脳梗塞に関する実験的研究

フリーズフラクチャーレプリカ (FFR) 法による毛細血管透過性の超微形態学的検討

井上 優

Experimental Cerebral Infarction in the Dog

Ultrastructural Study of Capillary Permeability by Freeze-fracture Replica

Masaru INOUE

Department of Neurosurgery, Nagasaki University, Nagasaki

Abstract

Underlying mechanisms which lead to brain edema following ischemic insults have been subjects of much debate. In this study, experimental cerebral infarction was produced in dogs by injecting one or two silicone rubber cylinders through the cervical internal carotid artery. Twenty-four hours after embolization, animals were killed and morphometrical analyses in the capillary endothelial cell membranes in the cortex were done by freeze-fracture replica in addition to conventional ultra-thin section using the transmission electron microscope.

In ultra-thin sections of capillary endothelium in the ischemic cerebral cortex, surface infolding and increase in number of pinocytotic vesicles were recognized, but no findings of opening of tight junction were ascertained.

In freeze-fracture replicas of capillary endothelium of both normal and ischemic cerebral cortex, tight junction was presented as the network of ridges composed of about 100 Å particles on the protoplasmic face (PF) and grooves on the extracellular face (EF). In the ischemic cortex, arrangement of strands of these protein particles was not changed. In replica preparations, too, no definite findings of opening junction were certificated. Pinocytotic vesicles were seen as invaginations on the PF and as protrusions on the EF. In the ischemic cortex, the average number per square μm was increased. On the luminal front, it reached to 22.0 (on the PF) and 29.5 (on the EF) as compared to 7.2 and 9.0 in the normal cortex, respectively. The size of vesicles was also enlarged; $4,990.7 \pm 798 \text{ nm}^2$ (on the PF) and $4,762.8 \pm 878 \text{ nm}^2$ (on the EF) as compared to $3,567.7 \pm 570 \text{ nm}^2$ and $3,404.5 \pm 573 \text{ nm}^2$ in the normal cortex, respectively.

These results indicate that transcellular transport by pinocytotic vesicles has an important role in increase of capillary permeability observed in an ischemic model.

Key words: cerebral infarction, freeze-fracture replica, capillary, brain edema, electron microscope

I はじめに

急性期脳梗塞に伴う脳浮腫の発現機序については、組織学、生化学および生理学など各方面での検討^{12,13,16)}にもかかわらず、なお不明な点が多い。特に動物実験においては、種や週齢による血管構築の特異性^{8,17,28)}、梗塞モデル作製法の違い^{10,19)}、虚血時間や梗塞部領域の程度などにより得られた成績に大きな相違が認められる。また浮腫発現の基盤を成す毛細血管透過性の変動に関する研究は、色素や horseradish peroxidase などのトレーサーを使ったものの^{2,20)}が主であった。

私は今回、シリコン円柱注入によるモデル犬^{25,31)}を用い、梗塞24時間後の大脳皮質虚血巣における毛細血管内皮細胞をフリーズフラクチャーレプリカ(以下 FFR)法により検討し、従来の超薄切片では解明が困難であった pinocytotic vesicle や tight junction などの形態学的変化をより詳細に観察し、血管透過性の亢進や脳浮腫発生の機序について考察を行った。

II 実験方法

1. 脳梗塞モデル犬の作製

体重10 kg 前後の雑種成犬を用い、ケタラル筋注(5 mg/kg)、ネンブタール静注(25 mg/kg)麻酔下に気管内挿管を行い、調節呼吸下に頸部傍正中切開を加え、一側内頸

動脈より 1×8 mm のシリコン円柱2個を注入して脳梗塞巣を作製し、24時間後に脱血、ただちに脳を取り出した。

2. レプリカ膜の作製

視交叉のレベルで ectosylvian gyrus より 1×1 cm の皮質を切り出し、約10分間 3 % glutaraldehyde, 1 % paraformaldehyde, 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4, 0°C) で固定後、実体顕微鏡下に $1 \times 1 \times 3$ mm の四角柱切片とし、さらに同一固定液で24時間浸漬固定を行った。切片を cacodylate buffer で一晩洗滌し、氷結防止のため同緩衝液を含む30 % glycerol で約 1 ~ 2 時間脱水後、液体窒素で冷却した freon 22 で凍結し、 -130°C , 1×10^{-6} torr の条件下で EE-FED-B 凍結割断装置(日本電子, 東京)を用いて凍結割断を行った。ついで割断面に platinum-paradium, carbon の真空蒸着を行い、ブリーチ液(sodium hypochlorite)で約 1 時間組織を溶解し、蒸留水で洗滌後レプリカ膜を作製し、JEM-100 B 型電子顕微鏡(日本電子, 東京)で観察した。

3. 超薄切片の作製

四角柱切片の一部は 1 % osmium tetroxide で後固定を行い、ethanol 系列で脱水後 Epon 812 に包埋して超薄切片を作製し、uranyl acetate, lead citrate で二重染色を行い観察した。

なお、対照として正常犬でも同様の2つの標本を作製し、観察を行った。

Fig. 1 A Electron micrograph of a capillary located in moderate edematous cortex at 24 hours after embolization. A capillary shows surface infolding and pericapillary fluid collection. $\times 21,000$, Bar=1 μm B Higher magnification of the same case. The endothelial junction is almost closed by an extensive zonula occludente (arrows), but the basal portion opens to the basal lamina (arrow-head). $\times 100,000$, Bar=0.2 μm C. Higher magnification of the same case. The wall of a capillary endothelial cell (e) is thinned, in which the formation of pinocytotic vesicles are observed (arrows) $\times 100,000$, Bar=0.2 μm

Fig 2 Electron micrograph of freeze-fracture replica of a capillary endothelium in the normal cerebral cortex. Pinocytotic vesicles are seen not only on the protoplasmic face (PF) on the luminal front side, but also on the PF in the abluminal side (arrow). There is a erythrocyte (e) in the capillary lumen. Direction of shadowing is shown by an arrowhead in an open circle. $\times 21,000$, Bar = $1 \mu\text{m}$

Ⅲ 結 果

シリコン円柱塞栓術を施行した雑種成犬80頭のうち45頭で組織学的に脳梗塞を認め、さらにそのうち大脳半球大梗

塞巣、すなわち大脳基底核を含んだ皮質髄質の梗塞巣が認められたものは25頭であった。これら25頭で超薄切片およびFFR標本を作製した。

1. 超薄切片所見

中大脳動脈閉塞24時間後の大脳皮質部の電顕像では、毛細血管内皮細胞に marginal infolding の傾向が認められた。また basal lamina が膨化し、拡大した perivascular space には浮腫液が貯留し、neuropil も膨化していたが赤血球の血管外漏出は認められず、いわゆる vasogenic edema の像を示していた (Fig. 1A)。毛細血管内皮細胞間の tight junction の開大は認められない (Fig. 1B) が、毛細血管の内腔側、細胞質内、そして基底膜側のいずれにおいても内皮細胞の pinocytotic vesicle が増加していた。しかし channel 形成¹⁸⁾はみられなかった (Fig. 1C)。

2. FFR 所見

正常犬の皮質毛細血管：Fig. 2 は正常犬の大脳皮質毛細血管レプリカ像であり、さらに強拡大すると protoplasmic face (PF) に caveola が (Fig. 3A)、extracellular face (EF) には pit が認められた (Fig. 3B)。つまり、FFR において pinocytotic vesicle は PF で陥凹、EF で隆起として観察され、直径は約65 nm であった。また、tight junction は相接する内皮細胞のおおのの形質膜に線状もしくは網目状に配列した膜内粒子 (intramembranous particle: IMP) として観察され、PF では ridge, EF では groove な像を示した。Fig. 4 は正常犬の tight junction の1例を示し、PF で

Fig. 3 Higher magnification of the same case as in Fig. 2. A: Pinocytotic vesicles are observed as invaginations on the PF. B: Pinocytotic vesicles are seen as protrusions on the extracellular face (EF). Direction of shadowing is shown by an arrowhead in an open circle. $\times 63,000$, Bar = $0.3 \mu\text{m}$

Fig. 4 Freeze-fracture replica of a capillary endothelium in the normal cortex. Tight junctions are observed as a network of ridges (r) composed of about $100 \text{ \AA}$ particles on the PF and grooves (g) on the EF. Direction of shadowing is shown by an arrowhead in an open circle. $\times 86,000$, Bar = $0.2 \mu\text{m}$

Fig. 5 A: Freeze-fracture replica of a capillary endothelium in the ischemic cortex at 24 hours after embolization. Pinocytotic vesicles on the PF increased in number, and are enlarged in size. B: EF of the same case. Increased and large pinocytotic vesicles are observed and desmosome (d) is seen toward the right lower corner of photograph. Direction of shadowing is shown by an arrowhead in an open circle. $\times 63,000$, Bar = $0.3 \mu\text{m}$.

Fig. 6 Freeze-fracture replica of a capillary endothelium in the ischemic cortex. Tight junction on the PF has 6 strands and arrangement of particles are not irregular (arrows). Vascular lumen (l), endothelial cell (e), nucleus (n). Direction of shadowing is shown by an arrowhead in an open circle. $\times 54,000$, Bar = $0.5 \mu\text{m}$.

は約 $100 \text{ \AA}$ の IMP が連続して配列して strand (紐) を形成し、さらにこれら 5 条の strand が網目状の network を形成しており、一方 EF では groove となっていた。

梗塞24時間後の皮質毛細血管：24時間後の毛細血管内皮細胞においては、pinocytotic vesicle の数の増加のほかに直径の増大がみられ、PF では約 85 nm (Fig. 5A), EF では約 90 nm (Fig. 5B) であった。また、これら pinocytotic vesicle は、vesicle 周囲の IMP が辺縁に沿って集簇しているものと IMP が付随していないものとの 2 種類に分けることができた。一方 tight junction は、やはり $100 \text{ \AA}$ の IMP が PF で ridge, EF で groove な像を呈しており、正常犬のそれと比較し IMP の配列にやや不連続が認められたが、strand の数には大きな変化はみられなかった (Fig. 6)。

Pinocytotic vesicle の大きさ、数の変化：皮質部毛細血管内皮細胞膜面 (計30カ所) を撮影した写真を倍率約70,000倍とし、画像解析システム (MYPAD-A3 Logitech Digitizer Model K-510, 関東電子, 東京) を用い、毛細血管内腔側の PF, EF における pinocytotic vesicle の面積を計測した (Fig. 7)。正常犬 (10頭, 15カ所) においては PF で $3,567.7 \pm 570 \text{ nm}^2$, EF で $3,404.5 \pm 573 \text{ nm}^2$, 直径はそれぞれ平均 67 nm , 66 nm であり、一方梗塞犬では PF で $4,990.7 \pm 798 \text{ nm}^2$, EF で $4,762.8 \pm 878 \text{ nm}^2$, 直径はそれぞれ 80 nm , 78 nm となり、正常犬に比し約1.2倍大きくなっていった。さらに、単位面積当たりの pinocytotic vesicle の数は、正常犬の

Fig. 7 Histograms of the size of pinocytotic vesicles on the PF (upper) and EF (lower) in normal versus ischemic capillary endothelium plasma membrane of the cerebral cortex.

PF で平均 $7.2/\mu\text{m}^2$, EF で $9.0/\mu\text{m}^2$ であったのに対し梗塞犬では PF で $22.0/\mu\text{m}^2$, EF で $29.5/\mu\text{m}^2$ であり, 梗塞犬で約3倍に増加していた。

IV 考 察

生体膜は内外2枚の磷脂質層から構成され, それぞれの疎水面を膜の内側に, 親水面を膜の外側に向けており, この磷脂質層の中に蛋白粒子が浮遊しているとされている。FFR 法においては分子間結合力がもっとも弱い疎水部分, つまり膜の中心部で離隔が生じるため, 膜内構造を広い範囲で三次元的に観察することができる。また, IMP は切断されたどちらかの面に残るかあるいは真中で割られる¹¹⁾が, 膜の内側面を細胞の外から眺めた場合が PF, 逆に細胞内から膜の外側面をみた場合が EF であり, 通常 IMP は PF に多く認められる⁹⁾。実際の膜面を正しく把握するためには, shadowing の方向が写真の下から上へ向かうようにして見なければならない。

1953年, Palade は経細胞輸送(transcellular transport)機構の概念として“飲み込み小胞(pinocytotic vesicle)”の存在を提唱した。その後多くの研究^{4,5)}がなされ, 現在では高分子, たとえば血漿蛋白の輸送に特に重要な役割を果たすと言われている^{3,23)}。また, 脳のいろいろな病態(外傷, 虚血¹¹⁾, 急性高血圧¹⁴⁾, 痙攣^{21,22,35)}など)や放射線照射後²⁹⁾などで pinocytotic vesicle の増加がみられ, 特に脳梗塞急性期の脳浮腫発生に伴う pinocytotic vesicle の増加は, Dodson ら¹⁰⁾, Petito ら²¹⁾のヒヒ, ラットにおける報告を初め諸家のほぼ一致した見解と思われる。しかしながらこれらの報告はすべて超薄切片の観察によるものであり, FFR 法による検討報告はみあたらない。FFR 法では切断面が細胞膜内部を接線方向に通過し, ために細胞膜は通常の超薄切片のように“線”ではなく“面”として観察されるため, pinocytotic vesicle の検討には非常に有用な方法^{7,26,30)}である。今回の実験においても, pinocytotic vesicle の増加は超薄切片でも認められたが, その正確な大きさや数の分析は電顕の解像力からみても不十分と思われた。

今回の24時間梗塞犬において, vesicle は正常犬に比し数で約3倍, 大きさでも約1.2倍に増加および拡大しており, 血管の透過性が亢進していることを強く示唆していた。しかし, あくまでも形態面からの推定に留まっている。また, Wagner ら³⁴⁾は pinocytotic vesicle は二方向性(bidirectional)の移動を示し, 内腔側および基底膜側のいずれの側においても飲み込みと放出が同時に進行していると述べているが, 観察されたそれぞれの vesicle がいずれの動きをしているのかの鑑別もできなかった。今回の実験結果では, 周辺部の IMP の分布状態は IMP が集合しているも

のと乏しいものとに分かれていたが, 前者が取り込みを示す像, 後者が放出, 開口の過程を示す像に相当するのかもしれない。今後の詳細な検討を必要とするが, IMP が pinocytotic vesicle の形成, 機能になんらかの役割を果たしていることは十分予想される。

一方, 血管内皮細胞間隙は超薄切片での観察によると, 相接する内皮細胞の形質膜が接着しているいわゆる tight junction と約 $20\text{\AA}$ の間隙を有する gap junction とから成っている。虚血性脳障害においては, 内皮細胞の tight junction は開かないとする報告が多い。FFR 法では脳毛細血管の tight junction は約 $100\text{\AA}$ の蛋白粒子が連続して配列した5~6条の strand が網目を形成しており^{1,6,27,33)}, 今回の実験条件下においては junction を構成する strand の数は正常犬のそれと大差なく, また粒子配列の不連続性も認めなかった¹⁵⁾。ただし, Van Deurs³²⁾は閉鎖帯を構成する蛋白粒子の荷電状態によりイオン透過性に差がみられるとしており, 単に粒子配列の連続性のみから tight junction の非開閉を論定することはできず, 今後さらに検討を要する問題と思われる。

現在, 各種トレーサーを用いた検討⁵⁾のほかに FFR 法にオートラジオグラフィーを併用する試みが行われており²⁴⁾, 今後形態学的にも分子レベルでの研究がさらに進むものと期待される。

V ま と め

1. シリコン栓子による中大脳動脈閉塞モデル犬を用い, 虚血部皮質毛細血管の透過性について通常の超薄切片法に加えフリーズフラクチャーレプリカ(FFR)法による電顕的検討を行った。
2. 電顕上, FFR では虚血部皮質毛細血管において pinocytotic vesicle の数は正常犬に比し約3倍と有意に増加していた。一方, 毛細血管内皮細胞間の tight junction は FFR では約 $100\text{\AA}$ の膜内粒子で形成された strand から成る網目状の配列が認められ, 正常犬に比し変化はなかった。
3. 以上の所見より, 急性期脳梗塞に伴う脳浮腫発現の一因として, 毛細血管内皮細胞における pinocytotic vesicle による透過性亢進の関与が強く示唆された。一方, tight junction の変化は強くないと思われた。
4. FFR は毛細血管内皮細胞膜の超微形態学的研究に有用な手段と考えられた。

稿を終えるにあたり, 御指導・御校閲を賜りました長崎大学脳神経外科 森 和夫 教授に深甚の謝意を表します。また, 本研究に直接の御指導を頂きました柴田尚武 助教授, ならびに共同研

究者諸氏に深く感謝致します。

本論文の要旨は、第14回日本臨床電子顕微鏡学会(1982年9月、東京)および第8回日本脳卒中学会総会(1983年6月、仙台)において発表した。

文 献

- 1) Branton D: Fracture faces of frozen membranes. *Proc Nat Acad Sci USA* 55: 1048-1056, 1966
- 2) Brightman MW, Hori M, Rapoport SI, Reese TS, Westergaard E: Osmotic opening of tight junctions in cerebral endothelium. *J Comp Neurol* 152: 317-326, 1973
- 3) Bruns RR, Palade GE: Studies on blood capillaries. 1. General organization of blood capillaries in muscle. *J Cell Biol* 37: 244-276, 1968
- 4) Castejón OJ: Electron microscopic study of capillary wall in human cerebral edema. *J Neuropathol Exp Neurol* 39: 296-328, 1980
- 5) Chien S, Laufer L, Handley DA: Vesicle distribution in the arterial endothelium determined with ruthenium red as an extracellular marker. *J Ultrastruct Res* 79: 198-206, 1982
- 6) Claude P, Goodenough DA: Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J Cell Biol* 58: 390-400, 1973
- 7) Connel CJ, Mercer KL: Freeze-fracture appearance of the capillary endothelium in the cerebral cortex of mouse brain. *Am J Anat* 140: 595-599, 1974
- 8) Coyle P: Middle cerebral artery occlusion in the young rat. *Stroke* 13: 855-859, 1982
- 9) Crévecoeur M, Deltour R, Bronchart R: Quantitative freeze-fracture study of plasmalemma and nuclear envelope of Zea mays root cells during early germination. *J Ultrastruct Res* 80: 1-11, 1982
- 10) Dodson RF, Aoyagi M, Hartmann A, Tagashira Y: Acute cerebral infarction and hypotension: An ultrastructural study. *J Neuropathol Exp Neurol* 33: 400-407, 1974
- 11) Garcia JH, Conger KA, Briggs L: Brain capillaries in acute and subacute regional ischemia, in Cervós-Navarro J, Fritschka E (eds): *Cerebral Microcirculation and Metabolism*. New York, Raven, 1981, pp 83-91
- 12) Garcia JH, Kalino H, Kamiyio Y, Trump BF: Cellular events during partial cerebral ischemia. 1. Electron microscopy of feline cerebral cortex after middle-cerebral-artery occlusion. *Virchows Arch [Cell Pathol]* 25: 191-206, 1977
- 13) Garcia JH, Kamiyio Y: Cerebral infarction. Evolution of histopathological changes after occlusion of a middle cerebral artery in primates. *J Neuropathol Exp Neurol* 33: 408-421, 1974
- 14) Hedley-Whyte ET, Lorenzo AV, Hsu DW: Protein transport across cerebral vessels during metrazole-induced convulsions. *Am J Physiol* 233: 74-85, 1977
- 15) 井上 優, 堤 健二, 柴田尚武, 森 和夫, 井上靖久, 瀬戸口孝夫, 末松 正: 脳梗塞に関する実験的研究 一皮質毛細血管の超微形態学的検討一. *日臨電顕会誌* 15: 793-794, 1982
- 16) Katzman R, Clasen R, Klatzo I, Meyer JS, Pappius HM, Waltz AG: Report of joint committee for stroke resources. Brain edema in stroke. *Stroke* 8: 512-540, 1977
- 17) Levine S, Sohn D: Cerebral ischemia in infant and adult gerbils. *Arch Path (Chicago)* 87: 315-317, 1969
- 18) Lossinsky AS, Garcia JH, Iwanowski L, Lightfoot WE: New ultrastructural evidence for a protein transport system in endothelial cells of gerbil brains. *Acta Neuropathol (Berl)* 47: 105-110, 1979
- 19) Molinari GF, Laurent JP: A classification of experimental models of brain ischemia. *Stroke* 7: 14-17, 1976
- 20) Nagy Z, Mathieson G, Hüttner I: Blood-brain barrier opening to horseradish peroxidase in acute arterial hypertension. *Acta Neuropathol (Berl)* 48: 45-53, 1979
- 21) Petito CK, Pulsinelli WA, Jacobson G, Plum F: Edema and vascular permeability in cerebral ischemia: Comparison between ischemic neuronal damage and infarction. *J Neuropathol Exp Neurol* 41: 423-436, 1982
- 22) Petito CK, Schaefer JA, Plum F: Ultrastructural characteristics of the brain and blood-brain barrier in experimental seizures. *Brain Res* 127: 251-267, 1977
- 23) Renkin EM: Multiple pathways of capillary permeability. *Circ Res* 41: 735-743, 1977
- 24) Schiller A, Taugner R: Combined freeze-fracturing and autoradiography techniques: Freeze-fracture autoradiography, in Heym C, Forssmann W-G (eds): *Techniques in Neuroanatomical Research*. Berlin, Springer, 1981, pp 301-314
- 25) 柴田尚武, 堤 健二, 森 和夫, 安永暁生: 脳梗塞に関する実験的研究 (第5報) 一梗塞巣分類について一. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 22: 262-266, 1982
- 26) Simionescu M, Simionescu N, Palade GE: Morphometric data on the endothelium of blood capillaries. *J Cell Biol* 60: 128-152, 1974
- 27) Simionescu M, Simionescu N, Palade GE: Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. The microvasculature. *J Cell Biol* 67: 863-885, 1975
- 28) Tamura A, Graham DI, McGulloch J, Teasdale GM: Focal cerebral ischemia in the rat. 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1: 53-60, 1981
- 29) Tani E, Kochi N: Pathology of blood-brain barrier and glia. *Advances in Neurological Sciences* 27: 140-153, 1983
- 30) Tani E, Yamagata S, Ito Y: Freeze-fracture of capillary endothelium in rat brain. *Cell Tissue Res* 176: 157-165, 1977
- 31) 堤 健二, 井上 優, 柴田尚武, 森 和夫: 実験的脳梗塞一終末部および境界部における微小血管の超微形態学的変化一. *日臨電顕会誌* 15: 791-792, 1982
- 32) Van Deurs B: Vesicular transport of horseradish peroxidase from brain to blood in segments of the cerebral microvasculature in adult mice. *Brain Res* 124: 1-8, 1977
- 33) Wade JB, Karnovsky MJ: The structure of the zonula occludens. A single fibril model based on freeze-fracture. *J Cell Biol*

60: 168-180, 1974

- 34) Wagner HJ, Pilgrim C, Brandl J: Penetration and removal of horseradish peroxidase injected into the cerebrospinal fluid. Role of cerebral perivascular spaces, endothelium, and microglia. *Acta Neuropathol (Berl)* 27: 299-315, 1974
- 35) Westergaard E, Hertz MM, Bolwig TG: Increased permeability to horseradish peroxidase across cerebral vessels, evoked by elec-

trically induced seizures in the rat. *Acta Neuropathol (Berl)* 41: 73-80, 1978

[別刷請求先：〒852 長崎市坂本町7-1, 長崎大学脳神経外科, 井上 優]