

# Ultrastructure of the Blood- Brain Barrier in Human Gliomas : a Freeze-Fracture Study

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8257">http://hdl.handle.net/2297/8257</a>

## ヒト神経膠腫の血管内皮細胞の形態学的研究

## —凍結割断レプリカ法を用いた超微構造—

金沢大学医学部脳神経外科学講座 (主任: 山下純宏教授)

上野 恵

(平成3年1月28日受付)

ヒト神経膠腫の血液脳関門の超微構造の特徴を解明するため、通常の超薄切片に加え、凍結割断レプリカ法を用いて15例の神経膠腫の腫瘍血管と4例の正常脳の毛細血管の形態を電顕的に観察した。凍結割断レプリカ法は広範囲の細胞膜面を一度に観察できるので、特定の膜内構造物の分布密度や細胞間接着装置の観察にきわめて適した手法である。正常脳と神経膠腫の内皮細胞間にはいずれも閉鎖帯が特徴的構造として認められた。すなわち膜内粒子が連続して線条を形成し、数条から30条程度の線条が互いに吻合して網目を形成している像が認められた。しかし、神経膠腫の一部で腫瘍血管の閉鎖帯に線条のとぎれた部分が観察された。血管内皮細胞表面には飲み込み小胞が細胞質面 (P面, protoplasmic face) で円形の陥凹、細胞外面 (E面, extracellular face) で円形の隆起として観察された。その直径はおよそ 60-80nm であった。飲み込み小胞の分布密度は正常脳、良性群 (low grade group) および悪性群 (high grade group) の神経膠腫の3群間で統計的有意差はなかった。小窓はレプリカのP面で円形の陥凹、E面で円形の隆起として観察され、その直径はおよそ 80-130nm であり、底面が平らで浅く、群をなして分布する傾向があることから飲み込み小胞と鑑別された。15例中5例の神経膠腫で腫瘍血管に小窓の形成が認められ、その組織像の内訳は視神経膠腫、上衣下巨細胞性星膠腫、原線維性星膠腫及び膠芽腫であった。この小窓は正常脳では認められず、血液脳関門に破綻をきたす重要な要素のひとつと考えられた。

---

**Key words** glioma, blood-brain barrier, freeze-fracture replica, fenestration, pinocytosis

---

血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) の形態学的根拠としては脳毛細血管の内皮細胞間に緊密な閉鎖帯 (tight junction) を有すること、内皮細胞に小窓 (fenestration) がないこと、飲み込み小胞 (pinocytosis) が少ないこと、連続した基底膜が存在すること、血管周囲間隙 (perivascular space) が少ないことなどが挙げられており<sup>1)</sup>、血液脳関門を欠くといわれている脳腫瘍ではその血管に種々の形態学的な変化をおこしていると報告されている<sup>2-20)</sup>。従来の報告はそのほとんどが通常の超薄切片の透過電顕による観察であるため、膜面の構造を広い範囲にわたって観察し、また立体的な三次元的構造をとらえるには連続的な切片を

大量に観察せねばならず、膨大な観察が必要であった。神経膠腫の血管にも閉鎖帯が正常とおなじくみられるとするものと、接合部が開き、あるいは線条が少なく漏出性であるとするもの<sup>4,21)</sup>がある。また、神経膠腫の血管の飲み込み小胞は充進しているとするもの<sup>21)</sup>と正常と変わらないとするもの<sup>4)</sup>があり、意見の一致をみていない。神経膠腫の血管の小窓は、組織学的に比較的良性である視神経膠腫や突起膠腫にも見られるという報告があるが<sup>16,17,20)</sup>、星状神経膠腫では良性の組織像をもつものでは認められないとされている<sup>21)</sup>。我々は神経膠腫の腫瘍血管を通常の透過電顕に加え、凍結割断レプリカ法を用いてより広い膜面を一度に観

---

Abbreviations: BBB, blood-brain barrier; CT, computed tomography; MRI, magnetic resonance imaging; E面, extracellular face; P面, protoplasmic face

察することによって、内皮細胞間の閉鎖帯の形態と飲み込み小胞および小窓の分布状態を定量的に比較検討した。

### 対象および方法

#### I. 神経膠腫および正常脳の電顕的検査

手術により摘出された15例の神経膠腫の腫瘍組織を対象とした(表1)。組織診断には、試料を3.7%ホルマリンで固定し、ヘマトキシリンエオジン(HE)染色を施したものをを用い、光学顕微鏡にて観察した。組織学的悪性度はWHOの分類に従い、悪性度IおよびIIを良性群、IIIおよびIVを悪性群とした。摘出された腫瘍組織の一部は直ちに2.5%グルタルアルデヒドで4°Cで2時間以上前固定を行い、オスミウムによる後固定をしたのち、エポン、アララダイトにて包埋した。包埋した組織は、まずガラスナイフにて薄切して、トルイジンブルー染色し、光学顕微鏡にて部位を確認した後、ダイヤモンドナイフを用いて薄切し、ウラニウムと酢酸鉛で二重染色した。また一部は凍結割断レプリカの試料用に3mm角とし、2.5%グルタルアルデヒドにて固定したのち、バイプラトームにて50μmの厚さに薄切し、組織の一部をトルイジンブルーで染色し、組織内に血管の存在することを確認した。氷晶形成防止処置として、10%グリセリンに10分間、

20%グリセリンに10分間、30%グリセリンに1時間浸した。試料を2枚の金のディスクにはさみ、これを液体窒素にて冷却したフロン22を用いて急速凍結させた後、Balzer社(Liechtenstein, Liechtenstein)の凍結割断装置(BAE080T)を用いて真空内(2×10<sup>-6</sup>Torr以下)-110°Cで割断し、割断面に白金蒸着し、さらに炭素蒸着で補強し、双面レプリカを作製した。組織をブリーチにて2時間以上溶解し、レプリカを蒸留水にて洗浄した後、100メッシュの銅のグリッド面に回収した。またコントロールとして、脳葉切除術の際に得られた4例の正常脳組織を同様の方法にて処理し、試料を作製した。これらの超薄切片およびレプリカを日立H-600型または日本電子JEM-100B型の電子顕微鏡にて観察した。レプリカ法においては膜の内側半面を細胞外からみた場合がP面(protoplasmic face)、反対に膜の外側半面を細胞内からみた場合がE面(extracellular face)と呼ばれる<sup>20)</sup>。レプリカでは血管腔の周囲の細胞膜で、閉鎖帯および飲み込み陥凹(pinocytotic pit)をもつ細胞を内皮細胞膜と同定した上で、内皮細胞間の閉鎖帯の形態および内皮細胞膜表面の飲み込み陥凹と小窓の分布を観察した。凍結割断レプリカ法により得られた各症例の飲み込み陥凹の分布密度、小窓の観察範囲全体に対する分布密度、観察された閉鎖帯を構成する線条の数および総観察面積を

Table 1. Summary of clinical data

Case	Age	Sex	Diagnosis	Histological grade	Tumors		CT findings	
					Location	Size cm×cm	Edema (0~3)	CE (0~2)
1	56	F	Glioblastoma	IV	L-trigone	2.5×3	3	2
2	24	M	Glioblastoma	IV	L-trigone	1×1	1	2
3	53	M	Glioblastoma	IV	R-TO	5×6	3	2
4	54	M	Glioblastoma	IV	R-TP	4.5×5	2	2
5	65	M	Glioblastoma	IV	R-F	2×3	3	2
6	45	F	Glioblastoma	IV	L-F	5×5	3	2
7	70	F	Glioblastoma	IV	L-F	6×6	3	2
8	48	M	Glioblastoma	IV	R-F	4×4	2	2
9	48	M	Astrocytoma	III	L-P	4.5×4.5	1	2
10	31	F	Astrocytoma	III	C. callosum	1.5×1.5	1	2
11	49	F	Oligodendroglioma	II	R-F	6×6	1	-
12	42	F	Oligodendroglioma	II	R-F	5.5×4.5	2	-
13	23	M	Fibrillary astrocytoma	II	Brainstem	2×3	1	-
14	5	F	Pilocytic astrocytoma	I	L-optic nerve	4.5×3	0	2
15	14	M	Subependymal giant cell astrocytoma	I	L-lat. ventricle	2×2	0	2

Sex F, Female; M, Male, Location L, Left; R, Right; F, Frontal; T, Temporal; P, Parietal; O, Occipital; C, Corpus; lat, lateral. Edema 0, none; 1, slight; 2, moderate; 3, severe. CE, contrast enhancement 0, none; 1, slight; 2, moderate; -, not examined.

まとめて表2に示した。

飲み込み陥凹の分布密度については、飲み込み陥凹の1個以上存在する血管内皮細胞の膜面を強拡大にて写真撮影し、比較的平坦な約 $5\mu\text{m}^2$ の膜面をひとつの領域としてとり、その各領域における密度を求め、正常脳と良性群および悪性群の3群それぞれに110余の領域を無作為に抽出した。この抽出数は3群間の比較に際して検出力を理想的な80~90%にするためである。

また、飲み込み陥凹の分布様式については、前記の領域における飲み込み陥凹の密度を5個/ $\mu\text{m}^2$ ごとに区切り、その度数の百分率を求め、正常脳、良性群、悪性群の3群において、それぞれ2群間の密度の分布に有意差があるか否かについて統計学的処理を行った。

## II. ラットを用いた実験

また、組織の固定の条件による飲み込み陥凹の変化をみるために動物実験を行った。3匹の雌 Wistar ラット (体重 180g) を用いた。麻酔としては体重

100g 当たり 0.04ml のネブタールを腹腔内に注射した。第1匹は麻酔後、直ちに断頭し、直後に開頭し、大脳白質より脳組織を採取し、3mm 角の小片として $4^\circ\text{C}$ の2.5%グルタルアルデヒドにて2時間以上浸潤固定した (直後浸潤固定群)。第2匹は麻酔後、頸部より両側の頸動脈を露出後これをナイロン糸で結紮し、さらに開胸して心臓を結紮した。3時間放置の後、第1匹と同様に脳組織を採取し、固定した (3時間後浸潤固定群)。第3匹は麻酔後、開胸し、心臓を露出後、左室を穿刺し、600ml の2.5%グルタルアルデヒドにて30分間灌流固定した。その後同様に脳組織を採取し、さらに浸潤固定した (灌流固定群)。これらの3種の脳組織を凍結割断レプリカ法にてレプリカを作製し、毛細血管内皮細胞を電顕にて観察した。膜表面における比較的平坦な $5\mu\text{m}^2$ の部位をひとつの領域とし、各群の21, 16, 32の領域における飲み込み陥凹の密度を求めた。

## III. 統計学的検定法

得られた成績はすべて平均値±標準偏差およびNで

Table 2. Summary of data from freeze-fracture replicas

Case	Pinocytotic pits* (/ $\mu\text{m}^2$ )	Fenestrations** (/ $\mu\text{m}^2$ )	Tight junctions Number of strands	Total area examined ( $\mu\text{m}^2$ )
High grade group				
1	19.8±12.2	5.0	2~3	496
2	17.5±16.8	—	4~9	349
3	4.3±3.6	1.4	—	490
4	14.0±9.7	—	3~8	183
5	4.1±4.0	—	10~12	202
6	8.7±8.8	—	5~12	265
7	9.3±5.5	—	3~7	220
8	6.9±5.2	—	4~30	235
9	13.3±12.3	—	2~14	298
10	5.3±2.4	—	—	664
Low grade group				
11	11.0±6.3	—	10~30	237
12	11.0±4.8	—	5~30	166
13	6.6±7.6	0.3	1~10	564
14	3.6±2.0	1.0	4~10	545
15	9.4±9.5	1.6	3~6	264
Normal brain				
	10.6±7.9	—	20~30	430
	8.4±3.4	—	—	150
	7.9±4.9	—	4~5	375
	9.5±7.7	—	7~30	300

\* The mean±standard deviation of the density. \*\*Density from total examined area. —, no fenestration or tight junction was found.

示した。正常脳，良性群，悪性群の3群間の飲み込み陥凹の密度の差の検定には一元配置分散分析法を用いた。またラットを用いた実験における固定法の異なる3群間の飲み込み陥凹の密度の差の検定には一元配置分散分析法の後，Scheffeの方法に従い多重比較を行った。飲み込み陥凹の分布様式の差の検定には，Mann-Whitneyの順序カテゴリーに基づく2群の分布差の検定法を用いた。p<0.05を有意とした。

## 成 績

### I. 超薄切片による電顕所見

#### 1. 正常脳毛細血管

脳毛細血管内皮細胞は内腔側の表面が比較的平滑であり，表面のひだ形成 (surface infolding) は稀に認めるのみであった (図 1a)。隣接する内皮細胞間には細胞間接着装置が認められたが，閉鎖帯と同定できるもの

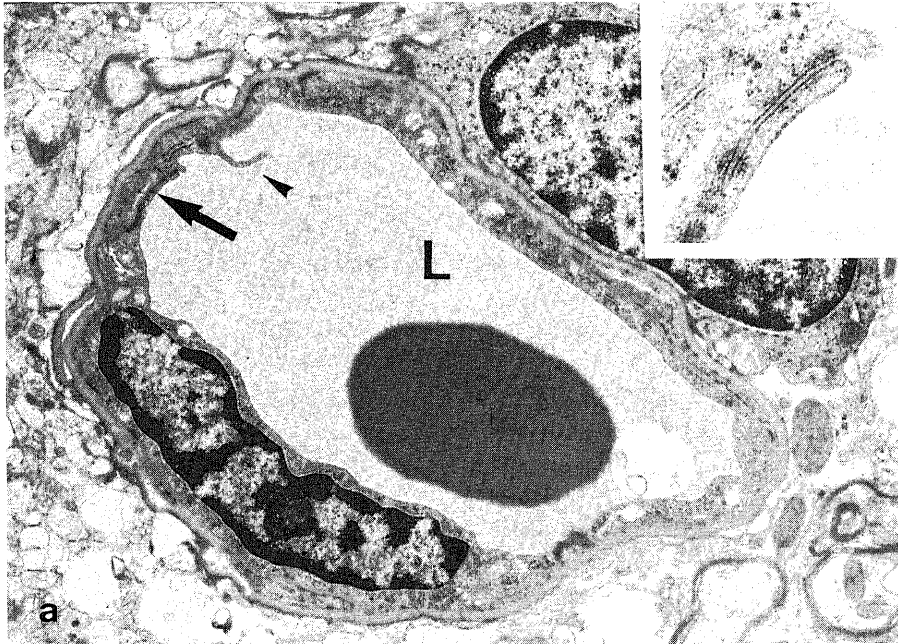


Fig. 1a. An electron micrograph of an ultrathin section showing capillary endothelial cells of the normal brain. Thin and continuous endothelial cells and a surface infolding (arrowhead) are seen. Arrow shows the junctional apparatus between the cell membranes.  $\times 1100$  Inset; Detail of the junctional apparatus pointed by the arrow.  $\times 27500$  L, lumen.

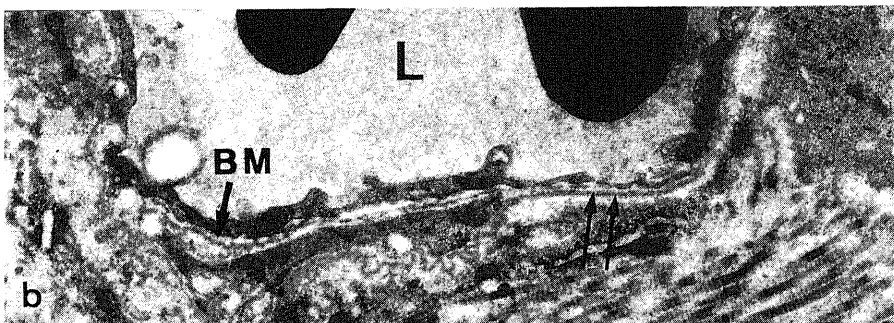


Fig. 1b. An electron micrograph of an ultrathin section showing an endothelial cells of glioblastoma. The cell surface is irregular and partially thin. Fenestrations are occasionally seen (arrows). Thin and irregular basement membrane (BM) is surrounding the endothelial cell. L, lumen.  $\times 13200$ .

は少なかった。また内皮細胞は常にある程度の厚みを保っており、観察した範囲では小窓は認められなかった。内皮細胞の外側には一層の基底膜が連続して認められた。飲み込み陥凹および飲み込み小胞は多くの細胞に認められた。

## 2. 神経膠腫腫瘍血管

神経膠腫の腫瘍血管はその内腔側表面が不規則であり、多数のひだ形成 (surface infolding) や辺縁部のひだ形成 (marginal infolding) を認めた。細胞間接着装置は常に認められたが、明らかに閉鎖帯と同定できるものは少なかったが、飲み込み小胞はほとんどの細胞に認められた。内皮細胞には多数の空胞を有する部位

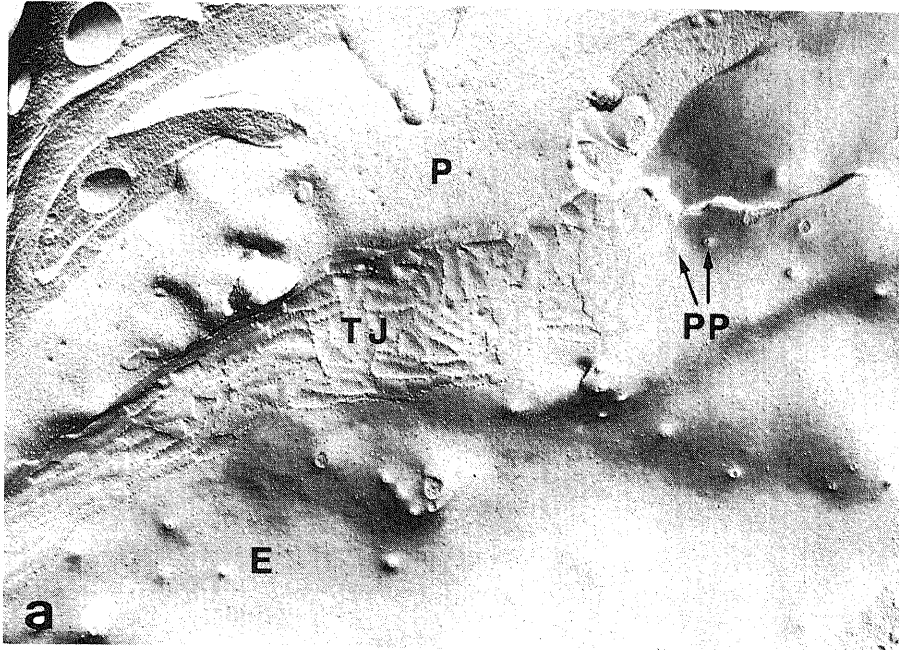


Fig. 2a. An electron micrograph showing the replica of normal capillary endothelial cells. Tight junctions (TJ) are seen as a series of interconnected ridges on the P-face (P) and as a series of grooves on the E-face (E). The number of strands are around eight in this case. Pinocytotic pits (PP) are seen.  $\times 30000$ .

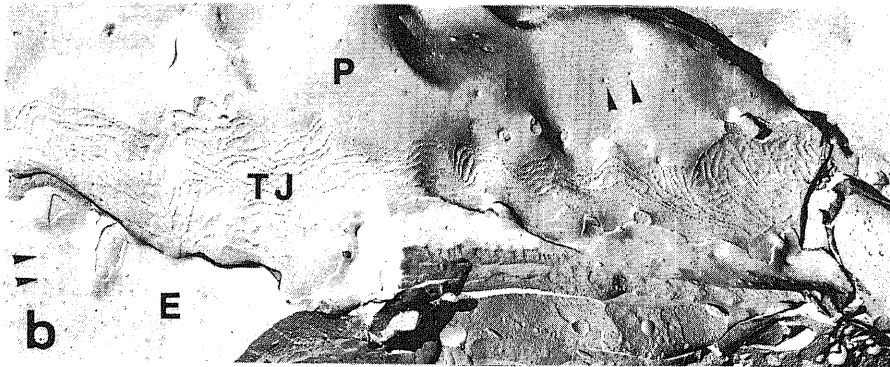


Fig. 2b. An electron micrograph showing the replica of endothelial cells of astrocytoma grade III. Tight junctions (TJ) similar to those of normal brain are seen. Strands are around five to twelve here. Pinocytotic pits (arrowheads) are scattered both in the P-face (P) and the E-face (E).  $\times 10800$ .

も認められた。内皮細胞の厚みは不定であり、一部は菲薄化しており、小窓を形成している部位が認められた(図1b)。基底膜は常に認められたが、厚さは一定でなく、薄い部分や不整な部分、あるいは多層になっている部分が認められた。

## II. 凍結切断レプリカによる電顕所見

### 1. 閉鎖帯

正常脳毛細血管の内皮細胞膜のE面及びP面の両者に膜内蛋白が連続して線条を形成し、線条が互いに吻合して網目をなしていた。線条の数は数条から多いところでは30条余りに及んだ。膜内蛋白は連続性であり、途切れた像は認められなかった(図2a)。神経膠腫の血管内皮細胞膜においても同様の形態と数をもつ閉鎖帯が認められた(図2b)。また部分的には線条の途切れた閉鎖帯が認められた(図2c)。

### 2. 飲み込み陥凹

飲み込み陥凹は血管内皮細胞の膜表面にP面で円形の陥凹、E面で円形の隆起として認められた(図2a,b)。その径はおよそ60~80nmであった。膜表面での飲み込み陥凹の分布様式は、一様であったり、疎な部位と密な部位とが混在するところもみられた(図3)。また、細胞質が横断された部位では細胞内へ突出する飲み込み陥凹が飲み込み小胞に移行しているのが観察された(図4)。

飲み込み陥凹の分布密度は正常脳と良性群および悪性群の3群間に統計学的有意差は認められなかった(表3)。

飲み込み陥凹の分布様式について統計処理を行うと、正常脳と良性群の間には有意差が認められたが( $p < 0.01$ )、良性群と悪性群および正常脳と悪性群の間

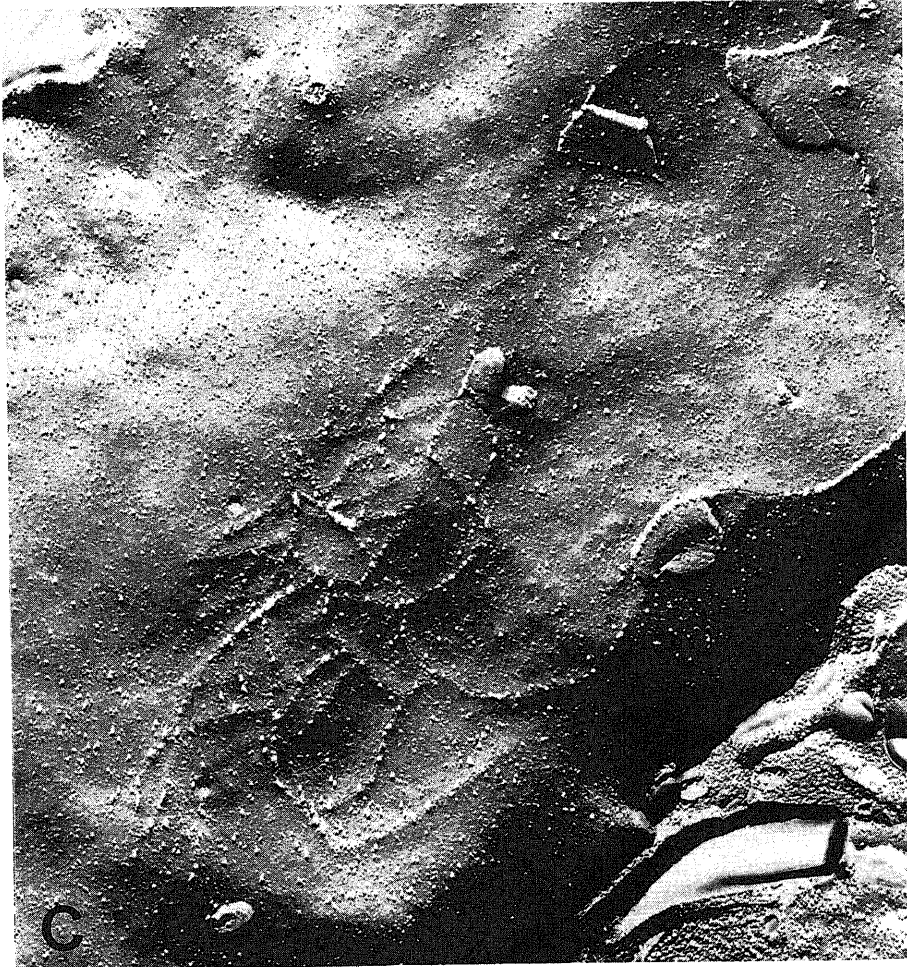


Fig.2c. An electron micrograph showing the replica of an endothelial cell of glioblastoma. Irregular and discontinuous tight junctions are seen.  $\times 37500$ .

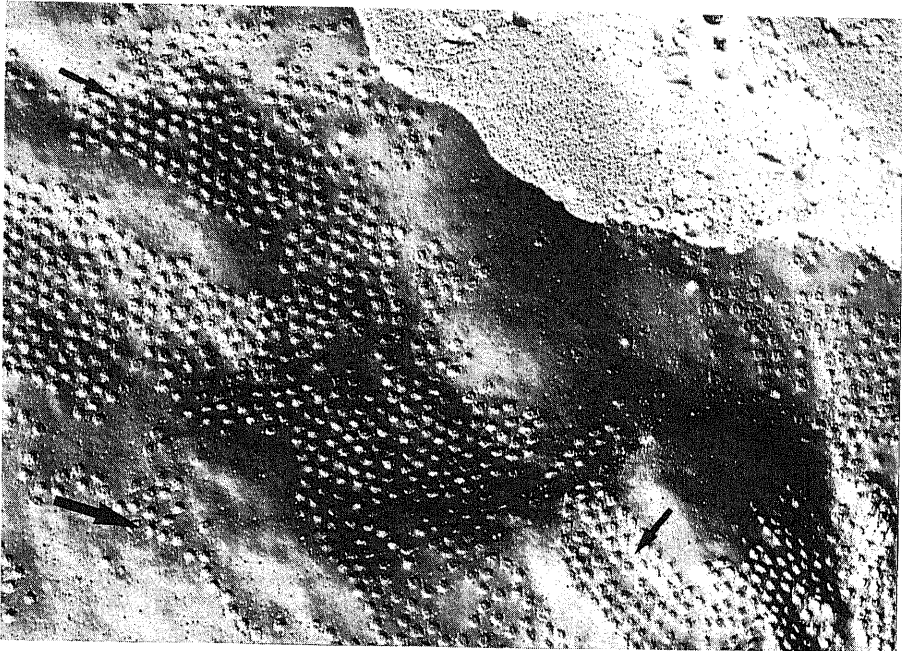


Fig. 3. An electron micrograph showing the replica of endothelial cells of a glioblastoma. Numerous pinocytotic pits on the P-face are distributed in the hexagonal lattice (small arrows) or linear array (large arrow). Their diameters are about 60-80nm.  $\times 27000$ .

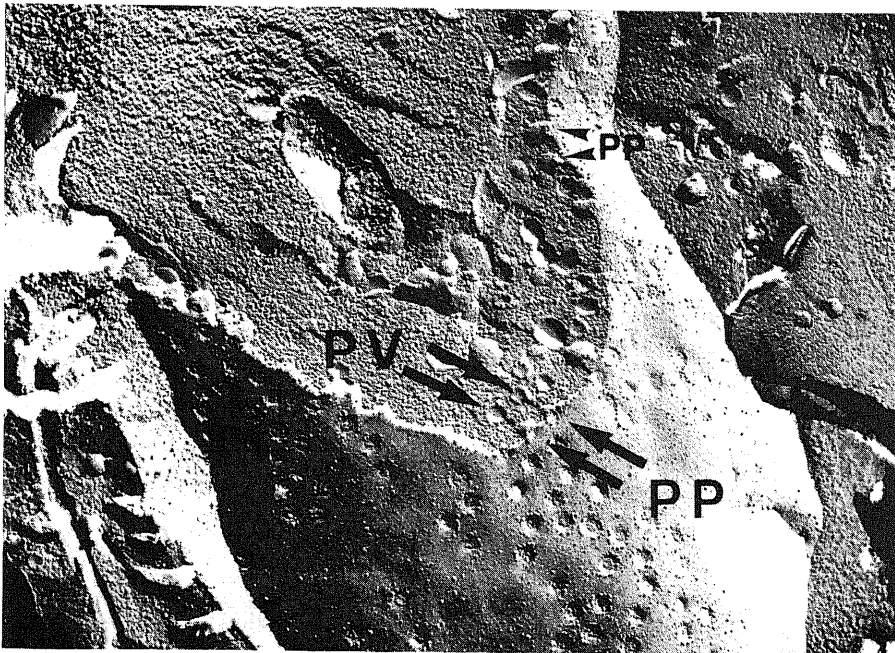


Fig. 4. Cross-fractured cytoplasm of the endothelial cell of a glioblastoma. Pinocytotic pits (PP) protruding into the cytoplasm are seen. Pinocytotic vesicles (PV) are also seen.  $\times 43200$ .



に有意差は認められなかった (図 5)。

ラットを用いた実験では飲み込み陥凹の密度は直後浸潤固定群と灌流固定群の間には統計学的有意差が認められなかったが、直後浸潤固定群と3時間後浸潤固定群、3時間後浸潤固定群と灌流固定群の間には有意差が認められ ( $p < 0.01$ )、3時間後浸潤固定群で増加していた (表 4)。

### 3. 小窓

小窓はレプリカのP面で円形の陥凹、E面で円形の隆起として認められ、細胞質の割断された部位では1個の内皮細胞の細胞質が薄くなった部分で血管腔側と基底膜側の2枚の細胞膜が癒合しているのが観察された (図 6a, b)。その直径はおよそ80~130nmと飲み込み陥凹よりも大きく、底面は浅く、平らであった。また小窓は数10個が群をなして存在する傾向にあった (図 7a, b)。15例の神経膠腫の腫瘍血管のうち、5例の腫瘍血管内皮細胞においてこの小窓の存在が確認された。このうち、3例は良性群で、その組織型は視神経

膠腫、上衣下巨細胞性星膠腫及び原線維性星膠腫であった。また他の2例は悪性群で、組織型はいずれも膠芽腫であった。正常脳では4例をあわせて1255  $\mu\text{m}^2$ の範囲を写真撮影したが、いずれも小窓は観察されなかった。

## 考 察

血液脳関門は、中枢神経系における物質の血管透過性の特異性についての概念である。Goldman はトリパンプルーを家兎に静注すると脳実質は染まらないのに、脳実質に注入すると脳は染まることを観察した<sup>23</sup>。この実験から、脳の血管には物質透過に関する特殊な機構が存在することが示唆された。その後、色素以外の各種の物質を用いて脳血管の透過性が調べられた。すなわち、銀粒子<sup>24,25</sup>、ペルオキシダーゼ<sup>26~29</sup>、フェリチン<sup>30,31</sup>などを経口投与、または血管内、ならびに髄液腔から注入して電顕的にこれを観察し、血液脳関門の実態は脳の毛細血管内皮細胞にあることが証明された。その形態学的根拠としては、他の臓器の毛細血管と比較して、内皮細胞間に緊密な閉鎖帯を有すること、飲み込み小胞が少ないこと、小窓を有しないこと、内皮細胞の外側に一層の連続した基底膜が存在すること、基底膜外表面の大部分は星状膠細胞とその突起に包まれていることなどが挙げられている<sup>3</sup>。一般に脳腫瘍はコンピューター断層画像 (CT) や核磁気共鳴画像 (MRI) において造影剤の注入により増強されること、あるいは核医学検査にて RI の集積を認めることなどより血液脳関門が破綻しているとされてきた。その形態学的根拠としては正常脳毛細血管と腫瘍血管の構造の違い、すなわち内皮細胞間の閉鎖帯、飲み込み小窓の分布、小窓の相違などに求められてきた。

脳腫瘍血管の形態に関する報告は数多くあるが、そのほとんどが通常の超薄切片による報告である。凍結断断レプリカ法は、生物の微細構造を瞬間的に凍結す

Table 3. Density of pinocytosis in normal brain and gliomas

Group	Mean $\pm$ S.D. ( $/\mu\text{m}^2$ )	N
Normal	9.7 $\pm$ 6.5	113
Low grade	7.9 $\pm$ 7.7	131
High grade	10.2 $\pm$ 11.3	147

No statistically significant differences among groups by one-way analysis of variance.  
N: Number of  $5\mu\text{m}^2$ -areas counted.

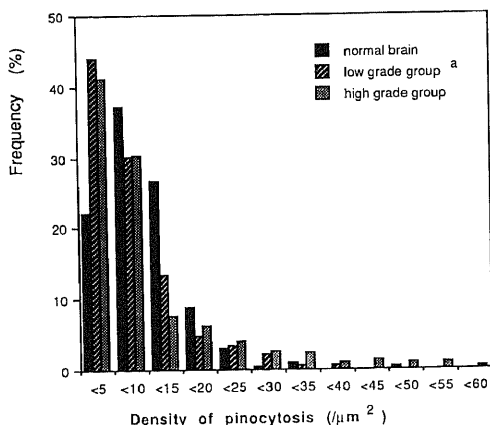


Fig. 5. Correlation between the distribution density of pinocytotic pits and the percentage of frequency. <sup>a</sup>  $p < 0.01$  by Mann-Whitney test between the normal brain and the low grade group.

Table 4. Density of pinocytosis in rats

Group	Mean $\pm$ S.D. ( $/\mu\text{m}^2$ )	N
1) Immediate immersion	13.1 $\pm$ 11.0	21
2) Immersion after 3 hours	21.4 $\pm$ 6.4 <sup>a</sup>	16
3) Perfusion	13.8 $\pm$ 5.5 <sup>b</sup>	32

<sup>a, b</sup>  $p < 0.01$  by one-way analysis of variance followed by Scheffe's multiple comparison; <sup>a</sup> between group 1 and 2, <sup>b</sup> between group 2 and 3. N: Number of  $5\mu\text{m}^2$ -areas counted.

ることにより生きた状態のまま組織を保存する方法として Steere により開発された<sup>29)</sup>。この方法では、切断の際に二重膜の内部、つまり脂質の疎水性の部分で割れ、内在する蛋白分子がどちらかに含まれるので膜内の構造が広い範囲で観察でき、細胞表面の形態や細胞間接着装置をみる上で、極めて有用である<sup>29)</sup>。この方法では、膜の内側半面を細胞外からみた場合がP面、反対に膜の外側半面を細胞内からみた場合がE面と呼ばれている<sup>29)</sup>。

閉鎖帯は細胞間の物質輸送を制限する構造であり、その幅の広さと、またそれを構成する線条の数と、接合装置としての緊密度は相関することが知られている<sup>30)</sup>。また、レプリカによる観察でネコの脳の脈絡叢と最後野の毛細血管には閉鎖帯を構成する線条の非連続性が認められたとの報告がある<sup>30)</sup>。神経膠腫の腫瘍血管の閉鎖帯については必ずしも緊密度を保っておらず、血液脳関門の破綻の重要な要素であるとの報告もあるが<sup>2)</sup>、神経膠腫においては離開した閉鎖帯を認め

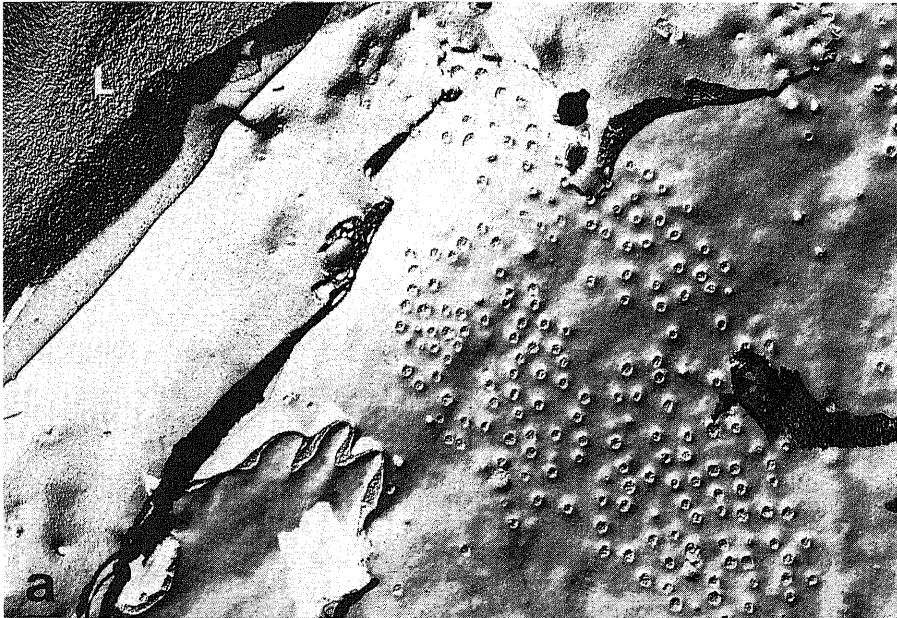


Fig. 6a. An electron micrograph showing the replica of endothelial cells of an optic glioma. Fenestrations are seen in clusters. L, lumen.  $\times 15000$ .

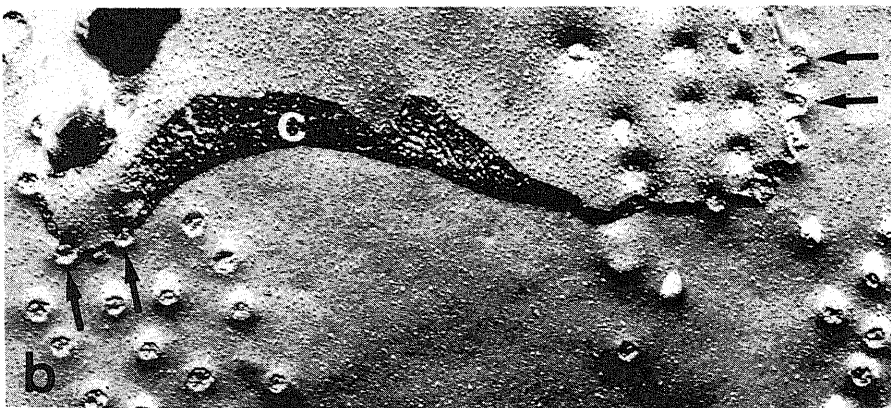


Fig. 6b. A higher magnification of the upper right corner of Fig. 6a. Fenestrations at the border of the P- (P) and the E-face (E) where the cytoplasm (C) becomes thinner and two membranes are attached together (arrows).  $\times 36000$ .

ないとの報告も多く、離開した閉鎖帯が不良な固定によるアーチファクトである可能性も示唆されている<sup>3)</sup>。本研究において、レプリカ面で観察された正常脳と神経膠腫の毛細血管の閉鎖帯はいずれも基本的には連続した膜内粒子からなる線条によって構成されていた。しかも、線条は数条以上の網目を構築し、非漏出性の形態を保持している様みえた。しかし、本法では、組織内で切断される部位は偶然に頼るところが大きいので、閉鎖帯が全幅にわたり切断されることはむしろまれと考えられる。そのため、観察された線条の数からその閉鎖帯の緊密度を比較評価するのは困難と思われた。ただ神経膠腫の内皮細胞の閉鎖帯には、アーチファクトとは考えられない非連続性の線条が観察され、閉鎖帯としての機能が破綻している部分があることを示していた。

飲み込み小胞は経細胞的な血管透過性に役割を果たす機構である。レプリカ法を用いた研究で各臓器の毛

細血管の膜面における密度が調べられており、その値は $1\mu\text{m}^2$ 当たり横隔膜で78個、心筋で89個、脾臓で26個、小腸粘膜で10個と報告されている<sup>36)</sup>。脳毛細血管における飲み込み小胞の密度については、ラットの脳毛細血管のレプリカ面で $1\mu\text{m}^2$ 当たり8個<sup>37)</sup>、および5個<sup>38)</sup>、また超薄切片の細胞質内でヒトの毛細血管の飲み込み小胞が $1\mu\text{m}^2$ あたり3.7個という報告がある<sup>4)</sup>。飲み込み小胞は種々の生体の環境変化に伴い、変化することが知られている。すなわち、放射線照射<sup>39)</sup>、高血圧、てんかん発作、脳虚血<sup>37,40)</sup>などにより亢進することや温度の低下やpHの上昇、代謝の阻害により減少することが報告されている<sup>41)</sup>。そこで、動物実験にて脳組織の固定条件を変えて飲み込み陥凹の分

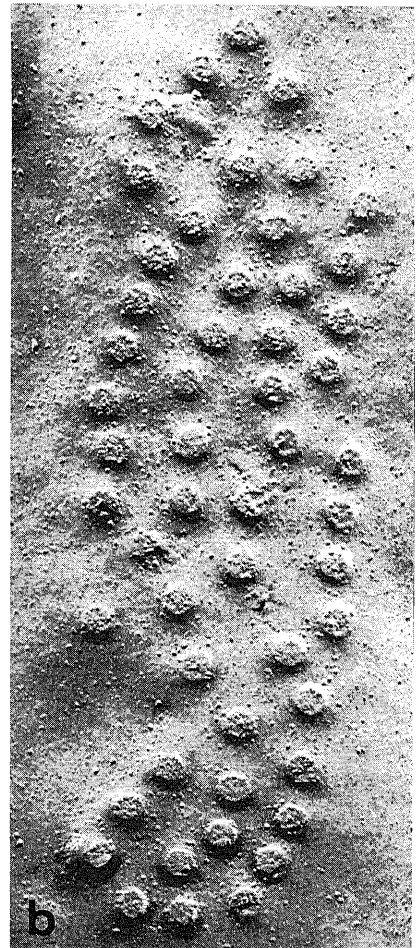
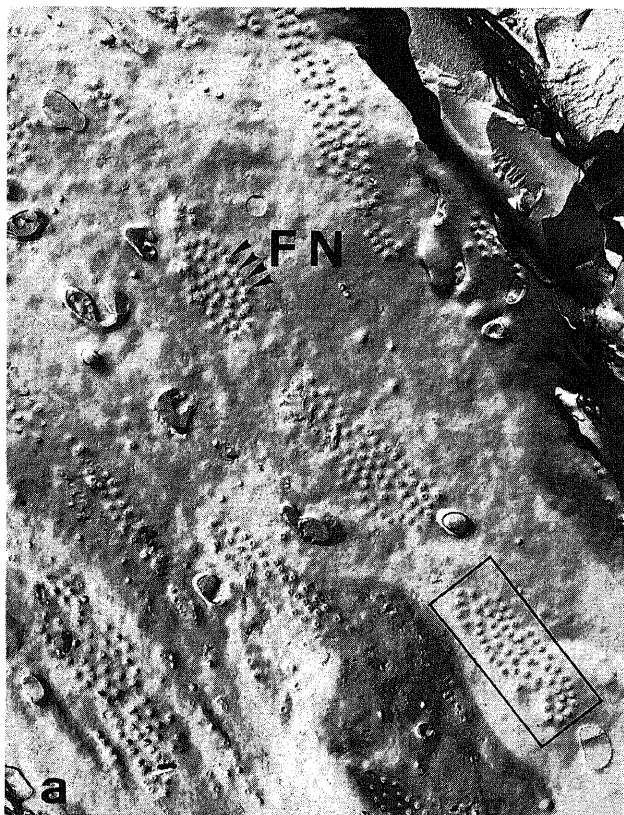


Fig. 7a. An electron micrograph showing the replica of an endothelial cell of a glioblastoma. Fenestrations (FN) are seen in clusters.  $\times 10800$ .

Fig. 7b. A higher magnification of the rectangle in Fig. 7a, showing fenestrations. They show circular elevations on the E-face. Their diameters are about 80-130nm.  $\times 54000$ .

布密度を測定した。灌流固定法は、生体組織の状態を形態学的に保つのに最適な方法と考えられる。臨床材料としてのヒト脳腫瘍は灌流固定で固定するのは不可能である。しかし、今回の実験での直後浸潤固定群は、臨床におけるヒト脳腫瘍の採取ならびに固定に相当し、直後浸潤固定群と灌流固定群の間に飲み込み陥凹の分布密度に統計学的有意差を認めなかったことにより、臨床材料の固定としての浸潤固定は十分に信頼性があると考えられる。また、3時間後浸潤固定群は他の2群に比較して飲み込み陥凹が有意に亢進しており、虚血の際に飲み込み小窓が亢進したとする過去の報告<sup>37,40)</sup>とよく一致した。神経膠腫の腫瘍血管においては、飲み込み小窓が亢進しているとするものと正常と比較して差がない<sup>4)</sup>とする立場があり、我々の成績は後者を支持するものとなった。今回飲み込み陥凹の分布様式の検定に用いた Mann-Whitney 法は順序をもつカテゴリーとその頻度の分布が比較する2群間において有意差があるか否かを検定する方法である。レプリカにおける飲み込み陥凹の密度と分布の定量的解析を行ったのは今回我々が初めてと思われる。その結果、正常群と悪性群、良性群と悪性群の間には飲み込み陥凹の密度およびその分布様式に統計学的有意差が認められなかった。しかし正常群と良性群の間では平均密度そのものはほとんど同じであったが、分布様式にわずかな統計学的有意差が認められた。これは、主に5個/ $\mu\text{m}^2$ 未満の分布の相違によるものであり、本研究の写真撮影の方法に起因する可能性がある。すなわち、0個/ $\mu\text{m}^2$ の領域は、内皮細胞膜として同定し難いために、意図的に統計処理からはずしてあるのは3群とも共通しているが、0個/ $\mu\text{m}^2$ の領域に近い領域の抽出が3群間で一定してなかった可能性である。

正常状態では小窓は血液脳関門の欠如する松果体、下垂体、脈絡叢、視床下部、最後野、変連器官などの特殊な領域に存在し、血管と周囲実質との間の物質交換に大きな役割を果たす機構とされている<sup>42,43)</sup>。非腫瘍性病変では、遅発性放射線脳壊死<sup>44,45)</sup>、慢性硬膜下血腫の外膜<sup>46)</sup>、実験的鉛中毒性脳脊髄炎<sup>47)</sup>、実験的慢性アレルギー性脳脊髄炎<sup>48)</sup>に認められ、脳血液関門の破綻と血管透過性の亢進に関与すると報告されている<sup>42)</sup>。脳腫瘍では、神経膠腫以外の腫瘍、すなわち髄膜腫<sup>9)</sup>、神経鞘腫<sup>5-7)</sup>、脈絡叢乳頭腫<sup>8)</sup>、頭蓋咽頭腫<sup>9)</sup>、下垂体腺腫<sup>10)</sup>、悪性黒色腫<sup>11)</sup>、血管芽腫<sup>12)</sup>、頭蓋内原発悪性リンパ腫<sup>13)</sup>、転移性腫瘍<sup>14,15)</sup>などおよびラットのエチルニトロソウレア誘発神経膠腫<sup>16)</sup>においてはその腫瘍血管に一般にみられる構造である。神経膠腫の腫瘍血管の小窓は、視神経膠腫<sup>16,17)</sup>、髄芽腫<sup>18)</sup>、星芽腫<sup>19)</sup>、乏突起膠

腫<sup>20)</sup>、膠芽腫<sup>20)</sup>などに少数の報告がみられるのみである。小窓は、血管腔側と基底膜側の2枚の膜が癒合し、超薄切片では隔膜が存在するといわれてきたが、その中に8個前後の小孔 (pore) が開いている構造であることがディープエッチレプリカ法を用いた研究により知られており<sup>20)</sup>、また血漿成分や高分子の透過性の高いことも確かめられている<sup>51)</sup>ことから、神経膠腫においても血液脳関門の破綻の重要な要素のひとつであると考えられる。グリア系の腫瘍血管は小窓をもたない、すなわち無窓血管であり、非グリア系の腫瘍および転移性腫瘍の腫瘍血管は小窓をもつ、すなわち有窓血管であることを、脳腫瘍の血管の形態はその発生母地の血管の性格を引き継ぐという考え方で説明する報告もある<sup>21)</sup>。今回、血管に小窓を認めた5例の腫瘍の部位はそれぞれ視神経、脳室内、側脳室三角部、頸髄延髄移行部、側頭後頭葉であり、血液脳関門を欠く組織に近接したものが多く、腫瘍血管の起源を考える上でのひとつの参考になるかもしれない。しかしまた、たとえ血液脳関門を欠く組織に近くても、発生母地がそれらの組織であるという証拠は腫瘍細胞の組織像からは読みとれないのも事実である。また逆に、例えば側脳室三角部に発生した膠芽腫でも、小窓が認められたものと認められなかったものがあり、発生部位によって直ちに小窓の有無を判別することはできない。また、脳幹に発生した原線維性星膠腫の症例は、再発例であり、放射線治療もなされており、その影響も少なからずあるものと思われる。今回、我々は通常の超薄切片に加え、凍結割断レプリカ法により観察し、比較的良性的な組織像をもつ神経膠腫の腫瘍血管にも少なからず小窓を認めた。しかも、既に報告のある視神経膠腫のみならず、上衣下巨細胞性星膠腫や放射線照射後ではあるが原線維性星膠腫にすら観察された。これらの良性神経膠腫の組織像をみると、その主たる構築細胞のうち星細胞由来の腫瘍細胞は視神経膠腫では毛様細胞性であり、上衣下巨細胞性星膠腫では肥大細胞性であり、原線維性星膠腫では非双極性の突起をもち、原線維性であり、それぞれ異なっている。しかし、前二者にはいずれも細胞間隙が認められ、殊に毛様細胞性星膠腫では著明である。また、視神経膠腫と上衣下巨細胞性星膠腫は腫瘍の部分がCT スキャン上いずれも造影剤で増強された。したがって術前診断として、神経膠腫のCT上の増強効果の存在は、組織型の悪性度を問わず、腫瘍血管内皮細胞の小窓の存在と相関があることが示唆される。以前の報告に比べて多数の神経膠腫の腫瘍血管に小窓が認められたことは、レプリカ法により膜面を広範囲に観察できたため

と思われる。また、今回レプリカで観察した範囲は腫瘍全体のごく一部であり、さらに多くの神経膠腫においても内皮細胞の小窓が存在する可能性があると思われる。しかしまた、すべての神経膠腫に内皮の小窓が存在するとも限らず、小窓の他にも膜表面や辺縁部のひだ形成など、膜自体が突起を出して血漿成分を取り込む機構や、不規則な基底膜なども血液脳関門の破綻の要因として挙げることができると考えられる。

### 結 論

神経膠腫の腫瘍血管の超微形態を通常の超薄切片に加え、凍結割断レプリカ法を用いて観察し、正常脳組織の毛細血管と比較した。

1. 内皮細胞の小窓は検索した15例の神経膠腫のうち5例にみられ、血液脳関門の破綻を示唆した。この組織像は視神経膠腫、上衣下巨細胞性星膠腫、毛様細胞性星膠腫および膠芽腫であった。

2. 神経膠腫の血管内皮細胞には正常脳と同様の形態をもつ閉鎖帯が認められたが、一部には線条の非連続性が認められ、血液脳関門の破綻を示唆した。

3. 内皮細胞の飲み込み陥凹は良性群および悪性群の神経膠腫の間でその分布に統計的有意差はなく、いずれにも正常脳と同程度の密度で分布していた。

以上の結果から、ヒト神経膠腫における血液脳関門の形態学的な破綻の要素として、血管内皮細胞の小窓の形成と閉鎖帯の部分的な非連続性が重要と考えられる。

### 謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師山下純宏教授に深甚なる謝意を捧げます。また直接御指導を賜りました集中治療部石瀬淳講師に深謝致します。また統計学的処理に関して懇切な御指導を賜った衛生学橋本和夫教授に深謝致します。本研究の遂行にあたり、御協力を戴きました金沢大学脳神経外科学教室の諸先生方、電子顕微鏡技術員横田輝一氏、ならびに当教室今村明子氏に厚く御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) 佐野 豊: 血液脳関門の形態学—歴史的観点から—。神経進歩, 32, 953-965 (1988).
- 2) Long, D. M.: Capillary ultrastructure and the blood-brain barrier in human malignant tumors. J. Neurosurg., 32, 127-144 (1970).
- 3) Raimondi, A. J., Mullan, S. & Evans, J. P.: Human brain tumors. An electromicroscopic study. J. Neurosurg., 19, 731-752 (1962).

- 4) Coomer, B. L., Stewart, P. A., Hayakawa, K., Farrell, C. L. & Maestro, R. F. D.: Quantitative morphology of human glioblastoma multiforme microvessels: structural basis of blood-brain barrier defect. J. Neurooncol, 5, 299-307 (1987).
- 5) Don, M. L.: Vascular ultrastructure in human meningiomas and schwannomas. J. Neurosurg., 38, 409-419 (1973).
- 6) Hirano, A., Dembitzer, H. M. & Zimmerman, H. M.: Fenestrated blood vessels in neurilemoma. Lab. Invest., 27, 305-309 (1972).
- 7) Kasantikul, V. & Brown, W. J.: Ultrastructure of capillaries in acoustic neurilemoma. Surg. Neurol., 16, 30-35 (1981).
- 8) Carter, L. P., Beggs, J. & Waggener, J. D.: Ultrastructure of three choroid plexus papillomas. Cancer, 30, 1130-1136 (1972).
- 9) Hirano, A., Ghatek, N. R. & Zimmerman, H. M.: Fenestrated blood vessels in craniopharyngioma. Acta Neuropathol. (Berl.), 26, 171-177 (1973).
- 10) Hirano, A., Tomiyasu, U. & Zimmerman, H. M.: The fine structure of chromophobe adenoma. Acta Neuropathol. (Berl.), 22, 200-207 (1972).
- 11) Ward, J. D., Hadfield, M. G. Becker, D. G. & Lovings, E. T.: Endothelial fenestrations and other vascular alterations in primary melanoma of the central nervous system. Cancer, 34, 1982-1991 (1974).
- 12) Tani, E. Ikeda, K., Kudo, S., Yamagata, S., Higashi, N. & Fujihara, E.: Fenestrated vessels in human hemangioblastoma. J. Neurosurg., 40, 696-705 (1974).
- 13) Hirano, A., Ghatak, N. R., Becker, N. H. & Zimmerman, H. M.: A comparison of the fine structure of small blood vessels in intracranial and retroperitoneal malignant lymphomas. Acta Neuropathol. (Berl.) 27, 93-104 (1974).
- 14) Hirano, A. & Zimmerman, H. M.: Fenestrated blood vessels in a metastatic renal carcinoma in the brain. Lab. Invest., 26, 465-468 (1972).
- 15) Long, D. M.: Capillary ultrastructure in human metastatic brain tumors. J. Neurosurg., 51, 53-58 (1979).
- 16) Anderson, D. R. & Spencer, W. H.:

- Ultrastructural and histochemical observations of optic nerve gliomas. *Arch. Ophthalmol.*, **83**, 324-335 (1970).
- 17) **Miki, H. & Hirano, A.**: Optic nerve glioma in an 18-month old child. *Am. J. Ophthalmol.*, **79**, 589-595 (1975).
- 18) **Hassoun, J., Hirano, A. & Zimmerman, H. M.**: Fine structure of intercellular junctions and blood vessels in medulloblastomas. *Acta Neuropathol.*, (Berl.), **33**, 67-78 (1975).
- 19) **Kubota, T., Hirano, A., Sato, K. & Yamamoto, S.**: The fine structure of astroblastoma. *Cancer*, **55**, 745-750 (1985).
- 20) **Waggener, J. D. & Beggs, J. L.**: Vasculature of neural neoplasms. *Adv. Neurol.*, **15**, 27-49 (1976).
- 21) 柴田尚武, 森 和夫: 脳腫瘍の血液脳関門—超微形態による検討—。 *神経進歩*, **32**, 974-983 (1988).
- 22) **Branton, D.**: Freeze-etching nomenclature. *Science*, **190**, 54-56 (1975).
- 23) **Goldman, E. E.**: Experimentelle Untersuchungen über die Funktion der Plex. choroid. und der Hirnhäute. *Arch. Klin. Chirur.*, **101**, 735-741 (1913).
- 24) **Van Breeman, V. L. & Clemente, C. D.**: Silver deposition in the central nervous system and the hematoencephalic barrier studied with the electron microscope. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **1**, 161-166 (1955).
- 25) **Wislocki, G. B. & Leduc, E. H.**: Vital staining of the hematoencephalic barrier by silver nitrate and trypan blue, and cytological comparisons of the neurohypophysis, pineal body, area postrema, intercolumnar tubercle and supraoptic crest. *J. Comp. Neurol.*, **96**, 371-414 (1952).
- 26) **Reese, T. S. & Karnovsky, M. J.**: Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.* **34**, 204-217 (1967).
- 27) **Karnovsky, M. J.**: The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. *J. Cell Biol.*, **35**, 213-236 (1967).
- 28) **Bodenheimer, T. S. & Brighman, M. W.**: A blood-brain barrier to peroxidase in capillaries surrounded by perivascular space. *Am. J. Anat.*, **122**, 249-256 (1968).
- 29) **Broadwell, R. D. & Brightman, M. W.**: Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. *J. Comp. Neurol.*, **166**, 257-284 (1976).
- 30) **Farquhar, M. G. & Palade, G. E.**: Segregation of ferritin in glomerular protein absorption droplets. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **7**, 297-304 (1960).
- 31) **Brightman, M. W.**: The distribution within the brain of ferritin injected into cerebrospinal fluid compartment. I. Ependymal distribution. *J. Cell Biol.*, **26**, 99-123 (1965).
- 32) **Steere, R. L.**: Electron microscopy of structural detail in frozen biological specimens. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **3**, 45-60 (1957).
- 33) **Branton, D.**: Fracture faces of frozen membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **55**, 1048-1055 (1966).
- 34) **Claude, P. & Goodenough D. A.**: Fracture faces of zonulae occludentes from tight and leaky epithelia. *J. Cell Biol.*, **58**, 390-400 (1973).
- 35) **Dermietzel, R.**: Junctions in the central nervous system of the cat. VI. Interendothelial junctions of cerebral blood vessels from selected areas of the brain. *Cell Tissue Res.*, **164**, 45-62 (1975).
- 36) **Simonescu, M., Simonescu, N. & Palade, G. E.**: Morphometric data on the endothelium of blood capillaries. *J. Cell Biol.*, **60**, 138-152 (1974).
- 37) **Shibata, S., Fukushima, M., Inoue, M., Tsutsumi, K. & Mori, K.**: Experimental cerebral infarction in the dog (Part VII). *Neurol. Med. Chir.* (Tokyo), **24**, 831-839 (1984).
- 38) **Tani, E., Yamagata, S. & Ito, Y.**: Freezefracture of capillary endothelium in rat brain. *Cell Tissue Res.*, **176**, 157-165 (1977).
- 39) **Reyners, H., deReyners, E. G., Jadin, J. R. & Maisin, J. R.**: An ultrastructural quantitative method for the evaluation of the permeability to horseradish peroxidase of cerebral cortex endothelial cells of the rat. *Cell Tissue Res.*, **157**, 93-99 (1975).
- 40) **Westergaard, E.**: The blood-brain barrier to horseradish peroxidase under normal and experimental conditions. *Acta Neuropathol.* (Berl.), **39**,

181-187 (1977).

- 41) Sullivan, P. C., Ferris, A. L. & Storrie, B.: Effects of temperature, pH, Elevators, and energy production inhibitors on horseradish peroxidase transport through endocytic vesicles. *J. Cell. Physiol.*, **131**, 58-63 (1987).
- 42) Hirano, A.: Fine structural alterations of small vessels in the nervous system. *In* J. Cervos-Navarro (ed.), *Pathology of Cerebral Microcirculation*, 1st ed. p.203-210, De Gruyter, Berlin, 1974.
- 43) Lee, J. C.: Evolution in the concept of the blood-brain barrier phenomenon. *In* H. M. Zimmerman (ed.), *Progress in Neuropathology*, 1st ed. vol.1, p.84-145, Grune & Stratton, New York, 1971.
- 44) Llana, J. F., Matsumura, H., Hirano, A. & Zimmerman, H. M.: Ultrastructure of vascular alterations in delayed radiation necrosis of the human brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **35**, 334 (1976).
- 45) 松村豪一, 平野朝雄: 人脳の遅発性放射線壊死における微小血管内皮細胞構築に関する新知見. *日本臨床顕微鏡学会誌*, **9**, 37-43 (1976).
- 46) 佐藤 壮, 鈴木二郎: 慢性硬膜下血腫の非観血的

療法—第2法, 血腫被膜の電顕的観察—。脳と神経, **25**, 557-563 (1973).

- 47) Llana, J. F., Cespedes, G., Hirano, A., Zimmerman, H. M., Feiring, E. H. & Fine, D.: Vascular alterations in delayed radiation necrosis of the brain *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **100**, 531-534 (1976).
- 48) Snyder, D. H., Hirano, A. & Raine, C. S.: Fenestrated CNS blood vessels in chronic experimental allergic encephalomyelitis. *Brain Res.*, **100**, 645-649 (1975).
- 49) Hirano, A., Hasson, J. & Zimmerman, H. M.: Some new fine structural observations of ethylnitrosourea-induced nerve tumors in rats. *Lab. Invest.*, **27**, 555-560 (1972).
- 50) Rombardi, T., Montesano, R., Furie, M. B., Silverstain, S. C. & Orci, L.: Endothelial diaphragmed fenestrae: in vitro modulation by phorbol myristate acetate. *J. Cell Biol.*, **102**, 1965-1970 (1986).
- 51) Mayerson, H. M., Wolfram, C. G., Shirley, H. H. & Wasserman, K.: Regional differences in capillary permeability. *Am. J. Physiol.*, **198**, 155-160 (1960).

**Ultrastructure of the Blood-Brain Barrier in Human Gliomas: a Freeze-Fracture Study**  
Megumi Ueno, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa  
920—J. Juzen Med. Soc., **100**, 221—235 (1991)

**Key words** glioma, blood-brain barrier, freeze-fracture replica, fenestration, pinocytosis

#### **Abstract**

The tumor vessels of 15 human gliomas and the capillary endothelial cells of normal brain tissues were electron-microscopically examined, with a freeze-fracture replica in addition to the conventional ultrathin sections, in order to investigate the morphological changes of the blood-brain barrier in human gliomas. The freeze-fracture method was useful for examining the distribution of the intramembranous structures and to observe the intercellular junctions, because it has the ability to observe a wider area. Tight junctions were found to be characteristic structures of the network, consisting of, from several to more than thirty strands, composed of continuous intramembranous particles, in the interendothelial portions in both the normal brain and gliomas. Discontinuous strands of tight junctions were found in a part of the tumor vessels in some glioblastomas. Pinocytotic pits were observed as circular depressions on the P-face and as circular elevations on the E-face, and their diameters were about 60~80 nm. The density of the pinocytotic pits was almost the same in the normal brains, the low grade group and the high grade group of gliomas. Endothelial fenestrations were found as circular depressions in the P-face and as circular elevations in the E-face, and their diameters were about 80~130 nm. Fenestrations were distinguished from pinocytotic pits by their larger diameters, shallow and flat floors and characteristic distribution of clusters. Fenestrations were not found in normal capillary endothelial cells but were found in 5 out of 15 gliomas, and their histological diagnoses were optic glioma, subependymal giant cell astrocytoma, fibrillary astrocytoma and glioblastomas. It is suggested that endothelial fenestrations and the discontinuity of endothelial tight junctions seem to be the most important factors in the morphological breakdown of the blood-brain barrier in human gliomas.