— 原 著 —

D-ガラクトサミンにより惹起した急性肝不全における 血液脳関門の電顕組織化学的研究

藤田 信輔

日本医科大学第1内科学教室 (主任: 奥村英正教授)

日本医科大学第2病理学教室 (指導: 浅野伍朗教授)

An electron microscopic histochemical study of the blood-brain barrier in acute hepatic failure induced by D-galactosamine

Shinsuke Fujita

The First Department of Internal Medicine, Nippon Medical School

The rat brain in acute hepatic failure induced by D-galactosamine hydrochloride was examined by a enzyme histochemical techniques. The Na-K-ATPase was assayed by a biochemical method. From an electron microscopic observation of hepatic encephalopathy, the brains showed an intracellular edema in the blood-brain barrier associated with a hydropic swelling of astrocytic foot process and increased pinocytotic vesicles in the capillary endothelium. The impairment of Na-K-ATPase and Mg-ATPase were histochemically demonstrated in the cytoplasmic membrane of capillary endothelium and astrocyte. The total ATPase and Na-K-ATPase ratio decreased in brain assay. A change in vascular permeability was revealed in the increasing number of HRP containing pinocytotic vesicles in the capillary endothelium.

These results suggest that in hepatic encephalopathy various toxic substances accumulate in the brain tissue with the functional disturbance of a membrane enzyme as Na-K-ATPase, contributing to the enhancement of cytotoxic edema.

Key words: hepatic encephalopathy, blood-brain barrier, enzyme histochemistry, Na-K-ATPase, Mg-ATPase

緒 言

肝性脳症の発生時には、臨床的に精神神経症状、昏睡などがみられ、その発生には血清中のアンモニア、メルカプタンを含むアミノ酸代謝異常、ビリルビン、遊離脂肪酸などの関与が注目されている¹⁻³⁾。そして脳症の発生機序としてこれらの因子の神経細胞への直接影響、あるいは二次的に生ずる循環障害性変化に加えてNa-K-ATPaseの活性低下を伴う血液脳関門(blood-brain barrier, 以下BBBと略す)の障害がみられ¹⁾、昏睡の発生や脳浮腫の発来に関与している可能性が考えられる。しかし、本症の発生についての形

態的变化の裏付けは十分ではなくいまだ不明な点も多い。この点に注目して、著者は実験的に急性肝不全モデルを作製することにより、合併する脳変化につき生化学的検索に加え、特に形態的立場から組織化学的手法を用いて検索した。

研究材料および方法

(1) 急性肝不全モデルの作製

材料には体重250~350gのWistar系雄性ラットを用い、D(+)-galactosamine hydrochloride (Sigma, 以下D-Galと略す) 2.5g/kgを生食2mlに溶解し、1N NaOHでpH 7.3に調製後、腹腔内に投与した。実験中ラットには、脱水、低血糖を防ぐため、10%ショ糖溶液を経口的に自由に与えた。D-Gal投与群では48~72時間後で、体動が減少し、痛覚刺激への反応が

Present address: The First Department of Internal Medicine, Nippon Medical School, 1-1-5, Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

低下するものがあり、これらの動物を肝性脳症発生病として以下の方法に準じての検討を行った。一方対照群では、生食 2 ml を腹腔内に投与し、同様に 10% ショ糖液を与えた。

(2) 生化学的検索

採血後、各ラットのアンモニア、血清 GOT、GPT、ALP、総ビリルビン、遊離脂肪酸を測定した。

ATPase 活性の測定には灌流固定を行わないラット脳を用い、Lane らの方法⁴⁾によりマイクロゾーム分画を分離し活性を測定、蛋白濃度は Lowry らの方法⁵⁾により決定した。Na-K-ATPase の活性測定には、Schwartz らの方法⁶⁾に従い spectrophotometric coupled enzyme assay 法を用い、25 mmol/l histidine、pH 7.4-5 mmol/l Na_2ATP 、5 mmol/l MgCl_2 、100 mmol/l NaCl、10 mmol/l KCl、1 mmol/l tricyclohexylammonium、0.4 mmol/l NADH、2 mmol/l phosphoenol pyruvate、pyruvate kinase/lactic acid dehydrogenase を含む medium 中、37°C での活性を測定した。また、10 mmol/l ouabain-sensitive Na-K-ATPase を測定した。

(3) 形態学的観察

一部のラットでは、固定開始前に下大静脈より horseradish peroxidase (Sigma, type II, 以下 HRP と略す) 70 mg を生食 1 ml に溶解して注射した。固定には、2% paraformaldehyde-0.25% glutaraldehyde-0.16 mol/l cacodylate buffer、pH 7.3 を用い、左心室より約 15 分間灌流した。大脳は頭頂から前頭部にかけて約 2 mm の厚さに前額断し、肝についても型のごとく 10% ホルマリン液に再固定、脱水後、パラフィンに包埋した。光顕的には、肝臓および脳組織は hematoxylin-eosin (以下 HE と略す) 染色を行い観察した。一方、電顕的には大脳皮質を約 $3 \times 2 \times 2$ mm の大きさに切り出し、さらに 2 時間、灌流固定液中に浸漬後、0.16 mol/l cacodylate buffer、一部は 2% paraformaldehyde-2.5% glutaraldehyde-0.1 mol/l cacodylate buffer 中にて一晩浸漬し、さらに 1% OsO_4 、0.1 mol/l cacodylate buffer により、1 時間後固定した後、エタノール系列およびプロピレンオキサイドにて脱水、Epok 812 に樹脂包埋してブロックを作製、超薄切片を酢酸ウランおよびクエン酸鉛で染色した。

(4) 組織化学的検索

前固定後の組織片を 0.16 mol/l cacodylate buffer にて洗浄、マイクロスライサー (堂坂製) を用いて約 40 μm に薄切し以下のごとく反応を行った。

1) Alkaline phosphatase (以下 ALPase と略す) の局在

Mayahara らの方法⁷⁾に準じ pH 8.5-0.2 mol/l tris-HCl buffer 5.6 ml、0.1 mol/l sodium β -glycerophosphate 8.0 ml、15 mmol/l magnesium sulfate 10.4 ml、0.5% lead citrate 16 ml、sucrose 3.2 g を加えて反応液を作製、pH 9.2 に調整し切片を浸漬、室温にて 15 分間反応させた。

2) Mg-ATPase の局在

Ogawa らの方法⁸⁾に準じ pH 8.5-0.2 mol/l tris-HCl buffer 5.6 ml、double distilled water 8.0 ml、15 mmol/l magnesium sulfate 10.4 ml、0.5% lead citrate 16 ml を加えて反応液を作成、pH 9.2~9.4 に調整し室温にて 15 分間反応させた。なお Mg-ATPase の阻害剤としては levamisole 12 mg を加え、同時に反応の特異性を検討した。

3) Na-K-ATPase の局在

Asano らの方法⁹⁾に基づき ouabain sensitive p-nitrophenyl phosphatase (以下 NPPase と略す) の局在を検討した。反応液の組成は p-nitrophenyl phosphate (Na 塩) 15 mmol/l、KCl 20 mmol/l、 MgCl_2 20 mmol/l、 SrCl_2 20 mmol/l、tris-HCl buffer 100 mmol/l であり、ALPase を阻害するために cysteine 10 mmol/l を加えた。さらに Na-K-ATPase の阻害剤として、同液に ouabain 10 mmol/l を加えて反応させ活性の特異性を検討した。反応液は pH 9.0 に調整し、切片を室温にて 30 分間浸漬し、次いで切片を pH 9.0-0.1 mol/l tris-HCl buffer にてよく洗浄した後、2% $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 溶液で反応を行った。

4) HRP の局在

Graham and Karnovsky の方法¹⁰⁾に基づき、diaminobenzidine-4 HCl 25 mg を pH 7.6-50 mmol/l tris-HCl buffer 50 ml に溶解し、この溶液に切片を 15 分間予備浸漬し、次いで同液に 0.01% H_2O_2 を加えた溶液にて室温で 30 分間反応を行った。各浸漬液中で反応後、各切片を 1% OsO_4 、0.1 mol/l cacodylate buffer により 1 時間後固定し、脱水、樹脂包埋を行い超薄切片を作製、酢酸ウラン単染色を行った。以上の切片は日立 H-800 透過型電子顕微鏡にて加速電圧 75 kV、直接倍率 3,000~20,000 倍で観察した。

結 果

1. 生化学的所見

血液生化学的には、Table 1 にみるように D-Gal 投

与群においてアンモニア、血清 GOT, GPT, ALP、総ビリルビン、遊離脂肪酸の増加を認めた。また、大腦における Na-K-ATPase 活性については Table 2 にみるように D-Gal 投与群において対照群との間で全 ATPase に対する Na-K-ATPase の比は D-Gal 群で有意の低下を認めた。

2. 形態学的所見

形態的に肝臓では D-Gal 投与群において広範な肝細胞壊死を認めた (Fig. 1)。

大腦は対照群では、灌流固定により毛細血管の管腔はすべてよく開き、内腔は円形を示す。内皮細胞は扁平で細長い核とわずかな胞体が認められる。毛細血管の周囲は均等に染色され神経細胞、星状膠細胞には著変はみられない。一方、D-Gal 投与群では、毛細血管周囲にしばしば淡明な構造が出現し、この中に顆粒状物を認め、星状膠細胞の腫脹は顕著であった。また血管

は内皮細胞の軽度腫大とともに管腔は大小不整であった。神経細胞では胞体辺縁部に多数の小空胞がみられ、一部に核、胞体の濃染を認める軽度の変性所見をみた (Fig. 2)。

電顕的には、対照群の大腦皮質の毛細血管内皮細胞は扁平で、小孔は存在せず、pinocytotic vesicle もきわめて少なく、内皮細胞間には tight junction が認められた。そして内皮細胞の周囲には連続性の基底膜、その外側にはしばしば pericyte が存在し、さらにその外側には多数の星状膠細胞の足突起が取り囲んでいた (Fig. 3)。一方、D-Gal 投与群では、内皮細胞は管腔側表面に microvilli 様の突起を出し、marginal fold にも延長が認められた。さらに核の腫大、ミトコンドリアの変性、細胞質の腫大、cytofolds の出現がみられた。また星状膠細胞には核の腫大を伴う著明な胞体の腫大と、ミトコンドリアの変性およびクリステの乱れを伴う膨化がみられ、neuropil の腫大も観察された (Fig. 4)。

3. 組織化学的所見

組織化学的な酵素の局在の観察では、ALPase は対照群では内皮細胞の細胞膜と基底膜に接した星状膠細胞足突起の細胞膜に局在が認められた。内皮細胞については、管腔側のみに局在を示すもの、基底膜側のみに局在を示すもの、両者に局在を示すものなど 3 型に分類されたが、そのうち両者に局在をみる血管が多かった (Fig. 5)。D-Gal 投与群では、形態変化の少ない内皮細胞では酵素の局在はきわめてよく保たれていたが (Fig. 6)、内皮細胞の形態の変化が著明になるに従い、酵素は不規則な局在を示し、特に星状膠細胞足突起の基底膜側の細胞膜に顕著であった。

Mg-ATPase は対照群で、内皮細胞の基底膜側、内皮細胞間の細胞膜、および星状膠細胞足突起の細胞膜に

Table 1 Biochemical changes in blood of control rats and acute hepatic failure rats induced by intraperitoneal administration of D-galactosamine hydrochloride

Test	Control rats	Acute hepatic failure rats
Ammonia ($\mu\text{g/dl}$)	69 $\pm$ 5	144 $\pm$ 22
S-GOT (IU/l)	118 $\pm$ 9	13849 $\pm$ 2135
S-GPT (IU/l)	22 $\pm$ 3	8428 $\pm$ 1458
ALP (mg/dl)	352 $\pm$ 28	689 $\pm$ 69
Total bilirubin (mg/dl)	0.1 $\pm$ 0	2.9 $\pm$ 0.3
Free fatty acid (mEq/l)	0.66 $\pm$ 0.06	1.24 $\pm$ 0.11

N=13~15, p<0.005, Mean $\pm$ S.E.

Table 2 ATPase activities(μmol s Pi/mg protein/h)and Na-K-ATPase/Total ATPase(%) in brain of control rats and acute hepatic failure rats induced by intraperitoneal administration of D-galactosamine hydrochloride

	Total ATPase	Na-K-ATPase	Na-K-ATPase/Total ATPase(%)
Control rats (N=5)	55.0 $\pm$ 11.7	40.0 $\pm$ 9.5	76.3 $\pm$ 3.2*
Acute hepatic failure rats (N=7)	61.3 $\pm$ 7.1	44.0 $\pm$ 5.7	71.1 $\pm$ 1.3*

*p<0.01, Mean $\pm$ S.E.

沿って局在が認められ、一部では内皮細胞管腔側に局在を認めた (Fig. 7)。一方、D-Gal 投与群では、反応産物の粗大化が著明で、内皮細胞基底側における局在の乱れに加えて腫大した足突起および neuropil の膜における活性局在の減弱が著しく、局在も不規則であった (Fig. 8)。

NPPase は、対照群で内皮細胞の内腔側および基底側細胞膜、星状膠細胞足突起の細胞膜に局在がみられ、これらの反応産物は 10 mmol/l ouabain の添加により減少し、Na-K-ATPase としての特異性を示していた (Fig. 9)。D-Gal 投与群では、特に内皮細胞膜において反応産物の拡散および減少傾向が顕著であった (Fig. 10)。

HRP の局在の観察では、HRP は対照群で内皮細胞および内皮細胞間の tight junction の存在により、血管外への無秩序な流出を阻止されており、少数の pinocytotic vesicle の中への取り込みが観察されるのみであった。これに対し D-Gal 投与群では、HRP が内皮細胞の管腔側表面に膠着し、胞体内では HRP を含む pinocytotic vesicle の増加がみられ (Fig. 11)、一部 HRP の星状膠細胞の細胞内への移行が認められた。

考 察

肝性脳症は種々の重篤な肝障害に随伴し、精神神経症状を主徴とする症候群である。すなわち見当識の障害、異常行動、羽ばたき振戦といったものから、刺激を加えてもまったく反応しない深い昏睡まで種々みられる。肝性脳症は障害された肝臓で代謝されなくなった毒性物質、すなわち肝性脳症発現物質が二次的に神経組織に蓄積するために起こると考えられている^{1,2)}。しかし最近の研究では、BBB の障害、あるいはそれに構成する細胞膜における Na-K-ATPase 活性の障害、神経伝達物質の異常や脳代謝障害、といった側面からのアプローチが試みられている¹⁾。肝性脳症発現因子については古くからアンモニアが重視されているが、アンモニアのみでは肝性脳症の発生機序を明確に説明できないのも事実である。実際にアンモニア以外にはメルカプタン、メタンエチオールなどのアミノ酸代謝異常、短鎖および遊離脂肪酸の存在などの重要性が指摘されている¹⁻³⁾。肝性脳症の発生に至る過程ではこれらの因子は BBB を透過し、さらに脳内 Na-K-ATPase の活性を抑制し、透過性亢進を惹起し脳浮腫を助長する可能性が考えられる。脳症発生時には

Livingstone ら¹¹⁾の報告にみられるように、正常では BBB を通過しないような trypan blue, D-sucrose, inulin, L-glucose が、BBB を通過することが考えられ、各種物質の中枢神経への作用機転が裏付けられている。そして Zaki ら¹²⁾も *E. coli* のエンドトキシンを注射した肝部分切除ラットに NH₃, methyl octanoate, mercaptan, phenole を投与することにより、inulin の脳内取り込みが増加することを観察している。また Horowitz ら¹³⁾は、galactosamine 投与ラットでは、GABA の異性体 amino-isobutyric acid の脳内取り込みが増加することを報告している。これらの事実からも肝性脳症の発生においては、BBB の透過性に変化がみられることが考えられる。

著者の形態的観察においては対照群の脳毛細血管内皮細胞には、fenestration がなく基底膜は連続しており、毛細血管周囲は星状膠細胞により完全に覆われている (Fig. 3)。また内皮細胞間には tight junction の存在がみられ正常状態では pinocytotic vesicle も少なく、蛋白などの透過が制御されている。しかし D-Gal 投与群においては内皮細胞は管腔側表面に microvilli 様の突起を出し、marginal fold にも延長がみられ、星状膠細胞足突起は著明に腫大し、細胞内浮腫の所見を呈していた (Fig. 4)。そして、BBB の透過性の観察においては、蛋白トレーサーとしての HRP が内皮細胞管腔側表面に膠着し、さらに内皮細胞内に増加した pinocytotic vesicle に取り込まれ (Fig. 11)、一部星状膠細胞の胞体内に認められた。しかし、HRP の血管周囲細胞間隙への漏出は認められなかった。この結果から、肝性脳症発生初期には血管内皮細胞の tight junction の開大などの著明な形態変化はみられず、内皮細胞内の pinocytotic vesicle の増加で示されるごとく vesicular transport の亢進が認められた。

Ishiharajima ら^{14,15)}および Masuzawa ら¹⁶⁾は脳浮腫の発生時の BBB を構成する細胞膜における酵素の局在の意義について報告しているが、ALPase の局在に関し、著者は対照脳において毛細血管内皮細胞膜の管腔側および基底膜側の両面に存在するもの (Fig. 5)、およびどちらか片方に限られるものを観察した。そして D-Gal 投与群では、ALPase は浮腫性変化の軽微な脳では比較的活性は保たれていたが (Fig. 6)、浮腫性変化の増強に伴い局所的な活性の低下および局在の不規則性がみられ、細胞膜における透過性の異常が示唆された。ALPase の脳血管での局在の意義についてはほとんど解明されていないが、Roman ら¹⁷⁾の

ラット脳を用いた ALPase の局在の観察によれば、BBB の発達途上の胎生初期のラットの血管における ALPase 活性は成熟したラットに比し高いといわれ、ALPase が脳血管での物質輸送において重要な役割を果たしていることを示唆している。

また、Mg-ATPase は対照群では毛細血管内皮細胞膜の管腔側および基底膜側、ならびに星状膠細胞膜の基底膜側に活性を認めたが (Fig. 7)、D-Gal 群では内皮細胞膜の管腔側での活性低下および反応産物の粗大化がみられ、内皮細胞基底膜側ならびに星状膠細胞膜の基底膜側の活性の低下を認めた (Fig. 8)。Mg-ATPase の脳血管での局在の意義に関しては詳細は解明されていないが、増沢ら¹⁸⁾によれば Mg-ATPase の活性が脳皮質毛細血管の基底膜側に陽性であり、脈絡叢毛細血管の基底膜側には陰性であることから、Mg-ATPase は BBB の構成要素の一つとしてイオン透過の制御に関与していると述べている。また、Na-K-ATPase を含む ATPase はその働きの上で Mg^{2+} の存在が必要であり、Mg-ATPase が Mg^{2+} の輸送のみならず、 Na^+ 、 K^+ の透過に関係している可能性があり、肝性脳症の発生機序からも重要な意義を持っていることが考えられる¹⁹⁾。

Na-K-ATPase の局在については、ouabain sensitive-NPPase 活性として内皮細胞の管腔側および基底側の細胞膜にその局在が認められている²⁰⁾。現在のところ、ouabain sensitive-NPPase は Na-K-ATPase と同一のものと理解されているが、著者の電顕的検索では、D-Gal 投与群内皮細胞においてその活性の低下を裏付ける反応産物の拡散を認めた (Fig. 10)。このような細胞膜の Na-K-ATPase の局在異常は、 Na^+ を始めとする種々の物質の active transport に障害をもたらしていることを示している。一方、in vitro において生化学的には急性肝不全時に血中に増加するアンモニア²⁾、ビリルビン²¹⁾、遊離脂肪酸²²⁾、オクタノエイト²³⁾、メルカプタン²⁴⁾、メタンエチオール²⁵⁾、胆汁酸、phenolic acid、endotoxin²⁶⁾、ある種の中分子量物質²⁷⁾ が脳の Na-K-ATPase の活性を低下させるという報告がある。著者は in vivo において全脳を用い、生化学的に全 ATPase 活性と Na-K-ATPase 活性について検索し、対照群と D-Gal 群との間に有意差を認めなかったが、全 ATPase に対する Na-K-ATPase の比は D-Gal 群では対照群に比し低下をみた。この結果はアンモニア、ビリルビンなどの増加が脳内の Na-K-ATPase の相対的低下をもたらし、BBB の機能的障

害を惹起していることを裏付けているものと考えられる。

BBB 障害に伴う脳浮腫の発生機序は、蛋白透過性の相違により、二型に分類されている²⁸⁾。その一つは、BBB に顕著な形態的障害がみられ、血漿蛋白の血管外漏出に伴い浮腫液が細胞外間隙に貯留するもので vasogenic edema と呼ばれ、もつ一つは血管内からの蛋白漏出を伴うことなく細胞内に液体の貯留をみるもので、cytotoxic edema と呼ばれている。特に肝性脳症に合併する脳浮腫は、これまで主として vasogenic edema と考えられてきた¹¹⁾が、著者の実験結果からは、BBB の著明な形態的障害はみられず、細胞内浮腫、膜系酵素の障害および active transport の亢進を認め、cytotoxic edema の状態を示しており、これが昏睡などの発生要因として注目される。

結 論

実験的に D-galactosamine hydrochloride を腹腔内投与し、急性肝不全ラットモデルを作製することにより、合併する脳変化につき生化学的ならびに形態的立場から組織化学的手法を導入し、検索を行い以下の結論を得た。

1) 肝性脳症の形態変化として脳浮腫があり、星状膠細胞足突起の水腫状腫大を主とした変性像を認めたが、BBB などの膜系障害など形態的变化は軽微であった。

2) トレーサー蛋白 HRP は毛細血管内皮細胞に増加した pinocytotic vesicle に取り込まれ、vesicular transport の亢進を認めたが、血管周囲腔への漏出はみられなかった。このことは、本実験の肝性脳症に合併する脳浮腫は cytotoxic edema に相当する浮腫状態である可能性が示唆された。

3) 脳内の全 ATPase に対する Na-K-ATPase の比は減少し、電顕的に毛細血管内皮細胞膜、星状膠細胞膜に局在する ALPase、Mg-ATPase、Na-K-ATPase などの酵素は活性局在の低下を認めた。

4) 以上より D-Gal 投与による実験的肝不全モデルでは、肝性脳症には脳浮腫の合併がみられ、その発生に Na-K-ATPase、Mg-ATPase などの膜系酵素の活性低下が重要な意義を有することがわかった。

稿を終るにあたり御指導、御協力賜りました第1内科学教室 荒牧琢己助教授、第2病理学教室 石原島繁彦助手、喜村久美子、工藤光洋研究技術員ならびに教室員各位、および中央電子顕微鏡研究施設の各位に深く感謝致します。

なお、本論文の要旨は、第54回日本医科大学医学学会総会(1986年9月)ならびに第18回日本臨床電子顕微鏡学会学術講演会(1986年10月)において発表した。

文 献

- Fraser, C.L. and Arief, A.I.: Medical progress; Hepatic encephalopathy. *N. Engl. J. Med.*, 313, 865~873, 1985.
- Crossley, I.R., Wardle, E.N. and Williams, R.: Biochemical mechanism of hepatic encephalopathy. *Clin. Sci.*, 64, 247~252, 1983.
- Zieve, L.: The mechanism of hepatic coma. *Hepatology*, 1, 360~365, 1981.
- Lane, L.K., Potter, J.D. and Collins, J.H.: Large-scale purification of Na-K-ATPase and its protein subunits from lamb kidney medulla. *Prep. Biochem.*, 9, 157~170, 1979.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265~275, 1951.
- Schwartz, A., Allen, J.C. and Harigaya, S.: Possible involvement of cardiac Na⁺,K⁺-adenosine triphosphatase in the mechanism of action of cardiac glycosides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 168, 31~41, 1969.
- Mayahara, H., Hirano, H., Saito, T. and Ogawa, K.: The new lead citrate method for the ultracytochemical demonstration of activity of nonspecific alkaline phosphatase; Orthophosphoric monoester phosphohydrolase. *Histochemie*, 11, 88~96, 1967.
- Ogawa, K. and Mayahara, H.: Intramitochondrial localization of adenosine triphosphatase activity. *J. Histochem. Cytochem.*, 17, 487~490, 1969.
- Asano, G., Ashraf, M. and Schwartz, A.: Localization of Na-K-ATPase in Guinea-Pig myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 12, 257~266, 1980.
- Graham, R.C. and Karnovsky, M.J.: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney; Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 14, 291~302, 1966.
- Livingstone, A.S., Potvin, M., Goresky, C.A., Finlayson, M.H. and Hinchey, E.J.: Changes in the blood-brain barrier in hepatic coma after hepatectomy in the rat. *Gastroenterology*, 73, 697~704, 1977.
- Zaki, A.E.O., Wardle, E.N., Canalese, J., Ede, R.J. and Williams, R.: Potential toxins of acute liver failure and their effects on blood-brain barrier permeability. *Experientia*, 39, 988~991, 1983.
- Horowitz, M.E., Schafer, D.F., Molnar, P., Jones, E.A., Blasberg, R.G., Patlak, C.S., Waggoner, J. and Fenstermacher, J.D.: Increased blood-brain transfer in a rabbit model of acute liver failure. *Gastroenterology*, 84, 1003~1011, 1983.
- 石原島繁彦: 虚血性脳浮腫における血液脳関門; とくに内皮細胞と星状膠細胞の細胞膜変化についての電顕組織化学的研究. *神経病理学*, 6, 341~354, 1985.
- Ishiharajima, S., Fujita, S., Yamada, N. and Asano, G.: Fine structural study of Mg-ATPase and alkaline phosphatase activities in the blood-brain barrier of ischemic rats. *Acta Histochem. Cytochem.*, 19, 347~354, 1986.
- Masuzawa, T., Shimabukuro, H. and Sato, F.: Cytochemical study of alkaline phosphatase activity in microvessels of rat cerebral cortex. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*, 23, 511~514, 1983.
- Rowan, R.A. and Maxwell, D.S.: An ultrastructural study of vascular proliferation and vascular alkaline phosphatase activity in the developing cerebral cortex of the rat. *Am. J. Anat.*, 160, 257~265, 1981.
- 増沢紀男, 島袋洋, 佐藤文明: 脳室脈絡叢における酵素組織化学的研究. 第4報 Mg²⁺-ATPaseとNa⁺,K⁺-ATPase (p-nitrophenylphosphatase) の活性局在. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*, 22, 332~335, 1982.
- Philipson, K.D. and Nishimoto, A.Y.: ATP-dependent Na⁺ transport in cardiac sarcolemmal vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 733, 133~141, 1983.
- Vorbrodt, A.W., Lossinsky, A.S. and Wisniewski, H.M.: Cytochemical localization of ouabain-sensitive, k⁺-dependent p-nitro-phenylphosphatase (transport ATPase) in the mouse central and peripheral nervous systems. *Brain Res.*, 243, 225~234, 1982.
- Kashiwamata, S., Goto, S., Semba, R.K. and Suzuki, F. N.: Inhibition by bilirubin of (Na⁺+K⁺)-activated adenosine triphosphatase and K⁺-activated p-nitrophenylphosphatase activities of NaI-treated microsomes from young rat cerebrum. *J. Biol. Chem.*, 254, 4577~4584, 1979.
- Dahl, D.R.: Short chain fatty acid inhibition of rat brain Na-K adenosine triphosphatase. *J. Neurochem.*, 15, 815~821, 1968.
- Trauner, D.A.: Regional cerebral Na⁺,K⁺ ATPase activity following octanoate administration. *Pediatr. Res.*, 14, 844~845, 1980.
- Foster, D., Ahmed, K. and Zieve, L.: Action of methanethiol on Na⁺,K⁺-ATPase; Implications for hepatic coma. *Ann. NY Acad. Sci.*, 242, 573~576, 1974.
- Quarfooth, G., Ahmed, K., Foster, D. and Zieve, L.: Action of methanethiol on membrane (Na⁺,K⁺)-ATPase of rat brain. *Biochem. Pharmacol.*, 25, 1039~1044, 1976.
- Seda, H.W.M., Gove, C.D., Hughes, R.D. and Williams, R.: Inhibition of partially purified rat brain Na⁺,K⁺-dependent ATPase by bile acids, phenolic acids and endotoxin. *Clin. Sci.*, 66, 415~420, 1984.
- Seda, H.W.M., Hughes, R.D., Gove, C.D. and Williams, R.: Inhibition of rat brain Na⁺,K⁺-ATPase activity by serum from patients with fulminant hepatic failure. *Hepatology*, 4, 74~79, 1984.
- Klatzo, I.: Neuropathological aspects of brain edema. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 26, 1~14, 1967.

Legends

- Fig. 1 Liver removed from a rat after administration of D-galactosamine.
Liver shows extensive necrosis of hepatocytes. (HE stain ×100)
- Fig. 2 Cerebral cortex removed from a rat after administration of D-galactosamine.
Swelling of astrocyte is noted around the capillaries (arrow). (HE stain ×100)

- Fig. 3 Cerebral cortex removed from a normal rat.
There are flat endothelium with smooth surface and astrocytic foot process without cytoplasmic swelling.
- Fig. 4 Cerebral cortex removed from a rat after administration of D-galactosamine.
There is marked swelling in the perivascular foot process of astrocyte (As) with swollen mitochondria (M). Endothelial cell is relatively preserved.
- Fig. 5 ALPase
Cerebral cortex removed from a normal rat. Localization of ALPase is demonstrated on both luminal and antiluminal plasma membrane of endothelial cell and astrocytic plasma membrane adjacent to basal lamina (arrow).
- Fig. 6 ALPase
Cerebral cortex removed from a rat after administration of D-galactosamine.
Localization of ALPase is relatively preserved in the endothelial cells. Astrocyte (As) shows marked hydropic swelling and the localization of ALPase is irregular on astrocytic plasma membrane (arrow).
- Fig. 7 Mg-ATPase
Cerebral cortex removed from a normal rat. Localization of Mg-ATPase is demonstrated on untiluminal plasma membrane of endothelial cell and astrocytic plasma membrane.
- Fig. 8 Mg-ATPase
Cerebral cortex removed from a rat after administration of D-galactosamine.
Localization of Mg-ATPase is irregular in the

distribution and the activity of Mg-ATPase is diminished on the endothelial cell and astrocyte (As).

- Fig. 9 Na-K-ATPase
Cerebral cortex removed from a normal rat. Localization of Na-K-ATPase is demonstrated on both luminal (arrow) and antiluminal plasma membranes of endothelial cell, and astrocytic plasma membrane adjacent to basal lamina.
- Fig. 10 Na-K-ATPase
Cerebral cortex removed from a rat after administration of D-galactosamine.
Activity of Na-K-ATPase is diminished on both luminal (arrow) and antiluminal plasma membrane of endothelial cell.
- Fig. 11 Cerebral cortex removed from a rat after administration of D-galactosamine.
At 15 minutes after injection of HRP, HRP is localized in the increasing pinocytotic vesicles (PV) of endothelium.

Abbreviations

C : central vein
P : portal area
L : lumen
R : red blood cell
As: astrocyte
M : mitochondria
BL: basal lamina
PV: pinocytotic vesicles

(受付: 1986 年 12 月 10 日)

Plate (1)

Plate (2)

Plate (3)