

正常脳と無酸素性脳症の microglia の形態変化の検討

北畑 龍生

正常脳における microglia の各抗体の染色性と無酸素性脳症における microglia の反応性について、ヒトの脳後頭葉組織を用いて検討を行った。

抗体は RCA-1 lectin, LN-1, LN-3, HAM 56, CD68 KP-1, CD45RA LCA, CD45 RO UCHL-1 を使用した。症例は正常脳 5 例と無酸素性脳症群 20 例のホルマリン固定パラフィン包埋切片を使用した。

評価方法は、染色された microglia を形態から 4 段階に分類し、後頭葉皮質第 4 層から第 6 層の部分で、光学顕微鏡の 40×10 倍の視野で 5 回計測を行い評価した。

結果は、正常脳の各段階の microglia は、中等度変化群と高度変化群が多く、軽度変化群、無変化群の順であった。RCA-1 lectin と LN-1 は形態変化が軽い microglia がよく染まり、HAM56, CD68 KP-1 は形態変化が強い microglia がよく染まった。CD45RA LCA, CD45 RO UCHL-1 に染まる microglia はみられなかった。

無酸素性脳症群では、無変化群と軽度変化群には増減はみられなかった。中等度変化群は 2 週間後で増加し、高度変化群は 1 ヶ月で増加した。

以上のことから、microglia の評価には複数の抗体を組み合わせる必要があることおよび、正常脳での形態が無変化群ばかりでなく、中等度変化群と高度変化群が多いことが明らかになった。

無酸素性脳症では、無変化群及び軽度変化群では増減がみられず、中等度変化群、高度変化群は 1 週間後に増加がみられた。このことから、無変化群が刺激に応じて変化していくのではなく、正常脳でも存在を認めた中等度変化群と高度変化群が増殖する、という microglia の population が複数存在する可能性が示唆された。(平成 11 年 10 月 5 日受理)

Examination of Microglial Morphology in Normal Brains and Anoxic Encephalopathy

Tatsuki KITAHATA

We examined microglia in 20 autopsy brains of patients with anoxic encephalopathy and 5 autopsy brains of neurologically normal patients immunohistochemically using RCA-1 lectin, LN-1, LN-3, CD68 KP-1, HAM56, CD45RA LCA, CD45RO UCHL-1.

Microglia were classified into four types based on their form, and were counted from the fourth layer to the sixth layer of the occipital cortex facing the calcarine sulcus. Counting was done five times by light microscopy at 40×10 magnification.

In the neurologically normal brains, the "moderate group" and "severe group" showed more

microglia than the other groups, followed by the "mild group" and "no change group". RCA-1 lectin and LN-1-stained microglia showed few changes in form, but CD68 KP-1 and HAM56 stained microglia showed strong changes. No CD45RA LCA and CD45RO UCHL-1-stained microglia were detected.

The correlation of the number of microglia and the survival time were examined in each group with anoxic encephalopathy. The "mild group" and "no change group" showed no increase in the number of microglia. The "moderate group" and "severe group" showed an increase one week after onset.

It was found that microglia of each group could be evaluated by combining the results from more than one antibody from the normal brain. In addition, it was found that not all of the microglia in the normal brain belonged to the "no change group".

These findings raise the possibility that the increase in microglia in each group with anoxic encephalopathy may have originated from more than one population. (Accepted on October 5, 1999)

Kawasaki Igakkaishi 25(4): 279-286, 1999

Key Words ① Microglia ② Normal brains ③ Anoxic encephalopathy
④ Immunohistochemistry ⑤ Occipital lobe

はじめに

microglia は中枢神経系の glia 細胞の 1 つで、胎生後期に amoeboid microglia¹⁾ と呼ばれるアメーバ状の形態で出現する。出生直後に最も増加し、成熟するに従い、ramified microglia²⁾ と呼ばれる長い分枝を持つ形態のものに置き換わり、成熟した脳では glia 細胞全体の数%になるとされている。1932年 Hortega が弱炭素銀による鍍銀染色を用いて初報告を行った³⁾。しかし、Hematoxylin-Eosin 染色 (H-E 染色) などの一般的な染色法では、細胞質と突起が染まらず、核のみ背景の基質の中に見えるのみで血管の内皮細胞の核と類似しているためこれらの染色法では評価が困難であった。Hortega の行った鍍銀染色が不安定な方法であったこともあり、microglia の研究は、免疫組織化学染色法が一般化する1980年代後半まで遅れていた。

microglia は虚血の発生から数十分後から形態変化が起こり、MHC class II 抗原の発現や isolectin B4 との強い結合が実験モデルで観察されている⁴⁾。ところがヒトを対象とした検討では、その反応時間、形態変化については十分

には研究されていない⁵⁾。

本研究は病理解剖で得られた神経学的に異常を認めない症例と無酸素性脳症の症例のホルマリン固定パラフィン切片を用いて、ヒトの microglia について、免疫組織化学染色の手法を用いて、正常状態で染色される microglia の形態的特徴、各免疫抗体での染色性の差異、無酸素性脳症の発症後の時間経過と各形態の変化について検討を行った。

材料と方法

川崎医科大学附属病院病理部にて病理解剖されたホルマリン固定パラフィン包埋の左大脳半球後頭葉ブロックを使用した。対象は中枢神経系に病変がなく、H-E 染色標本で異常がみられなかった正常脳が5例(男性4例, 女性1例, 年齢55~88歳, 平均75.8歳, 循環障害4例, 縊死1例の3時間以内に死亡し, H-E 染色で異常がみられなかった症例。Table 1 Case No. 1~5)と無酸素性脳症の脳が20例(男性13例, 女性7例, 年齢19~87歳, 平均68.4歳, 窒息8例, 縊死1例, 溺水1例, 循環障害4例, 呼吸障害6例のH-E 染色で異常がみられた症例。

Table 1. Summary of cases

Case number	Age Sex	Cause of death	Survival time	Microscopic findings (H-E staining)
1.	88 M	acute heart failure	30 min	none
2.	84 M	acute myocardial infarction	30 min	none
3.	83 M	acute myocardial infarction	1 hr	none
4.	69 M	acute heart failure	2 hrs	none
5.	55 F	hanging	3 hrs	none
6.	66 M	acute heart failure	5 hrs	mild pyknotic change
7.	69 M	acute myocardial infarction	5 hrs	mild pyknotic change
8.	87 F	asphyxia	6 hrs	mild pyknotic change
9.	86 M	metastatic lung cancer, shock	10 hrs	laminar necrosis
10.	57 F	drowning	12 hrs	mild pyknotic change
11.	40 F	acute heart failure	1 day	mild pyknotic change
12.	77 F	respiratory failure	2 days	moderate pyknotic change
13.	66 M	lung cancer, shock	3 days	mild pyknotic change
14.	82 M	asphyxia	4 days	mild pyknotic change
15.	29 F	hanging	4 days	mild pyknotic change
16.	19 F	pulmonary infarction	5 days	laminar necrosis
17.	63 F	asphyxia	7 days	laminar necrosis
18.	50 M	hypovolemic shock	8 days	moderate pyknotic change
19.	64 M	asphyxia	10 days	laminar necrosis
20.	64 M	asphyxia	10 days	laminar necrosis
21.	71 M	asphyxia	14 days	laminar necrosis
22.	67 M	asphyxia	15 days	laminar necrosis
23.	85 M	asphyxia	1 month	laminar necrosis
24.	62 M	respiratory failure	1 month	severe necrosis
25.	76 M	metastatic lung cancer	10 months	severe necrosis

Table 2. Primary reagents

Antibody	Dilution	Isotype	Specificity	Source
RCA-1 lectin	1:2000	lectin	β -D-Galactose	VECTOR
LN-1	1	Ig-M	B cell	ICN
LN-3	1	Ig-G	B cell	ICN
CD68 KP-1	1:200	Ig-G	macrophage	DAKO
HAM56	1:100	Ig-M	macrophage	DAKO
CD45RA LCA	1:200	Ig-G	leukocyte lineage	NOVO CASTRA
CD45RO UCHL-1	1:200	Ig-G	T cell	DAKO

Table 1 Case No. 6~25) である。

免疫組織化学染色に使用した免疫抗体は RCA-1lectin, LN-1, LN-3, CD68 KP-1, HAM56, CD45RO UCHL-1, CD45RA LCA の 7 種類の市販抗体である (Table 2)。

染色手順は各ブロックを厚さ 8 μ m に薄切し、抗原賦活化は microwave 加熱を 5 分間を 2 回行った。免疫抗体は 1 昼夜反応させた後、biotin 化抗体 (VECTOR, anti-mouse IgG Horse antibody, anti-mouse IgM Goat antibody) に 2 時間反応させた後、Avidin-Biotin Complex 試薬 (VECTOR, ABC Elite Kit) に 1 時間反応させ、DAB (和光純薬, 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) にて発色、Hematoxylin にて、1 分間核染色を行った。

microglia の形態を評価するため、染め出された突起の形状から、

1) 無変化群：胞体の突起が 30 μ m 以上のものが 3 本以上あるもの、2) 軽度変化群：胞体の突起が 30 μ m 以上のものが 2 本以下のもの、3) 中等度変化群：胞体の突起が 30 μ m 以下のもの、4) 高度変化群：突起がなく、形態的に macrophage と区別の付かないもの、の 4 段階に分類した (Fig. 1)。この分類は秋山の示した 5 段階の形態変化⁶⁾の、C と D を中等度変化群と改変したものを使用した。

評価部位は後頭葉 17 野の鳥距溝周辺の皮質第 4 層から第 6 層の部分で、40 \times 10 倍の視野 5 個の microglia の個数を平均化した。

血管内皮細胞が RCA-1 lectin と HAM56 にて陽性となるが、計測の際には形態的に判断して除外した。

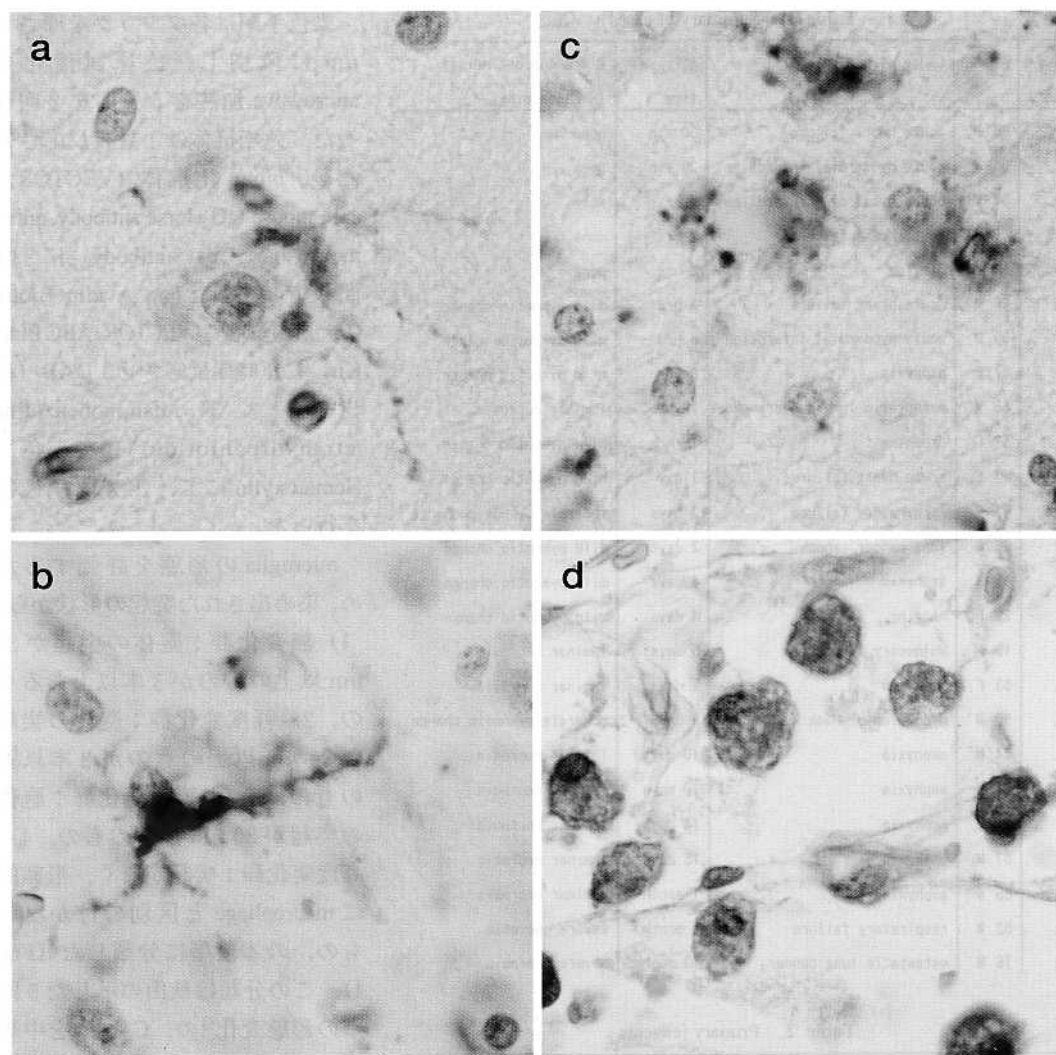


Fig. 1. Photomicrographs of microglia which was classified by the projection. Immunohistochemical stain ($\times 300$).

結 果

1. 正常脳での microglia の形態的特徴

各免疫抗体にて正常脳の症例 (Table 1 Case No. 1~5) の染色を行った (Fig. 2).

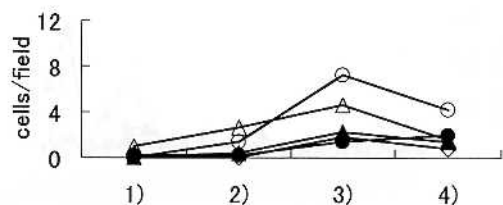
RCA-1 lectin では、無変化群の microglia は 1 視野当たり 0.0~1.0 個 (平均 0.2 個) が観察された。軽度変化群は、1 視野当たり 0.0~2.6 個 (平均 0.9 個) が観察された。中等度変化群は、1 視野当たり 1.4~7.2 個 (平均 3.4 個) が観察された。高度変化群は、1 視野当たり 0.8~

4.2 個 (平均 2.0 個) が観察された。

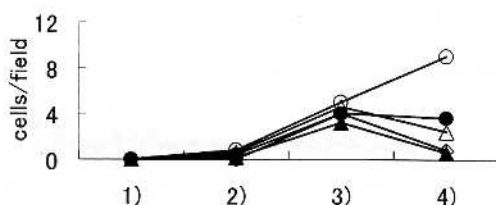
LN-1 では、無変化群の microglia は、1 視野当たり 0.0~0.6 個 (平均 0.3 個) が観察された。軽度変化群は、1 視野当たり 0.0~2.2 個 (平均 1.3 個) が観察された。中等度変化群は、1 視野当たり 0.8~5.8 個 (平均 4.5 個) が観察された。高度変化群は、1 視野当たり 0.4~4.2 個 (平均 1.8 個) が観察された。

LN-3 では、無変化群の microglia は、1 視野当たり 0.0~0.2 個 (平均 0.1 個) が観察された。軽度変化群は、1 視野当たり 0.0~0.4 個 (平均 0.1 個) が観察された。中等度変化群は、1 視

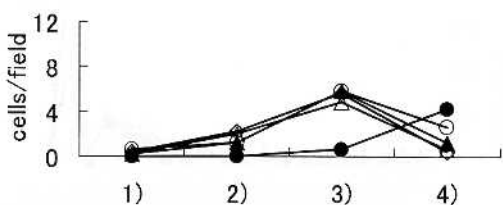
a; RCA-1 lectin



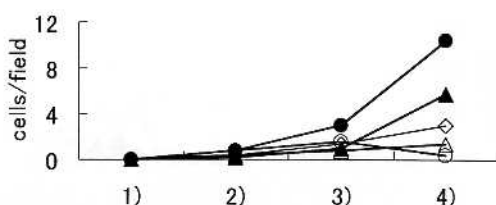
d; CD68 KP-1



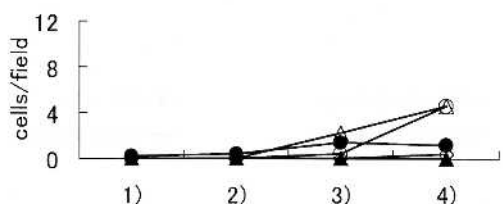
b; LN-1



e; HAM56



c; LN-3



Patients number

○ No.1 ● No.2 △ No.3
 ▲ No.4 ◇ No.5

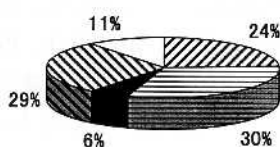
1) no change group 2) mild group 3) moderate group 4) severe group

Fig. 2. Microglia cell number per field ($\times 40 \times 10$). Microglia were counted by the classification of Fig. 1 in normal brain (Patients No. 1 to 5 of the Table 1)

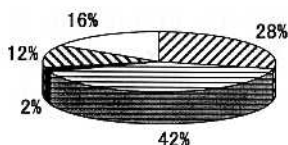
a; No change Group



c; Moderate Group



b; Mild Group



d; Severe Group

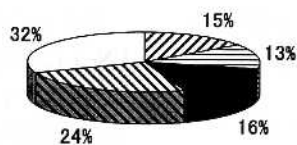


Fig. 3. Microglia forms were stained by each antibody in normal brain. (Patients No. 1 to 5 of the Table 1)

高度変化群は、1視野当たり0.0~4.6個(平均2.2個)が観察された。

CD68KP-1では、無変化群の microglia はすべての症例でみられなかった。軽度変化群は、1視野当たり0.0~0.6個(平均0.4個)が観察された。

中等度変化群は、1視野当たり3.2~5.0個(平均4.2個)が観察された。高度変化群は、1視野当たり0.6~9.0個(平均3.3個)が観察された。

HAM56では、無変化群の microglia はすべての症例でみられなかった。軽度変化群は、1視野当

野当たり0.0~2.2個(平均0.8個)が観察された。

たり0.2~0.8個(平均0.5個)が観察された。

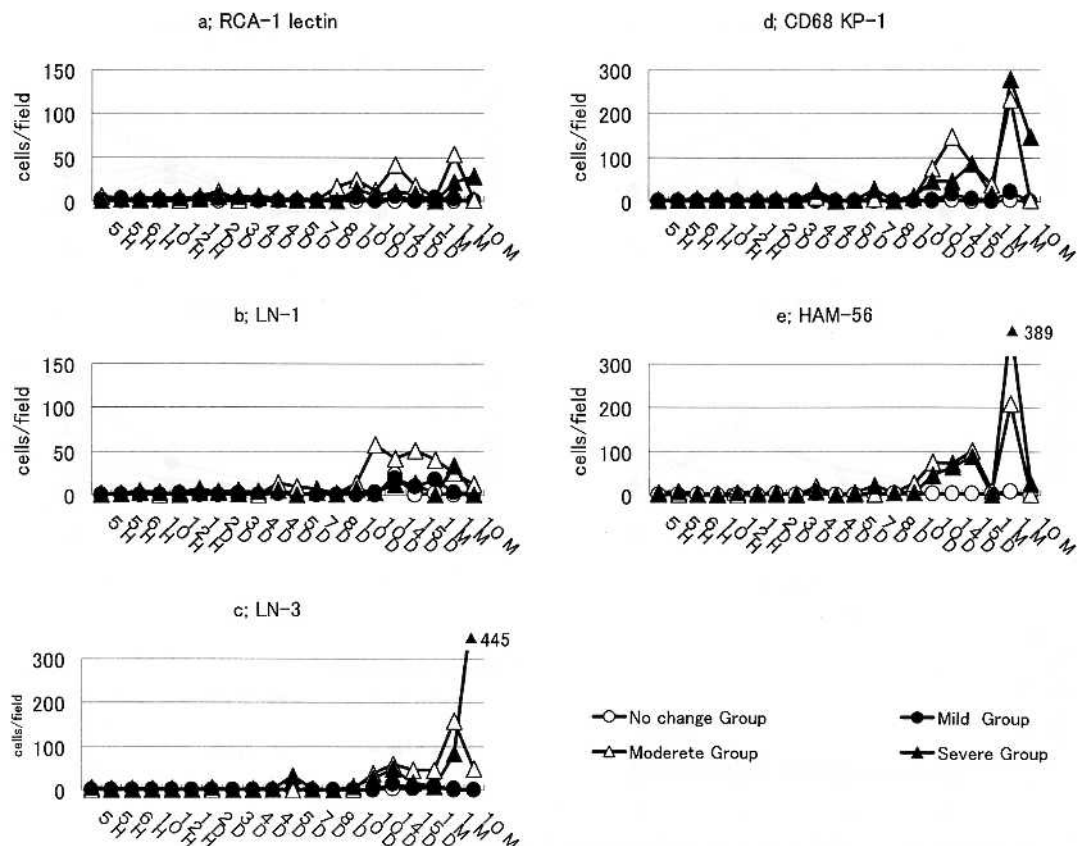


Fig. 4. The correlation of the cell number per field ($\times 40 \times 10$) microglia and the survival time is examined for each staining in anoxic encephalopathy. (Patients No. 6 to 25 of the Table 1)

中等度変化群は、1視野当たり0.8~3.0個(平均1.6個)が観察された。高度変化群は、1視野当たり0.4~9.0個(平均3.9個)が観察された。

CD45RA LCA と CD45RO UCHL-1では、すべての免疫抗体において、microglia はまったく染色されなかった。

以上のことより、LN-1, RCA-1 lectin では無変化群が染色されるが個数は少なく、その他の抗体では染色されなかった。RCA-1 lectin, LN-1, LN-3, CD68 KP-1, HAM56 において、中等度変化群が最も多く染色され、次いで高度変化群、軽度変化群の順であった。

2. 各免疫抗体での染色性の差異

1. の結果から、それぞれの免疫抗体が microglia のどの形態に陽性となるか検討を行った (Fig. 3)。

無変化群では RCA-1 lectin 43%, LN-1 が50

%と大部分を占めた。軽度変化群では RCA-1 lectin が28%, LN-1 が42%と減少し、CD68 KP-1 が12%, HAM56 が16%であった。中等度変化群では、RCA-1 lectin が24%, LN-1 が30%とさらに減少し、CD68 KP-1 が29%, HAM56 が11%であった。高度変化群では、RCA-1 lectin が15%, LN-1 が13%となり、CD68 KP-1 が24%, HAM56 が32%にと占める割合が増えてきた。

以上から形態変化が軽い程、RCA-1 lectin と LN-1 によく染まり、変化が強くなるに従い、CD68 KP-1 と HAM56 に染まる比率が高くなる結果が得られた。

3. 無酸素性脳症の発症後の時間経過と各形態の増加

各免疫抗体にて無酸素性脳症の症例 (Table 1 Case No. 6~25) を染色したが、CD45RA LCA

とCD45RO UCHL-1では、microgliaはまったく染色されなかった。発症後の時間経過と各形態の増加との相関 (Fig. 4a~e) であるが、無変化群と軽度変化群の個数は全症例で少なく、増減がみられなかった。

中等度変化群の microglia は、RCA-1 lectin では発症後8日目の症例から増加がみられた。LN-1では10日目の症例から増加がみられた。LN-3では10日目の症例から増加がみられた。CD68 KP-1では10日目の症例から増加がみられた。HAM56では10日目の症例から増加がみられた。

高度変化群の microglia は、中等度変化群とほぼ同様に、RCA-1 lectin では発症後10日目の症例から増加がみられた。LN-1では14日目の症例から増加がみられた。LN-3では10日目の症例から増加がみられた。CD68 KP-1では10日目の症例から増加がみられた。HAM56では10日目の症例から増加がみられた。

考 案

中枢神経系は血液脳関門により免疫担当細胞から隔離されており、microgliaはこの特殊な環境下の貪食細胞であると考えられてきた^{3), 7)}。しかし、最近の研究では、通常の静止形である resting microglia にも、サイトカイン分泌などの恒常性の維持など様々な機能を持つことが判明しつつある^{8)~12)}。また、疾病時に microglia が様々な反応をして、防御に働くことが解明されつつある^{13), 14)}。

今回の研究に選んだ部位は、第一次視覚中枢で Horton らが局在を明らかにしている¹⁵⁾後頭葉の鳥距溝に面した部分 (第17野) の皮質第4層から第6層の部分を対象とした。

microglia は、ホルマリンで固定すると、免疫活性が著しく低下する。このため、凍結切片で検討している報告がある^{16), 17)}。しかし、保存の上では、ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックが優れているため、数種類の免疫抗体を試行して、文献の結果との比較を試みた。今回

行った研究では、正常脳、無酸素性脳症の両方ともに無変化群、軽度変化群の microglia が染まる数が少なく、さらなる免疫抗体や方法の検討が必要と考えられた。

これまでのヒト脳組織の microglia の研究報告の中には、1種類の免疫抗体しか使用せずに評価したものがあつた^{5), 16)}。しかし、使用する免疫抗体が異なることもあり、結果として偏りがみられる報告が含まれている可能性が考えられた。今回の研究では、これまでの報告で使用された7つの市販免疫抗体を試みたところ、それぞれ染色される形態が異なっていることが解った。現時点では、すべての形態の microglia を特異的に染色し得る免疫抗体は報告されておらず、著者の試みた7つの抗体にも、すべての形態の microglia と特異的に反応するものはなかった。このため、microglia の評価には、少なくとも、無変化群から高度変化群まで評価するには数種類の抗体を組み合わせることが必要であると考えられた。

正常脳の各形態分布が、中等度変化群と高度変化群が多くみられた抗体が多かったという結果は、正常状態でも ramified microglia ばかり存在するのではないことを示唆している。

今回の研究では microglia の形状から4段階に分類を行ったが、使用した抗体に macrophage を認識するもの (CD68 KP-1, HAM56) があることから解るように、microglia は、macrophage と共通抗原を持っている。このため、高度変化群は、microglia 由来であるか、macrophage 由来であるか、形態的に判別が不可能であつた。このことから、microglia の評価には分枝を持つ中等度変化群が重要で、高度変化群には、血液脳関門の破綻から侵入してくる macrophage が混入している事が考えられた。

無酸素性脳症の症例においては、各染色ともに、無変化群、軽度変化群では、増減はみられなかったにもかかわらず、1週間程度後に中等度変化群と高度変化群の増加がみられた。このことから、正常脳にも存在がみられた中等度変化群が主に増加し、無変化群と軽度変化群は反

応が鈍いことが疑われた。つまり、沢田が培養 microglia について報告している¹⁸⁾ように、現在 microglia とされている細胞には、いくつかの別個のグループがあり、著者が無変化群、軽度変化群とした細胞群と、中等度変化群とした細胞群は別のグループである可能も示唆された。

本論文は「平成八年度私立大学等経常費補助金特別補助大学院重点特別経費」の助成を受けた。

本論文の要旨は第39回日本神経病理学会総会学術研究会(1998年5月24日 福岡)で発表を行った。

本稿を終えるに当たり、御指導、御高閣を賜りました川崎医科大学神経病理学教室調輝男教授に深謝致します。

文 献

- 1) Perry VH, Gordon S : Macrophages and microglia in the nervous system. *TINS* 11 : 273-277, 1988
- 2) Perry VH, Hume DA, Gordon S : Immuno-histochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuro-science* 15 : 313-326, 1985
- 3) del Rio-Hortega P : Microglia. In *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*, vol 2, ed by Penfield W, New York, Hocker. 1932, pp 483-534
- 4) Morioka T, Kalchua AN, Streit WJ : Progressive expression of immuno-molecules on microglia cells in rat dorsal hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol* 83 : 149-157, 1992
- 5) 久保真一, 小片 守, 岩崎 稔, 北村 修, 中国一郎 : 脳虚血の免疫組織化学的検討。法医学の実際と研究 32 : 203-207, 1989
- 6) 秋山治彦 : アルツハイマー病におけるミクログリアの役割。神経精神薬理 16 : 393-401, 1994
- 7) Ling EA : Electron-microscopic identification of ameboid microglia in the corpus callosum and neighboring regions of neonatal rats. *J Anat* 121 : 29-45, 1976
- 8) 中嶋一行, 濱之上誠, 下条雅人, 高坂新一 : 脳とミクログリア。神経進歩 34 : 577-589, 1990
- 9) 松本 陽 : 中枢神経系の免疫防御機構-ミクログリアとアストロサイトの役割について-。脳神経 44 : 881-892, 1992
- 10) 中嶋一行, 高坂新一 : ミクログリアの分泌性生理活性物質とその作用。脳と精神の医学 3 : 393-399, 1992
- 11) 中嶋一行, 高坂新一 : ミクログリアの分泌性プロテアーゼ。神経進歩 36 : 697-708, 1992
- 12) 錫村明生 : 脳の免疫応答細胞 : ミクログリア。Dementia 4 : 120-124, 1990
- 13) 中嶋一行, 島田章則, 高坂新一 : ミクログリアと病態。神経進歩 37 : 665-675, 1993
- 14) 中嶋一行, 高坂新一 : ミクログリア-機能と病態との関連-。脳神経 50 : 5-16, 1998
- 15) Horton JC, Hoyt WF : The representation of the visual field in human striate cortex, A revision of the classic Holmes map. *Arch Ophthalmol* 109 : 816-824, 1991
- 16) Tomimoto H, Akiguchi I, Suenaga T, Nishinura M, Wakita H, Nakamura S, Kimura J : Alteration of the blood-brain barrier and glial cells in white matter lesions in cerebrovascular and Alzheimer's disease patient. *Stroke* 27 : 2069-2074, 1996
- 17) Graeber MB, Streit WJ, Buringer D, Sparks DL, Kreutzberg GW : Ultra-structural location of major histocompatibility complex (MHC) class II positive perivascular cells in histologically normal human brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 47 : 303-311, 1992
- 18) 澤田 誠 : ミクログリアの発生と多様性。細胞 27 : 193-198, 1995