimentally induced changes in the intraneuronal amine levels of bulbospinal neuron system. *Acta Physiol Scand Suppl* **247** : 1-36, 1965.
 - 15) Dahlström A, Häggendal J : Studies on the transport and life span of amine stored granules in peripheral adrenergic neuron system. *Acta Physiol Scand* **67** : 278-288, 1966.
 - 16) Falck B, Hillarp NA, Thieme G, Torp A : Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J Histochem Cytochem* **10** : 349-354, 1962.
 - 17) Fuxe K : Distribution of monoamine nerve terminals in the central nervous system. *Acta Physiol Scand Suppl* **247** : 37-85, 1965.
 - 18) Gaudet R, Welch KMA, Chabi E, Wang TP : Effect of transient ischemia on monoamine levels in the cerebral cortex of gerbils. *J Neurochem* **30** : 751-757, 1978.
 - 19) Haber B, Hatchison HT : Uptake of neurotransmitters and precursors by clonal cell lines of neural origin. *Adv Exp Med Biol* **69** : 179-193, 1978.
 - 20) Harisson MJG, Marsden CP, Jenner P : Effect of experimental ischemia on neurotransmitter amines in the gerbil brain. *Stroke* **10** : 165-168, 1979.
 - 21) Henn FA, Hamberger A : Glial cells function . Uptake of transmitter substances. *Proc Nat Acad Sci USA* **68** : 2686-2690, 1971.
 - 22) Hori H : The effect of alpha-methyl-para-tyrosine on cerebral vascular occlusive disease. *Neurol Surg* **3** : 859-865, 1975.
 - 23) Ito H, Spatz M, Walker JT, Klatzo I : Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. I. Light microscopic observations. *Acta Neuropathol* **32** : 209-225, 1975.
 - 24) Jellinger K, Rieder P, Kothbauer P : Changes of some putative neurotransmitters in human cerebral infarction. *J Neur Transm Suppl* **14** : 31-44, 1978.
 - 25) Jones BE, Halaris AE, McIlang M, Moore RY : Ascending projections of the locus ceruleus in the rat. I. Axonal transport in central noradrenaline neurons. *Brain Res* **127** : 1-21, 1977.
 - 26) Kahn K : The natural course of experimental cerebral infarction in gerbils. *Neurol* **22** : 510-515, 1972.
 - 27) Katzman R, Bjöklund A, Owman C, Stenevi U, West KA : Evidence for regenerative axons sprouting of central catecholamine neurones in the rat mesencephalon following electrolytic lesion. *Brain Res* **25** : 579-596, 1971.
 - 28) Kogure K, Scheinberg P, Matsumoto A, Busto R, Reinmuth OM : Catecholamines in experimental ischemia. *Arch Neurol* **32** : 21-24, 1975.
 - 29) Kopin IJ, Palkowitz M, Kobayashi RM, Jakobowitz DM : Quantitative relationship of catecholamine content and histofluorescence in brain of rats. *Brain Res* **80** : 229-235, 1974.
 - 30) Laveynte MH, Moskowitz MA, Larin F, Zervas NT, Wurtman RJ : Brain H³-catecholamine metabolism in experimental cerebral ischemia. *Neurol* **25** : 483-485, 1975.
 - 31) Levine S, Payan H : Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Exp Neurol* **16** : 255-262, 1966.
 - 32) Levy DE, Duffy TE : Cerebral energy metabolism during transient ischemia and recovery in the gerbil. *J Neurochem* **28** : 63-70, 1977.
 - 33) Loskota WJ, Lomax P, Verity MA : A stereotaxic atlas of the mongolian gerbil brain (*Meriones unguiculatus*). Ann Arbor Science Publisher, Michigan, 1974.
 - 34) Loy R, Moore RY : Anomalous innervation of the hippocampal formation by peripheral sympathetic axons following mechanical injury. *Exp Neurol* **57** : 645-650, 1977.
 - 35) Lust WD, Mrsulja BB, Mrsulja RJ, Passoneau JV, Klatzo I : Putative neurotransmitters and cyclic nucleotides in prolonged ischemia of the cerebral cortex. *Brain Res* **98** : 394-399, 1975.
 - 36) Moskowitz MA, Meyer E, Wurtman RJ, Laveynte MH, Zervas NT : Attenuation by catecholamine antagonists of the hypothermia that follows cerebral infarction in gerbils. *Life Sci* **17** : 597-602, 1975.
 - 37) Mrsulja BB, Mrsulja BJ, Spatz M, Ito U, Walker JT, Klatzo I : Catecholamine in brain ischemia—alpha-methyl para-tyrosine. *Brain Res* **104** : 373-378, 1976.
 - 38) Mrsulja BB, Mrsulja BJ, Spatz M, Ito U, Walker JT, Klatzo I : Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. IV. Behavior of biogenic amines. *Acta Neuropathol* **36** : 1-8, 1976.
 - 39) Owman C : Sympathetic nerves probably storing two types of monoamines in the rat pineal gland. *Int J Neuropharmacol* **3** : 105-112, 1964.
 - 40) Silberstein SD, Shein HM, Berv RR : Catechol-O-methyl transferase and monoamine oxidase activity in cultured rodent astrocytoma cells. *Brain Res* **41** : 245-248, 1972.
 - 41) Stenevi U, Bjöklund A : Growth of vascular sympathetic axons into the hippocampus after

- lesions of the septo-hippocampal pathway : A pitfall in brain lesion studies. *Neurosci Lett* **7** : 219-224, 1978.
- 42) Ungerstedt U : Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol Scand Suppl* **367** : 1-48, 1971.
- 43) Watanabe H, Ishii S : The effect of brain ischemia on the levels of cyclic AMP and glycogen metabolism in gerbil brain in vivo. *Brain Res* **102** : 385-389, 1976.
- 44) Welch KMA, Meyer JS, Teraura T, Hashi H, Shinmaru S : Ischemic anoxia and cerebral serotonin levels. *J Neurol Sci* **16** : 85-92, 1972.
- 45) Welch KMA, Chabi E, Buckingham J, Bergin B, Meyer JS : Catecholamine and 5-hydroxytryptamine levels in influence of para-chlorophenylalanine. *Stroke* **8** : 341-346, 1977.
- 46) Wurtman RJ, Zervas NT : Monoamine neurotransmitters and the pathophysiology of stroke and central nervous trauma. *J Neurosurg* **40** : 34-36, 1974.
- 47) Zervas NT, Hori H, Negoro M, Wurtman RJ, Larin F, Laveyne MH : Reduction of brain dopamine following experimental cerebral ischemia. *Nature* **247** : 283-284, 1974.