第 17 回日本臨床麻酔学会総会

脳損傷後の脳細胞移植による神経回路再建

片山容一* 越永守道*

I はじめに

中枢神経系に損傷が加わり、いったん変性が起こると、再生、修復は不可能であると古くから信じられてきた。しかし近年になって、中枢神経系の機能の解明が進み、変生によって神経活動の基本であるシナプス結合が失われた部分に、別の神経細胞から神経線維が伸長し、新たなシナプスを形成する現象が示されている。しかしながら、この現象のみで補える神経機能はきわめて限定されたものであり、失われた神経機能を十分に補えないことも、日常の臨床ではよく経験することである。そこで古くから脳や脊髄などの損傷を神経組織の移植によって修復が試みられてきた。しかし当時は、中枢神経系の高度に複雑な構造よりみて、神経組織の移植は意味のある結果をもたらさないと考えるのが一般的であった。ところがここ 20 年余りで神経移植に関する研究が飛躍的に進歩し、幼若な脳や脊髄組織であれば宿主内で生存しうるのみでなく、損傷された神経回路を修復することさえも可能であることが示されてきている。

重傷の頭部外傷や脳虚血などの侵襲が加わると、両側の海馬の錐体細胞が選択的に脱落する場合があることが知られている。これらの症例では記憶機能（主に recent memory）が障害される。最近では蘇生技術の進歩により、このような症例を救命できることが多くなってきただけに、記憶機能の障害のた

めに社会復帰がうまくいかない例も増加してきている。この病態を根本的に治療しうる薬物も現状ではなく、この点においては脳損傷の従来の治療には限界があるといわざるをえない。そこでこの限界を克服するために、著者らはこのような海馬損傷による記憶機能の障害に対して、その治療法の確立を念頭において神経移植に関する基礎的研究を行なってきた。その結果、現在の著者らの移植方法は、きわめて高い生着率を得ることができるのみならず、技術的には臨床応用可能な段階に達している。本稿では、脳虚血により海馬錐体細胞が脱落したラットにおいて、胎児の海馬細胞を移植するとどのように神経回路が再構築されるかを検討した一連の実験¹⁾について総括的に報告する。

II 脳虚血モデルの作成

ラットにおいて、脱血による低血圧下に両側頸動脈を 10～15 分間遮断すると、その 3 日以内に両側の海馬 CA 1 錐体細胞が比較的選択的に脱落する^{2)~4)}。樹状突起に特異的に存在する細胞骨格蛋白である microtubule-associated protein 2 (MAP 2) の免疫染色により正常な海馬を観察すると、CA 1 錐体細胞からは、背側に basal dendrite、腹側に apical dendrite が特徴的な層状構造を形成する。一過性の脳虚血により海馬 CA 1 錐体細胞が選択的に脱落すると、これらの樹状突起も消失する。この病態で最も特徴的なことは、神経の入力を受ける側の樹状突起、神経細胞は脱落するが、入力を送る軸索の変性は数週間にわたって起こらず、シ

*日本大学医学部脳神経外科学教室

図1 胎仔ラットの海馬のNissl染色(A)と移植に用いるcell-suspension(B)

ナプス終末はその部に intact な状態でとどまることである。

III 神経細胞の採取

胎齢 17～18 日のラット胎児より実体顕微鏡下に海馬を採取しこれを移植に用いる。採取した海馬は、細胞培養液の中で細胞をばらばらにした cell-suspension (細胞浮遊液) を作成する。この cell-suspension には、海馬 1 個分当たり約 40 万個の細胞が含まれており、そのうち約 80% にあたる約 30 万個が、trypan blue dye exclusion test (死滅する細胞にこの感光色素が取り込まれることを利用したテスト) で viable cell である。この cell-suspension を顕微鏡にて観察すると、ニッスル染色にて濃い染色性を示す比較的小さな細胞群であり、成熟した錐体細胞とは異なった形態を示す (図 1 A, B)。これらの細胞が成熟し、神経線維による network を形成する過程で、特徴的な錐体細胞の形態に変化してゆくものと考えられる。

IV 細胞の保存法

神経細胞移植を実際に臨床応用する場合には、必要なときに随時神経細胞が使用可能であること、移植する細胞の感染の有無など安全性を確認しておく必要がある。そこでこの方法を一般的な治療法とす

るためには、採取した細胞を保存する技術が必要である。著者らは、従来の組織片を凍結保存する方法にかわって、cell-suspension を作成した後に、dimethylsulfoxide (DMSO) を凍結保護剤として凍結保存する方法を工夫した⁵⁾。この方法は、従来の組織片の凍結保存の場合に比べて、多くの viable cell を得ることが目的である。cell-suspension を凍結する理由は、凍結保護剤が個々の細胞表面により浸透させることが可能であり、凍結という侵襲に対してより抵抗性を示すと考えられたためである。この方法で凍結保存した cell-suspension を解凍し、trypan blue dye exclusion test で検討すると、約 70% の細胞が viable な状態を維持している。また一度凍結して保存すると viable cell の割合は、その保存期間に大きな影響を受けないことも明らかとなっている。

V 移植法

移植は、海馬 1 個分に相当する細胞を含む cell-suspension を、海馬の背側、すなわち alveus と corpus callosum の間の cleavage に接する海馬 CA 1 領域に定位的にゆっくり注入することによって行なう^{2),6)}。その際には注入する medium が多ければ、それにより組織を破壊してしまう恐れがあるため、全体量を $4 \mu\text{l}$ とした濃厚液として注入することになっている。

VI 生着状況と発育の条件

一過性脳虚血後 1 週間してから海馬細胞の移植を行ない、その 4 週間後には、大量の細胞が生着し、大きな mass を海馬の背側に形成しているのが観察される (図 2 A)^{2),5)}。この中に約 3 万から 6 万の細胞が生着している。凍結保存した細胞でも viable cell の生着する割合はほぼ同じである。移植後約 25 週間 (180 日) 以上経過すると、錐体細胞が脱落した海馬 CA 1 領域が萎縮して扁平となり、これに代わって生着した移植細胞の mass が海馬背側を占めるようになっている。またこの生着した個々の細

図2 A. 一過性脳虚血後に海馬細胞を移植したラット海馬 (MAP2免疫染色) 矢印: 移植された神経細胞によって形成されたmass. *印: CA1領域の樹状突起は完全に消失しており染色されていない. B. massの背側で上方に伸長する樹状突起. C. 腹側で海馬に向けて柵状に伸長している樹状突起

胞の形態は、明らかに成熟した錐体細胞の特徴を示していた。

最もよくmassを形成するのは海馬の alveus と

corpus callosum の間の間隙 (cleavage) であり、海馬背側に結合した脳組織が新しくできたようにみえる。このことは、髄液に満たされた脳室に接していることが生着に好条件をもたらしているのかもしれない。著者らは、以前に水頭症により間質性浮腫を生じたラットに対して移植を行なったが、細胞間隙が拡大していると、移植細胞の生着ならびに神経線維の伸張が促進されることを観察した^{7),8)}。このことは、髄液ないし細胞外液が生着になんらかの好影響を及ぼしていることを示唆している。

損傷が加えられていないまったく正常な海馬でも、ある程度の数の移植細胞が生着する。しかし上述のように大量の細胞が生着するのは、海馬 CA1 錐体細胞に著明な脱落があるときである²⁾。このように一過性脳虚血を加えたラットでは、海馬 CA1 錐体細胞の脱落の程度と生着する細胞数との間には明らかな相関関係がある。

VII 生着した海馬細胞の性質

生着したmassを組織学的に観察すると、生着した細胞はmassの中心部で密度が高く、水平方向に広がっている。正常の海馬にみられているような明らかな層構造は形成されないが、cluster ないしは rudimentary layer を形成している。これらの細胞の形態は上述したように、成熟した海馬 CA1 錐体細胞に形態的にも類似している。また多くの細胞が、CA1 錐体細胞に特徴的な calbindin D 免疫反応陽性である (図3A, B)²⁾。またこのほかに GABA 作動性介在ニューロンの特徴である parvalbumin 陽性細胞も生着している (図3C, D)。このことは、一過性脳虚血によって CA1 錐体細胞が脱落すると、これに相当する胎児の神経細胞が生着するようになるものと考えられる。

VIII 移植に対するグリア反応

移植を行なったラットの海馬領域を astrocyte のマーカーである GFAP 免疫染色にて観察すると、astroglial proliferation が移植1週間までに出現す

図3 Calbindin D 免疫染色 (A, B) と parvalbumin 免疫染色 (C, D)
移植された細胞(B)の多くは正常 CA1 錐体細胞(A)と同様に calbindin D 陽性を示す。正常海馬(C)と同様な GABA 作動性ニューロンの特徴である parvalbumin 陽性を示すものが移植細胞(D)の中に存在している。

る。その後、2 週および 4 週を経過しても、GFAP 免疫反応で検出される astroglia は肥大し、mass の中に均一に分布しており、この間にはあまり大きな変化はみられない。このような GFAP 反応の増加を伴う astroglia の肥大、増殖は古くから gliosis とよばれ、これによって生じた瘢痕は神経線維の伸長を阻害する障壁となると考えられてきた。しかし、移植後 1 週間という早期からすでに astroglial proliferation が出現するにもかかわらず、後述するように、その後 4 週まで移植細胞からの旺盛な樹状突起の伸長や宿主脳からの神経線維の侵入が進む。したがって、このような gliosis が神経線維の伸長を阻害しているとは考えにくい。また加えてこれらの astroglia においては、強い神経栄養効果をもつ塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: bFGF) の発現が認められている。

Astroglia と並んでグリア細胞の主要な構成細胞

である microglia は、正常中枢では長い多くの枝分かれした突起をもつ ramified microglia として存在する。この microglia は、いったん外傷や感染などのストレスが加わると円形の ameboid microglia に変化し、脳内のマクロファージ様細胞として組織の debris の貪食やサイトカインの放出などさまざまな役割がある。胎生期の神経回路形成期にみられる microglia は、すべて ameboid microglia であり、これが神経系のネットワークの形成に関与していることが知られている。移植された mass の周囲およびその内部において OX 42 免疫染色にて microglia の形態を観察すると、これらはすべて ameboid microglia の形態を示していた¹⁾。このような microglial activation ならびに astrogliosis は、胎齢 19 日前後からの synaptogenesis の時期にみられる gliogenesis と類似しており、生着した細胞と神経回路の損傷された宿主脳との間の inter-

action を促進するように働いているのではないかと推定される。

IX 樹状突起の伸長とシナプス形成

移植後生着した細胞は、海馬の背側に mass を形成するとともに、その個々の細胞からは旺盛な樹状突起の伸展をするようになる。移植後 4 週を経過すると、生着細胞は背側および腹側の二つの方向性をもって、樹状突起を伸長させているのが MAP 2 免疫染色により観察される。すなわち背側では上方の corpus callosum に向けて扇状に伸長した樹状突起が多数みられるのに対して、腹側の細胞からは下方の海馬に向けて伸長した樹状突起が多数みられる(図 2 B, C)。全体をみると、生着した腹側の細胞から下方に伸長した樹状突起が柵状に配列し、正常な海馬にみられるような層構造をある程度形成しているのがわかる⁹⁾。またシナプス小胞特異的蛋白である synaptophysin (SVP 38) の免疫染色を用いることにより、mass の中で樹状突起の豊富な部位を観察すると、樹状突起に沿うように無数のシナプスが形成されていることが確認されている⁹⁾。正常な海馬に移植を行なったものでは、生着した細胞においては MAP 2 染色性は細胞質内に局限し、樹状突起の著明な伸長とシナプス形成はみられない。このことは移植された海馬細胞が、宿主脳内で target を失った nerve terminal から新たな入力を受けるように発育していることを示すものである。

X 宿主脳との神経回路の形成

生着した mass への宿主由来の神経線維の伸長を acetylcholinesterase (AChE) 組織化学で観察すると、移植後 1 週間では mass と海馬の境界部に多くの神経線維の集簇が認められ、2 週間を経過するとそこより無数の AChE 陽性線維が mass 中心部に向かって伸展しはじめる⁵⁾。さらに移植後 4 週間すると mass の中は、AChE 陽性の宿主由来神経線維で満たされ、密な神経網を形成するようになる(図 4 A, B)。前述のように生着した細胞は、clus-

図 4 Acetylcholinesterase 染色

Mass の中へは 2 週間(A)で宿主由来の神経線維が侵入しはじめ、4 週間(B)で密な神経網を形成している。

ter ないしは rudimentary layer を形成しているが、その周辺に高い AChE 活性を示す patch がみられるようになる。このような AChE を含む神経線維の伸長は、海馬細胞を半透膜のカプセルに封入し移植した場合にも、明らかにこれら細胞を target とするように半透膜の境界部まで誘導される¹⁰⁾。したがって移植細胞由来のなんらかの液性因子が関与しているものと推定される。海馬に神経線維を送る acetylcholine 陽性細胞は主に中隔野由来であるので、生着した細胞の mass に伸展した AChE 陽性の神経線維も宿主の中隔野からもたらされたものであると考えることができる。

XI 再構築された神経回路の機能

正常な海馬 CA 1 領域で、その入力の一つである Schaffer collateral を刺激したときの反応を記録すると、CA 1 錐体細胞の synchronous な放電が population spike として記録されるとともに、これに先だって population EPSP が観察される⁴⁾。この population EPSP は、記録のための micropipette を apical dendrite の深さまで進めると、樹状突起から細胞体に向かって発生する sink のために極性を反転する。この性質は、樹状突起が柵状に配列して層状をなしている海馬の構造を反映して

いる。

生着した海馬細胞は、宿主の Schaffer collateral を刺激すると asynchronous な放電を生じる¹⁾。Synchronous に放電せず大きな population spike を形成しないのは、移植された海馬細胞が正常の海馬 CA1 錐体細胞のように 1 列に配列しているわけではないためであろうと考えられる。いずれにしても宿主脳から生着した細胞に synaptic connection が形成されていることは間違いない。また micro-pipette を深く進めると、細胞の移植された領域の腹側の境界付近で、細胞放電に先行する EPSP の極性が逆転するのが観察されることがある。この事実は、MAP2 免疫染色により明らかにされた樹状突起の伸長の仕方に一致するものである。

XII 行動学的変化

一過性脳虚血により海馬 CA1 錐体細胞を脱落させたラットにおいては、空間的な記憶機能 (spatial memory) の障害が発生する。この記憶機能の障害は、radial maze test あるいは Morris water maze test により検出することができる。脳虚血後のラットにこれらのテストを行なうと正常に比べ明らかにこの成績が低下することが示されている。著者らは、Morris water maze test を用い、一過性脳虚血により海馬 CA1 錐体細胞を脱落させた後に海馬細胞を移植し、11~15 日後に水面下に設置したプラットホームに向かってラットを泳がせる task を 1 日に 4 試行ずつ行ない、翌日に 1 分間の記憶機能のテストを行なった。また 28~32 日後にも目標の位置だけを変えて同じように task とテストを行なった。移植を行っていないラットは、海馬 CA1 錐体細胞が脱落しているかぎり、いずれの時期においても、プラットホームに到達する潜時の延長および正確に到達する回数の低下を認める。これに対して移植を行なったラットでは、明らかにプラットホームに到達する潜時の短縮および正確に到達する回数の増加を示す。このような効果は、海馬細胞の移植を一側に行なうだけで観察される。

Maze test によって検出される記憶障害は、両側に海馬損傷があるときのほうが、一側に海馬損傷があるときよりも明らかに強く出現する。したがって、海馬細胞の一側への移植は、少なくともその側の海馬損傷を修復させる効果があるものと理解できる。

XIII おわりに

これらの結果は、脳虚血によって海馬錐体細胞が脱落した海馬に胎児の海馬細胞を移植すると、生着した細胞と宿主脳との間で新たな神経回路の再構築が行なわれることを示している。しかもこの新たに形成された神経回路は無秩序なものではなく、失われた神経機能を回復する方向へ構成されていると考えられる。現在まで著者の知るかぎり、海馬細胞の移植を臨床に応用したという報告はまだない。しかしヒト胎児の海馬細胞は比較的容易に採取することができる。例えば Freeman らは elective abortion を行なった二人の分裂病の女性から採取した海馬細胞を無胸腺ラットの前眼房に移植している。このような海馬細胞は錐体細胞、顆粒細胞、GABA 作動性介在ニューロンなどへの分化を示したという。しかも rhythmical electrical activity が記録されており、局所的な神経回路の形成が示唆された。神経細胞の移植という技術を臨床的な治療法にするためには、まだまだ多くの問題を解決しなければならない。しかしこれが一般的な治療法となる可能性は少しずつ現実的なものとなってきていると考える。

参考文献

- 1) 片山容一：脳細胞移植による再構築。海馬の移植、神経の再生と機能再建、川村光毅ほか編、東京、西村書店、1997、350~359
- 2) Katayama Y, Tsubokawa T, Koshinaga M, et al. : Temporal pattern of survival and dendritic growth of fetal hippocampal cells transplanted into ischemic lesions of the adult rat hippocampus. Brain Res 562 : 352~355, 1991
- 3) Katayama Y, Kawamata T, Kano T, et al. : Excitatory amino acid antagonist administered via

- microdialysis attenuates lactate accumulation during cerebral ischemia and subsequent hippocampal damage. *Brain Res* 584 : 329~333, 1992
- 4) Miyazaki S, Katayama Y, Furuichi M, et al. : Postischemic potentiation of Schaffer collateral/CA1 pyramidal cell response of the rat hippocampus: Involvement of N-methyl-D aspartate receptors. *Brain Res* 611 : 155~159, 1993
 - 5) Katayama Y, Tsubokawa T, Koshinaga M, et al. : Transplantation of cryopreserved fetal hippocampal cells into ischemic lesions in the adult rat hippocampus. *Cell Transpl* 3 (Suppl.) 1 : 39~41, 1994
 - 6) Tsubokawa T, Katayama Y, Miyazaki S, et al. : Supranormal levels of serotonin and its metabolite after raphe-cell transplantation in serotonin denervated rat hippocampus. *Brain Res Bull* 20 : 303~306, 1988
 - 7) Ogawa H, Tsubokawa T, Katayama Y, et al. : Facilitated growth of transplanted raphe cells in hydrocephalic interstitial edema. *Brain Res Bull* 24 : 769~774, 1990
 - 8) Miyazaki S, Katayama Y, Tsubokawa T, et al. : Effects of interstitial edema on brain cell transplantation. *Stereotact Funct Neurosurg* 54/55 : 364~367, 1990
 - 9) Koshinaga M, Katayama Y, Takahata T, et al. : Temporal pattern of synaptophysin expression in cryopreserved fetal hippocampal cells transplanted into ischemically damaged adult rat hippocampus. *Cell Transpl* 4 (Suppl.) 1 : 9~11, 1995
 - 10) Takahata T, Katayama Y, Oshima H, et al. : Transplantation of polymer-encapsulated fetal hippocampal cells into ischemic lesions of adult rat hippocampus. *Cell Transpl* 5 (Suppl.) 1 : 13~15, 1996

著者連絡先 片山容一
〒173-8610 東京都板橋区大谷口上町 30-1
日本大学医学部脳神経外科学教室