

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

滋賀医科大学脳神経外科

京蔭 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 II: Cell Suspension Transplantation into the Subarachnoid Space

KAZUMITSU KYOSHIMA, MASAYUKI MATSUDA and JYOJI HANDA

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

Suspensions of basal forebrain cells of fetal rats were transplanted into the subarachnoid space of adult rats through a microsyringe needle which was transcortically inserted to the subarachnoid space. Two to 3 months after the transplantation, growth of the graft, neuritic elongation, neovascularization, and astrocytic reaction were examined by Nissl staining, histochemical staining for acetylcholinesterase and Klüver-Barrera's myelin staining, vascular relief images and immunohistochemical staining for laminin, and immunocytochemical staining for glial fibrillary acidic protein (GFAP).

Transplanted fetal neurons survived and grew very well over the brain surface and exhibited facilitated neuritic elongation. Several bundles of myelinated fibers linking the subarachnoid and the subpial grafted cells were noticed, but the myelinated fibers penetrating the intact pia mater were not verified.

In the grafted tissue, extracellular matrix was formed and a lot of small vessels and capillaries were noticed.

Many GFAP-immunoreactive cells were seen in the graft. They had a tendency to gather perivascularly and near the margin of the graft tissue facing subarachnoid space.

The subarachnoid space is thought to be an adequate place for transplanted neuronal and glial cells to grow. The subarachnoid space contains the cerebrospinal fluid and also it contacts with rich pial vessels, so that it seems to be superior to the intraparenchymal area in respects of a supply of oxygen and nutrition and of low tissue pressure.

Transplanted tissue may be supposed to work as the exocrine and/or endocrine organ which secretes neurotransmitters and their synthetic enzymes and neurotrophic factors. If this is true, it would imply that the subarachnoid space is considered as a promising site for implantation.

Key words: Cell suspension technique, Subarachnoid space, Neuronal regeneration, Neovascularization, Reactive astrocytes.

索引語：細胞浮遊法，クモ膜下腔，神経再生，血管新生，反応性アストロサイト

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

はじめに

損傷を受けたり変性したりして機能低下を来した中枢神経系に対して、『移植』という手段によってその回復を図る試みが、各種の中枢神経疾患モデル動物を使った実験で検討され、有効性が報告されている^{2,5-8,10,12-15,19}。機能回復の機序はいまだ十分に解明されていないが、考えられるものとしては、1) グラフト—ホスト細胞間のシナプス形成による神経回路の再構成、2) 神経伝達物質やその合成酵素の補充、3) 神経細胞の生存維持や神経線維の sprouting を誘導する栄養因子の産生と分泌、4) ホストの血管新生の誘導、5) 神経障害因子の除去、などが言われており、それらのうちのいくつかの要因が複合した結果と思われる。その解明がさらに進んでいけば、移植手技の改良にもつながっていくと考えられる。

実験的脳移植において現在用いられている移植の手法は主に2通りあり、1つは切り出した組織片を小塊として脳室内や脳実質に作成した cavity 内に移植する方法で、もう1つは組織をトリプシンやパペインで酵素処理した後、ピペッティングで細胞をバラバラにし、その浮遊液を脳実質内に注入する方法 (cell suspension 法) である^{3,4}。それぞれの方法について利点、欠点が論じられており、一部は Part I でも紹介した。しかし、臨床応用となれば、最終的には個々の疾患ごとに病態が解明され、それぞれに応じたより安全で効果的な移植手技が開発される必要がある^{1,16,18,20}。

近年、アルツハイマー病の病態解明の進歩に加え、学習・記憶障害モデルラットを作成し、これに脳移植を行なって記憶障害の改善をみたという報告が散見されるようになり^{6,9,13}、アルツハイマー病に対する脳移植療法の可能性がクローズアップされてきた。そこには臨床応用に向けての数多くの解決すべき問題が存在するが、われわれはそのうちの1つである移植方法・手技の確立に主眼を置き、実験を行なっている。Part I ではラット胎仔前脳基底底部組織を小塊として成ラットの大脳皮質内、側脳室内、脳表クモ膜下腔などに移植し、神経線維の再生とグリア性瘢痕形成を含む反応性アストロサイトの存在様式について検討した。その中で、移植手技上の難点を別にすれば、脳表クモ膜下腔に移植した小組織塊は脳室内移植と同様に成育が良く、多数の再生神経線維が観察され、GFAP 陽性アストロサイトはクモ膜下腔に面する移植片の周辺部や血管周囲に多数存在し、神経細胞の支持とともに、

移植片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た。そこで今回は cell suspension 法にて浮遊化した胎仔脳細胞をクモ膜下腔に移植し、その生着、神経線維の伸展、血管新生、アストロサイトの存在様式について検討し、アルツハイマー病に対する脳移植療法上の移植部位や手技としての適切性について考察を加えた。

II 実験方法

1) 移植手技

移植細胞は、胎齢15~17日の Sprague-Dawley (SD) ラット胎仔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摘出、1辺 0.2 mm の金属メッシュを通して後ピペッティングにて浮遊細胞化し、さらに氷冷リンゲル液で2回洗浄・ピペッティングを繰り返して移植に用いた。

ホストには成 SD ラット (250~300 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、左頭頂部に小開頭を施した。bregma の外側約 2.8 mm の部位と、そこより約 3.0 mm 後方の2か所に、脳表の比較的大い血管を避けて大脳皮質内に外側に向けて約 45° の角度で刺入したマイクロシリンジ針を通して、手動的にわずかな圧を加えながら、それぞれ $1 \sim 3 \times 10^4$ cells/ μ l, 7 μ l を注入移植した (Fig. 1)。

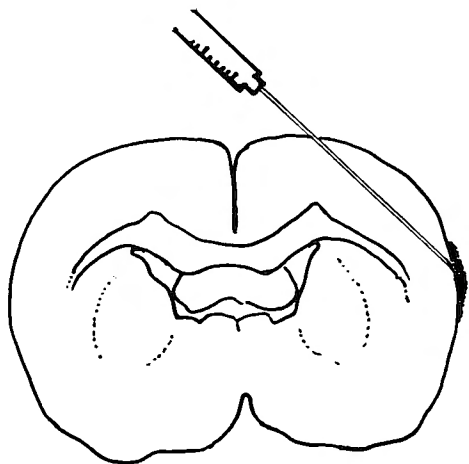


Fig. 1 Schematic illustration showing transcortical fetal brain cell suspension transplantation into the subarachnoid space using a microsyringe.

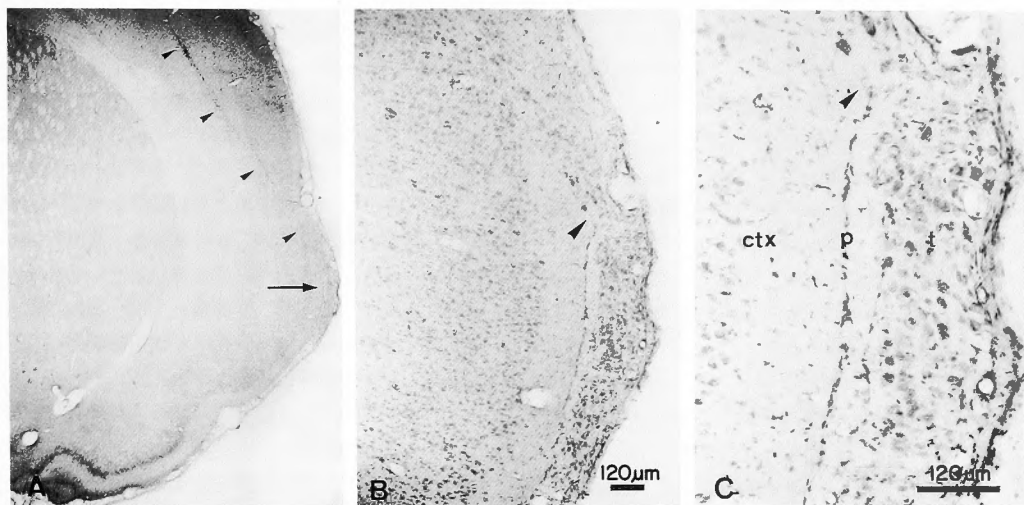


Fig. 2 Nissl staining.

Graft cells transplanted into the subarachnoid space are noticed over the brain surface in a relatively localized form (A: arrow). Extracellular matrices are constructed, and a kind of cellular arrangement consisting of an inner molecular-like layer and an outer large neuronal cell layer is observed (B and C).

Smaller arrowheads: transcortical needle tract, Larger arrowhead: point of pial penetration, ctx: cerebral cortex, p: pia mater, t: transplanted tissue, bar=120 μ m.

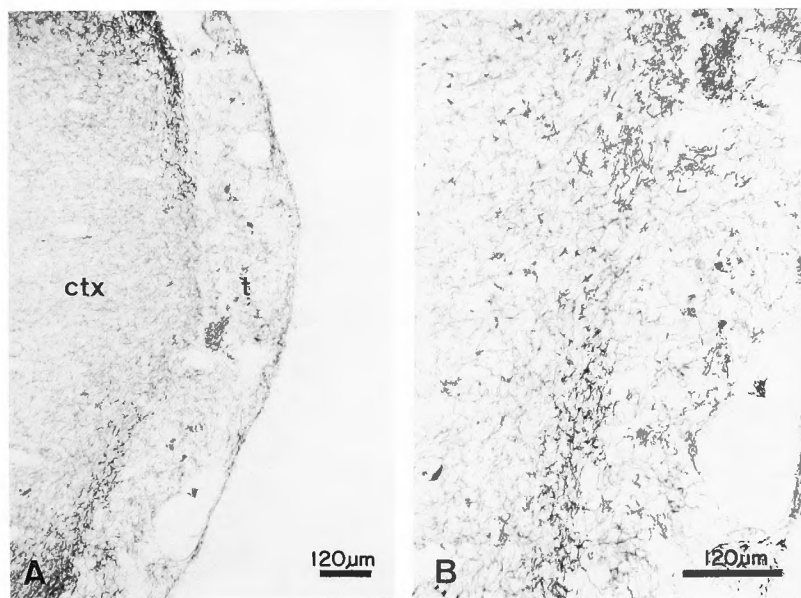


Fig. 3 Acetylcholinesterase (AChE) staining.

It shows facilitated elongation of numerous AChE-positive neurites in the graft (t), but clear delineation of the innervation into the host cortex (ctx) is impossible. bar=120 μ m.

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、40 μ m の凍結切片を作製した。

cresyl violet による Nissl 染色にて移植細胞の生着、成育状態を、acetylcholinesterase (AChE) 染色や Klüver-Barrera 髄鞘染色にて再生神経線維や有髄線維の伸長を、laminin 免疫染色または組織切片をスライドグラスに貼付風乾した血管レリーフ像で移植組織内の血管新生を、グリア線維性酸性タンパク glial fibrillary acidic protein (GFAP) 免疫染色にて反応性アストロサイトの存在状態をそれぞれ観察した。

Ⅲ 結 果

灌流固定の後摘出した脳を肉眼的に観察したのは、クモ膜下腔に生着した移植細胞が局所的に膨隆して明白に同定できることはほとんどなかった。すなわち、脳表はほとんどの例で正常のごとく、ほぼ平滑であった。

組織学的には、クモ膜下腔に出た胎仔浮遊脳細胞は、比較的限局して脳表に沿う形で成育した。細胞外基質が形成され、大幅に体積を増した一つの組織塊として同定された。部分的に大脳皮質の分子層・顆粒層と中・大型錐体細胞層を思わせるような細胞配列を示した (Fig. 2)。

AChE 染色では良好な再生神経線維の伸長が観察された。軟膜を境としてホスト神経線維と豊富に接していたが、ホスト皮質内へ線維を伸ばしているか否かは解らなかった (Fig. 3)。髄鞘染色では移植組織内および軟膜貫通部からホスト軟膜下移植組織間で有髄線維が錯綜して走行するのが観察されたが、軟膜が正常な部位を貫いてホスト皮質と交通する有髄線維は同定できなかった (Fig. 4)。

移植組織内には豊富な細血管や毛細血管が観察された (Fig. 5, laminin 染色の提示は略す)。

GFAP 陽性アストロサイトはクモ膜下腔に面する移植組織内周辺部や移植組織内の血管周囲に多数存在し、ホスト皮質との接触部やホスト皮質内には少数であった (Fig. 6)。

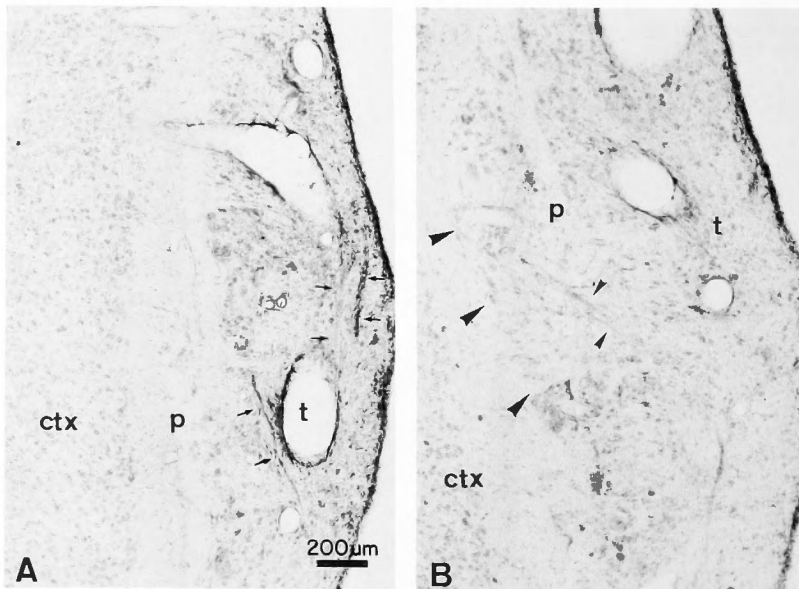


Fig. 4 Klüver-Barrera's myelin staining.

Some bundles of myelinated fibers are seen in the graft (A: arrows), and a few of them cross the pial defect (B: smaller arrowheads) and link together the subarachnoid (t) and subpial graft cells (B: larger arrowheads). However, myelinated fibers passing through the intact pia mater are not verified. bar = 200 μ m.

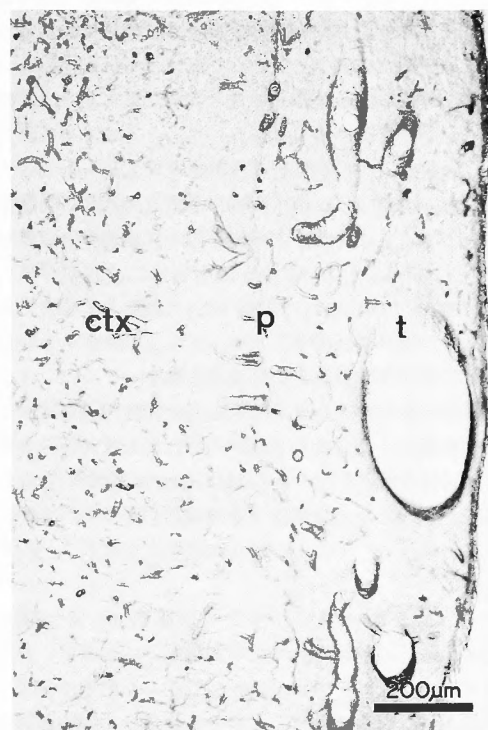


Fig. 5 Vascular relief image.

A lot of small vessels and capillaries are seen in the graft (t). The same finding is also noticed by laminin immunohistochemical staining (data not presented).

ctx: cerebral cortex, p: pia mater, bar=200 μm.



Fig. 6 Glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunocytochemical staining.

Many GFAP-immunoreactive cells are seen in the graft (t). They have a tendency to gather in the perivascular regions and in the margin of the graft tissue facing to the subarachnoid space. ctx: cerebral cortex, p: pia mater, bar=200 μm.

IV 考 察

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大いに関係すると考えられている²¹⁾。特に、Meynert 核の変性が顕著で、動物実験でもこの部位を興奮性アミノ酸や電気凝固で破壊すると、学習記憶障害が生じる。このようにして作成した記憶障害ラットに、Fine ら⁸⁾は同種胎仔ラットの前脳基底部細胞浮遊液を、板倉ら¹³⁾は自家迷走神経下神経節(多数のコリン作動性ニューロンが含まれる)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。症状改善のメカニズムは明らかではないが、移植された神経細胞による神経回路網の再構築というより、移植細胞や移植操作がもたらす神経伝達物質やその合成酵素、神経栄

養因子などの供給によるところが大きいと考えられる。移植された神経細胞が突起を伸ばし、ホスト神経細胞とシナプス形成で連絡することに意義があるとしても、少なくともアルツハイマー病に対する脳移植を考えていく場合には、その条件は大脳皮質に多数箇所の移植が必要となることを意味し、難題の一つと言える。もしも各種神経伝達物質や神経栄養因子を産生、分泌するいわば内分泌・外分泌器官として移植組織が重要な意義を持つことが明らかとなれば、より安全確実な移植方法の開発も可能となろう。

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。この部位に移植を行った場合、酵素処理やメッシュを通したりビベッティングといった機械的損傷により疲弊した細胞の生存率は、脳実質内移植よりも高いと思

われる。cell suspension 法によれば脳表に沿った比較的広い発育スペースも有利である。しかし、移植細胞数や細胞密度の問題があり、胎仔前脳基底部細胞を約 1×10^6 cells/ μ l, 7 μ l を同様の手技で移植してみたところ、3 か月目で肉眼的に明らかに脳表より膨隆して成育している移植組織が見られた (Fig. 7)。すなわち、ホスト脳を圧迫して発育する危険があり、さらに検討を要する。

移植に用いた細胞は胎生期の神経細胞およびグリア細胞の混合であるため、細胞外基質の形成や豊富な血管新生の誘導がみられ、神経細胞を支持していた。さらに血管周囲やクモ膜下腔に面する移植組織周辺部に GFAP 陽性アストロサイトが集簇していた。これらは移植組織内部環境の恒常性維持に重要な役割を演じているものと推察され、ほとんどは移植された胎仔由来のアストロサイトと考えられる。血管新生はホストにとっては局所の脳血流を増加させられると思われるが、逆に血流を奪ってしまう可能性も考えられ、これも検討を要する点の一つである。

神経伝達物質や神経栄養因子などのホスト神経細胞への供給路としては、経シナプス性あるいは髄液、血液、組織間液が考えられる。軟膜を穿通する血管など

を媒介にして、ホスト皮質内に線維を進展させる可能性が考えられるが、今回の検討では正常軟膜を貫通している線維は確認されなかった。移植神経細胞からの新たな innervation が、ホスト神経回路に重大な障害をもたらす危険性が考えられ、もしそうであるとする、軟膜が一つのバリアの役目を成すと思われる。逆に、部分的にでもホスト脳内に直接交通している方が有利であるとすれば、クモ膜下腔の移植組織と直接つながるように少量の細胞を脳実質内にも移植するか (今回のモデルはこれに相当する)、細胞の代わりに神経線維の伸展を誘導する laminin などのいわゆる細胞接着因子を注入する方法²²⁾ も考えられる。

細胞の拡散を防止する工夫も必要で、細胞浮遊液をある程度ゲル化することが考えられる。また、その液中に神経成長因子¹¹⁾ やその他の細胞保護物質¹⁷⁾ を溶かし込むことなども考慮すべき点と思われる。

V ま と め

クモ膜下腔への胎仔浮遊細胞移植は、クモ膜の trabecula に補捉されて比較的限局性に生着し、良く成育した。髄液や豊富な軟膜血管からの酸素や栄養の供給が良好なためと考えられる。ホスト大脳皮質線維

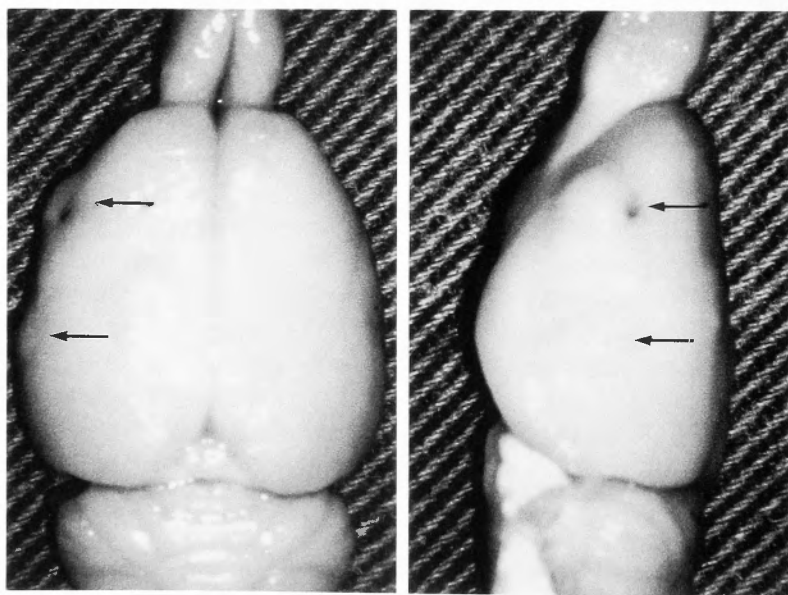


Fig. 7 Fetal basal forebrain cell suspension (1×10^6 cells/ μ l, 7 μ l) had been transplanted 3 months before. Because of higher cell density, it is noticed that the graft tissues have grown protruding from the brain surface of the host (arrows).

と移植神経細胞の再生線維とは豊富に近接してはいるが、両者間に軟膜があり、穿通血管などを媒介に軟膜を貫通して宿主脳内へ innervate する否かは、神経機能に及ぼす効果や危険性を含めて今後の検討課題である。

反応性アストロサイトは移植組織の周辺部や新生血管周囲に集簇し、神経細胞の支持、線維の伸長の誘導、移植組織内環境の恒常性維持などに関与しているものと推察された。

現在ほとんど有効な治療薬のないアルツハイマー病に対する治療法として、脳内移植療法の可能性が考えられているが、各種の神経伝達物質や神経栄養因子などを産生、分泌するいわば内分泌・外分泌器官として移植組織を考えることも可能であり、これによって疾病の進行を食い止められることが明らかとなれば、浮遊細胞のクモ膜下腔への移植法は、一つの移植手技・手法として考慮され得ると思われる。

文 献

- 1) Bakay RAE, Fiandaca MS, Sweeney KM, et al: Delayed stereotactic transplantation technique in non-human primates. *Prog Brain Res* 78: 463-471, 1988.
- 2) Björklund A, Dunnett SB, Stenevi U, et al: Reinnervation of the denervated striatum by substantia nigra transplants: Functional consequence as revealed by pharmacological and sensorimotor testing. *Brain Res* 199: 307-333, 1980.
- 3) Björklund A, Stenevi U, Schmidt RH, et al: Intracerebral grafting of neuronal cell suspension. Survival and growth of nigral cell suspension implanted in different brain sites. *Acta Physiol Scand (Suppl)* 522: 1-18, 1983.
- 4) 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.
- 5) Bregman BS, Reier PJ: Neural tissue transplants rescue axotomized rubrospinal cells from retrograde death. *J Comp Neurol* 244: 86-95, 1986.
- 6) Dunnett SB, Toniolo 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. *Neurosci* 16: 787-797, 1985.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Gage FH, Björklund A, Stenevi U, et al: Intrahippocampal septal grafts ameliorate learning impairments in aged rat. *Science* 225: 533-536, 1984.
- 10) Gash D, Sladek JR, Sladek CD: Functional development of grafted vasopressin neurons. *Science* 210: 1367-1369, 1980.
- 11) Hefti F: Nerve growth factor promotes survival of septal cholinergic neurons after fimbrial transections. *J Neurosci* 6: 2155-2162, 1986.
- 12) Isacson O, Brundin P, Gage FH, et al: Neural grafting in a rat model of Huntington's disease: Progressive neurochemical changes after neostriatal ibotenate lesions and striatal tissue grafting. *Neuroscience* 16: 799-817, 1985.
- 13) 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.
- 14) Kesslak JP, Nieto-Sampedro M, Globus J, et al: Transplants of purified astrocytes promote behavioral recovery after frontal cortex ablation. *Exp Neurol* 92: 377-390, 1986.
- 15) Labbe R, Firl A, Mufson EJ, et al: Fetal brain transplants: Reduction of cognitive deficits in rats with frontal cortex lesions. *Science* 221: 470-472, 1983.
- 16) 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.
- 17) Palaoglu S, Erbenig A, Kaya S, et al: Improved survival of transplanted cortical brain tissue grafts by Iloprost in rats. *Surg Neurol* 34: 212-218, 1990.
- 18) 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.
- 19) Perlow MJ, Freed WJ, Hoffer BJ, et al: Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science* 204: 643-647, 1979.
- 20) Pezzoli G, Motti E, Zecchinelli A, et al: Adrenal medulla autograft in 3 parkinsonian patients: results using two different approaches. *Prog Brain Res* 82: 677-682, 1990.
- 21) 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.

- 22) Zhou FC and Azmitia EC: Laminin directs and facilitates migration and fiber growth of

transplanted serotonin and norepinephrine neurons in adult brain. Prog Brain Res 78: 413-426, 1988.