

ラットのクモ膜下出血におけるクモ膜下腔の免疫細胞亜群の経時的変化

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: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9154

ラットのクモ膜下出血におけるクモ膜下腔の 免疫細胞亜群の経時的变化

金沢大学医学部脳神経外科学講座 (主任: 山下純宏教授)

久保田 鉄也

クモ膜下出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH) 後に起こる脳血管攣縮の原因は充分には明らかにされていないが、脳血管攣縮の病因において免疫反応の果たしている役割が注目されている。免疫反応が脳血管攣縮の病態に関与しているかどうかを解明するためには、SAH 後のクモ膜下腔に何らかの抗原が存在しているのか、クモ膜下腔に出現している細胞が異なる種類の免疫反応に関与しているのか、またその免疫反応と脳血管攣縮の間に時間的な相関関係はあるのか、という点を明らかにしなければならない。これらの問題を解決するために、ラットの実験的 SAH モデルを作製し、SAH 後のクモ膜下腔における免疫細胞亜群の経時的变化を解析した。108匹の Sprague-Dawley ラットを2群に分け、一方に 0.3ml の自家血を大槽内に注入し、これを SAH 群とした。他方には、同量の生理食塩水を注入してこれを生食群とした。SAH 導入から10分後、1, 2, 3, 5, 7 日後の各時期にラットを屠殺し、脳を摘出した。各時期毎に HE 染色を行い、クモ膜下腔および脳底動脈の組織学的変化を観察した。また、T 細胞亜群と主要組織適合性遺伝子複合体 (major histocompatibility complex, MHC) クラス II 陽性細胞の出現を免疫組織化学染色により観察した。フローサイトメトリーを用いて、各時期毎に抗マクロファージ抗体および T 細胞亜群の各抗体 (CD5, CD4, CD8) に、それぞれ陽性の細胞の出現率を測定した。脳底動脈の内腔の狭小化、外膜への単核細胞出現などの組織学的変化が観察され、これらの変化は SAH 2 日後、3 日後に最も顕著であった。免疫組織化学では、クモ膜下腔における MHC クラス II 陽性細胞の増加が SAH 1~3 日後に認められ、その増加は T 細胞亜群の出現に先行していた。フローサイトメトリーでは、抗マクロファージ抗体陽性細胞の出現率が、SAH 2 日後に最も高値 ($13.5 \pm 2.5\%$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$) を示した。SAH 群における CD4/CD8 比は、SAH 2 日後に有意に高値 (3.21 ± 0.89) となった。本実験の結果は、SAH 後のクモ膜下腔において、マクロファージによる抗原情報の提示と T 細胞による遅延型過敏反応が起きていることを示している。これらの一連の反応が、脳血管攣縮の発生に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

Key words cerebral vasospasm, subarachnoid hemorrhage, T lymphocyte, macrophage, cellular immunity

脳動脈瘤破裂によるクモ膜下出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH) では、約40%の患者が死亡あるいは重篤な神経症状をきたす¹⁾。SAH 症例の予後に影響を及ぼす病態として、SAH 急性期に起こる頭蓋内圧亢進、急性水頭症、脳ヘルニア等に加えて、遅発性脳血管攣縮が重要である¹⁾。遅発性脳血管攣縮は、SAH 発症後数日経過した時期より脳底部主要動脈に攣縮が発生し、SAH 7~10日後の時期にその攣縮のピークを示す現象である。その結果として、攣縮動脈の灌流域は脳虚血の状態に陥り、生命的あるいは機能的予後に重要な影響を及ぼす。脳血管攣縮の病因に関しては未だ完全に解明されていないが、オキシヘモグロビン²⁾、トロンボキサン³⁾、ロイコトリエン⁴⁾、血小板活性化因子⁵⁾、など、クモ膜下腔の血腫由来もしくは血腫と密接な関係を持つ血管収縮物質の関与が報告されてきた。しかしながら、これらの物質は、いずれも単独では脳血管攣縮の機転を十分には説明し得ないものであり、複数の物質あるいは因子が、協調的に働いて脳血管攣縮を惹起すると考えら

れている。

一方、SAH 後のクモ膜下腔において何らかの免疫あるいは炎症に関連した反応が起きていることが、多くの研究により示されてきた。SAH 患者の剖検例では、クモ膜下腔での免疫あるいは炎症細胞の出現⁶⁾や、攣縮を示した動脈壁への免疫グロブリンと補体 C3 の沈着⁷⁾が観察され、SAH 後の患者の脳脊髄液中では、T 細胞活性化因子のマーカーであるネオプテリン⁸⁾や、インターロイキン 6 (interleukin-6, IL-6)⁹⁾の上昇が認められた。また、脳血管攣縮を示した患者の末梢血中では、全身的な免疫反応の存在を示す免疫複合体が上昇することが報告された¹⁰⁾。以上の事実は、SAH 後の脳血管攣縮の発生に関して免疫学的反応が何らかの役割を果たしていることを強く示している。免疫反応は液性免疫反応と細胞性免疫反応に大別されるが、上記の報告では、SAH 後のクモ膜下腔および動脈壁周囲では、液性免疫と細胞性免疫の両者に関連する因子の存在が報告されていることから、両者の相互作用が起きていることが

平成7年6月7日受付, 平成7年8月11日受理

Abbreviations: CD, cluster of differentiation, DAB, diaminobenzidine tetrahydrochloride; FITC, fluorescein isothiocyanate; IL, interleukin; MHC, major histocompatibility complex; PBS, phosphate-buffered saline; SAH, subarachnoid hemorrhage

推測されるが、SAH 後のクモ膜下腔に生じる免疫反応の質的特徴やその経時的な変化に関して詳細な検討はなされていない。もし、SAH 後のクモ膜下腔に抗原の存在を前提とした免疫反応が惹起されるのであれば、同部に出現する免疫細胞亜群のそれぞれに特徴的な経時変化が見られるはずである。また、脳血管攣縮発生の機序に対しての免疫反応の責任的関与を検討するためには、SAH 後のクモ膜下腔で起こっている免疫反応について、以下の点を解明する必要があると考えられる。SAH 後のクモ膜下腔には何らかの抗原が出現するのか、脳血管攣縮発生の時期と免疫反応の時期には時間的相関関係があるのか、免疫反応のいずれのプロセスが脳血管攣縮に最も影響を及ぼしうるのか、という点についてである。本研究では、ラットを用いて、実験的クモ膜下出血を作製し、クモ膜下腔における免疫反応に特異的な免疫細胞亜群出現の経時変化を、免疫組織化学的方法およびフローサイトメトリーの方法を用いて解析した。それらの結果から、SAH 後の脳血管攣縮発生の機転における上記の問題について検討した。

材料および方法

1. 実験動物

空調飼育室(室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 5\%$)で飼育している体重 $200 \sim 400\text{g}$ の雄 Sprague-Dawley ラット(クレア, 大阪) 108匹を用いた。無作為に、54匹ずつの SAH 作製群(SAH 群)と、対照としての生食群の2群に分けた。

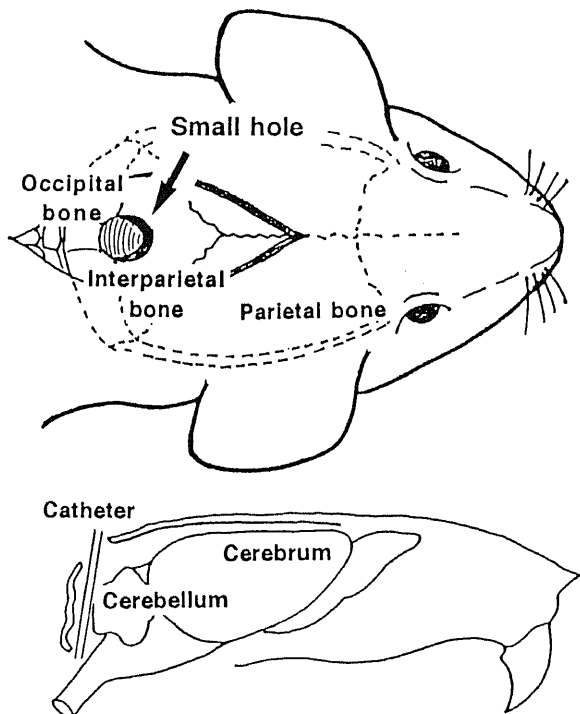


Fig. 1. Schematic representation of implantation of the catheter into the cisterna magna of the rat. An animal was placed in a prone position. The scalp was incised, and a small hole was made in the midline just rostral to the interparietaloccipital suture. The catheter was passed through the hole, sliding along the inner table of occipital bone.

II. クモ膜下出血作製

1. 実験準備

全動物108匹についてシリコンカテーテルを大槽内に留置した。ペントバルビタール(ダイナボット, 大阪) 50mg/kg の腹腔内注射によって全身麻酔を行い、自発呼吸下に以下の処置を行った。皮切部位は十分に剃毛し消毒を行い、手術器具は乾熱滅菌したものを使用して、無菌的に外科的処置を行った。図1に示したように、頭皮を正中にて線状切開し、正中線上の後頭骨と頭頂間骨の縫合線吻側に小孔を設けた。小孔を通じて後頭骨内側面に沿わせてシリコンカテーテル(外径 1mm , 内径 0.5mm) (ダウ・コーニング, 神奈川) を挿入し、先端は大槽内に位置するように留置した。管内の閉塞を防止する目的にて3-0 ナイロン糸をカテーテル管内に封入し、頭皮を縫合した。

2. クモ膜下腔内血液注入と群分け

大槽内にカテーテルを留置してから7~10日後に、全動物に対して、再びペントバルビタール(50mg/kg)の腹腔内投与により麻酔を行った。大腿動脈に22Gのエラスター針を挿入して自家動脈血 1ml を採取した。SAH 群では、頭部を20度下降させ、頭皮を再切開し、あらかじめ留置しておいたカテーテルを通じて大槽内に自家動脈血 0.3ml を約3分間かけて注入することにより、人工的な SAH を作製した。生食群では、同様の方法および手技にて、自家動脈血のかわりに生理食塩水 0.3ml を注入した。

III. 屠殺および固定

自家血あるいは生理食塩水を注入してから10分後、1日後、2日後、3日後、5日後、および7日後の各時期においてそれぞれ9匹ずつ屠殺した。各時期に屠殺する9匹のうち2匹は HE 染色に、2匹は免疫組織化学染色に、残りの5匹はフローサイトメトリーに用いた。屠殺時には、ペントバルビタール(80mg/kg) 腹腔内投与の深麻酔下に、経心臓的に生理食塩水 300ml による全身灌流を行った。灌流後速やかに、頭蓋より脳を摘出した。フローサイトメトリーの解析に用いるラットについては、灌流直前に 1ml の末梢血を心臓から採取した。

HE 染色および免疫組織化学のために、クモ膜に包まれた脳底動脈を含む脳幹部を切り出した。HE 染色用の試料は、 10% ホルマリン液にて固定した後、パラフィンに包埋した。免疫組織化学用の脳幹部組織は未固定の状態にて凍結切片用包埋剤 OCT コンパウンド (Tissue-Tek Products, Miles Inc, Eikhardt, USA) に包埋し、直ちに液体窒素に浸して凍結ブロック標本として -80°C にて保存した。

IV. HE 染色

パラフィンブロックから厚さ $5\mu\text{m}$ の水平断切片を作成し、HE 染色を行い、脳幹、クモ膜下腔および脳底動脈の組織学的変化を観察した。

V. 免疫組織化学

クリオスタット COLDTOME CM-41 (サクラ精機, 東京) を用いて、厚さ $10\mu\text{m}$ の水平断切片を作成した。各動物の脳ブロックより30枚ずつの切片を採取した。切片標本は、スライドガラスに載せて乾燥1時間の後に、室温でウサギ正常血清と10分間反応させた。24枚の切片を一次抗体にて 4°C で24時間反応させた。一次抗体として用いたモノクローナル抗体は、抗ラット CD3 マウス抗体 (IF4) ($1:100$) (生化学工業, 東京), 抗ラット CD4 マウス抗体 (W3/25) ($1:8000$) (Chemicon International, CA, USA), 抗ラット CD8 マウス抗体 (R1-10B5) ($1:100$)

(生化学工業), 抗ラット主要組織適合性遺伝子複合体 (major histocompatibility complex, MHC) クラス II (MRC, OX6) マウス抗体 (1:10000) (Serotec, Oxford, UK) である。6枚の切片は陰性対照としてウサギ正常血清と反応させた。一次抗体と反応させた切片は、ビオチン標識抗マウス免疫グロブリン・ヤギ抗体 (ダコ・ジャパン, 京都) と室温で10分間反応させ、次いでペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ダコ・ジャパン) と室温で10分間反応させた。発色は、ジアミノベンチジン (diamino-benzidine tetrahydrochloride, DAB) 反応を用い 0.2% DAB (同仁化学研究所, 熊本), 0.01% H_2O_2 溶液と 5分間反応させた。最後に、ヘマトキシリンにて核染色を行った。各反応過程の間では、0.1M リン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) にて充分なる洗浄を繰り返し行った。

VI. フローサイトメトリー

Suyu らの方法¹²⁾ に従い、以下の手順によりフローサイトメトリーの試料を作製した。摘出した未固定の全脳を、剪刀およびホモゲナイザー (直径 23mm, 高さ 24mm の円柱形の樹脂にステンレス棒をさし込んで製作したもの) を用いて機械的に細片化した後に、DNase I (0.1mg/ml) (Sigma, MO, USA), コラゲナーゼ (1mg/ml) (Sigma), ヒアルロニダーゼ (2.5 μ /ml)

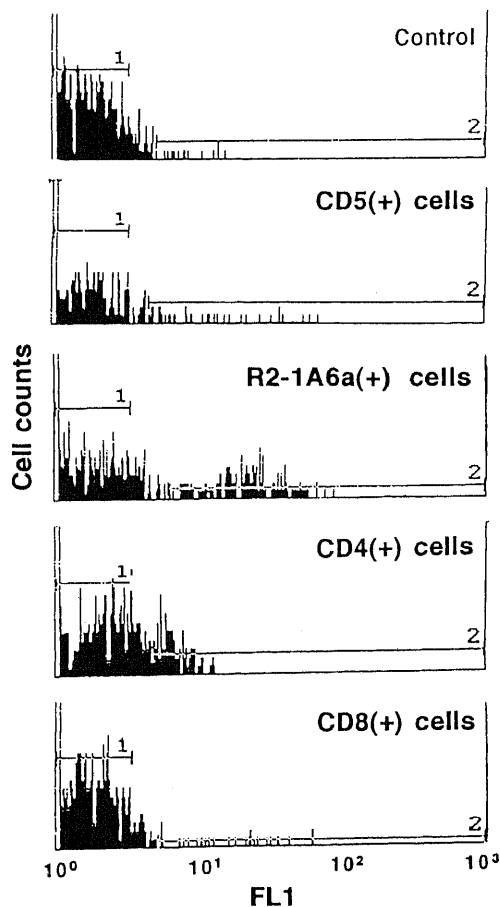


Fig. 2. Fluorescence intensity histograms for fluorescein isothiocyanate obtained from brain tissue. Area 1 (1), a cluster of fluorescein isothiocyanate-negative cells and debris of the tissue; area 2 (2), a cluster of fluorescein isothiocyanate-positive cells; FL1, intensity of fluorescence of fluorescein isothiocyanate. The vertical axis is determined by an autoscaling method.

(Sigma), をダルベッコ変法イーグル培養液に溶解した混合液で処理して、単細胞浮遊液を作製した。抗ラット CD5 マウス抗体 (R1-3B3) (生化学工業), 抗ラット CD4 マウス抗体 (RTH-7) (生化学工業), 抗ラット CD8 マウス抗体 (R1-10B5) (生化学工業), 抗ラットマクロファージマウス抗体 (R2-1A6a) (生化学工業) をそれぞれ PBS を用いて 1:20 に調整して、一次抗体として使用した (R2-1A6a に関しては、相当するヒトの表面抗原が存在しないため、便宜的に以下、これを抗マクロファージ抗体と称した。)。単細胞浮遊液を 1ml ずつ分注して、それぞれの一次抗体 20 μ l と 0 $^{\circ}$ C で 30分間反応させた。フルオレスセイン・イソチオシアン酸 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識抗マウス免疫グロブリン・ヤギ抗体 (Becton Dickinson, CA, USA) を、PBS で 1:50 に希釈して、二次抗体として用い、0 $^{\circ}$ C で 30分間反応させた。対照として用いた単細胞浮遊液には、一次抗体の代わりに同量の PBS を滴下し、一次抗体を加えた試料と同様の手順で、FITC 標識抗マウス免疫グロブリン・ヤギ抗体と反応させた。染色した試料については、直ちにフローサイトメーター EPICS Profile (Coulter, Hialeah, FL, USA) を用いて陽性細胞出現率の測定を行った。あらかじめ各ラットの末梢血 1ml を低張液で処理して赤血球を破壊した後に、リンパ球および単球の分布を測定して、ゲートを決定した。このゲートを利用して、全脳から作製した単細胞浮遊液中のリンパ球および単球の分布を決定した。各一次抗体に陽性の細胞の出現率は、図 2 に示したようなヒストグラムから、全分画に対する各抗体陽性の分画の面積比を測定することによって算出されるが、この値は FITC 標識抗マウス免疫グロブリン・ヤギ抗体と非特異的に反応する細胞の出現率を含んでいる。対照として作製した試料のヒストグラムから、FITC 標識抗マウス免疫グロブリン・ヤギ抗体と非特異的に反応する細胞の出現率が算出されるので、この値を差し引くことにより、各一次抗体に陽性の細胞の真の出現率を算出した。また、CD4 および CD8 陽性細胞の出現率から CD4/CD8 比を計算した。各モノクローナル抗体陽性細胞の出現率について、SAH 群と生食群の両群間で、また各群の各時間間で有意差を検討した。また、CD4/CD8 比は、SAH 群の各時間間で有意差を検討した。検定は Student *t* 検定を採用した。

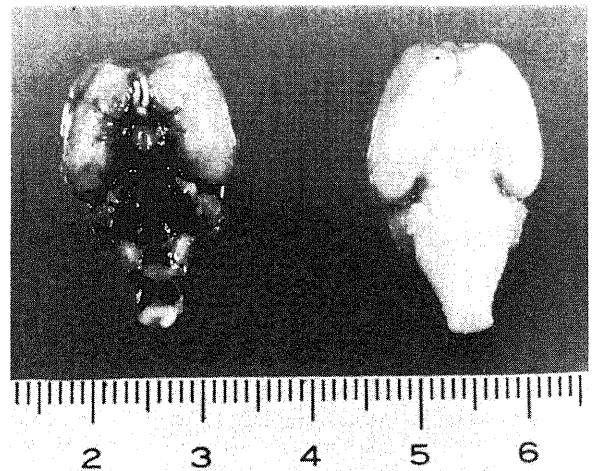


Fig. 3. Gross appearance of the ventral surface of the removed brains. Right, normal brain; left, 10 min after subarachnoid injection of arterial blood.

成 績

1. 肉眼所見

SAH 作製10分後に屠殺したラットの脳標本では、脳底部および脳幹周囲のクモ膜下腔に血腫が充満していることが観察された(図3)。その後の各時期の脳標本では、クモ膜下腔の血腫は時期を経るにしたがって徐々に減少し、SAH 5, 7日後の脳では脳底部の血腫はほぼ消失した。

II. HE 染色

正常ラットの脳底動脈、クモ膜、脳実質、およびクモ膜下腔

の組織像を図4Aに示した。SAH 作製10分後(0日目)(図4B)では、多量の赤血球が脳底動脈周囲のクモ膜下腔に充満しているが、脳底動脈壁自体の構造的な変化は全く生じていなかった。SAH 作製2日後、3日後(図4C, 4D)では、脳底動脈には内膜の波状変化、内腔の狭小化、内弾性板の肥厚、中膜筋層の肥厚と平滑筋細胞の変性像、外膜線維成分の増殖性変化が観察され、SAH 後の他の時期に比して最も顕著な病理学的変化を示した。また、脳底動脈の外膜層およびクモ膜下腔には多数の単核細胞の出現が観察された。SAH 5日後、7日後(図4E, 4F)では、脳底動脈での上記の病理学的変化は緩解し、クモ

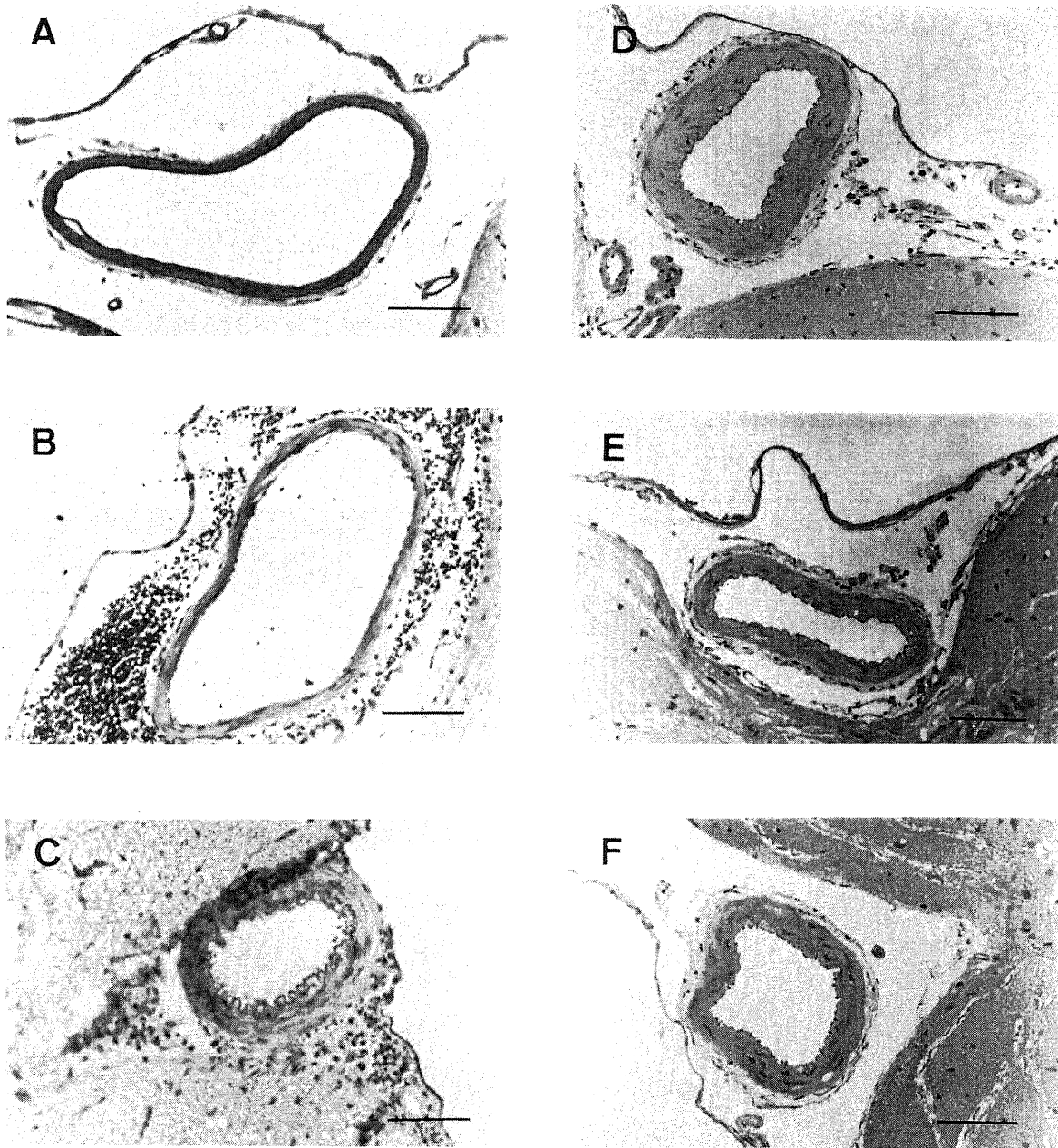


Fig. 4. HE staining of the subarachnoid space including the basilar artery. Bar=200 μ m. (A) Normal control. (B) Ten min after subarachnoid hemorrhage (SAH). Numerous erythrocytes are seen in the subarachnoid space. (C) Two days after SAH. The vascular lumen of the basilar artery narrows and cells infiltrate in the subarachnoid space. (D) Three days after SAH. Narrowing of the vascular lumen and sparse cell infiltration are seen. (E) Five days after SAH. Narrowing of the vascular lumen is alleviated. Sparse cell infiltration is seen. (F) Seven days after SAH. Mild narrowing of the vascular lumen and minimal cell infiltration are seen.

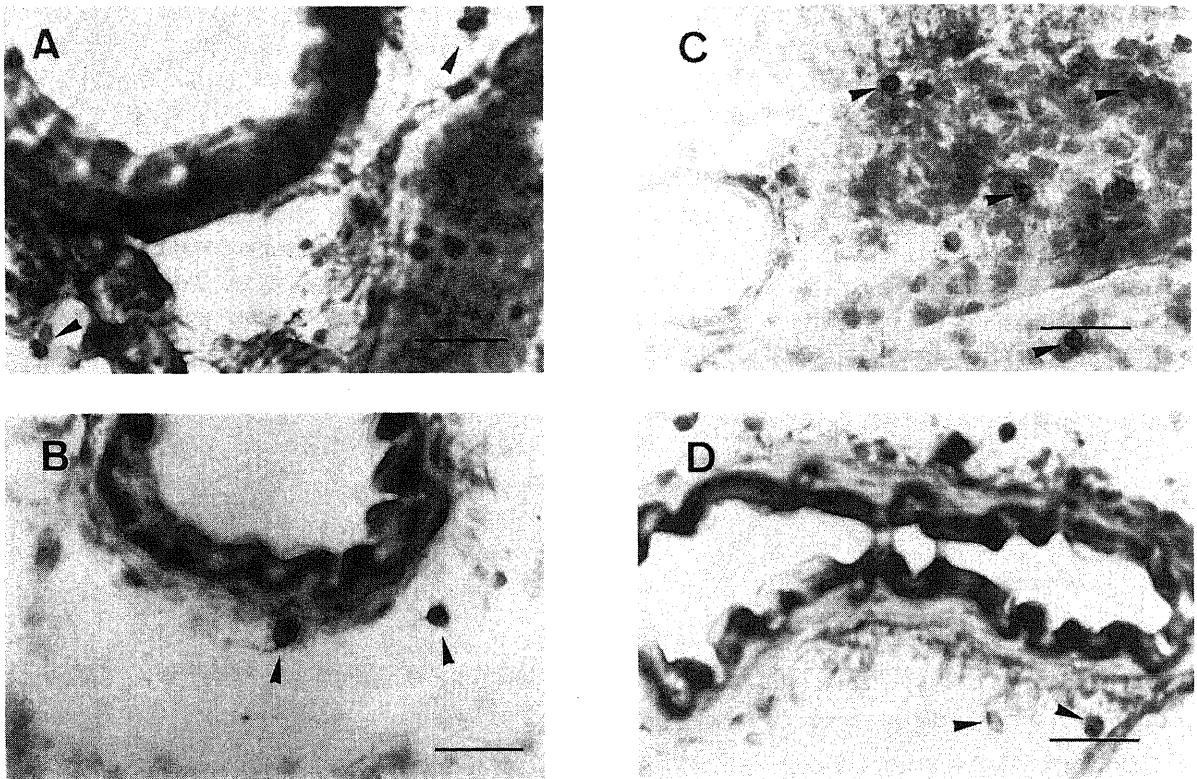


Fig. 5. Immunohistochemical staining of the rat brain tissue using an antibody against major histocompatibility complex class II. Arrowheads indicate positively stained cells in the subarachnoid space including the basilar artery. Bar=100 μ m. (A) One day after induction of subarachnoid hemorrhage (SAH). (B) Two days after SAH. (C) Three days after SAH. (D) Five days after SAH.

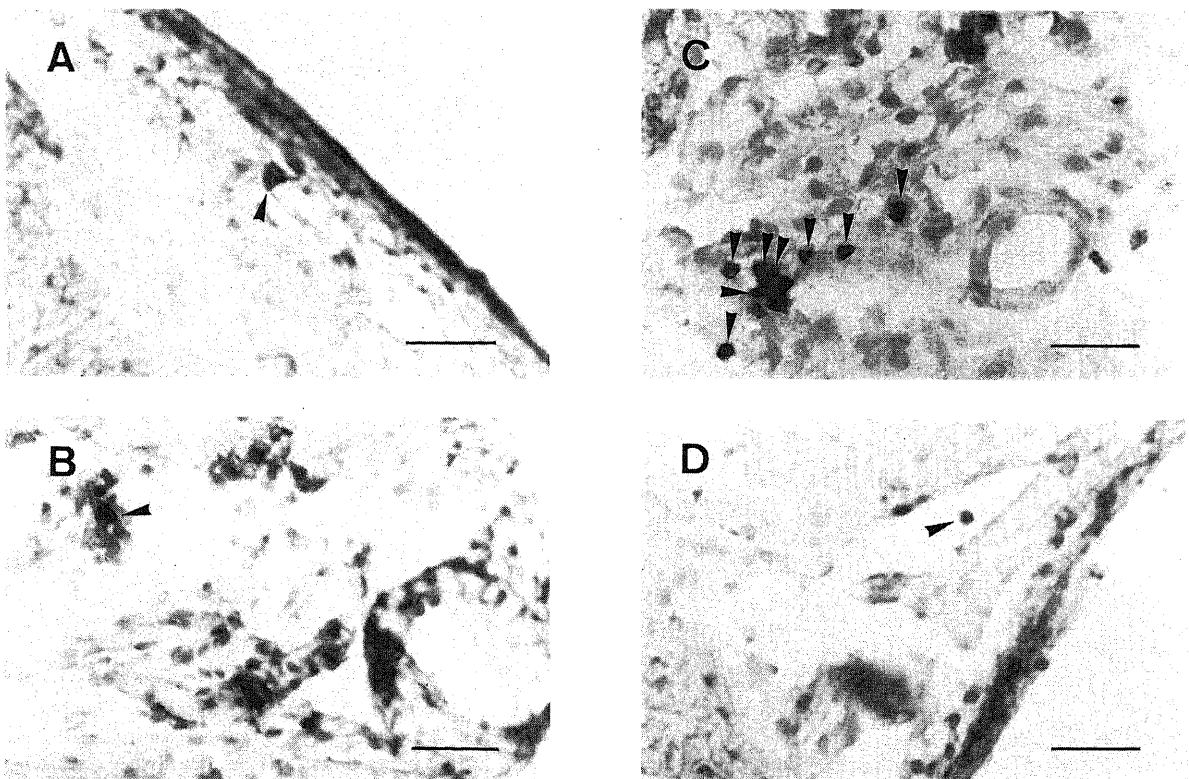


Fig. 6. Immunohistochemical staining of the rat brain tissue using an antibody against CD3 molecule. Arrowheads indicate positively stained cells in the subarachnoid space including the basilar artery. Bar=100 μ m. (A) One day after induction of subarachnoid hemorrhage (SAH). (B) Two days after SAH. (C) Three days after SAH. (D) Five days after SAH.

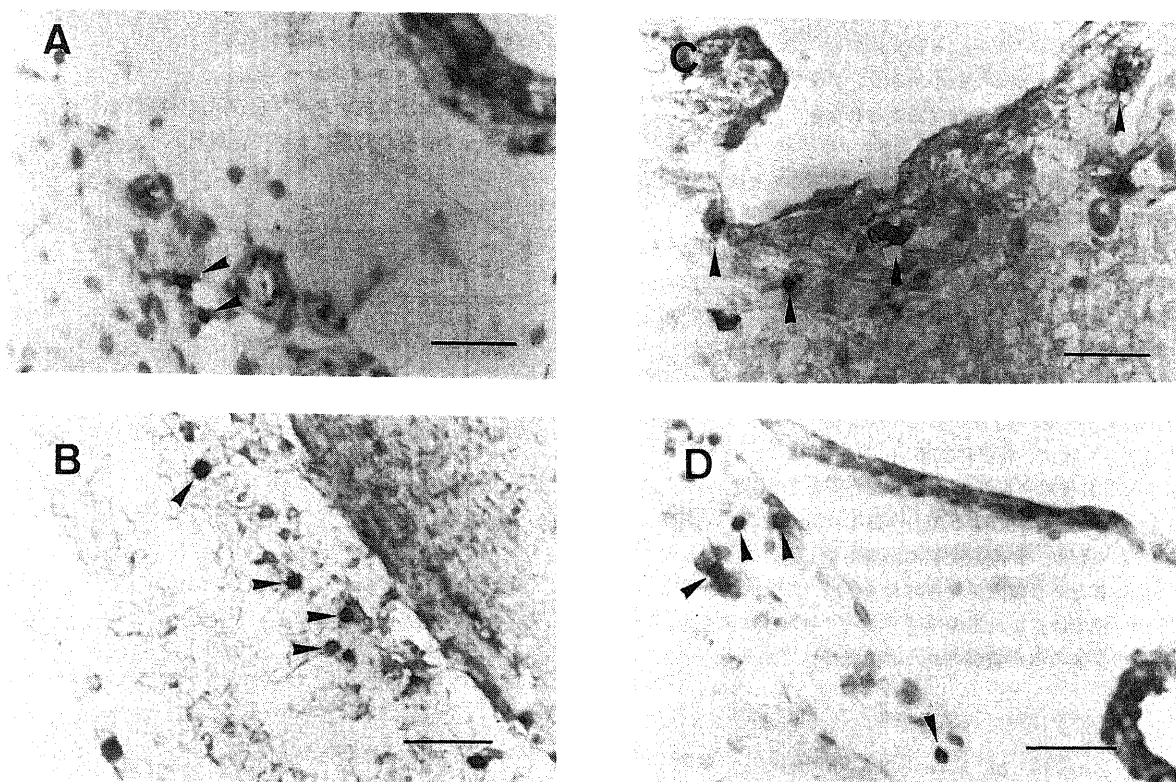


Fig. 7. Immunohistochemical staining of the rat brain tissue using an antibody against CD4 molecule. Arrowheads indicate positively stained cells in the subarachnoid space including the basilar artery. Bar=100 μ m. (A) One day after induction of subarachnoid hemorrhage (SAH). (B) Two days after SAH. (C) Three days after SAH. (D) Five days after SAH.

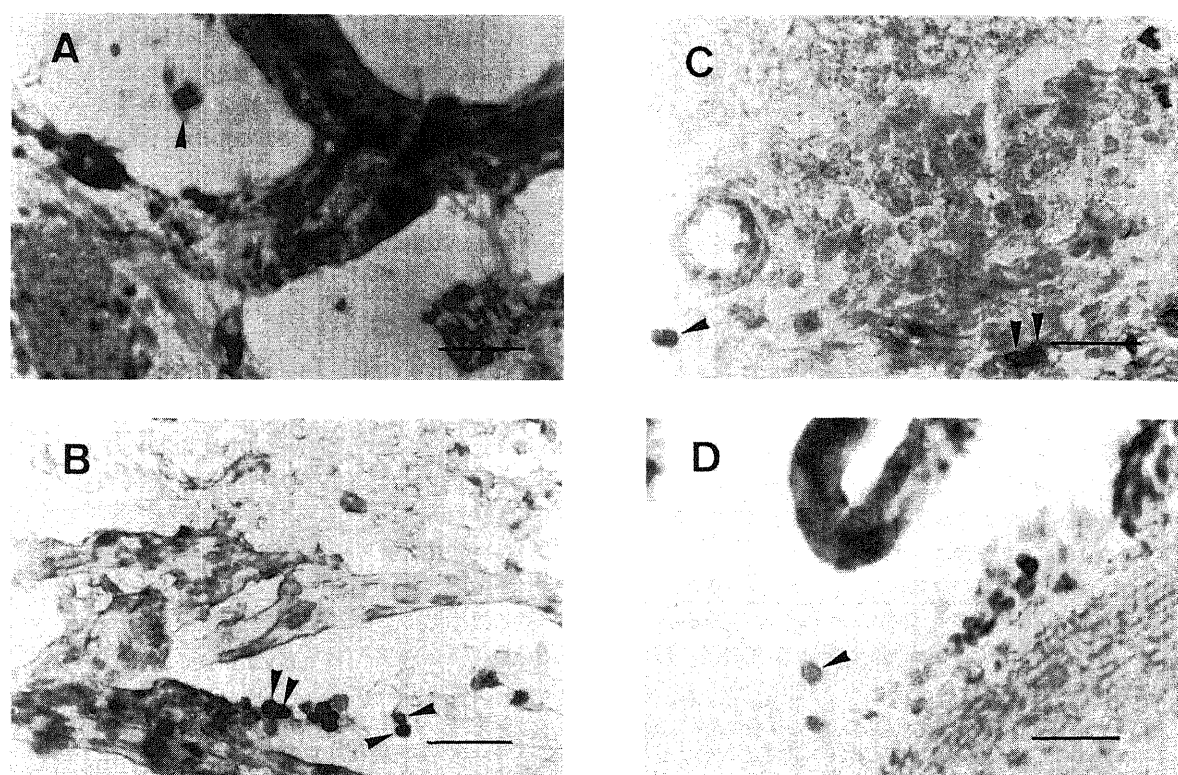


Fig. 8. Immunohistochemical staining of the rat brain tissue using an antibody against CD8 molecule. Arrowheads indicate positively stained cells in the subarachnoid space including the basilar artery. Bar=100 μ m. (A) One day after induction of subarachnoid hemorrhage (SAH). (B) Two days after SAH. (C) Three days after SAH. (D) Five days after SAH.

膜下腔での単核細胞の出現も減少した。生食群では、生理食塩水クモ膜下腔注入後のいずれの時期においても、脳底動脈での病理組織学的変化は極めて微小であり、クモ膜下腔あるいは脳底動脈壁への単核細胞の浸潤は認められなかった。

Ⅲ. 免疫組織化学

SAH 群の SAH 1～5 日後の時期においてクモ膜下腔の脳底動脈の周囲に抗 MHC クラス II 抗体、抗 CD3 抗体、抗 CD4 抗体、および抗 CD8 抗体にそれぞれ陽性の単核細胞が観察されたが、脳実質内には全く認められなかった。クモ膜下腔での MHC クラス II 陽性細胞の出現は、SAH 1～3 日後に最も顕著であり一視野 (20 倍) に 10 個以上認められた (図 5)。CD3 陽性細胞は、SAH 3～5 日後の時期に多数出現しており、一視野におよそ 5～10 個であった (図 6)。CD4 陽性細胞は SAH 2～5 日後に、視野に 10 個以上 (図 7)、CD8 陽性細胞は SAH 2～5 日後に一視野に 5～9 個 (図 8) 出現していた。MHC クラス II 陽性細胞は SAH 作製 1 日後の時期にすでに多数観察されており、T 細胞亜群の出現が少し遅れて 2 日後から増加しているという傾向が見られた (表 1)。また、SAH 7 日後のクモ膜下腔では、これらのモノクローナル抗体に陽性の細胞は、極めて少数のみが観察された。生食群ラットの標本では、

Table 1. Grading of appearance of reaction-positive cells

Monoclonal antibody	Appearance ^{a)} of reaction-positive cells on day					
	0	1	2	3	5	7
MHC class II	—	‡	‡	‡	+	—
CD3	—	±	±	‡	+	—
CD4	—	+	‡	‡	‡	—
CD8	—	±	+	+	+	—

^{a)} Number of reaction-positive cells/high power field: —, 0; ±, 1~2; +, 3~9; ‡, ≥10.

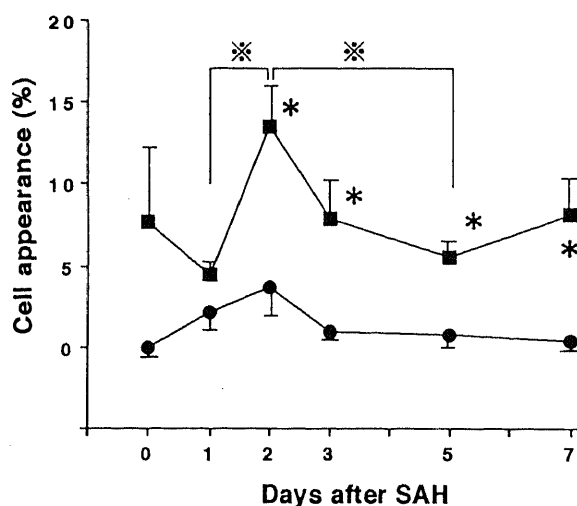


Fig. 9. The time course of the percentage of appearance of R2-1A6a (+) cells after subarachnoid hemorrhage (SAH) in brain tissues. Day 0 refers to 10 min after induction of SAH. Vertical bars indicate SEM. ■, SAH group; ●, saline group. *, $p < 0.05$, compared with saline group for each survival time; ※ $p < 0.05$, intergroup comparison in SAH group.

いずれのモノクローナル抗体に陽性の細胞も、クモ膜下腔あるいは脳実質内には観察されなかった。

Ⅳ. フローサイトメトリー

SAH 群における抗マクロファージ抗体陽性細胞の出現率は SAH 2～7 日後の時期において、対照としての生食群にお

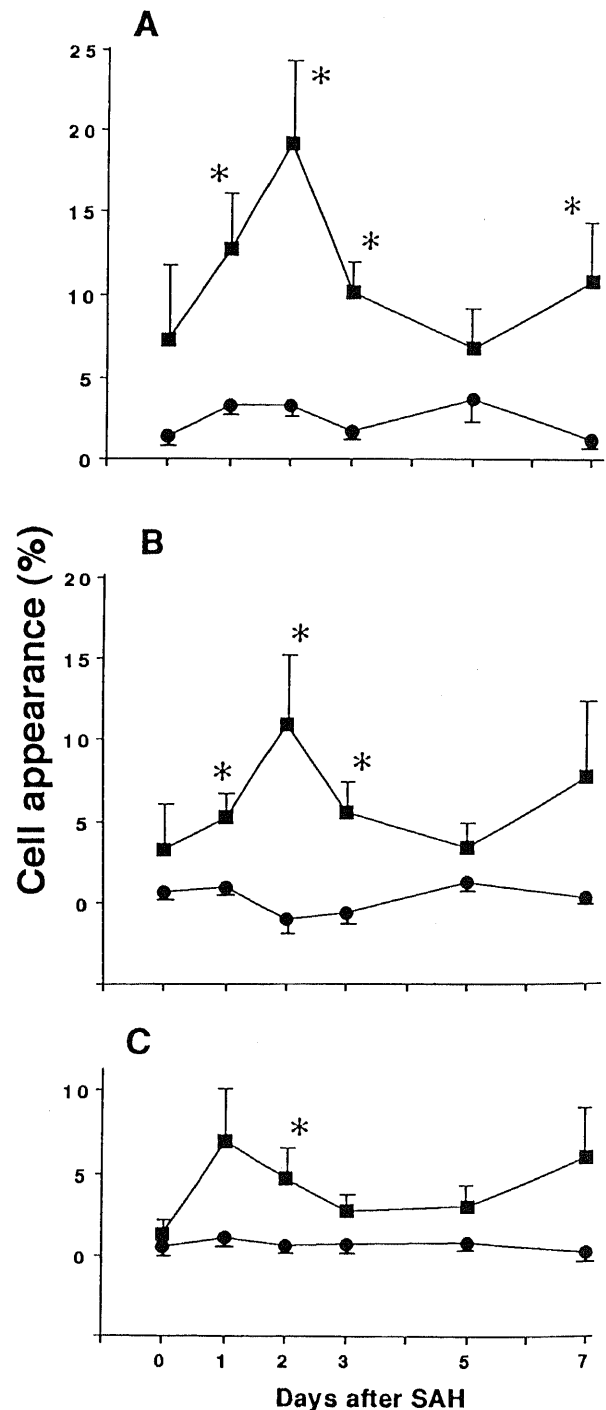


Fig. 10. The time course of the percentages of appearance of CD5 (+), CD4 (+), and CD8 (+) cells after subarachnoid hemorrhage (SAH) in brain tissues. Day 0 refers to 10 min after induction of SAH. Vertical bars indicate SEM. ■, SAH group; ●, saline group. (A) CD5 (+) cells. (B) CD4 (+) cells. (C) CD8 (+) cells. *, $p < 0.05$ compared with saline group for each survival time.

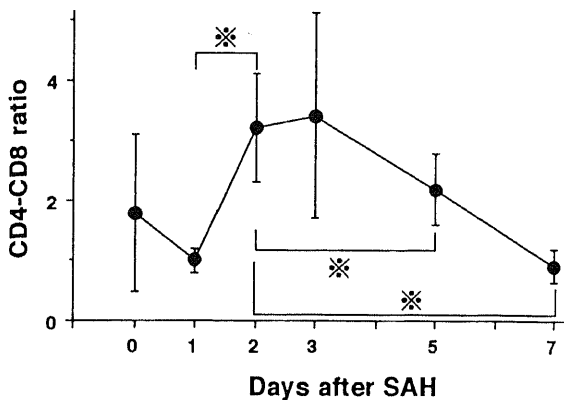


Fig. 11. The time course of ratio of CD4 (+) cells to CD8 (+) cells in brain tissue after subarachnoid hemorrhage (SAH). Day 0 refers to 10 min after induction of SAH. Vertical bars indicate SEM. All five animals were used each day. ※, $p < 0.05$, intergroup comparison.

る出現率に比べ有意 ($p < 0.05$) の高値を示した。SAH 群において各時期の陽性細胞出現率を比較すると、SAH 2日後に $13.5 \pm 2.5\%$ ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) と、他の時期に比べて有意 ($p < 0.05$) の高値を示した (図 9)。

CD5 陽性細胞の出現率は、SAH 群では SAH 1, 2, 3, 7 日後の時期において生食群での出現率に比べて有意 ($p < 0.05$) の高値を示した。この細胞の出現率は、SAH 群では、SAH 2日後に最高値 ($19.2 \pm 5.2\%$) に達したが、SAH 後の各時期の間では有意差は認められなかった (図 10A)。SAH 群での CD4 陽性細胞の出現率は、SAH 1~3 日後の時期において生食群での出現率よりも有意 ($p < 0.05$) に高値であったが、SAH 後の各時期の間では特に有意な差は認められなかった (図 10B)。CD8 陽性細胞は、SAH 2日後においてのみ、SAH 群での陽性細胞出現率は生食群での出現率に比して、有意 ($p < 0.05$) の高値をとった (図 10C)。

SAH 群における CD4/CD8 比の経時的変化を検討すると、SAH 1 日後より上昇が見られ、SAH 2 日後において 3.21 ± 0.89 と最高値を示し、これは SAH 後の時期に比べて有意 ($p < 0.05$) の高値であった (図 11)。

考 察

SAH 後の遅発性脳血管攣縮の成因論に関しては、機能的な血管収縮を重視する仮説と、器質的な血管の変化を重視する仮説に大別される。機能的血管収縮に関しては、血管平滑筋細胞を収縮させる因子として、前述のごとく血腫由来のオキシヘモグロビン²⁾、トロンボキサン³⁾、ロイコトリエン⁴⁾、血小板由来成長因子¹³⁾、プロテインキナーゼ C¹⁴⁾、エンドセリン¹⁵⁾などの物質の関与が報告されている。一方、攣縮脳血管の器質的な変化に関しては、マクロファージやリンパ球などのクモ膜下腔への出現⁹⁾や、中膜平滑筋層の組織の線維化など、血管壁に慢性炎症の反応が起こっていることを示唆する所見が報告されている。SAH の臨床例においては、血小板活性化因子⁵⁾、ネオプテリン⁶⁾、IL-6⁶⁾、免疫複合体¹⁰⁾など免疫反応の活動を示す物質の増加が報告されている。動物モデルで実験的に作製した SAH の場合でも、クモ膜下腔に免疫細胞が出現すること¹⁰⁾が報告されている。また、免疫抑制剤としてのサイクロスポリンを投与

した動物では SAH 後の脳血管攣縮が抑制されることが報告されている¹⁰⁾。同剤は IL-2 の遺伝子を抑制することによって T 細胞の分化を抑制し、その結果、細胞免疫反応を抑制すると考えられている²⁰⁾。これらの報告は、SAH 後のある時期において免疫反応が起こり、特に T 細胞が関与した免疫反応の活動期が存在し、結果的には攣縮動脈は免疫反応後の慢性炎症の病理組織像を示すものと推測される。

SAH 後の免疫反応を説明する上では、クモ膜下腔にいかなる抗原が存在しているのかを明らかにすることが必要であり、これまでに抗原となりうる物質が報告されている。Peterson らは、SAH 後の変性した血腫が自己抗原になりうることを述べている²¹⁾。Handa らは、サルを用いて、SAH 後に著しい脳血管攣縮を来した動脈の壁に、免疫複合体が沈着することを観察し、SAH 後損傷を受けた動脈壁組織自体が抗原となりうる可能性を示唆した²²⁾。本研究では、抗原を認識するマクロファージや抗原情報提供能を有する MHC クラス II 陽性細胞の出現およびその数の増加を、SAH 後 1~3 日後の時期に認め、SAH 後のクモ膜下腔に抗原が出現する可能性を示唆する。しかし、抗原の内容に関しては未だ確定されていない。

本研究では、まず形態学的に免疫細胞亜群の出現の動態を観察することにより、脳血管攣縮発生と免疫反応の相関関係を検討した。クモ膜下腔への出現を認めた免疫細胞の中では、MHC クラス II 陽性細胞の出現とその数の増加が、SAH 1 日後から認められた。これは、SAH 2 日後から見られる T 細胞系の表面抗原陽性細胞の増加に先行するものである。この MHC クラス II 陽性細胞の早期の出現は、抗原認識を前提とした T 細胞の反応を誘導する免疫反応が、クモ膜下腔にまず出現することを示している。本研究では、クモ膜下腔にて誘導されたと考えられる T 細胞系の細胞亜群の経時的な変化をフローサイトメトリーを用いて半定量的に解析した。

フローサイトメトリー用の測定試料として単細胞浮遊液を作製するため、摘出した脳を機械的に細片化し DNase I, コラゲナーゼ、およびヒアルロニダーゼの酵素混合液を用いて処理した。これらの酵素は、結合組織と組織残渣に主に作用する。ラットでは、脳腫瘍組織において、機械的処理と酵素処理後もその細胞の 80% の生存率が報告されている²⁰⁾。本研究においても、単細胞浮遊液を作製する過程における免疫細胞の損傷は無視しうる最低限度のものと考えられる。免疫組織化学の標本の検索の結果、本研究の実験的クモ膜下出血後の脳では、免疫細胞がクモ膜下腔のみに存在しており脳実質内に存在していないことが示された。したがって、本研究のフローサイトメトリーによる測定結果は、クモ膜下腔に存在する免疫細胞の経時的かつ定量的変化を反映しているものと考えられる。フローサイトメトリーによる測定では、非特異的に FITC 標識抗マウス免疫グロブリン・ヤギ抗体と反応した細胞の出現率を差し引いて特異的に各一次抗体に反応した細胞の真の出現率を算出したが、この方法では、特異的に反応した細胞が皆無に近い場合には負の値の陽性細胞出現率が得られる可能性がある。本実験結果においても一部の試料では、出現率が -2% 程度の負数を示した。これらの試料は、すべて生食群の試料であり、同群のラットの脳のクモ膜下腔には免疫細胞がほとんど出現していなかったことを示すと思われる。SAH 直後の動物の脳では、免疫細胞は、免疫組織化学の方法ではクモ膜下腔にも脳実質内にも全く検出されず、フローサイトメトリーによる測定では他の時期

に比べてかなり少数しか検出されなかった。したがって、その後の各時期で得られた実験結果は、最初からクモ膜下腔に存在していた免疫細胞ではなく、SAH 後のある時から新たにクモ膜下腔へ浸潤した細胞の経時的変化を示していると考えられる。

本実験では、SAH 1～3日後のクモ膜下腔において、フローサイトメトリーで一般に T 細胞の表面抗原とされている CD5 陽性細胞の増加が示された。T 細胞の中では CD4 陽性細胞出現率のピークが SAH 2日後に見られ、同時期に抗マクロファージ抗体陽性細胞出現率も最高値となっていることが示された。CD4 陽性細胞は MHC クラス II を発現したマクロファージから抗原の情報提示を受けると言われている²⁹⁾。また、CD4 陽性細胞は、種々のサイトカインを産生、放出し、マクロファージ、T 細胞、B 細胞など各種の免疫細胞の局所への遊走を促し、また B 細胞の抗体産生を促進すると考えられている²⁹⁾。本研究の結果は、SAH 後のクモ膜下腔において、CD4 細胞はマクロファージから抗原情報を受け取るにより、免疫細胞遊走の促進と、免疫グロブリン産生を惹起する反応を誘発していることを示唆している。また、CD4/CD8 比は SAH 2日後に最高値となることが示唆された。CD8 陽性細胞は、体内の臓器のほとんどで非特異的に発現している MHC クラス I 抗原を認識すると言われている。一般に自己免疫疾患において障害臓器では MHC クラス II 抗原が発現しており、遅延型過敏反応の増悪期には CD8 陽性細胞よりも CD4 陽性細胞が重要な役割を果たすことが知られ、CD4/CD8 比の増大が報告されている。神経サルコイドーシスの活動期の髄液中の CD4 陽性細胞の増加²⁶⁾が、多発性硬化症の急性増悪期には、末梢血中の CD8 陽性細胞の減少と髄液中 CD4 陽性細胞の増加が報告されている^{27)~29)}。自己免疫疾患では、全身進行性硬化症³⁰⁾や Sjögren 症候群の増悪期での CD4/CD8 比の上昇³¹⁾、自己免疫性甲状腺炎での、MHC クラス II の発現や局所の CD4 陽性細胞の増加が報告されている^{32)~34)}。本研究での SAH 2～3日後の CD4/CD8 比の上昇は、抗原情報提示を前提とした遅延型過敏反応と類似した免疫反応の活性化が、本研究で用いたラットの SAH モデルにおいては、SAH 2～3日後にクモ膜下腔に起こっていることを示している。

本実験では、SAH 2日後に、脳動脈の血管壁肥厚、血管腔の狭小化といった病理学的変化が最も顕著であることが観察された。Delgado らは、本研究と同様のラット SAH モデルを用いて、脳血管撮影上の脳血管攣縮の程度が SAH 2日後に最大であることを報告した³⁵⁾。したがって、脳血管攣縮の病理組織学的増悪、脳血管撮影像上での攣縮のピーク、T 細胞を中心とした免疫細胞による反応の活性化の時期は、このラット SAH モデルにおいてはいずれも SAH 2～3日後の時期に見られるという相関関係が認められ、脳血管攣縮における T 細胞を中心とした遅延型過敏反応の重要性が示唆される。

本研究の結果とこれまでの報告の結果から、SAH 後のクモ膜下腔において以下のような反応が起こって脳血管攣縮の発生に関与していることが推測される。クモ膜下腔の血腫によって誘導あるいは出現した何らかの抗原がマクロファージにより認識され、その抗原情報が MHC クラス II 抗原を発現して、CD4 陽性細胞に提示される。マクロファージおよび CD4 陽性細胞は、さまざまなサイトカインの作用を介して、さらにマクロファージや T 細胞の遊走を惹起するとともに、T 細胞のイ

コサノイドの産生と放出を促しうる。その結果、イコサノイドによる動脈の収縮と動脈壁の破壊、サイトカインによる動脈壁への傷害が起こることが考えられる。すなわち、遅延型過敏反応自身が、血管の収縮および器質的变化を引き起こす因子と考えられる。CD4 陽性細胞は B 細胞の免疫グロブリン産生および放出を促すが、免疫グロブリンと抗原との反応で形成された免疫複合体は、さらにケミカルメディエーターや補体の作用を介して局所の炎症反応を増幅させていく。このような抗原認識後に起こる一連の細胞性免疫反応が、その後起こる液性免疫反応と相互的な反応を起こして、脳動脈周囲の炎症反応を増幅させ結果的に脳動脈壁に病理学的変化を引き起こすものと考えられる。

SAH 後の脳血管攣縮のピークは本研究で用いられたラットのモデルでは SAH 2日後であるのに対して、ヒトのそれは SAH 7～10日後と、時間的経過がかなり異なる。したがって、ヒトにおける SAH 後のクモ膜下腔の免疫反応については臨床例における検討が必要である。ヒト用には、はるかに多様な免疫細胞表面抗原に対応したモノクローナル抗体がより精製されて製造されているため、動物実験よりも詳細な免疫細胞亜群の経時的変化を解析することが可能と思われる。脳血管攣縮において免疫細胞の果たしている役割が明らかにされれば、さまざまな免疫抑制剤による脳血管攣縮の予防もしくは治療への可能性が開かれると予想される。

結 論

1. SAH 後のクモ膜下腔においては、まずマクロファージが出現し、それに続いて T 細胞亜群の特徴的な経時的変化が見られた。これらの一連の反応は、遅延型過敏反応に類似していた。
2. SAH 後のクモ膜下腔では、遅延型過敏反応に類似した細胞性免疫反応が起こり、そのピークは SAH から 2～3日後であり、脳血管攣縮の経時的変化と相関した。
3. 脳血管攣縮の病態は、マクロファージによる抗原認識と情報提示、T 細胞による遅延型過敏反応の惹起、および細胞性免疫反応と液性免疫反応の相互作用により引き起こされる血管壁での局所の免疫反応であると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました山下純宏教授に謹んで謝意を表します。また、本研究の遂行にあたり終始ご指導いただきました福井医科大学脳神経外科久保田紀彦教授、半田裕二講師に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Kassel, N. F., Torner, J. C., Haley, E. C., Jane, J. A., Adams, H. P. & Kongable, G. L.: The international cooperative study on the timing of aneurysm surgery. *J. Neurosurg.*, 73, 18-36 (1990).
- 2) Aoki, T., Takenaka, K., Suzuki, S., Kassel, N. F., Sagher, O. & Lee, K. S.: The role of hemolysate in the facilitation of oxyhemoglobin-induced contraction in rabbit basilar arteries. *J. Neurosurg.*, 81, 261-266 (1994).
- 3) Nosko, M., Schulz, R., Weir, B., Cook, D. A. & Grace, M.: Effects of vasospasm on levels of prostacyclin

- and thromboxane A₂ in cerebral arteries of the monkey. *Neurosurgery*, 22, 45-50 (1988).
- 4) Yokota, M., Tani, E. & Maeda, Y.: Biosynthesis of leukotrienes in canine cerebral vasospasm. *Stroke*, 20, 527-533 (1989).
- 5) Hirashima, Y., Endo, S., Ohmori, T., Kato, R. & Takaku, A.: Platelet-activating factor (PAF) concentration and PAF acetylhydrolase activity in cerebrospinal fluid of patients with subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.*, 80, 31-36 (1994).
- 6) Hughes, J. T. & Schianchi, P. M.: Cerebral artery spasm: a histological study at necropsy of the blood vessels in cases of subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.*, 48, 515-525 (1978).
- 7) Hoshi, T., Shimizu, T., Kito, K., Yamasaki, N., Takahashi, K., Takahashi, M., Okada, T., Kasuya, H. & Kitamura, K.: Immunological study of late cerebral vasospasm in subarachnoid hemorrhage: detection of immunoglobulins, C3, and fibrinogen in cerebral arterial walls by immunofluorescence method. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*, 24, 647-654 (1984).
- 8) Mathiesen, T., Fuchs, D., Wachter, H. & von Holst, H.: Increased CSF neopterin levels in subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.*, 73, 69-71 (1990).
- 9) Mathiesen, T., Andersson, B., Loftenius, A. & von Holst, H.: Increased interleukin-6 levels in cerebrospinal fluid following subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.*, 78, 562-567 (1993).
- 10) Pellettieri, L., Nilsson, B., Carlsson, C. A. & Nilsson, U.: Serum immunocomplexes in patients with subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*, 19, 767-771 (1986).
- 11) Østergaard, J. R., Kristensen, B. Ø., Svenhag, S. E., Teisner, B. & Milectic, T.: Immune complexes and complement activation following rupture of intracranial saccular aneurysms. *J. Neurosurg.*, 66, 891-897 (1987).
- 12) Suyu, S., Chou, T. & Sakai, K.: Lymphocytes generated by in vivo priming and in vitro sensitization demonstrate therapeutic efficacy against a murine tumor that lacks apparent immunogenicity. *J. Immunol.*, 143, 740-748 (1989).
- 13) Iwasa, K., Bernanke, D. H., Smith, R. R. & Yamamoto, Y.: Nonmuscle arterial constriction after subarachnoid hemorrhage: Role of growth factors derived from platelets. *Neurosurgery*, 32, 619-624 (1993).
- 14) Sako, M., Nishihara, J., Ohto, S., Wang, J. & Sakai, S.: Role of protein kinase C in the pathogenesis of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 13, 247-254 (1993).
- 15) Kasuya, H., Weir, B. K. A., White, D. M. & Stefansson, K.: Mechanism of oxyhemoglobin-induced release of endothelin-1 from cultured vascular endothelial cells and smooth-muscle cells. *J. Neurosurg.*, 79, 892-898 (1993).
- 16) Seifert, V., Stolke, D., Kunz, U. & Resch, K.: Influence of blood volume on cerebrospinal fluid level of arachidonic acid metabolites after subarachnoid hemorrhage: experimental study on the pathogenesis of cerebral vasospasm. *Neurosurgery*, 23, 313-321 (1988).
- 17) Jackowski, A., Crockard, A., Burnstock, G., Russell, R. R. & Kristek, F.: The time course of intracranial pathophysiological changes following experimental subarachnoid haemorrhage in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 10, 835-849 (1990).
- 18) Peterson, J. W., Nishizawa, S., Hackett, J. D., Bun, T., Teramura, A. & Zervas, N. T.: Cyclosporine A reduces cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in dogs. *Stroke*, 21, 133-137 (1990).
- 19) Handa, Y., Hayashi, M., Takeuchi, H., Kobayashi, H., Kawano, H. & Kabuto, M.: Effect of cyclosporine on the development of cerebral vasospasm in a primate model. *Neurosurgery*, 28, 380-386 (1991).
- 20) Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pober, J. S.: *Cellular and Molecular Immunology*, 2nd ed., p348, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1994.
- 21) Peterson, J. W., Kwun, B. D., Teramura, A., Hackett, J. D., Morgan, J. A., Nishizawa, S., Bun, T. & Zervas, N. T.: Immunological reaction against the aging human subarachnoid erythrocyte. A model for the onset of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.*, 71, 718-726 (1989).
- 22) Peterson, J. W., Roussos, L., Kwun, B. D., Hackett, J. D., Owen, C. J. & Zervas, N. T.: Evidence of the role of hemolysis in experimental cerebral vasospasm. *J. Neurosurg.*, 72, 775-781 (1990).
- 23) Handa, Y., Kabuto, M., Kobayashi, H., Kawano, H., Takeuchi, H. & Hayashi, M.: The correlation between immunological reaction in the arterial wall and the time course of the development of cerebral vasospasm in a primate model. *Neurosurgery*, 28, 542-549 (1991).
- 24) Morantz, R. A., Wood, G. W., Foster, M., Clark, M. & Gollahon, K.: Macrophages in experimental and human brain tumors part 1: studies of the macrophage content of experimental rat brain tumors of varying immunogenicity. *J. Neurosurg.*, 50, 298-304 (1979).
- 25) Austyn, J. M. & Wood, K. J.: *Principles of Cellular and Molecular Immunology*, 1st ed., p203-205, Oxford University Press, Oxford, 1993.
- 26) Stern, B. J., Griffin, D. E., Luke, M. D., Krumholz, A. & Johns, C. J.: Neurosarcoidosis: cerebrospinal fluid lymphocyte subpopulations. *Neurology*, 37, 878-881 (1987).
- 27) Matsui, M., Mori, K. J., Saida, T., Akiguchi, I. & Kameyama, M.: The imbalance in CSF T cell subsets in active multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.*, 77, 202-209 (1988).
- 28) Chofflon, M., Weiner, H. L., Morimoto, C. & Hafler, D. A.: Decrease of suppressor inducer (CD4+2H4+) T cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Ann. Neurol.*, 25, 494-499 (1989).

- 29) Salonen, R., Ilonen, J., Jagerroos, H., Syrjala, H., Nurmi, T. & Reunanen, M.: Lymphocyte subsets in the cerebrospinal fluid in active multiple sclerosis. *Ann. Neurol.*, 25, 500-502 (1989).
- 30) Umehara, H., Kumagai, S., Ishida, H., Sugino-shita, T., Maeda, M. & Imura, H.: Enhanced production of interleukin-2 in patients with progressive systemic sclerosis: hyperactivity of CD4-positive cells? *Arthritis. Rheum.*, 31, 401-407 (1988).
- 31) Ichikawa, Y., Shimizu, H., Yoshida, M. & Arimori, S.: Activation of T cell subsets in the peripheral blood of patients with Sjögren syndrome: multicolor flow cytometric analysis. *Arthritis. Rheum.*, 33, 1674-1681 (1990).
- 32) Dayan, C. M., Londei, M., Corcoran, A. E., Grubeck-Loebenstein, B., James, R. F. L., Rapoport, B. & Feldmann, M.: Autoantigen recognition by thyroid-infiltrating T cells in Graves disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88, 7415-7419 (1991).
- 33) Londei, M., Bottazzo, G. F. & Feldmann, M.: Human T-cell clones from autoimmune thyroid glands: specific recognition of autologous thyroid cells. *Science*, 228, 85-89 (1985).
- 34) Aichinger, G., Fill, H. & Wick, G.: In situ immune complexes, lymphocyte subpopulations, and HLA-DR-positive epithelial cells in Hashimoto thyroiditis. *Lab. Invest.*, 52, 132-140 (1985).
- 35) Delgado, T. J., Brismar, J. & Svendgaard, N. A.: Subarachnoid haemorrhage in the rat: angiography and fluorescence microscopy of the major cerebral arteries. *Stroke*, 16, 595-602 (1985).

The Time Course of Immune Cell Subsets in Subarachnoid Space after Subarachnoid Hemorrhage in Rats
Tetsuya Kubota, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, 104, 506—516 (1995)

Key words cerebral vasospasm, subarachnoid hemorrhage, T lymphocyte, macrophage, cellular immunity

Abstract

While the etiology of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage (SAH) still remains obscure, the role of immunological responses in the pathophysiology of cerebral vasospasm has been emphasized. In order to clarify whether immunological reactions take a role in development of cerebral vasospasm, several issues should be resolved: whether some antigens exist in the subarachnoid space following SAH, what kind of immunological reaction occurs there, and how the immunological reaction correlates with the time course of vasospasm. The present study was performed to analyze the kinetics of immune cell subsets in the subarachnoid space after SAH in the rat. One hundred and eight Sprague-Dawley rats were divided into the SAH and the saline groups. SAH was induced by autologous arterial blood (0.3 ml) injection into the cisterna magna in the SAH group and the same amount of saline was injected in the control saline group. The animals were sacrificed at 10 min or 1, 2, 3, 5, or 7 days after SAH induction. Histopathological changes of the basilar artery and the subarachnoid space were observed by HE staining. The appearance of T cell subsets and MHC class II (+) cells were observed by means of immunohistochemistry. The percentage of appearance of anti-macrophage antibody-positive cells or positive cells to T cell subsets antibodies (CD5, CD4, or CD8) were measured by flow cytometry. Narrowing of the vascular lumen of the basilar artery and infiltration of mononuclear cells in the adventitial layer were most prominent 2 and 3 days after SAH induction. Immunohistochemical study revealed an appearance of MHC class II (+) mononuclear cells in the subarachnoid space 1 to 3 days after SAH, prior to the appearance of T cell subsets. A flow cytometric study revealed the peak of percentage of appearance ($13.5 \pm 2.5\%$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$) of macrophages 2 days after SAH. The CD4/CD8 ratio increased significantly (3.21 ± 0.89) 2 days after SAH in the SAH group. The present results indicate that antigen-presentation by macrophages and delayed-type hypersensitivity reaction by T lymphocytes occur in the subarachnoid space after SAH. These serial reactions may play an important role in eliciting the development of cerebral vasospasm.