

マウス脳髄膜の超微構造

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者:
	メールアドレス:
URL	所属:
	http://hdl.handle.net/2297/9088

マウス脳髄膜の超微構造

金沢大学医学部病理学第一講座 (主任: 中西功大教授)

小 田 恵 夫

(昭和58年10月3日受付)

くも膜下腔並びに硬膜下腔の微細構造を明らかにするために、特に細胞外マトリックス構成成分に注目して、マウス脳髄膜を電子顕微鏡的に観察した。細胞外マトリックスのうち、礎質の状態を調べるためにルテニウムレッド染色を、また弾性線維を同定するためにタンニン酸染色を行った。硬膜は主に緻密に配列するコラーゲン線維から成る線維性結合組織であった。コラーゲン線維間には血管、神経および細長い線維芽細胞が介在し、少数の弾性線維と microfibril 束が散在していた。線維間隙はルテニウムレッド染色陽性のフィラメントと粒子の礎質で満たされていた。硬膜最内層には線維芽細胞に類似した扁平な細胞が軟膜最外層の細胞と密接していた。硬膜下腔と呼ぶべき特殊な細胞間隙は認められなかった。Arachnoid membrane は内・外二層に区別された。外層は重層する扁平な細胞からなり、多数の tight junction によって互いに接着していた。内層の細胞は複雑に分岐する細胞突起を有し、時にコラーゲン線維や microfibril などの結合組織線維成分を囲んでいた。Arachnoid membrane と脳実質との間には、粗網状に配列するくも膜細胞と、非連続性で一層の扁平な柔膜細胞が認められ、これらの細胞は多量の細胞外物質で包埋されていた。Arachnoid trabecula は認められなかった。この部位の細胞外物質は大部分ルテニウムレッド染色陽性の微細柔毛状物質と粒子から成り、この中にはコラーゲン線維束と microfibril 束が混在していた。弾性線維はみられなかった。このような軟膜の微細構造は、くも膜下腔が軟膜細胞によって内張りされた管腔ではなく、コラーゲン線維などの細胞外マトリックスを含む広い軟膜細胞間隙そのものであることを明確に示すとともに、脳脊髄液がこの軟膜細胞外マトリックスの中を通過して循環していることを示唆するものと考えられた。

Key words Meninges, Extracellular matrix, Subarachnoid space, Subdural space, Ultrastructure.

髄膜は中枢神経組織を被う中胚葉由来の膜性構造物で、組織学的には外側より硬膜 (dura mater)、くも膜 (arachnoid)、および柔膜 (pia mater) の三層に区別される。しばしばくも膜と柔膜をあわせて軟膜 (leptomeninx) と呼んでいる。硬膜が線維性緻密結合組織であるのに対し、arachnoid membrane と arachnoid trabecula からなるくも膜と脳脊髄表面を被う柔膜は主に繊細なコラーゲン線維が疎に配列する線維性組織であり、表面をそれぞれくも膜細胞と柔膜細胞が被うと記載されている¹²⁾。硬膜とくも膜の間には硬膜下腔と呼ばれる狭い腔隙が存在するという。Arachnoid trabecula の間の腔隙はくも膜下腔 (sub-arachnoid space) と呼ばれ、脳脊髄液が流れる循環通

路と考えられている¹¹²⁾。

髄膜の微細構造については、1958年 Pease ら⁹⁾がラット脳髄膜を観察して以来、今日までヒトを含め種々の動物を対象として、脳脊髄液保持の観点から軟膜の細胞形態や細胞間接着装置などに主眼をおいた観察がなされてきた。しかし、組織学的に示されるくも膜下腔が、超微構造的にも軟膜結合組織線維を被う細胞によって完全に内張りされた細胞間腔であるのか¹¹⁻⁹⁾、または、細胞による被包は不完全で、コラーゲン線維が散在する特殊な細胞間腔であるのか³¹⁰⁾⁻¹³⁾について、未だ見解の一致をみていない。このような相違は髄膜の特殊構造と試料作成方法に起因しているように思われる。すなわち、従来の超微形態学的研究では、

Ultrastructure of the Mouse Cranial Meninges. **Yoshio Oda**, Department of Pathology (I) (Director: Prof. I. Nakanishi), School of Medicine, Kanazawa University.

髄膜を採取する際に頭蓋骨を人工的に除去し髄膜を露出させた後、髄膜と脳を切り出し固定して観察するという方法がとられてきた。しかし、このような方法では脳脊髄液とともに微細な軟膜の細胞外物質が流出してしまうことは避けられず、また、脆弱な軟膜に異常な外力が加わって artifact が生じ、正常構造がゆがめられてしまうものと考えられる。事実、従来の報告では軟膜の細胞外物質は線維成分を除いて十分保存されていないことが多く、このような標本で上記の問題を検討することは危険である。髄膜、特にくも膜下腔の微細構造を正しく把握するためには、髄液を含めた細胞外物質が十分保存されている標本を観察する必要がある。そこで著者はこの点を考慮して、実験動物として小動物であるマウスを選び、動物を灌流固定の後、髄膜を骨と脳をつけたまま切り出し、骨を脱灰後 en block に包埋するという方法をとった。この方法によって作成された標本で、くも膜下腔の微細構造を説明することが本研究の第一の目的である。第二の目的は硬膜下腔の微細構造の検討である。電子顕微鏡（以下電顕と略）的観察によって、組織学的に記載されている硬膜下腔は人工産物であるという意見⁶⁾⁸⁾¹³⁾¹⁴⁾が有力となってきている。そこで本研究では、硬膜とくも膜との境界部を併せて観察し、硬膜下腔が実存しないことを確認できたのでここに報告する。

材料および方法

生後 9 週から 16 週までの ddy 系成熟雄マウスを用いた。

体重 1g 当り 0.5mg の塩酸ケタミンを筋注し麻酔した後、開胸し両心室を開きすばやく左心室より大動脈へ 27 G テフロン製カテーテルを挿入し、これを通して 140cm 水柱の圧力で体重 1g 当り 1ml の 2.5% グルタルアルデヒド (0.1 M カコジール酸ソーダ緩衝液 pH7.4 20°C) を灌流した。その後、頭皮を切開し、頭蓋骨をつけたまま脳上半分を取り出し、これを同固定液でさらに 2 時間 en block 固定した。次いで、1 検体につき 0.1 M エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム (pH7.4) 1 l を用い 4°C で攪拌しながら 4 日間脱灰した。脱灰後、大脳鎌周辺部を矢状縫合に沿って細切し、これを 2% オスミウム酸 (0.1 M カコジール酸ソーダ緩衝液 pH7.4 4°C) で 2 時間後固定を行った。次いで、エタノール系列で脱水し Epon 812 に包埋した。超薄切片はダイヤモンドナイフを用い LKB ウルトラトームで作成し、酢酸ウラニール・硝酸鉛または 0.1% リンタングステン酸アンモニウム入り酢酸ウラニール・硝酸鉛の二重染色を行った。一部はタンニン酸染色¹⁵⁾を併用した。

ルテニウムレッド（以下 RR と略）染色：灌流固定液には 1,000ppm RR を含む 1.25% グルタルアルデヒド (0.1 M カコジール酸ソーダ緩衝液 pH7.4 20°C) を用い同様な方法で灌流後、取り出した材料を同 RR グルタルアルデヒド混合液で 4°C 2 時間固定した。これを 1,000 ppm RR 入り 0.1 M カコジール酸ソーダ緩衝液 (pH7.4) で 5 時間洗浄後脱灰した。細切後、1,000 ppm RR を含む 2% オスミウム酸 (0.1 M カコジール酸ソーダ緩衝液 pH7.4 4°C) で 5 時間後固定した。以後は上記と同様に処置し、超薄切片標本は無染色で観察した。

得られた超薄切片標本は日立電子顕微鏡 HU-500 (75 kV) で観察した (直接倍率 3,000~18,000)。

成 績

I. 硬膜

硬膜は血管と神経線維（有髄、無髄）を含む緻密結合組織である。線維成分の大部分は密に配列する直径 27~120 nm (平均 63 nm) のコラーゲン線維である (図 1)。コラーゲン線維の間には弾性線維と直径 13 nm 以下の microfibril 束が散在する。弾性線維はタンニン酸染色で濃染される無構造のエラスチン凝集体とこれを囲む microfibril よりなる (図 2)。これらの結合組織線維間は RR 陽性の微細フィラメントや粒子によって埋められている (図 3)。硬膜にみられる細胞は主に線維芽細胞であるが、大食細胞もしばしば認められる (図 1)。線維芽細胞は細長い細胞突起を延ばす紡錘形あるいは星形の細胞で、原形質には粗面小胞体とゴルジ装置が発達している。時に細胞表面に斑状の基底膜様物質があり、これに面した原形質膜にはマイクロフィラメントが凝集し半接着斑様構造が形成されている。線維芽細胞はしばしば 20 nm 前後を隔てて互いに隣接し、まれに zonula adherens によって接着している。大食細胞は多数の細偽足を有し、原形質はライソゾームと空胞に富む。硬膜には顆粒細胞、リンパ球、形質細胞などの血液由来の細胞も認めることがある。

硬膜の毛細血管は有窓性毛細血管である。

硬膜の最内層には、一〜二層の扁平な細胞が 20 nm 前後の間隙を隔てて後述の arachnoid membrane 外層の細胞に隣接している。この扁平な細胞は細胞内小器官の発育と分布の面では線維芽細胞によく似ている。この細胞相互やこの細胞と arachnoid membrane 外層の細胞間には接着装置が乏しく、まれに zonula adherens によって接着するのみである。硬膜下腔と呼ぶべき特殊な細胞間腔はない (図 4, 5)。

II. 軟膜

軟膜は硬膜と脳との間に位置し、硬膜側には重層あ

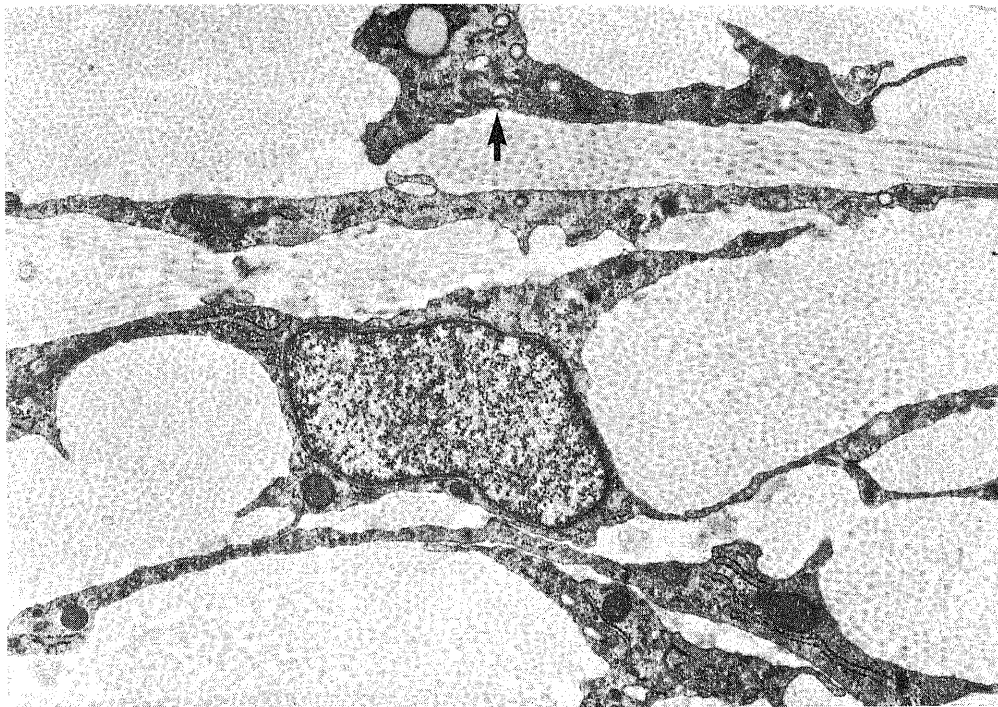


Fig.1. The dura mater. It is mainly composed of densely packed collagen fibers, in which fibroblasts and a macrophage (arrow) are intervened. $\times 12,000$.

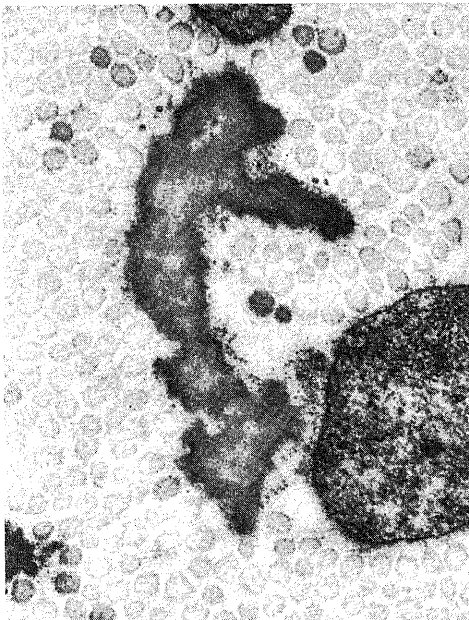


Fig.2. The elastic fiber in the dura mater. It appears as highly electron dense amorphous material and peripheral microfibrils. Tannic acid stain. $\times 40,000$.

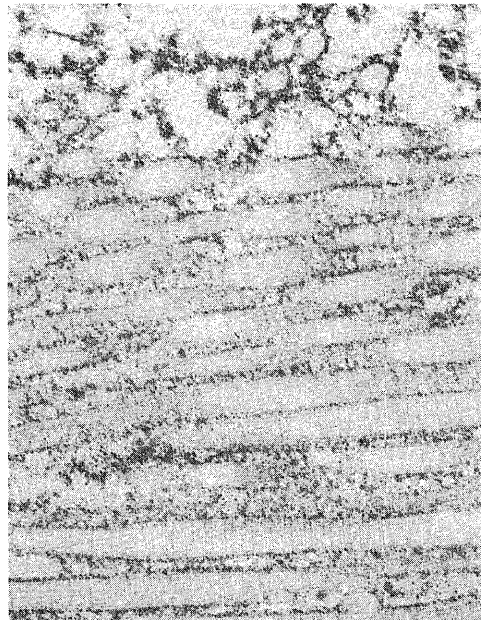


Fig.3. The dura mater stained with ruthenium red. Ruthenium red-positive filaments and particles are seen among collagen fibers. Ruthenium red stain. $\times 37,500$.

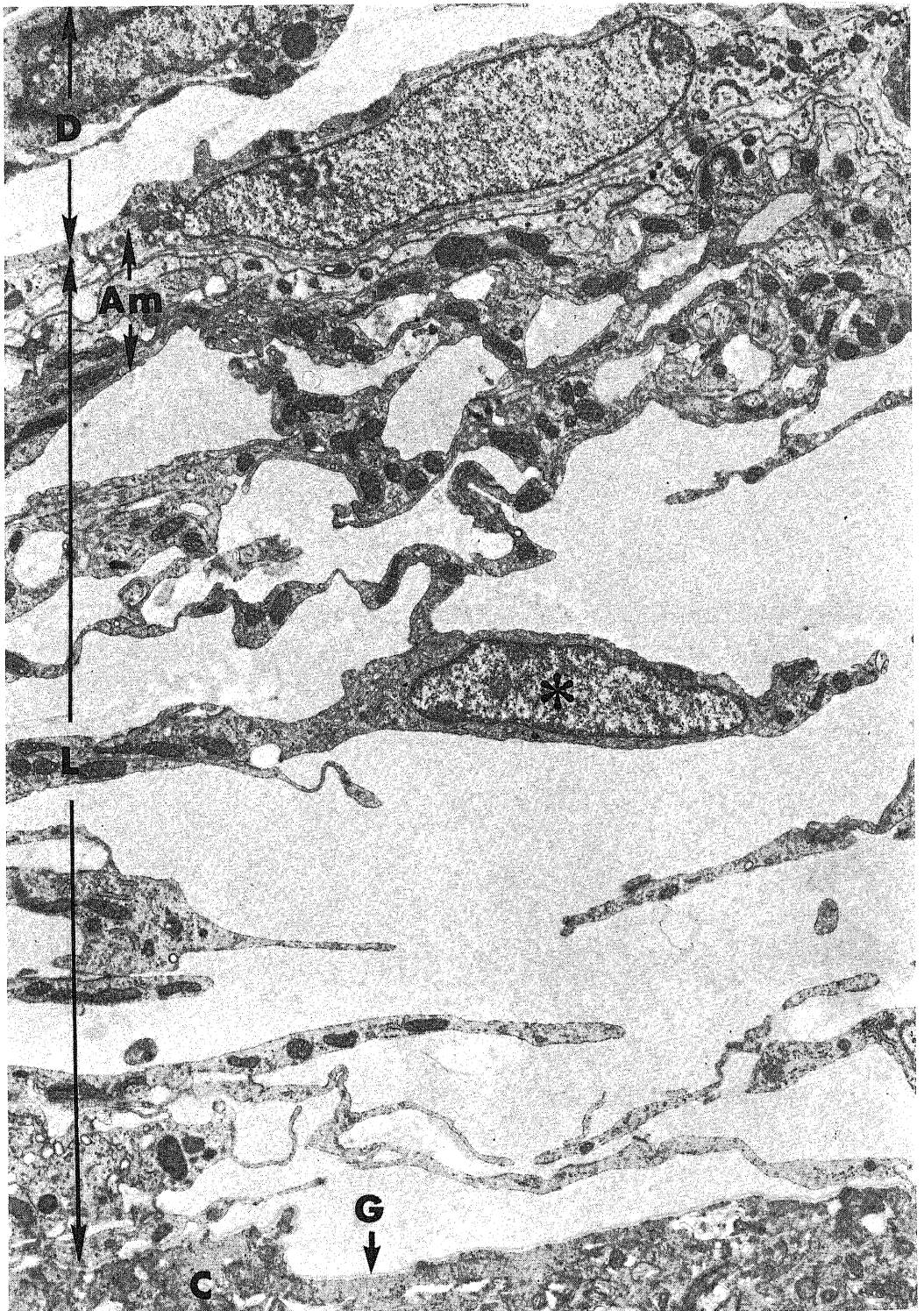


Fig. 4. Overview of entire thickness of the leptomeninx. Am designates arachnoid membrane; C, cerebral cortex; D, dura mater; G, glial basement membrane; L, Leptomeninx. Beneath the arachnoid membrane, arachnoid cells (asterisk) form a loose meshwork. $\times 7,500$.

るいは複雑に入りこんで配列する細胞が arachnoid membrane を形成する。脳表面には一層の柔膜細胞が存在するが、後述するように非連続性である。Arachnoid membrane と柔膜細胞との間にはくも膜

細胞が網状、粗に配列する(図4)。後述の arachnoid membrane 内層細胞、くも膜細胞、および柔膜細胞は、それぞれ細胞の位置と形と配列様式で概ね区別されるが、細胞内小器官の発育には差異がない。

Table 1. Comparison of ultrastructural features of the cells in the outer and inner layers of the arachnoid membrane

	Outer layer	Inner layer
Nucleus	large and spindle-shaped	small and spindle-shaped, occasionally irregular
Organelle	scant	abundant
Mitochondrion	a few, small and ovoid	a lot, large and elongated
Golgi apparatus	poorly-developed	well-developed
Rough endoplasmic reticulum	short	long
Pinocytotic vesicle	a few	a lot
Patchy basement membrane	absent	present
Tight junction	frequently seen, extensive	occasionally seen, less extensive

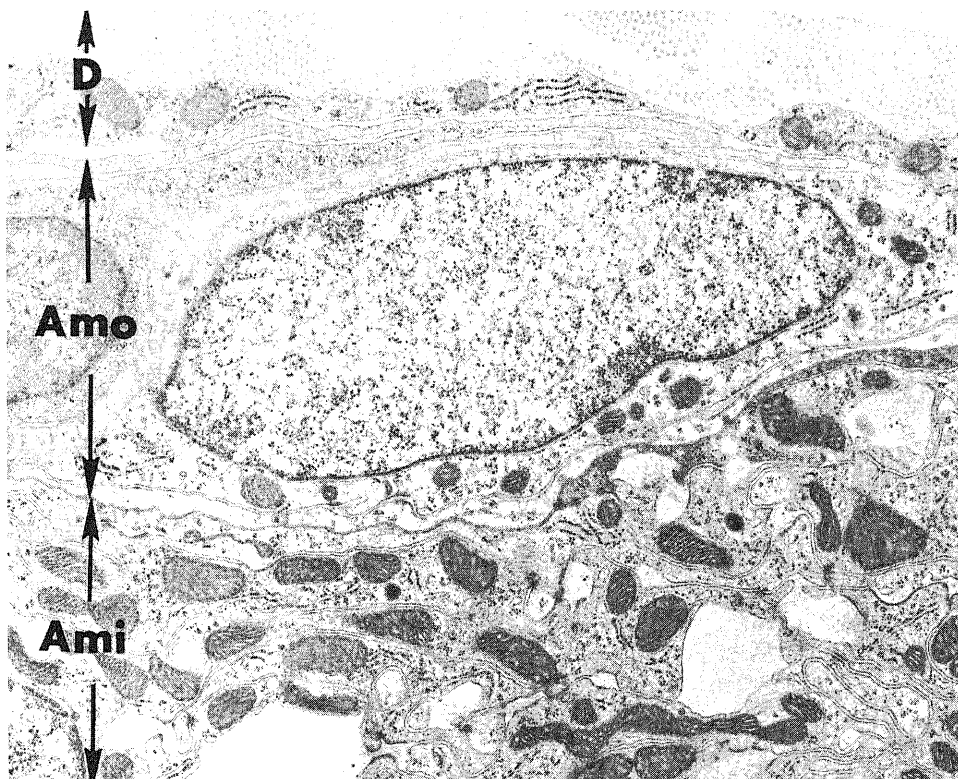


Fig. 5. Interface between the dura mater and arachnoid membrane. The outermost surface of the arachnoid membrane contacts with the fibroblast-like cell situating at the innermost portion of the dura mater (D). The arachnoid membrane is divided into the inner layer (Ami) and outer layer (Amo). $\times 12,000$.

Arachnoid membrane は細胞の配列と微細構造の違いにより内・外二層に区別される (図5). 内・外両層の細胞の微細構造上の相違を表1に示す. Arachnoid membrane 外層では数層の扁平な細胞が一定の間隔をもって配列し, その原形質膜には凹凸が乏しい.

細胞間隙の幅は4~20 nmで, arachnoid membrane 内層に近づくにつれて狭くなる傾向がある. Tight junction による細胞結合が広範囲で目立つ (図6). 所々細胞間隙が小のう状に開大し, そこに絮状物質と microfibril がみられる. コラゲン線維はみられない.

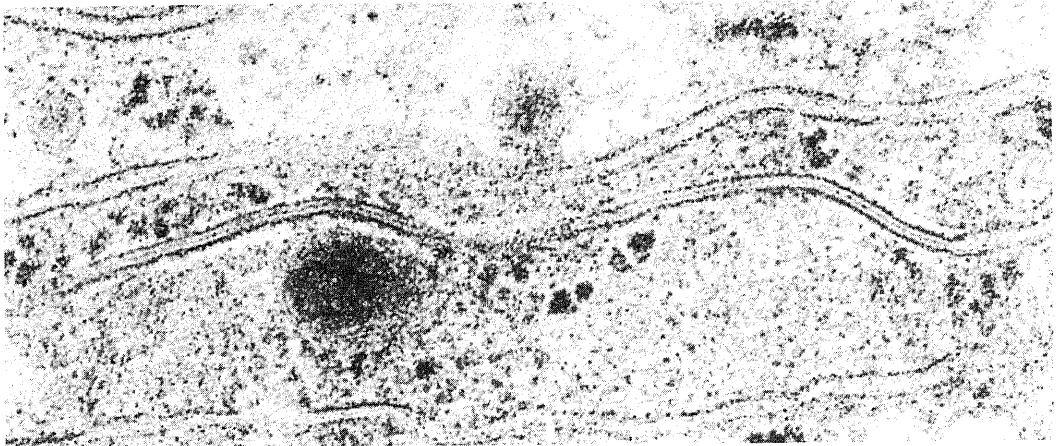


Fig. 6. Tight junction between the cells in the outer layer of the arachnoid membrane. $\times 105,000$.

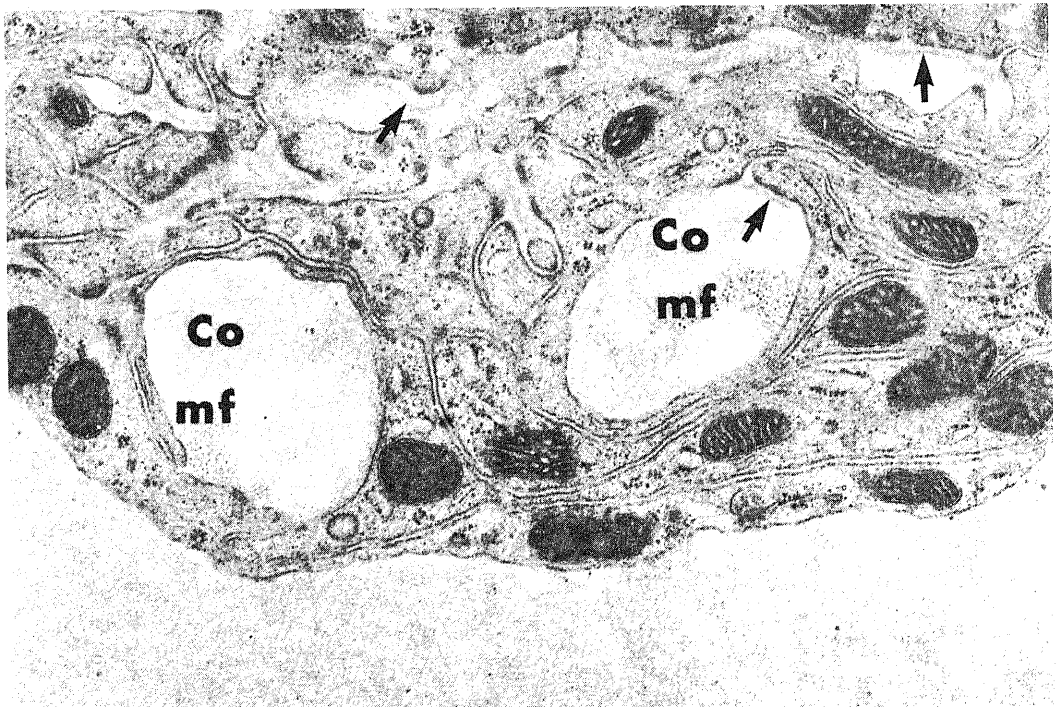


Fig. 7. Inner layer of the arachnoid membrane. The cells have complicatedly ramified cytoplasmic processes which tangle together. Intercellular spaces contain collagen fibers (Co) and microfibrils (mf) embedded in flocculent material. Patches of basement membrane are observed (arrows). $\times 24,000$.



Fig. 8. Tight junction between the cytoplasmic processes of the inner layer of the arachnoid membrane. $\times 105,000$.

Arachnoid membrane 内層では細胞の重層性は失われ、分岐を示す細胞突起が約 20 nm の間隙を隔てて複雑にからみあう。所々で細胞間隙が大きいように拡大し、架状物質、コラーゲン線維、microfibril が種々の割合で見られる (図 7)。コラーゲン線維は直径 27~60 nm (平均 40 nm) で、硬膜のコラーゲン線維よりも細い。Arachnoid membrane 内層の細胞には tight junction (図 8)、gap junction、デスモゾーム様接着構造が見られるが、tight junction は外層の細胞に比べ小範囲で少ない。

Arachnoid membrane の内側には、長い細胞突起を持った紡錘形あるいは多角形のくも膜細胞が粗に配列している。細胞突起は縦横に延び、時に tight junction、gap junction、デスモゾーム様接着構造によって連結し、網状構造をなす (図 4, 9)。くも膜細胞のゴルジ装置は比較的よく発達し、糸粒体が豊富で細長いものが目立つ。また原形質内に直径 20 nm の微細管を容易に認めることができる。細胞表面の所々に斑状の基底膜様物質を伴っている。この細胞は arachnoid

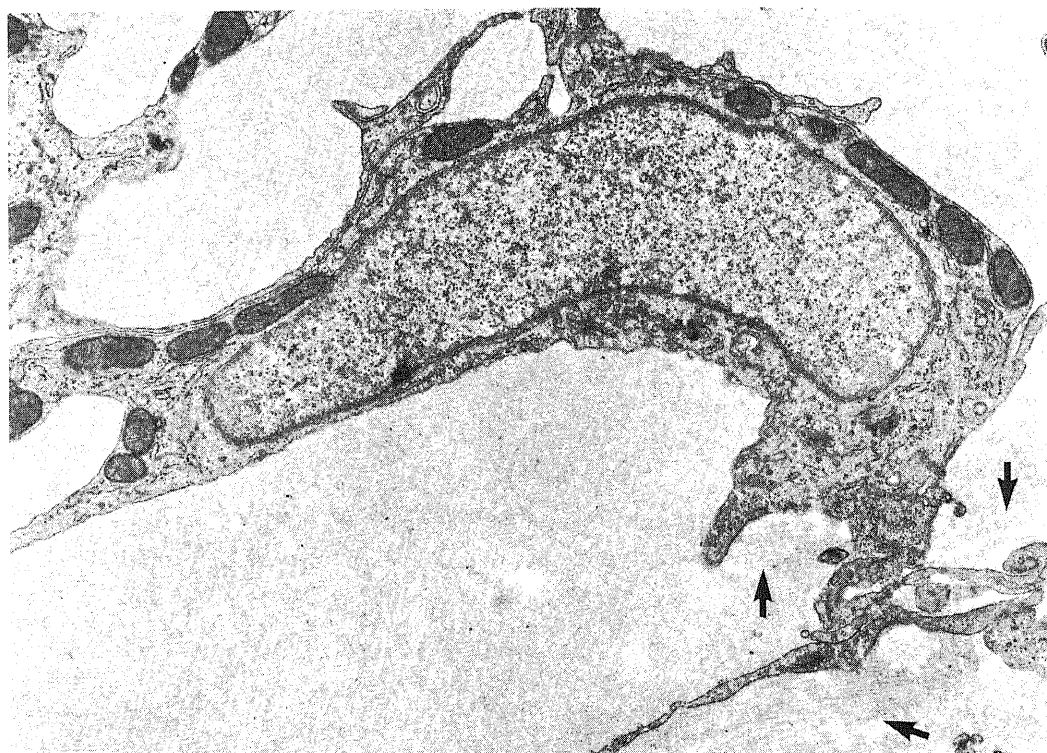


Fig. 9. Arachnoid cells forming a loose meshwork. They extend cytoplasmic processes in several directions and contact each other by their processes. Extracellular space is filled by flocculent material with an intermixture of collagen fibers (arrows). $\times 12,000$.

membrane 内層の細胞と、核のクロマチン構造や細胞内小器官の発育・分布の点で差異がなく、両者の移行部ではその境界を正確に決めることが困難な場合がある。くも膜細胞周囲の広い細胞間隙には、絮状物質、コラーゲン線維、microfibril が同定される。硬膜とは異なって線維成分が著しく少ない。コラーゲン線維の直径は arachnoid membrane 内層のコラーゲン線維と同じである。Microfibril は直径 10 nm で、横断面では中空になってみえる (図 10)。Microfibril 束内にはタンニン酸染色で濃染する無構造物質の沈着は認められない。これら線維は小さい束を作り絮状物質の豊富な細胞間隙に散在している。くも膜細胞で完全に被覆される arachnoid trabecula は認められない。

柔膜細胞にもくも膜細胞相互にみられた各種接着装置が認められるが、しばしばその細胞間は開大し、脳表面の神経膠細胞基底膜 (glial basement membrane) が直接露出していることがある。さらに観察部位によっては柔膜細胞による脳の被覆が広範囲にわたってみられないことがある。柔膜細胞は部分的に神経膠細胞基底膜に密着する。しかし、両者が密着していない場合には、絮状物質、コラーゲン線維、microfibril が介在する (図 11)。

軟膜にも大食細胞がしばしば認められる (図 12)。

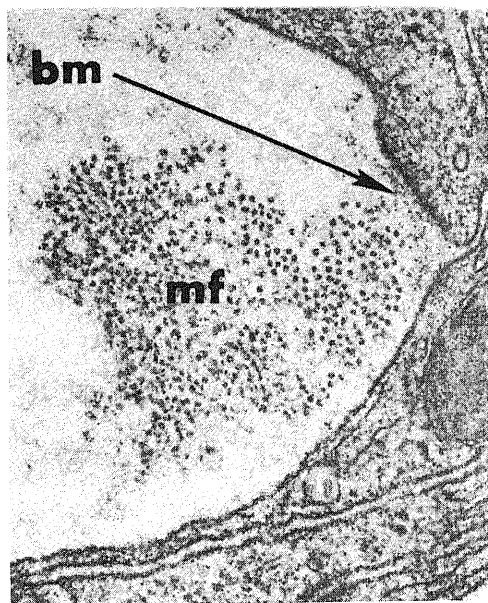


Fig. 10. Cytoplasmic processes of the arachnoid cells and extracellular materials. The microfibrils (mf) and collagen fibers are embedded in the flocculent material. A patch of basement membrane (bm) is observed. Tannic acid stain. $\times 50,000$.

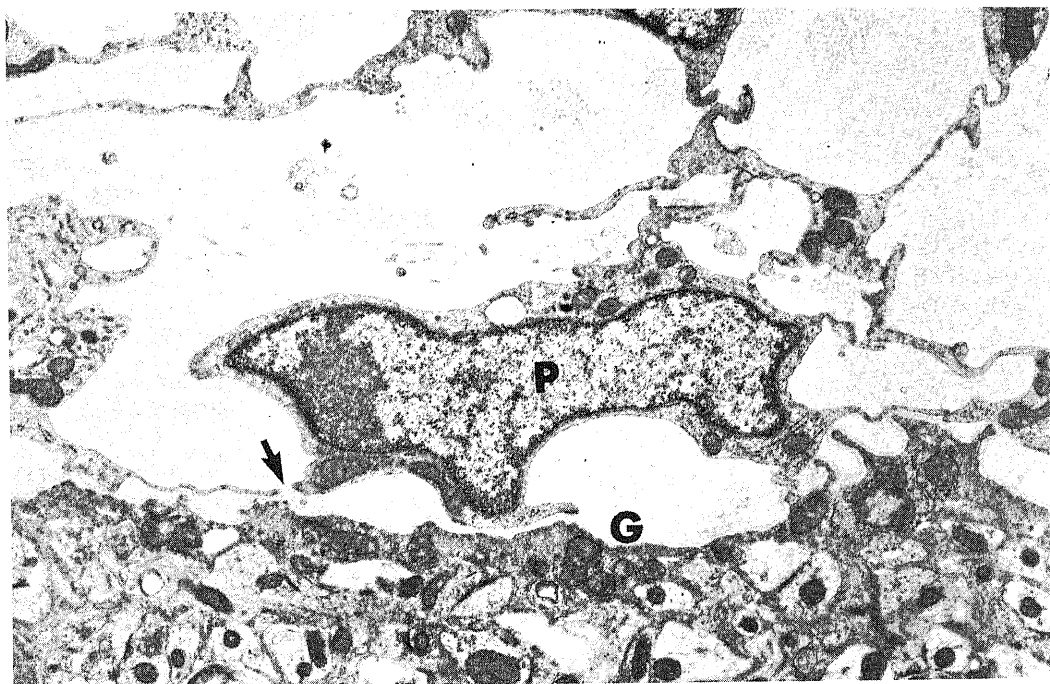


Fig. 11. Innermost portion of the leptomeninges and cerebral cortex. Portion of the pial cell (P) attaches to the glial basement membrane (G). An intercellular gap is observed (arrow). $\times 9,600$.



Fig. 12. A macrophage in the leptomeninx. $\times 9,000$.



Fig. 13. A capillary of the leptomeninx. It consists of non-fenestrated endothelial cells accompanied by pericytes (Pe). $\times 9,000$.

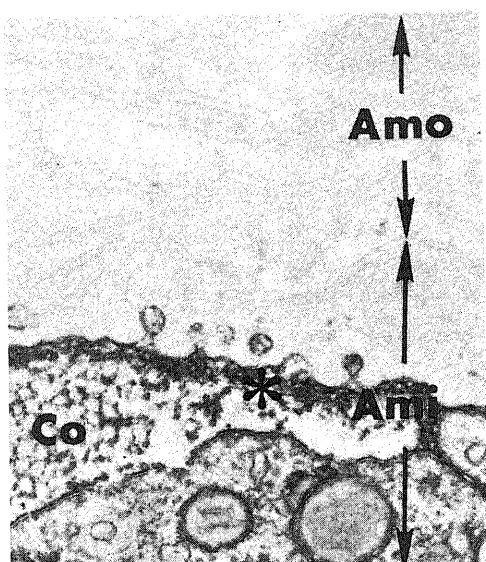


Fig. 14. The arachnoid membrane stained with ruthenium red. Ruthenium red is negative in the intercellular gaps of the outer layer of the arachnoid membrane (Amo). Collagen fibers (Co) are surrounded by ruthenium red-positive material. The basement membrane is positively stained with ruthenium red (asterisk). Am; inner layer of the arachnoid membrane. Ruthenium red stain. $\times 36,000$.

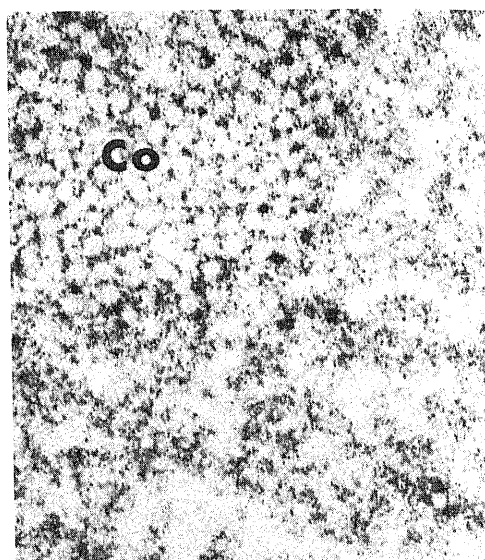


Fig. 16. High magnification of the intercellular space beneath the arachnoid membrane stained with ruthenium red. Ruthenium red-positive materials consist of particles of 40 nm or less in diameter and fine flocculent material. Co; collagen fibers. Ruthenium red stain. $\times 45,000$.

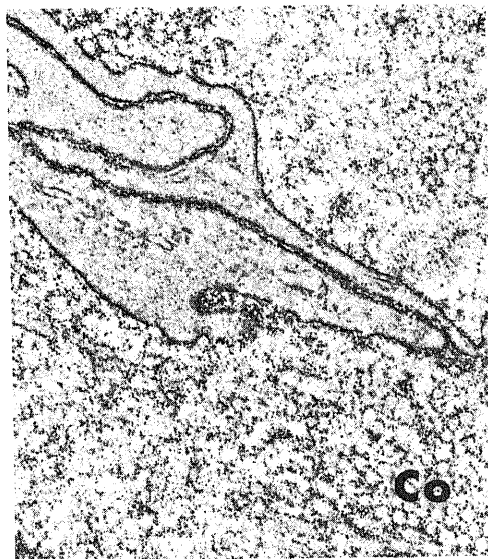


Fig. 15. The broad intercellular space beneath the arachnoid membrane stained with ruthenium red. The intercellular space is filled with ruthenium red-positive material, and collagen fibers (Co) are also outlined by this material. The outer surface of the arachnoid cells is ruthenium red-positive. Ruthenium red stain. $\times 30,000$.

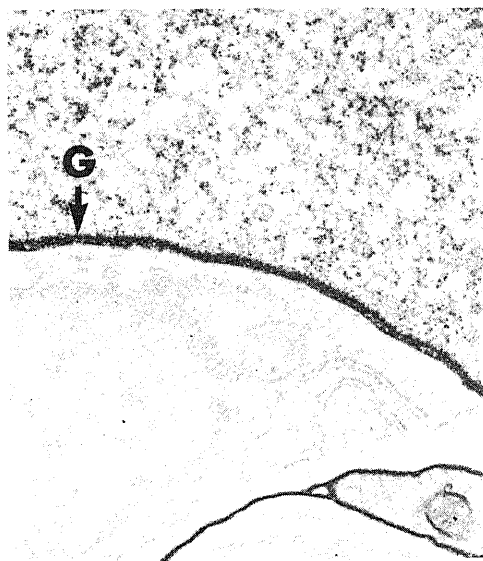


Fig. 17. Surface of the cerebral cortex stained with ruthenium red. Glial basement membrane (G) is ruthenium red-positive. Extracellular space of the leptomeninx seen at top is filled with ruthenium red-positive material. Pial cells are not intervened here. Ruthenium red stain. $\times 18,000$.

軟膜内を通過する血管は主に動・静脈であるが、毛細血管も認めることができる。軟膜の毛細血管は硬膜の毛細血管と異なり、tight junction で互いに結合する一層の内皮細胞からなる無窓性毛細血管である。毛細血管は部分的に周細胞によって被われる(図 13)。周細胞は全周性に基底膜様物質を有しているのも、くも膜細胞や柔膜細胞などと区別できる。動・静脈は中膜に相当する一層の平滑筋細胞を備えており、この外周をくも膜細胞や柔膜細胞がほぼ完全に被包している。

Arachnoid membrane 外層を除き、軟膜の広い細胞間隙は RR 陽性物質で満たされている(図 14, 15)。RR 陽性物質は大部分微細柔毛状構造をとり、細胞表面に凝集する傾向がある(図 15)。柔毛状 RR 陽性物質にまじって、40 nm 以下の RR 陽性粒子が at random に散在している。コラーゲン線維束は RR 陽性物質につつまれ、またコラーゲン線維間にも RR 陽性粒子が認められる(図 16)。Microfibril は RR 陽性である。Arachnoid membrane 内層細胞・くも膜細胞・柔膜細胞の斑状の基底膜様物質や、血管内皮細胞基底膜や、周細胞・平滑筋細胞の基底膜様物質や、神経膠細胞基底膜は、総て RR 強陽性である(図 14, 17)。

考 察

硬膜の微細構造に関しては、本研究結果はこれまでの報告³¹⁴⁾⁶⁾⁸⁾¹⁶⁾¹⁷⁾とほぼ同一であった。Weed¹⁸⁾の髄膜のシェーマに示されている硬膜下腔に相当する硬膜とくも膜との境界部には、硬膜最内層の線維芽細胞類似の扁平な細胞と arachnoid membrane 外層細胞とが密着して配列しており、硬膜下腔と呼ばれるような特別な細胞間隙はなかった。本研究でみられた硬膜最内層の扁平な細胞層は dural border layer⁸⁾¹³⁾と名づけられており、ヒトではマウスよりも多層性である。このような硬膜とくも膜との関係はすでに他の研究者⁶⁾⁸⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁷⁾によってもヒトを含む種々の哺乳動物を調べた際に指摘されているので、動物差を問わず普遍的な事実と考えられる。かつて電顕的にも硬膜とくも膜との間にくも膜下腔と交通する広い硬膜下腔があると報告されたこともあるが¹⁹⁾、硬膜下腔は人工産物であるという意見が多く⁶⁾⁸⁾¹³⁾¹⁴⁾、本研究結果は後者の見解を支持している。この人工的に生ずる硬膜下腔は、dural border layer と arachnoid membrane との間に生ずる場合⁶⁾と、dural border layer 内に生ずる場合⁸⁾¹⁷⁾とがあると指摘されている。Dural border layer と arachnoid membrane の細胞間にも、dural border layer の細胞相互間にも、接着装置が乏しい点において共通している。したがって、標本作成過程に伴う機械的外力によってこれらの細胞間隙が異常に離開して

硬膜下腔が形成されるものと考えられる。注目されるのは慢性硬膜下血腫の局在である。Friede ら²⁰⁾は、慢性硬膜下血腫は dural border layer の細胞間に起こる病変であり、硬膜と arachnoid membrane の境界に起こるのではないと述べている。したがって、慢性硬膜下血腫では単に機械的外力によって離開しやすい細胞間隙に血液が貯留するものではないと考えられる。Dural border layer 内に出血する必然性は、dural border layer の構造特性だけによるものではなく、出血源となる血管が硬膜の血管であることや出血量などが要因として加わっているものと思われる。

本研究では、軟膜の微細構造に関して次のような従来の報告と異なった所見がえられた。

1) Arachnoid trabecula は存在せず、同部には粗網状に配列するくも膜細胞が多量の細胞間物質で包埋されているにすぎなかった。細胞間物質は主に RR 陽性の微細柔毛状物質と粒子であるが、この中には少数のコラーゲン線維束と microfibril 束が at random に散在していた。

2) Tight junction は arachnoid membrane 外層のみならず、arachnoid membrane 内層、および、くも膜細胞や柔膜細胞相互にも同定された。

3) 軟膜には血管壁以外に弾性線維は認められなかった。

電顕的観察においても、くも膜下腔が軟膜結合組織間質を完全に被う細胞で内張りされた特殊な細胞間隙であるという報告がこれまでにいくつかなされている。Andres⁴⁾⁵⁾は、イヌとネコの脳脊髄髄膜を観察し、一層の扁平な中皮細胞がくも膜下腔と軟膜結合組織との間に介在していると述べている。Anderson⁶⁾は、ヒトとサル視神経髄膜を調べ、結合組織を被包する細胞は一〜数層の線維芽細胞に類似した髄膜細胞であると報告し、arachnoid membrane や arachnoid trabecula や柔膜に存在するコラーゲン線維がくも膜下腔に露出することはないと考えている。ヒト頭頂部脳髄膜を観察した Rascol ら⁹⁾も Anderson⁶⁾とほぼ同様の報告をしている。Nabeshima ら⁸⁾は、マウス、ラット、チンチラ、ウサギ、ネコ、サルの髄膜を調べ、くも膜下腔がくも膜や柔膜の結合組織間質空間から細胞によって分画された脳脊髄液の流通路であることをシェーマに示している。しかし、一方では、くも膜下腔と軟膜結合組織間質空間との間には細胞が必ずしも介在しないという報告がある。Pease ら³¹⁾や Fredrickson ら¹¹⁾はラットの、また、Nelson ら¹⁰⁾はハムスターの髄膜を観察し、コラーゲン線維をくも膜下腔に相当する部位に同定している。同じように、Lopes ら¹²⁾や Schachenmayr ら¹³⁾は、ヒトの髄膜でくも膜下腔にコ

ラゲン線維が存在することを認めている。このようにくも膜下腔の微細構造に関して所見が異なっているのは、これまで観察された動物を考慮すると動物差に基因するのではなく、先に述べたように軟膜の細胞間物質をどの程度保存しえたのかとか、間質と細胞との間の人工的離開の有無という電顕標本作成上の技術的な違いによる可能性が高いと思われる。今回、マウス脳髄膜を *in situ* で固定し骨と脳とともに包埋することによって、髄膜になるべくむだな外力を加えずかつ脳脊髄液の流出に伴う細胞間物質の漏出を避けて観察してみると、広いくも膜細胞間には多量の架状物質とともにコラゲン線維や microfibril が散在し、arachnoid trabecula と呼ばれるべき構造は認められなかった。したがって、くも膜細胞間隙がいわゆるくも膜下腔に相当し、脳脊髄液は他の結合組織における組織液同様、線維成分と礎質からなる細胞外マトリックスの中を流れて流れているものと考えられる。この考え方は発生学的にも支持されるように思われる。すなわち、脳髄膜は終脳を被う胎生期結合組織から発生し⁷⁾²¹⁾、この未熟結合組織に脳脊髄液が流れ込んで硬膜と軟膜が分化するのである⁷⁾。本研究のように細胞間物質がよく保存された標本を観察する場合には、動物種を問わずくも膜下腔に結合組織線維が含まれていることを明瞭に示すことができると思われる。

RR が浸透しなかった arachnoid membrane 外層を除き、軟膜の細胞外にみられる架状物質は大部分 RR 陽性であった。RR 陽性物質には微細柔毛状物質と粒子とが識別された。細胞表面には RR 陽性微細柔毛状物質が凝集し、コラゲン線維は RR 陽性物質で囲まれていた。RR は酸性ムコ多糖 (グリコサミノグリカン)、リン脂質、糖蛋白に親和性をもっていることが知られている^{22)~25)}。脳脊髄液にはリン脂質や糖蛋白が含まれているので²⁶⁾、微細柔毛状物質は脳脊髄液を表わしていると思われるが、粒子や、細胞表面やコラゲン線維束を囲む厚い RR 陽性物質は必ずしも脈絡膜で産生された脳脊髄液のみであるとは断定できないかもしれない。腰椎穿刺によって得られた正常脳脊髄液中には、少量ではあるが、グリコサミノグリカンが検出されている²⁷⁾。また、最近、結合組織に含まれる主たる糖蛋白であるフィブロネクチン²⁸⁾が、脳脊髄液中にも含まれていることが明らかになったからである²⁹⁾。一般に、硫酸基のついたグリコサミノグリカンは組織内ではコア蛋白と共有結合をしプロテオグリカンとして存在し、電顕的にプロテオグリカンは RR 陽性の直径 20~50 nm の粒子である³⁰⁾。したがって、マウス脳軟膜にみられた RR 陽性粒子の一部は、プロテオグリカンを表わしていると思われる。フィブロネクチンは、細胞

表面や基底膜やコラゲン線維の間に存在し、細胞と細胞あるいは細胞と細胞外マトリックスとの接着に役立っているものと考えられている²⁸⁾。電顕的には無構造あるいは微細線維状物質として認められる³¹⁾。したがって、本研究でみられた軟膜細胞表面やコラゲン線維周囲の RR 陽性微細柔毛状物質はフィブロネクチンを含んでいる可能性が示唆される。RR 染色の結果は、くも膜下腔に一般の結合組織にみられる線維成分と礎質からなる細胞外マトリックスが含まれていることを、さらに裏づけているように思われる。そして、このような細胞外物質の性状から、脳軟膜は組織液に富む疎性結合組織に類似しているといえる。

脳軟膜が疎性結合組織に類似しているとなると、くも膜細胞間隙を流れる脳脊髄液が、どうして硬膜と脳実質に容易に漏れ出すことがないのかという疑問が生ずる。Nabeshima ら⁸⁾は、本研究の arachnoid membrane 外層に相当する多数の tight junction で密着した重層する細胞層が、硬膜側への脳脊髄液漏出の barrier となっていると考え、この細胞層に機能的な意味をもたせた "arachnoid barrier layer" という名をつけている。Tight junction は分子量の大きな物質の細胞間の通過をブロックし、細胞間隙を通る物質拡散を抑制する重要な接着装置と考えられている³²⁾。Horse-radish peroxidase をいわゆるくも膜下腔に注入した実験では horseradish peroxidase が arachnoid barrier layer の tight junction によってブロックされ硬膜へは侵入しないことが知られている³³⁾³⁴⁾。本研究でも RR が arachnoid membrane 外層細胞間へ侵入しなかったことから、この細胞層がこれより内側の軟膜と外側の硬膜との間の物質拡散の barrier になっていることを間接的に支持していると思われる。脳側の barrier については、柔膜細胞層は不連続で gap が多いので、柔膜はその役目とはなりえず、Ramsey³⁵⁾が述べているように脳表面の神経膠細胞がその機能を有していると思われる。

Arachnoid barrier layer の細胞を除いて軟膜細胞相互には tight junction による接着がないという報告が多い⁴⁾⁷⁾⁸⁾¹¹⁾。しかし、本研究では arachnoid barrier layer に相当する arachnoid membrane 外層以外の部位の軟膜細胞にも tight junction による接着が認められた。くも膜細胞は細長い突起を出して網状に広がっているにすぎず、また柔膜細胞は不連続であることから、二次元的には tight junction でさえぎられて交通がないようにみえるが、三次元的にみると細胞間物質は容易にくも膜細胞や柔膜細胞の細胞間隙を通して流通するものと考えられる。したがって、この部位の tight junction は、物質交換を抑制することよりも、

細胞相互の密着性を保ち脳脊髄液に富む軟膜の構造維持に役立っているといえよう。

Andres⁴⁾とAnderson⁶⁾は、イヌ、ネコ、サルの軟膜に弾性線維を認めている。マウスの軟膜では、microfibril束は散見されたが弾性線維は認められなかった。ここでみられたmicrofibrilは、RR陽性で直径10 nmの中空構造をとることから、弾性線維microfibrilかもしれない。超微構造的に弾性線維は、中央のタンニン酸染色で濃染する無構造のエラスチン凝集体と、その周辺を取り囲む弾性線維microfibrilとからなる¹⁵⁾³⁶⁾。弾性線維の形成機序については、まず弾性線維microfibrilが凝集し、ついでmicrofibril束の中央にエラスチンが沈着して弾性線維が形成されるという考え方が有力である³⁶⁾³⁷⁾。マウスよりも高等な動物の場合には、軟膜のmicrofibril束内にエラスチンの沈着が進行して弾性線維が形成されることがありうるのかもしれないが、タンニン酸染色によって確かめる必要があると思われる。

結 論

くも膜下腔並びに硬膜下腔の微細構造を明らかにするために、マウス脳髄膜を電顕的に観察し、以下の結論を得た。

1) 硬膜最内層には一〜二層の線維芽細胞に類似した扁平な細胞が配列し、arachnoid membrane外層の細胞と約20 nmの間隔を隔てて隣接していた。硬膜下腔と呼ぶべき特殊な細胞間腔は認められなかった。

2) マウスのくも膜下腔は粗網状に配列するくも膜細胞間の広い細胞間隙であり、この中にはコラーゲン線維、microfibril、RR陽性粒子が散在していた。したがって、くも膜下腔は組織液の豊富な疎性結合組織間質空間と類似の構造であり、脳脊髄液は軟膜の細胞外マトリックスの中を通過して循環しているものと考えられた。

3) マウス軟膜には、従来の報告と異なっており、弾性線維は同定されなかった。また、くも膜細胞や柔膜細胞は所々tight junctionによって接着していた。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導を賜りました梶川欽一郎名誉教授、御校閲を賜りました中西功夫教授に深甚の謝意を表します。また、研究遂行に際して御助言、御協力を戴きました教室員各位と電子顕微鏡室技術員の方々に厚く御礼申し上げます。

文 献

1) Bloom, W. & Fawcett, D. W.: A textbook of histology, 10th ed., p 375-381, W. B. Saunders Co.,

Philadelphia, London & Toronto, 1975.

2) Ham, A. W. & Cormack, D. H.: Histology, 8th ed., p 515-521, J. B. Lippincott Co., Philadelphia & Toronto, 1979.

3) Pease, D. C. & Schultz, R. L.: Electron microscopy of rat cranial meninges. Am. J. Anat., 102, 301-321 (1958).

4) Andres, K. H.: Über die Feinstruktur der Arachnoidea und Dura mater von Mammalia. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., 79, 272-295 (1967).

5) Andres, K. H.: Zur Feinstruktur der Arachnoidalzotten bei Mammalia. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., 82, 92-109 (1967).

6) Anderson, D. R.: Ultrastructure of meningeal sheaths: Normal human and monkey optic nerves. Arch. Ophthalmol., 82, 659-674 (1969).

7) McLone, D. G. & Bondareff, W.: Developmental morphology of the subarachnoid space and contiguous structures in the mouse. Am. J. Anat., 142, 273-293 (1975).

8) Nabeshima, S., Reese, T. S., Landis, D. M. D. & Brightman, M. W.: Junctions in the meninges and marginal glia. J. Comp. Neur., 164, 127-169 (1975).

9) Rascol, M. M. & Izard, J. Y.: Arachnoidea and subarachnoid spaces of the vault of the skull in man. Acta Neuropath. (Berl.), 41, 41-44 (1978).

10) Nelson, E., Blinzinger, K. & Hager, H.: Electron microscopic observations on subarachnoid and perivascular spaces of the Syrian hamster brain. Neurology, 11, 285-295 (1961).

11) Frederickson, R. G. & Haller, F. R.: The subarachnoid space interpreted as a special portion of the connective tissue space. Proc. North Dak. Acad. Sci., XXIV, 142-159 (1971).

12) Lopes, C. A. S. & Mair, W. G. P.: Ultrastructure of the arachnoid membrane in man. Acta Neuropath. (Berl.), 28, 167-173 (1974).

13) Schachenmayr, W. & Friede, R. L.: The origin of subdural neomembranes. I. Fine structure of the dura-arachnoid interface in man. Am. J. Pathol., 92, 53-68 (1978).

14) Rascol, M. M. & Izard, J. Y.: The subdural neurothelium of the cranial meninges in man. Anat. Rec., 186, 429-436 (1976).

15) Kajikawa, K., Yamaguchi, T., Katsuda, S. & Miwa, A.: An improved electron stain for elastic

fibers using tannic acid. *J. Electron Microsc.*, **24**, 287-289 (1975).

16) Klika, E.: The ultrastructure of meninges in vertebrates. *Acta Univ. Carol. Med.*, **13**, 53-71 (1967).

17) Waggener, J. D. & Beggs, J.: The membranous coverings of neural tissues: An electron microscopy study. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, **26**, 412-426 (1967).

18) Weed, L. H.: The absorption of cerebrospinal fluid into the venous system. *Am. J. Anat.*, **31**, 190-221 (1923).

19) Tripathi, R. C.: Ultrastructure of the arachnoid mater in relation to outflow of cerebrospinal fluid: A new concept. *Lancet*, **2**, 8-11 (1973).

20) Friede, R. L. & Schachenmayr, W.: The origin of subdural neomembranes. II. Fine structure of neomembranes. *Am. J. Pathol.*, **92**, 69-84 (1978).

21) Klika, E.: L'ultrastructure des méninges en ontogenèse de l'homme. *Z. Mikr. Anat. Forschung*, **79**, 209-222 (1968).

22) Luft, J. H.: Electron microscopy of cell extraneous coats as revealed by ruthenium red staining. *J. Cell Biol.*, **23**, 54A-55A (1964).

23) Luft, J. H.: Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat. Rec.*, **171**, 347-368 (1971).

24) Luft, J. H.: Ruthenium red and violet. II. Fine structural localization in animal tissues. *Anat. Rec.*, **171**, 369-415 (1971).

25) Okada, Y., Nakanishi, I. & Kajikawa, K.: Ultrastructure of the mouse synovial membrane: Development and organization of the extracellular matrix. *Arthritis Rheum.*, **24**, 835-843 (1981).

26) Davson, H.: Physiology of the cerebrospinal fluid, p 282-285, J. & A. Churchill, London (1967).

27) Constantopoulos, G. & Dekaban, A. S.: Acid

mucopolysaccharides in the cerebrospinal fluid of patients with Hunter-Hurler's syndrome. *J. Neurochem.*, **17**, 117-120 (1970).

28) Stenman, S. & Vaheri, A.: Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin, in normal human tissues. *J. Exp. Med.*, **147**, 1054-1064 (1978).

29) Kuusela, P., Vaheri, A., Palo, J. & Ruoslahti, E.: Demonstration of fibronectin in human cerebrospinal fluid. *J. Lab. Clin. Med.*, **92**, 595-601 (1978).

30) Hay, E. D.: Extracellular matrix. *J. Cell Biol.*, **91**, 205s-223s (1981).

31) Hedman, K., Vaheri, A. & Wartiovaara, J.: External fibronectin of cultured human fibroblasts is predominantly a matrix protein. *J. Cell Biol.*, **76**, 748-760 (1978).

32) Fawcett, D. W.: The cell, 2nd ed., p 128-129, W. B. Saunders Co., Philadelphia, London & Toronto, 1981.

33) Shabo, A. L. & Maxwell, D. S.: The sub-arachnoid space following the introduction of a foreign protein: An electron microscopic study with peroxidase. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, **30**, 506-524 (1971).

34) Nabeshima, S. & Reese, T. S.: Barrier to proteins within the spinal meninges. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, **31**, 176-177 (1972).

35) Ramsey, H. J.: Fine structure of the surface of the cerebral cortex of human brain. *J. Cell Biol.*, **26**, 323-333 (1965).

36) Ross, R. & Bornstein, P.: The elastic fiber. I. The separation and partial characterization of its macromolecular components. *J. Cell Biol.*, **40**, 366-381 (1969).

37) Kadar, A., Gardner, D. L. & Bush, V.: The relation between the fine structure of smooth muscle cells and elastogenesis in the chick-embryo aorta. *J. Pathol.*, **104**, 235-260 (1971).

Key words:Meniges, Extracellular matrix, Subarachnoid space, Subdural space, Ultrastructure.

An electron microscopic study was performed to clarify the ultrastructure of the subarachnoid and subdural spaces in the mouse cranial meninges, with special reference to the components of the extracellular matrix. Ruthenium red stain was employed to reveal the structural components of the ground substance and tannic acid stain was done to identify elastic fibers. The dura mater was composed of fibrous connective tissue mainly consisting of densely packed collagen fibers, in which blood vessels, nerves and fibroblasts were intervened, and elastic fibers and bundles of microfibrils were scattered. Ruthenium red-positive filamentous material and particles were observed among these fibrous components. In the innermost portion of the dura mater, the flat cells similar to the dural fibroblasts were in direct contact with the cells belonging to the arachnoid membrane. A specialized extracellular space called the subdural space was not recognized. The arachnoid membrane was divided into outer and inner layers. The outer layer was composed of stratified flat cells with numerous tight junctions. The cells in the inner layer had complicatedly ramified cytoplasmic processes, some of which embraced connective tissue matrix components, such as collagen fibers and microfibrils. Between the arachnoid membrane and the brain parenchyma, there were a loose meshwork of arachnoid cells and a single, discontinuous layer of pial cells, both of which were embedded in a large amount of extracellular materials. No arachnoid trabeculae were observed. The extracellular materials consisted of ruthenium red-positive fine flocculent material and particles with intermixture of a small number of collagen fibers and microfibrils. Elastic fibers were not identified. These observations on the leptomeninx indicate that the subarachnoid space is not the canal lined with the leptomeningeal cells but the broad intercellular spaces of the arachnoid cells in which the connective tissue matrix components including the collagen fibers are present, also implying that the cerebrospinal fluid circulates through the broad extracellular matrix space.