原著

実験的定位脳放射線照射後の病理組織学的変化

—特に oligodendrocyte の細胞傷害の進展について—

大塚 隆嗣   清木 義勝   中野 次郎
柴田 家門   寺尾 榮夫

Neuropathological Changes following Experimental Stereotactic Irradiation : Progressive Injuries of Oligodendrocytes

by

Takashi Ohtsuka, M.D., Yoshikatsu Seiki, M.D., Jiro Nakano, M.D.,
Iekado Shibata, M.D., and Hideo Terao, M.D.

from

Department of Neurosurgery, Toho University School of Medicine

This report describes the results of neuropathological examinations in 14 rabbit brains after 100 Gy of linac stereotactic irradiation. The tissue around the area of radiation necrosis was subjected to special examination.

Fourteen rabbits were given a single dose of 100 Gy by a linear accelerator with a use of the 10 mm collimator. Animals were sacrificed serially after irradiation. Brains were removed and formalin treated paraffin sections were made. All sections were stained by H & E, GFAP and TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling method) stain. Pathological changes of vessels and neural tissue around the area of necrosis were examined.

Three months after irradiation, TUNEL-positive oligodendrocytes were seen scattered in the white matter of the radiated field, and after 6 months, these changes extended around the radiating field, but vessels and neurons appeared to be intact. Two years after irradiation, massive necrosis had occurred in the radiated area. Thickness and fibrinoid degeneration of the vessel walls were evident in the area around the necrosis. These vessel changes were recognized in the zone of the 40 Gy radiated region. TUNEL-positive oligodendrocytes were also observed around the necrosis, and were scattered in the white matter and corpus callosum over the region of vascular changes.

These findings suggested the following: In the later period after irradiation, oligodendrocytes in the peripheral zone of necrosis are damaged by ischemia and edema, which are caused by vascular changes. TUNEL-positive oligodendrocytes which existed in the white matter and corpus callosum distal to the radiated area may exhibit development of serial damage of oligodendrocytes in those regions.

(Received October 4, 1996; accepted March 22, 1997)

Key words : experimental stereotactic irradiation, oligodendrocyte, necrosis, TUNEL stain

Jpn J Neurosurg (Tokyo) 6: 441-447, 1997

はじめに

最近, 新しい放射線照射方法として, radiosurgery が種々の疾患に応用され, その臨床における有用性が多

数報告されているが²⁾⁷⁾¹²⁾, 同時に照射後の放射線障害の報告も散見される¹⁾. この放射線障害の中で問題とされるのは, 照射急性期における病巣周囲の浮腫と照射晩期に発生する放射線壊死であり, その成因はそれぞれ血

東邦大学医学部脳神経外科/〒143 大田区大森西 6-11-1 [連絡先: 大塚隆嗣]

Address reprint requests to: Takashi Ohtsuka, M.D., Department of Neurosurgery, Toho University School of Medicine, 6-11-1 Ohmori-nishi, Ohta-Ku, Tokyo 143, Japan

Fig. 1 Coronal section of the rabbit brain

A circle indicates 10 mm radiating field (80 Gys), and a small square indicates the radiating center (100 Gys).

Fig. 2 Microphotograph of specimen of the rabbit brain at 3 months after irradiation

TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling method (TUNEL) positive oligodendrocytes (arrowheads) are seen scatterly (TUNEL stain, $\times 40$).

A/B

Fig. 3 Photograph (A) and microphotograph (B) of specimen of the rabbit brain at 2 years after irradiation

B: Blood vessels with fibrinoid degeneration are observed in the necrosis and its-juxta area (H & E stain, $\times 40$).

管性浮腫、放射線の直接傷害と血管変性に基づく二次的障害であると考えられているが、radiosurgeryにおいては、いまだ十分な確証は得られていない。われわれは、linac stereotactic radiosurgeryの臨床応用に先立ち、ウサギ脳への100 Gy照射を行い経時的な組織変化と局所血流量の変化を観察し、照射1年後に明らかな壊死の発生とともに局所血流量が減少することから、壊死発生の成因は血管壁変化による組織の虚血や循環障害が主因であると報告した¹⁰⁾。最近 radiosurgery で加療された症例が蓄積されるとともに、MRIにおいて白質傷害が顕著となる症例の報告も散見される。そこでその成因を検討する目的で壊死周囲の組織変化に注目すると、

細胞傷害、特に oligodendrocyte の傷害の経時的な進展について若干の興味ある知見を得たので報告する。

方 法

① 照射方法

体重約5 kgの純系白色日本ウサギを Nembutal 0.3 mg/kg で静脈麻酔後、矢状縫合より右5 mm、人字縫合の前方5 mmの前頭骨内に径2 mmのsilicon ballを挿入し、放射線照射の際、および照射部の病理組織学的検索の際の landmark とした。この操作の脳血流への影響を考慮し、手術操作後1カ月の期間をおいて照射を行

Fig. 4 Microphotograph of specimen at 2 years after irradiation

Blood vessels with fibrinoid degeneration are observed in the 8 mm distant from radiating center (PAS stain, $\times 20$).

Fig. 5 Electromicrograph of specimen at 2 years after irradiation

Proliferation of endothelial cells and marked basal-lamina like structure are observed ($\times 6,000$, Bar: $100\mu\text{m}$).

った。照射は、すでに寺尾ら¹⁴⁾が報告した方法を動物モデル用に一部 modify し行った。linac は、NELAC-1018, 18 meV で径 10 mm のタングステン合金の円筒型 collimator を用い、計 14 羽のウサギ脳へ 100 Gy の stereotactic irradiation を行った (Fig. 1)。照射中は適宜静脈麻酔を追加し、ウサギを無動状態に保った。

② 病理組織学的検討

照射直後、3 日、1 週、3 週、3 カ月、6 カ月、1 年、2 年後に屠殺し、全脳を摘出した (照射直後～6 カ月まではおのおの 2 羽、1～2 年後は 1 羽)。摘出標本は、landmark において冠状断に分割し、ホルマリン緩衝液で固定し、パラフィン包埋後、薄切して hematoxylin-eosin (HE) 染色、glial fibrillary acidic protein (GFAP) 染色を行った。免疫染色は、peroxidase-anti-peroxidase method (PAP 法) を用い、GFAP 抗体は DAKO 社製、PAP kit を使用した。さらに、細胞傷害の一つの指標として DNA の fragmentation を明らかにするために、オンコー社製の Apop tag kit を用いて TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 染色を行い⁴⁾、HE、GFAP 染色と対比させることで細胞を同定した。ここで、照射辺縁部の皮質および白質における TUNEL 陽性細胞数を 400 倍、10 視野の平均として経時的に表し、student の *t* 検定を用いて検定した。また、照射 2 年後の検体については 10% グルタルアルデヒドで固定し、エポン包埋後、超薄切して壊死周囲の毛細血管を中心に電子顕微鏡的にも観察した。

結 果

① 血管壁の変化と TUNEL 陽性細胞

照射直後～3 週までの急性期変化としては、3 日目に照射部位の小出血と浮腫の所見が、また、3 週目には照射部白質の著明な空胞変性が認められたのみで、その他の明らかな病理学的変化は認められず、TUNEL 染色でも 3 週までは陽性細胞は確認できなかった。照射 3 カ月後になると照射部白質に HE 染色で oligodendrocyte と思われる細胞の壊死が出現し、この HE 染色標本と対比すると、TUNEL 染色でも照射野の oligodendrocyte と考えられる核が散在性に染色されていた (Fig. 2)。この変化は照射 6 カ月後で照射部を中心により顕著となったが、その周囲の明らかな血管壁の変化は認められず、TUNEL 陽性細胞も照射範囲内に限局して認められたのみであった。照射 2 年後になると全脳摘出標本で、照射部位に一致した壊死や出血が認められ、また嚢胞形成が多数みられ、一部は癒合し、脳室と交通していた。照射部における壊死部の弱拡大像では、壊死巣内の血管は著明に拡張し、また閉塞しているものも認められた (Fig. 3)。強拡大像では血管壁内外に PAS 陽性の沈着物質が認められた。これらの血管変化は、40 Gy 相当の照射中心から 8 mm 遠位部、壊死領域をわずかに越える範囲まで認められ、特に白質により顕著な傾向がみられた (Fig. 4)。電顕的には、これらの血管壁は内皮細胞の増殖によって血管内腔が狭小化しているか、あるいは内皮細胞の増殖は顕著でないものの、血管外膜側に著明な同心円状の沈着物質が認められるか、のい

A/B Fig. 6 At 2 years after irradiation TUNEL positive oligodendrocytes progress in the white matter and corpus callosum (TUNEL stain, A: $\times 40$, B: $\times 100$)

れかが確認された (Fig. 5). 照射2年後の TUNEL 染色では壊死巣部およびその周囲に多数の核濃染像がみられたが、神経細胞はごく一部の細胞が陽性を示すのみで、細胞質、核ともに膨化し、明らかな壊死の像を呈しており、むしろ神経細胞周囲の satellite oligodendrocyte と思われる細胞の核濃染像が認められた。TUNEL 陽性細胞は、そのほとんどが oligodendrocyte と考えられる細胞であり、照射晩期においても oligodendrocyte の傷害が主体であると考えられた。また、HE 染色ではこの部に一致して脱髄も認められた。一方、変性をきたした血管壁には TUNEL 染色陽性細胞は認められなかった。さらに、この oligodendrocyte の DNA fragmentation は壊死領域のみならず血管の変性領域も越え、白質および脳梁を介して照射中心から最大 16mm 外側の照射遠位部 (10Gy 相当) や一部対側へも散在性に拡大していた (Fig. 6). また、これら oligodendrocyte の TUNEL 陽性数は Fig. 7 のように、皮質、白質においても照射3週後～2年にわたって統計学的に有意な差をもって、徐々に増加することが確認された。

② 反応性 astrocyte の増殖

GFAP 染色では、照射3日後から照射部を中心とした astrocyte の増殖が認められ、1週後では周囲に拡大したが、照射3週後では照射部と非照射部に、もはや GFAP 染色性の明らかな差は認められなかった。しかし、照射6カ月になると再度壊死発生部位を中心に astrocyte の増殖が出現し、2年後では遠位部や対側の白質、脳梁まで拡大していた (Fig. 8A). 特に、

TUNEL 陽性の oligodendrocyte 近傍では反応性 astrocyte の増殖が顕著に認められた (Fig. 8B).

考 察

一般に TUNEL 法は *in situ* におけるアポトーシスの検出として用いられ、その原理は 1992 年に Gavrieli ら⁴⁾が報告しているように、アポトーシス細胞において顕著な現象である DNA fragmentation の結果として発生した 3'-OH DNA end を末端基転移酵素とビオチン化した deoxyuridine を用いて標識し検出することにある。したがって、なんらかの細胞傷害の結果、DNA fragmentation が発生すれば、細胞死がアポトーシスあるいは壊死のいずれであっても傷害を受けた細胞を判別することが可能である。本研究では核傷害を受けた細胞を同定する目的で TUNEL 染色を行い、放射線壊死周囲の血管変化がみられた領域とこの TUNEL 染色陽性細胞が確認された領域を比較して、放射線の照射晩期における正常脳に対する影響を検討した。

その結果、まず照射3カ月後で照射部白質の oligodendrocyte と考えられる細胞が TUNEL 陽性となったが、神経細胞や血管壁にはなんら変化が認められず、さらに、この変化は照射中心から半径 5mm、中心 100Gy から辺縁 80Gy の target volume 内に局限していたことから、単なる浮腫の影響であるとは考えにくく、この急性期の oligodendrocyte の変化は放射線の直接傷害に起因すると考えるのが妥当であろう。さらに、照射1, 2年後になると、従来の分割照射後の変化と同様に、血管壁は内皮細胞の増殖のみならず、外膜側でも

Fig. 7 Sequential changes of the number of the TUNEL positive oligodendrocytes in the radiated white matter (□) and cortex (■)

Values are means $\pm$ S.D..

*: Significantly different from 3W ($p < 0.01$)

**: Significantly different from 3M ($p < 0.01$)

Fig. 8 Microphotograph of specimen of the irradiated rabbit brain at 2 years after irradiation

Reactive astrocytes are observed in the white matter (GFAP stain, A: $\times 40$, B: $\times 100$).

著明な同心円状の沈着物質が認められ、この双方の影響で閉塞が進展し周囲組織が虚血に至るものと考えられ、血管変化が著明になると同時に TUNEL 陽性細胞領域が拡大したことから、循環障害が主因となり白質の細胞傷害が進展し、脱髄に至ったと推測された。

ここで注目すべき変化は、急性期、慢性期いずれの時期においてもこの TUNEL 陽性細胞のほとんどが oligodendrocyte であったという点である。壊死巣周囲のみならず血管壁変化が認められた領域を越えた白質および脳梁に、oligodendrocyte の DNA fragmentation が散在性に認められ、一部対側にまで及んだという事実から、照射晩期においては oligodendrocyte の傷害は血管変性範囲を越え、その白質や脳梁を介して進展する可能性があることを示している。その原因については、血管壁変化による循環障害や浮腫が解剖学的に粗な白質に、特に強く出現した結果であるのか、あるいは別の要因が存在するのかは明らかではない。以下、その原因について考察する。

臨床では、arteriovenous malformation (AVM)⁶⁾ や良性脳腫瘍¹⁾ に対して行われた中心線量 20~30 Gy 程度の radiosurgery 後でも、MRI 上 T2 強調画像で病巣周囲にしばしば high intensity area が出現することが知られており、この変化は主として血管性浮腫によると考えられている。壊死巣周囲の oligodendrocyte の傷害は、この部分の血管壁の変化を考慮すると、まさしく浮腫の影響であると考えて異論はないであろう。さらに、浮腫が病巣周囲のみならず、白質を介して遠位部に進展する事実は cold lesion モデルを使った Reulen ら¹¹⁾ の研究によって証明されており、それによると毛細血管内外の静水圧差が推進力となり、血液脳関門破綻部位から組織圧の勾配を形成して、圧の低い脳室や組織圧の低いさらに離れた白質へ浮腫が広がるが、組織の構造の違いからか、灰白質へは拡大しないという。しかし、脳梁においては線維束が密であり、白質に比べて浮腫が進展しにくいとされており、また白質や脳梁を介した oligodendrocyte の傷害が単なる浮腫の結果であれば、

その傷害も連続性に出現するはずであり、散在性の変化であることを考慮すると、単純に浮腫が原因であるとは考えにくい。また、この oligodendrocyte の傷害が放射線照射とはまったく無関係な、例えば加齢による脳の変化であれば、び漫性に脳全体に認められるはずであり、照射範囲からある一定の領域にのみ出現していることからこのことは否定できる。

一般に脳損傷時には astrocyte や microglia が活性化され、fibroblast growth factor (FGF), nerve growth factor (NGF) など種々の液性因子を発現しつつ組織修復がなされる⁵⁾⁸⁾⁹⁾。一方、microglia からは nitric oxide (NO) などの組織傷害性物質も分泌されることが明らかにされており⁹⁾、TUNEL 陽性の oligodendrocyte 近傍に反応性 astrocyte の増殖が認められたことは、この astrocyte から分泌されるなんらかの因子が関与していることを示唆する所見といえ、神経成長因子が白質傷害に関与しているとも推測できる。一方、動物モデルを使用した脳虚血実験では、中大脳動脈閉塞³⁾¹³⁾や大脳半球切除¹⁵⁾によって同側の視床や黒質に変性、萎縮をきたすことが報告されており、局所の脳損傷に伴う遠隔部の二次的変性と考えられている。現在までに放射線照射によってこのような形態学的に二次的な変化をみたという報告はないものの、照射領域における壊死の影響が遠隔部における神経線維および oligodendrocyte の変化をきたしたとも推測できる。さらに、*in vitro* の研究では、oligodendrocyte は 10 Gy 程度の放射線照射によって容易に傷害を受け、アポトーシスを起こすとされている¹⁶⁾。*in vivo* においても 2 年後には放射線による oligodendrocyte の直接傷害は起こり得るのかもしれない。oligodendrocyte 細胞個々の感受性の違いによってか、また *in vitro* では成熟 oligodendrocyte に比べて幼弱な oligodendrocyte type 2 astrocyte progenitor cell の方が放射線感受性は高いとされており¹⁶⁾、その影響で散在性の変化をきたしたとも考えられ、放射線の直接傷害も完全には否定できない。

いずれにしても、これらの原因については推測の域を出ないが、長期にわたり徐々に細胞傷害が進展し、最終的に脱髄に至るのは事実であろう。本研究で照射 2 年後に認められた壊死巣周囲および白質、脳梁を連続する oligodendrocyte の傷害はまさしくこの脱髄の初期を示していると考えられ、この意味で脳定位放射線外科での合併症であり、照射数年後にしばしば認められる照射対象周囲の変化は、今まで単なる浮腫であると考えられていたが、実は oligodendrocyte の傷害が重要な主因であり、経時的にさらに遠位部に進展し、最終的に leu-

koencephalopathy に至る可能性があることが示唆された。

まとめ

今回の結果は照射晩期において、細胞傷害、特に oligodendrocyte の傷害は血管の変性範囲を越え、その白質や脳梁を介して進展する可能性があることを示しており、臨床において非常に重要な事実と考えられる。通常の治療線量である 20~30 Gy 程度の照射で同じ現象が起こるか否かは今後の検討が必要ではあるが、照射の適応、線量を十分考慮するとともに、現時点では照射にあたって、この事実を念頭におき、注意深い経過観察と脱髄に至る以前のより早期からの対応が必要であると思われる。

本論文の要旨は、第 5 回日本定位的放射線治療研究会において発表した。

文 献

- 1) Engenhart R, Kimmig BN, Hover KH, Wowra B, Sturm V, Kaick G, Wannemacher M: Stereotactic single high dose radiation therapy of benign intracranial meningiomas. *Int J Radiation Oncol Biol Phys* **19**: 1021-1026, 1990.
- 2) Flickinger JC, Lunsford LD, Coffey RJ, Linskey ME, Bissonette DJ, Maitz AH, Kondziolka D: Radiosurgery of acoustic neurinomas. *Cancer* **67**: 345-353, 1991.
- 3) Fujie W, Kirino T, Tomukai N, Iwasawa T, Tamura A: Progressive shrinkage of the thalamus following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* **21**: 1485-1488, 1990.
- 4) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA: Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* **119**: 493-501, 1992.
- 5) 濱登希子, 小倉明彦: グリア細胞の機能に関する最近の知見. *生物物理* **35**: 7-12, 1995.
- 6) Levy RP, Fabrikant JL, Frankel KA, Phillips MH, Steinberg GK, Marks MP, DeLaPaz RL, Chuang FYS: Clinical-radiological evaluation of sequelae of stereotactic radiosurgery for intracranial arteriovenous malformations. in Steiner L, Lindquist C, Foster D, Backlund EO (eds): *Radiosurgery: Baseline and Trends*. New York, Raven Press, 1992, pp. 209-220.
- 7) Lunsford LD, Kondziolka D, Flickinger JC, Bissonette DJ, Jungreis CA, Maitz AH, Horton JA, Coffey RJ: Stereotactic radiosurgery for arteriovenous malformations of the brain. *J Neurosurg* **75**: 512-524, 1991.
- 8) Michael DN: Astrocyte response to CNS injury. *J Neuropathol Exp Neurol* **53**: 213-220, 1994.
- 9) 中島一行, 島田章則, 高坂新一: ミクログリアと病態.

- 神経進歩 37: 665-676, 1993.
- 10) 大塚隆嗣: ウサギ脳における linac stereotactic irradiation 後の脳血流動態及び病理組織学的変化. 脳外 24: 801-807, 1996.
  - 11) Reulen HJ, Graham BS, Spatz M, Klatzo I: Role of pressure gradients and bulk flow in dynamics of vasogenic brain edema. *J Neurosurg* 46: 24-35, 1977.
  - 12) Steiner L, Lindquist C, Adler JR, Torner JC, Alves W, Steiner M: Clinical outcome of radiosurgery for cerebral arteriovenous malformations. *J Neurosurg* 77: 1-8, 1992.
  - 13) Tamura A, Tahira Y, Nagashima H, Kirino T, Gotoh O, Hojo S, Sano K: Thalamic atrophy following cerebral infarction in the territory of the middle cerebral artery. *Stroke* 22: 615-618, 1991.
  - 14) 寺尾榮夫, 西川秀人, 大石仁志, 遠藤 剛, 金子稜威雄, 木暮 喬: 新しい原理, 装置による Linac Accelerator を用いた Radiosurgery. 脳外 20: 583-592, 1992.
  - 15) Villablanca JR, Burgess JW, Benedetti F: There is less thalamic degeneration in neonatal-lesioned than in adult-lesioned cats after cerebral hemidecortication. *Brain Res* 368: 211-225, 1986.
  - 16) Vrdoljak E, Bill CA, Stephens LS, Van der Kogel AJ, Kie-Kian A, Tofilon PJ: Radiation-induced apoptosis of oligodendrocytes *in vitro*. *Int J Radiat Biol* 62: 475-480, 1992.

要 旨

実験的定位脳放射線照射後の病理組織学的変化
 —特に oligodendrocyte の細胞傷害の進展について—
 大塚 隆嗣 清木 義勝 中野 次郎 柴田 家門
 寺尾 榮夫

100 Gy stereotactic irradiation 後の正常ウサギ脳の病理変化を観察した。照射後 3 カ月で発生した白質の oligodendrocyte の壊死は放射線による直接傷害に起因し, 2 年後に発生した壊死巣周囲の oligodendrocyte の傷害は, 循環障害に基づく虚血や浮腫によるものと考えられた。このことから臨床において radiosurgery 後にしばしば認められる照射対象の周囲における画像上の変化は, oligodendrocyte の傷害が重要な要因であると推測された。さらに, 照射晩期では血管壁の変性が認められた領域を越え, 遠位部の白質や脳梁を介して一部対側にも oligodendrocyte の傷害が認められたことから, この oligodendrocyte の傷害は経時的に進展する可能性のあることが示唆され, その原因として, 浮腫に伴う神経栄養因子などの液性因子の関与あるいは遠隔部の二次的変性の関与が推察された。

脳外誌 6: 441-447, 1997