

# 放射線照射後に生ずる遅発性脳壊死の組織学的ならびに生化学的研究

|       |   |
|-------|---|
| メタデータ | 言語: Japanese<br>出版者:<br>公開日: 2017-10-04<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 山口, 成仁<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/2297/8007">http://hdl.handle.net/2297/8007</a>                           |

## 放射線照射後に生ずる遅発性脳壊死の組織学的 ならびに生化学的研究

金沢大学医学部脳神経外科学講座（主任：山本信二郎教授）

山 口 成 仁

(昭和63年1月5日受付)

放射線照射後に生ずる遅発性脳壊死の発生機序について、脳内血管内皮細胞障害との関連において組織学的ならびに生化学的検索を行った。対象は雑種成犬25頭で、うち19頭を照射群とし6頭を対照群とした。大脳半球にライナックX線15Gyを一回照射し、3, 6, 9, 12, 15, 30カ月後に屠殺し、摘出した脳より、組織学的検索用試料の採取と脳内血管内皮細胞の分離を行った。前者については光顕と電顕を用いて脳壊死に至る過程を観察し、後者については放射線照射による細胞周期内動態とDNAの質的变化を生化学的に検索した。すなわち、フローサイトメトリーにてS+G<sub>2</sub>+M期に占める細胞比率（増殖期細胞比率）を算出すると同時に、Feulgen加水分解を行いアプロリン酸生成および破壊の速度定数を求めた。その結果、光顕的には、照射後3カ月では著変はないが、6カ月では白質の海綿状変化が散在性にみられた。9カ月では主として前頭葉の白質内に小壊死巣が出現し、その周囲の血管には内皮細胞の増殖や肥厚、小円形細胞浸潤などがみられた。15カ月までは壊死巣は拡大傾向にあるが、それ以降30カ月まで新しい壊死巣の出現はみられなかった。電顕的には、照射後6カ月では毛細血管や細静脈の内皮細胞にピノサイトシスの亢進がみられ、9カ月後では核の肥厚および血管内腔の著明な狭窄がみられた。核は切れこみが深く真正クロマチンの増加を示し、胞体には細胞内フィラメントやフリーリボソーム、Weibel-Palade小体、微絨毛などが発達していた。さらに、内皮細胞をとりまく基底膜は多層化を示し、周囲には膠原線維が増加していた。同様の血管変化は壊死巣の周囲において照射後15カ月まで認められたが、照射30カ月後には血管内皮細胞はほぼ正常な超微形態を呈した。また、血管内皮細胞の増殖期細胞比率は、対照群では6.4%であるのに対し、照射群では、3カ月後15.0%，6カ月後14.7%，9カ月後23.3%，12カ月後14.5%，15カ月後15.7%，30カ月後20.1%といずれも対照群より高値を示した。さらに、DNAの転写活性に相關するアプロリン酸生成の速度定数は、照射9カ月後に最大を示した。これらの事実は、放射線照射により内皮細胞の細胞周期の部分的同調が生じ、照射後9カ月頃に次期分裂期への移行が最大となることを示唆した。以上より、放射線照射により生じた脳内血管内皮細胞の潜在的DNA障害と細胞周期の部分的同調が、遅発性脳壊死の発生に重要な役割を果すものと推定された。

---

**Key words** delayed radiation necrosis, endothelial cell, flow cytometry, Feulgen hydrolysis

---

中枢神経系に対する放射線照射の重大な副作用の一つとして、遅発性脳壊死の発生が知られている。遅発性脳壊死は放射線照射の1~2年後に生ずるため、その臨床的診断および治療は困難であるとされている<sup>1)~6)</sup>。遅発性脳壊死の発生には、脳内血管内皮細胞の

障害による循環不全が関与することが示唆されており、放射線照射後に生ずる血管内皮細胞の障害については、これまで多数の組織学的研究がなされている。すなわち、Llenaら<sup>7)</sup>、松村<sup>8)</sup>は、遅発性脳壊死をきたした症例の脳を電顕的に観察し、壊死巣周囲の血管に、

Abbreviations: a, the constant representing the amount of potentially stainable DNA present initially; I<sub>p</sub>, the maximal yield of apurinic acid; t<sub>p</sub>, the peak time of depurination; K<sub>1</sub>, the rate constant of depurination; K<sub>2</sub>, the rate constant of depolymerization.

内皮細胞の変性がみられることを報告した。同様の所見は、多数の研究者によって動物実験においても確認されている<sup>9)~15)</sup>。一方、Cavenee<sup>14)</sup>は、サルを用いた実験により、遅発性脳壞死の発生に脳内血管内皮細胞の細胞周期の変化が密接な関係を持つとした。しかし、放射線照射後に生ずる脳内血管内皮細胞のDNA障害や細胞周期の変化についてはこれまで詳細な研究はなされていない。近年、フローサイトメトリーによる細胞周期の解析やFeulgen加水分解反応によるDNAの質的変化の解析が飛躍的に進歩した。そこで本研究において、著者は放射線照射による遅発性脳壞死の発生機序について脳内血管内皮細胞障害との関連において、組織学的ならびに生化学的検索を行った。すなわち、雑種成犬に放射線照射後経時に脳を摘出し、光顕と電顕による観察を行い、同時に脳内血管内皮細胞を分離し上述の手法により細胞周期の解析とDNAの質的変化の解析を行った。

#### 材料および方法

体重8~12kgの雑種成犬25頭を検索の対象とした。ペントバルビタール20~30mg/kgの静脈麻酔下に、19頭の一側大脳半球にLinac X線発生装置(三菱電機製ML-15M III型)を用いて10MVのX線15Gyを一回照射した。残りの6頭はX線照射を行わず対照群とした。照射後、3, 6, 9, 12, 15, 30カ月にペントバルビタール60~90mg/kgの静脈注射により屠殺し、直ちに脳を摘出した。摘出脳より光顕ならびに電顕用試料を採取し、残りの脳より血管内皮細胞を分離した。

#### I. 光顕および電顕用標本の作製

光顕用には、組織片を10%中性ホルマリン溶液にて1週間固定した後、パラフィンに包埋した。厚さ4~6μmの切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、ルクソール・ファーストブルー(LFB)染色を施し、光学顕微鏡にて観察した。電顕用(EM)には、試料を2.5%グルタルアルデヒド溶液にて2時間固定した後、さらに1%オスミウム酸で4°C、1時間固定した。エタノール系列で脱水後エボン812に包埋し、LKBミクロトームを用いて、超薄切片を作製した。酢酸ウラニールと硝酸鉛の二重染色を施し、日立H-600型電子顕微鏡で観察した。

#### II. 脳内血管内皮細胞の分離

Goetzら<sup>16)</sup>の方法により直径150μm以下の脳内血管より内皮細胞の分離を行った。あらかじめ髄膜を剥離した約20gの脳を、10%牛胎児血清(GIBCO社)加Eagle's minimum essential medium(MEM)(日本)中にて、1~2mm<sup>3</sup>に細切り同培養液にて遠心洗浄し

た。その沈渣に、0.5%の濃度でcollagenase-dispase(Boehringer Mannheim社)を溶解したMEM15mlを加え、37°C、1時間振盪培養した。遠心後、沈渣に25%の濃度で牛血清アルブミン(Bovine Albumin Powder Fraction V, ARMOUR社)を溶解したMEM40mlを加え、再び遠心した。沈渣に100mlの培養液を加え、150μmのナイロンメッシュを通したのち、濾過液をさらに遠心した。沈渣に10mlのcollagenase-dispase溶液を加え、37°C、30分間振盪培養後、40mlの冷培養液を加えた。細胞浮遊液を、底に50μmナイロンメッシュを張り直径0.25~0.30mmのガラスビーズを詰めた円柱の中を通して、さらに200mlの冷培養液にて洗浄した。ナイロンメッシュおよびガラスビーズに付着した細胞を培養液にて洗い出し、遠心したのち収集した。採取した細胞の一部はスライドガラスに塗沫し、風乾後、抗第VIII因子関連抗原抗体(DACO社)を用いた蛍光抗体間接法により、内皮細胞であることを確認した。

#### III. フローサイトメーター測定用サンプル調整

分離した内皮細胞をCa<sup>2+</sup>やMg<sup>2+</sup>を含まない10mMリン酸緩衝液(phosphate-buffered saline, PBS)(pH 7.2)にて、2回遠心洗浄後、70%エタノールにて、4°C、16時間固定した。次に、PBSにて2回遠心洗浄後、80°C、10分間加熱したリボヌクレアーゼ(Sigma社)2000単位を含む溶液にて37°C、30分間の振盪培養を行った。リン酸-クエン酸緩衝液(pH 6.5)にて2回遠心洗浄後、細胞沈渣に2N HClを加え、30°C、90分の加水分解を行った。0, 15, 30, 60, 90分の計5回のサンプリングを行い、0°C 0.1N HClで反応を止め、リン酸-クエン酸緩衝液で2回遠心洗浄を行った。細胞を1×10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup>個含む様に調整したサンプル0.2mlに、リン酸-クエン酸緩衝液に0.15N NaClおよびアクリジンオレンジ(和光純薬)を10μg/mlの濃度で含む染色液1.6mlを加え、4°C、30分間の染色を行った。

#### IV. フローサイトメーターによる蛍光量測定

測定には、CS-20型のフローサイトメーター(昭和電工製)を用い、データー処理および保存には付属コンピューターCTU-IIを用いた。染色後の試料は、40μmナイロンメッシュを通したのち、488nmアルゴンレーザーにて励起し、適正フィルターを用いて赤色螢光(波長帯630~650nm, F<sub>630</sub>)および緑色螢光(波長帯515~575nm, F<sub>550</sub>)を測光した。なお、測定前にAO用標準ビーズ(Ortho社)を用いて測定系の調整をおこなった。

#### V. DNAヒストグラム解析

リボヌクレアーゼ処理を加えた細胞では、アクリジ

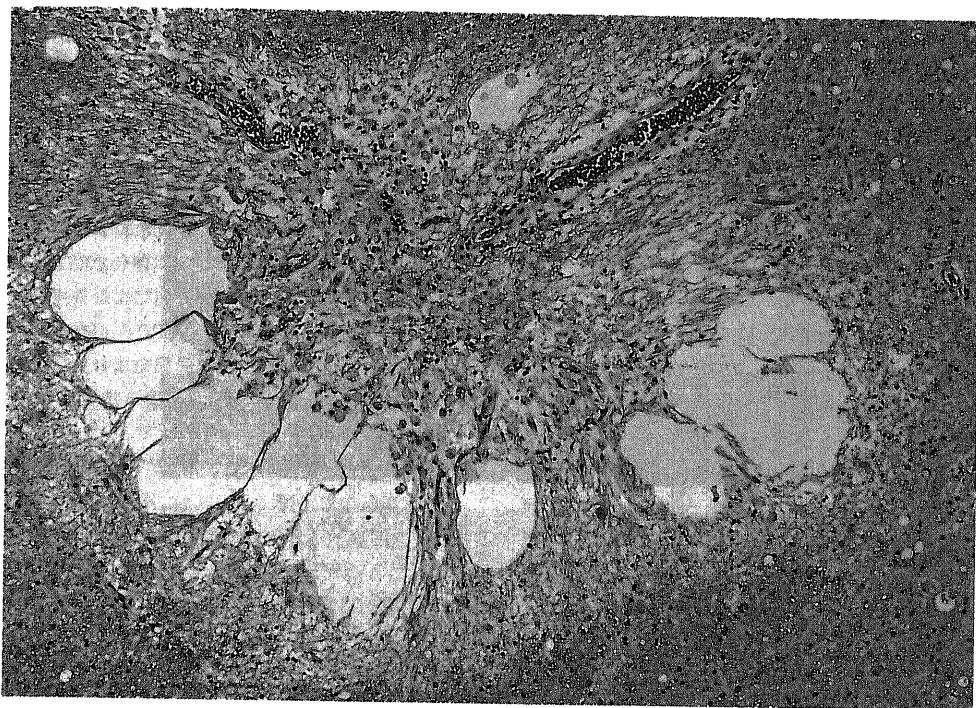


Fig. 1. A number of phagocytic cells are seen within the necrotic foci developing in the frontal white matter with marked spongy degeneration.  
9 months after irradiation. H & E stain  $\times 90$ .



Fig. 3. Demyelination extends from the necrotic area to the whole white matter.  
15 months after irradiation. LFB stain  $\times 60$ .

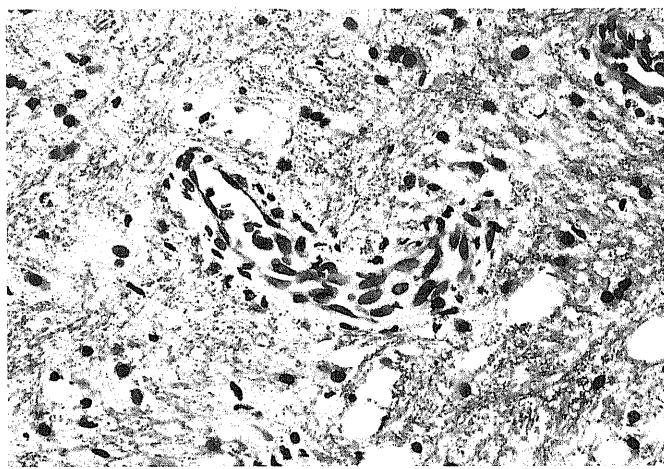
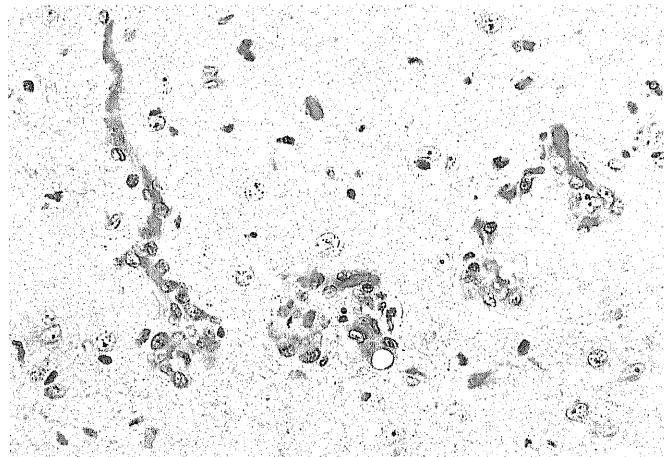
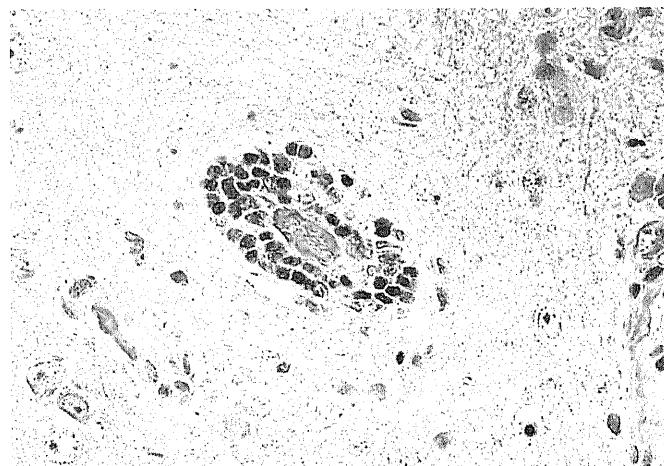
**A****B****C**

Fig. 2. Blood vessels around the necrotic foci show hyperplasia of plumped endothelial nuclei (A : 6 months after irradiation. H & E stain  $\times 250$ ), endothelial proliferation with a resultant luminal narrowing (B : 15 months after irradiation H & E stain  $\times 250$ ) and perivascular infiltration of lymphocytic cells (C : 15 months after irradiation. H & E stain  $\times 350$ ).

ンオレンジは主にDNA二重鎖間に結合し緑色螢光( $F_{530}$ )を発し、その量は相対的DNA含量に比例することが知られている<sup>17)~20)</sup>。この現象を利用して、フローサイトメーターにより $F_{530}$ を測光して得られたヒストグラムより、S+G<sub>2</sub>+M期に占める細胞の比率(増殖期細胞比率)を算出した。

#### VI. Feulgen 加水分解曲線の解析

Feulgen 加水分解反応は細胞核内DNAからのアブリン酸の生成および消失の過程を表すと考えられている<sup>21)~24)</sup>。Böhmら<sup>25)</sup>によれば、このDNAよりのアブリン酸の生成および消失の逐次反応は、加水分解時間tでのアブリン酸の量をy(t)とすると次式であらわされる。

$$y(t) = aK_1(e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) / (K_2 - K_1)$$

aは初期DNA量、 $K_1$ はアブリン酸生成の速度定数、 $K_2$ はアブリン酸破壊の速度定数である。また、アクリジンオレンジは、酸による変性をうけたDNAでは、その負に荷電したリン酸基と静電的に結合し、赤色螢光

( $F_{630}$ )を発することが知られている。上式にフローサイトメーターを用いて $F_{630}$ を測光して得られた測定値を挿入し、最小二乗法プログラムを用いたコンピューター解析により、各パラメーターを求めた。同一モデルが複数存在する場合は、実測値と理論値の相關係数が最大となったものを最適値として選んだ。

#### 成 績

##### I. 光顕所見

放射線照射3カ月後では、血管および脳には特記すべき変化はみられなかった。6カ月後では、主として前頭葉の白質内に散在性に海綿状変化が出現し、周辺の毛細血管および細静脈には、リンパ球と思われる多数の小円形細胞の浸潤がみられた。大脳皮質の実質細胞や主幹動脈には、著変はなかった。9カ月後では、海綿状変化を示す範囲が拡大し、前頭葉のみならず頭頂葉の白質内的一部分にも長径が1000μm程度の壞死巣が出現した(図1)。壞死巣は液状の空洞化を示し、

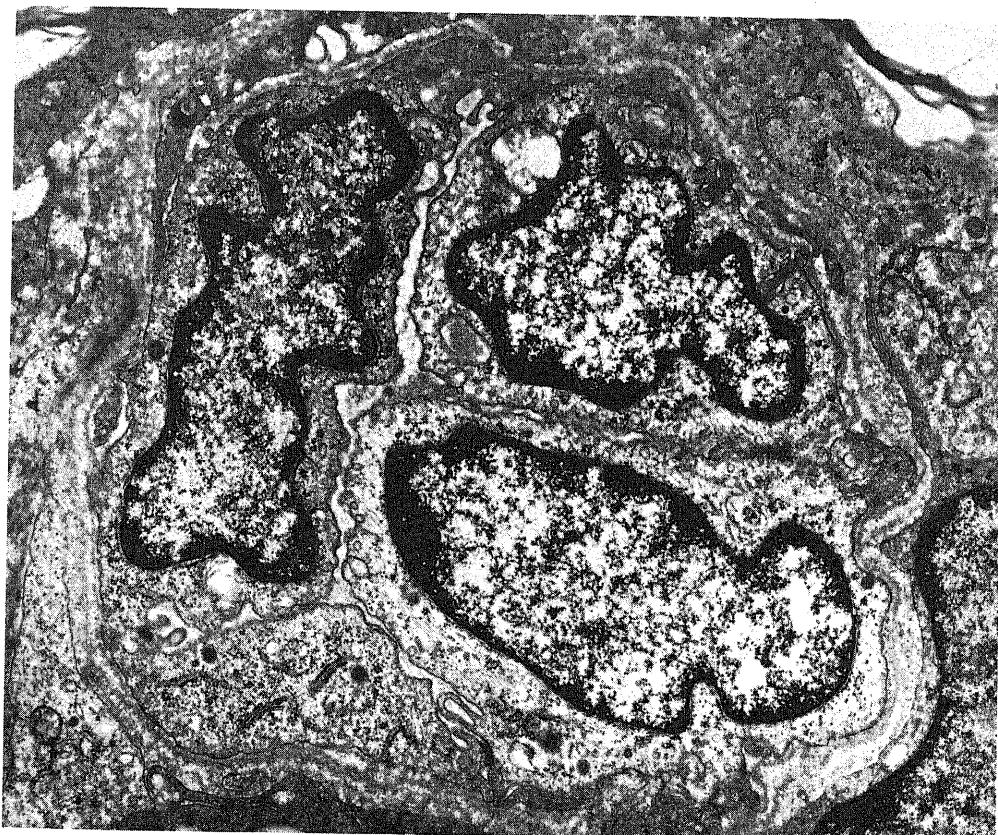


Fig. 4. Endothelial nuclei with an increase of infoldings and euchromatin show marked swelling which results in luminal narrowing.  
9 months after irradiation. EM×12,000.

その内腔には、多数の貪食細胞がみられた。また、壊死巣周辺の血管には壁の肥厚や細胞集積がみられた(図 2-A)。この様な血管変化は、一般に白質内の毛細血管や細静脈にしばしばみられたが、皮質内血管の一部にも同様の所見がみられた。しかし、大脳皮質には明らかな壊死巣は認められなかった。12 カ月後には、9 カ月とほぼ同様の壊死巣がみられた。15 カ月後では、壊死巣は拡大し、肉眼的に大きさが 1~2 mm の病巣を識別した。壊死巣は主に前頭葉の白質内に多くみられたが、頭頂葉や側頭葉、後頭葉内にもみられた。また、壊死巣とその周辺には、多数の貪食細胞が集積していた。壊死巣は海綿状変化を示す部分と連続しており、壊死巣周辺の血管には、内皮細胞の増殖により内腔の狭窄を示すもの(図 2-B)や、周囲に著明な細胞集積を示すもの(図 2-C)がみられた。血管変化は、9 カ月後と同様に壊死巣周囲の毛細血管および細静脈に多くみられたが、壊死巣から離れた部分にも観察された。大脳皮質の一部には、神経細胞の脱落とグリア細

胞の反応性増殖がみられた。30 カ月後では、壊死巣は 15 カ月後とほぼ同様の大きさで、周囲にはグリア細胞の増殖がみられた。LFB 染色では、15 カ月以降に白質の著明な脱髓性変化がみられた(図 3)。

## II. 電顕所見

放射線照射 3 カ月後では、内皮細胞には著変を認めなかった。照射 6 カ月後では、毛細血管や細静脈の内皮細胞の胞体内に微小のみこみ小胞や呑飲空胞の増加がみられた。これらの血管には、胞体内に多数のライソゾーム顆粒をもつ貪食細胞がしばしば付着していた。照射 9 カ月後では、血管内皮細胞の核は肥大し切れこみが多く、真正クロマチンの増加を示した。また、核周囲部においては胞体の肥厚により血管内腔は著しい狭窄を示した(図 4)。胞体内には中間径フィラメントやフリーリボゾームが発達しており、多数の Weibel-Palade 小体がみられた(図 5, 図 6)。内皮細胞から血管内腔に向かい多数の微絨毛様の突起がみられた(図 6)。さらに、内皮細胞をとりまく基底膜は多

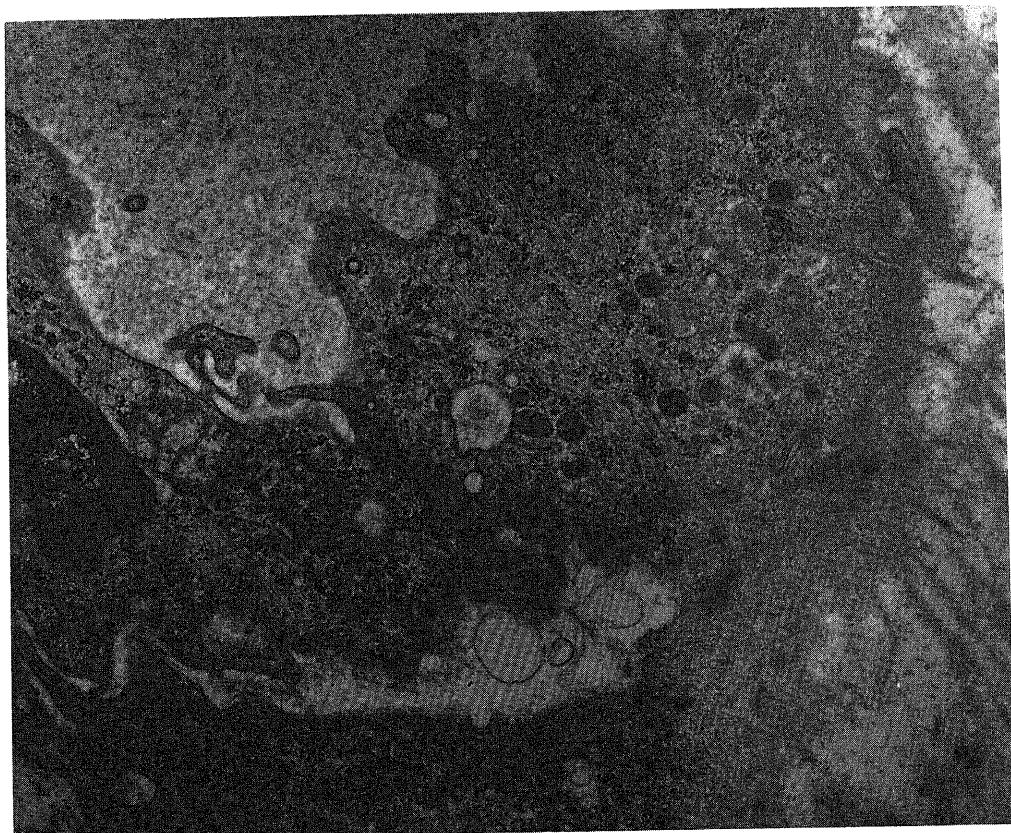


Fig. 5. The endothelial cytoplasm contains numerous intermediate filaments, micro-pinocytotic vesicles and Weibel-Palade bodies.  
9 months after irradiation. EM $\times$ 18,000.

層化を示し、周囲には多数の膠原線維がみられた(図7)。これらの血管をとりまく星状膠細胞の突起はしばしば水腫様の肥大を示した。内皮細胞の肥厚により著明な内腔狭窄を示す血管は壞死巣の周囲において、照

Table 1. The DNA distribution in endothelial cells in different periods after irradiation

| survival period † | Cells in S+G <sub>2</sub> +M (%) |
|-------------------|----------------------------------|
| 3M                | 15.0                             |
| 6M                | 14.7                             |
| 9M                | 23.3                             |
| 12M               | 14.5                             |
| 15M               | 15.7                             |
| 30M               | 20.1                             |
| control ‡         | 6.4                              |

† months; ‡ non-irradiated dog.  
the value showing the smallest deviation.

射15カ月後まで認められた。照射30カ月後には、血管内皮細胞はほぼ正常な超微形態を示した。

### III. 増殖期細胞比率

増殖期細胞比率は、対照群では6.4%であるのに対し、照射群では3カ月後15.0%，6カ月後14.7%，9カ月後23.3%，12カ月後14.5%，15カ月後15.7%，30カ月後20.1%といずれも高値を示し、9カ月後に最大であった(表1)。

### IV. Feulgen 加水分解曲線の解析

15Gy 照射15カ月後の犬より得られた成績を図8に示す。図の左において縦軸は緑色螢光強度( $F_{530}$ ) (arbitrary unit, a.u.)、横軸は赤色螢光強度( $F_{630}$ ) (a.u.)を示す。ドット1つは細胞30個を表す。図の右は左における赤色螢光のみをヒストグラム表示したもので、縦軸は細胞数を示し、横軸は赤色螢光強度を示す。このように加水分解時間0分では、アクリジンオレンジは主にDNA二重鎖間に結合し緑色螢光を発したのに対し、15分以降では螢光波長は大きく赤色に傾

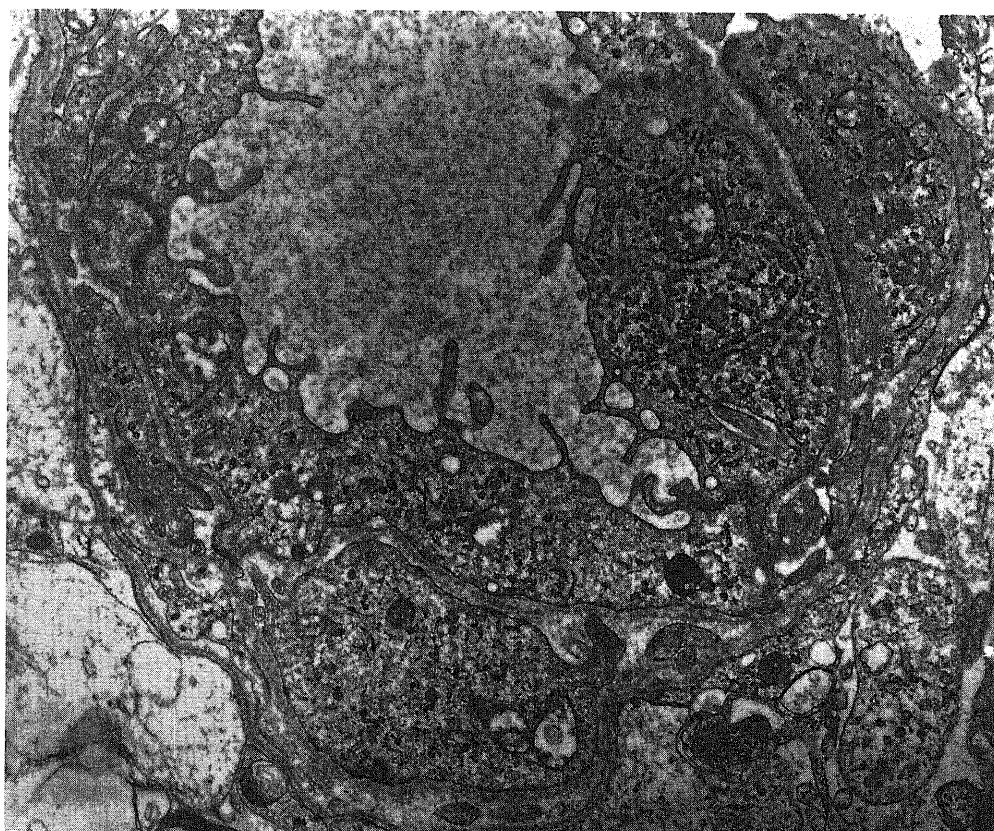


Fig. 6. The endothelial cytoplasm has abundant free ribosomes and microvillous projections into the lumen.  
9 months after irradiation. EM  $\times$  12,000.

き、アプリン酸の生成を示した。また、時間の経過と共に、赤色螢光強度のピーク値は 18, 17, 13, 8 と減少し、アプリン酸の消失を示した。表 2 はコンピューター解析により得られた各パラメーターを示したもので、図 9 はその成績を図式化したものである。表およ

び図中の  $I_p$  はアプリン酸の最大生成量を示し、 $t_p$  はその加水分解時間を示す。 $t_p$  は照射 3 カ月後に最大となり、その後減少し 9 カ月後に最小となった。12 カ月以後再び上昇する傾向がみられた。 $I_p$  は照射 6 カ月後に最大となり 12 カ月後に最小となった。 $a$  は照射 3 カ月

Table 2. Representative values for the kinetic parameters of Feulgen hydrolysis

| survival period † | $t_p$ (min) | $I_p$ (a.u.) | $a$ (a.u.) | $k_1$ (1/min)         | $k_2$ (1/min)         |
|-------------------|-------------|--------------|------------|-----------------------|-----------------------|
| 3M                | 41.8        | 32.92        | 40.58      | $6.71 \times 10^{-2}$ | $5.00 \times 10^{-3}$ |
| 6M                | 21.4        | 36.36        | 39.30      | $1.88 \times 10^{-1}$ | $3.64 \times 10^{-3}$ |
| 9M                | 14.0        | 35.76        | 38.22      | $3.01 \times 10^{-1}$ | $4.74 \times 10^{-3}$ |
| 12M               | 26.7        | 26.03        | 32.39      | $1.03 \times 10^{-1}$ | $8.18 \times 10^{-3}$ |
| 15M               | 29.1        | 29.41        | 33.77      | $1.14 \times 10^{-1}$ | $4.75 \times 10^{-3}$ |
| 30M               | 22.9        | 21.27        | 25.35      | $1.32 \times 10^{-1}$ | $7.67 \times 10^{-3}$ |
| control ‡         | 23.7        | 30.76        | 35.36      | $1.40 \times 10^{-1}$ | $5.85 \times 10^{-3}$ |

† months; ‡ non-irradiated dog.

the most proper value obtained from the regression analysis between observed and expected values.

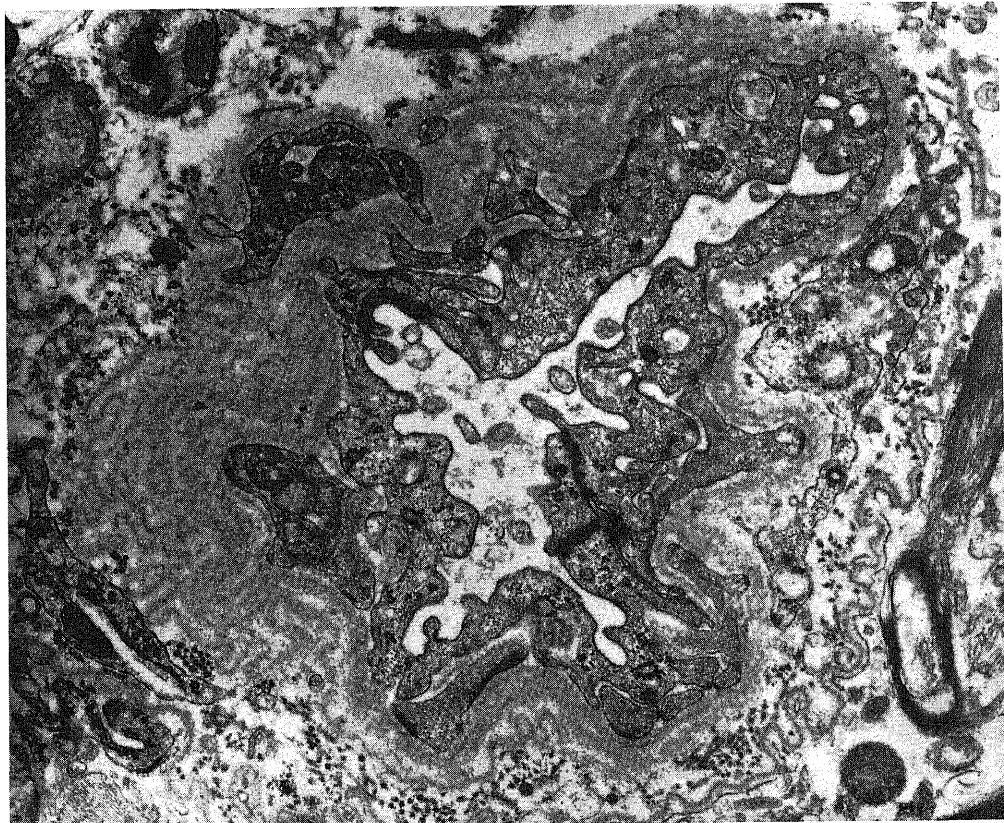
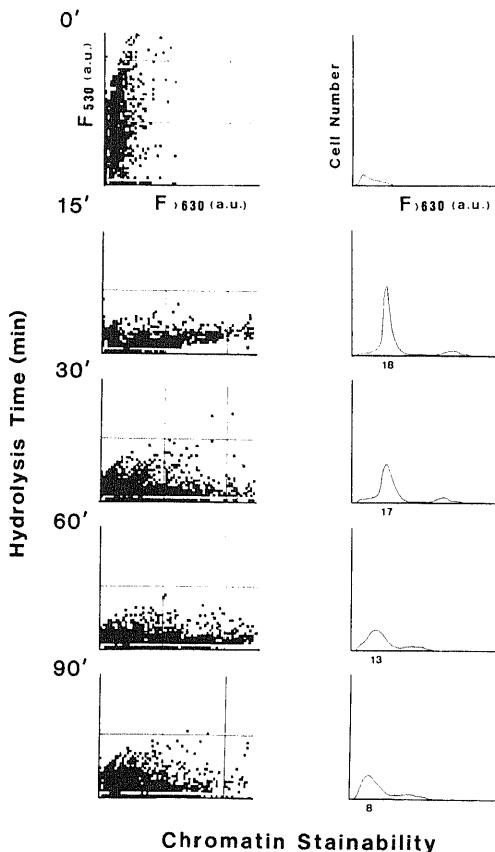


Fig. 7. Regenerating capillaries are surrounded by multilayered basal lamina and a number of collagen fibrils.  
9 months after irradiation. EM  $\times 18,000$ .

後に最大となり、その後、徐々に減少する傾向がみられた。 $K_1$  は照射 3 カ月後に最小となり、9 カ月後には最大値をとり、 $t_p$  とほぼ逆の位相関係がみられた。また、 $K_2$  は照射 6 カ月後に最小となり、12 カ月後に最大値をとり、 $I_p$  とほぼ逆の位相関係がみられた。この様にして得られた各パラメーターの値を用いて描いた加水分解曲線を図 10 に示す。図において横軸は加水分解時間を示し、縦軸は赤色蛍光量（相対的アブリン酸量）を示す。立ち上がりのカーブはアブリン酸の生成過程を表し、照射 9 カ月後に最も急峻であった。ピーク値以降に続くカーブはアブリン酸の消失過程を表わし、照射 6 カ月後に最も緩徐であった。

### 考 察

放照線照射後に生ずる遅発性脳壞死について現在



### Chromatin Stainability

Fig. 8. Stainability of nuclear chromatin by Feulgen hydrolysis.

Computer-drawn scattergrams of endothelial cells following the acridine orange staining are shown in the left, while single parameter frequency histograms of red fluorescence are shown in the right.

まで多数の組織学的研究がなされており、その発生には血液脳閂門の破綻や血管透過性の亢進および血管内腔の閉塞などが重要な役割を果すとされている。すなわち、Llena ら<sup>7</sup>、Matsumura ら<sup>20</sup>は臨床材料を光頭と電頭を用いて検索し、壞死巣周囲の血管に類線維素変性や内皮細胞の菲薄化、窓形成、ピノサイトシスの亢進などをみた。一方、Caviness<sup>14</sup>はサルを用いた実験で、壞死巣とその周囲の血管に内皮細胞の消失や過形成をみた。さらに、McDonald<sup>11</sup>はウサギを用いた

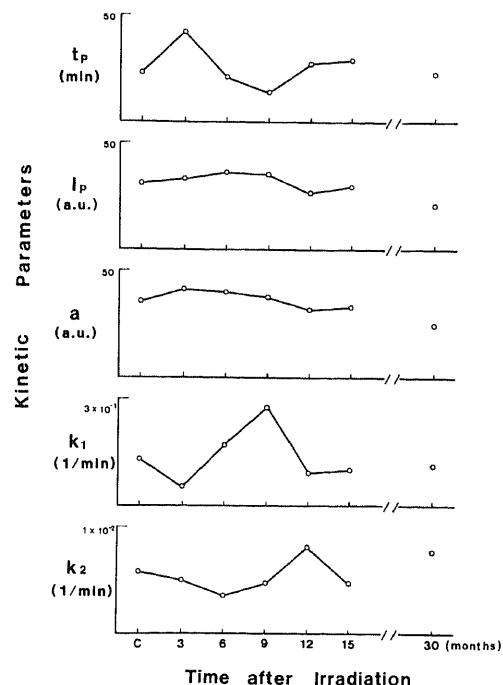


Fig. 9. Depiction of kinetic parameters in Table 2.

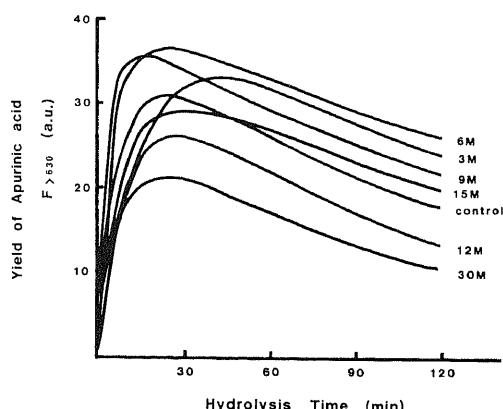


Fig. 10. Feulgen hydrolysis curves of endothelial cells in different periods after irradiation.

実験で毛細血管の内皮細胞に膨化や壊死をみた。本研究では、15Gy の放射線照射 6 カ月後より白質の海綿状変化が出現し、血管周囲の小円形細胞浸潤や血管内皮細胞のピノサイトーシスの亢進がみられたことより、脳血管の透過性の亢進が示唆された。照射 9 カ月後には、部分的に壊死巣が出現し、15 カ月後には壊死巣はほぼ完成した。壊死巣周囲の血管には透過性亢進を示す所見に加え、内皮細胞の肥厚や増殖による血管内腔の閉塞がみられた。さらに、周囲の神経細胞には、核クロマチンの濃縮やニッスル小体の中心崩壊などの虚血性変化がみられ、グリア細胞は反応性増殖を示したことより、血液脳関門の破綻による微小循環障害が示唆された。照射 15 カ月後には壊死巣に加え広範な脱髓病巣がみられた。以上より、放射線照射後の早い時期ではなく遅発性に脳壊死が生ずるのは、放射線が直接脳に作用するのではなくまず脳血管に何らかの障害を与え、その結果二次的に脳細胞や髓鞘が障害されるためであると解される。したがって、遅発性脳壊死の発生機序を解明する糸口は、脳血管ことにその内皮細胞が放射線によってどの様な生化学的变化をきたすかを知ることにある。なかんずく、放射線が血管内皮細胞の細胞周期に与える影響を究明すれば、なぜ照射後一定の期間において形態学的ならびに機能的に異常な血管内皮細胞が再生されるかがわかるはずである。

正常の血管内皮細胞の DNA 合成期 (S 期) 細胞比率については従来より多数の研究がなされている<sup>27)~29)</sup>。すなわち、Engerman ら<sup>27)</sup>は <sup>3</sup>H-thymidine を用いたオートラジオグラフィーにより、マウス毛細血管内皮細胞の S 期細胞比率は、網膜では 0.01%、心筋では 0.14% 以上であると報告した。Tannock ら<sup>29)</sup>は同様の方法で筋肉、骨、および皮膚における S 期細胞比率を算出し、いずれも 0~2.4% であるとした。従来より、放射線照射により細胞周期の同調および遅延がおこることが知られているが<sup>30)31)</sup>、現在に至るまで、*in vivo*において放射線照射による脳内血管内皮細胞の細胞周期の変化を検索した報告はみられない。本研究においては、内皮細胞の増殖期細胞 (S+G<sub>2</sub>+M) 比率は対照群では 6.4% であるのに対し、照射群では 14.5~20.1% といずれもより高値を示した。また、組織学的に明瞭な壊死巣が初めて出現した照射 9 カ月後において増殖期細胞比率は 23.3% と最大値を示した。これらの事実は、壊死巣の発生と血管内皮細胞の増殖期細胞比率には密接な相関があることを示唆していた。すなわち、照射により細胞周期の部分的同調をうけた内皮細胞の多くが、9 カ月前後に次期分裂期に入り、この時期に初めて照射による DNA 障害が頭在化するため、形態的および機能的に異常な内皮細胞が再

生されたものと思われた。そこで本研究においては、さらに放射線照射後に生ずる血管内皮細胞の DNA の質的変化について Feulgen 加水分解反応を用いて定量的な解析を行った。

Feulgen 加水分解反応は従来、核 DNA の定量に利用されてきたが、近年、加水分解曲線にコンピューター解析を加え DNA の質的変化を定量的に解析する方法に応用されている<sup>32)~34)</sup>。Feulgen 加水分解曲線において、最初の急峻なカーブはアプリン酸の生成を示し<sup>21)~23),35)</sup>、K<sub>1</sub> はその速度定数である。一般に、細胞周期内各分画によって Feulgen 反応が異なり<sup>36)</sup>、DNA の転写活性の高い細胞ほど反応が大きいことが知られている<sup>37)~40)</sup>。また、DNA 合成前には Feulgen 加水分解反応が数倍に高まり、クロマチンはより分散した構造をとる<sup>41)~43)</sup>。以上の事実より、アプリン酸生成の速度定数である K<sub>1</sub> はクロマチンの空間構造の差による DNA 転写活性に相關するパラメーターであると考えられる。本研究において、K<sub>1</sub> が照射後 9 カ月で最大となった事実は、この時期に血管内皮細胞のクロマチン構造の分散化がおこり DNA の転写活性が増大したことを見出しており、同時期に増殖期細胞比率が最大となった事実と一致する。一方、アプリン酸生成に続く緩やかなカーブはアプリン酸の消失を示し、K<sub>2</sub> はその速度定数である。Andersson ら<sup>44)~46)</sup>は、Ehrlich 腹水癌細胞を用いて Feulgen 加水分解曲線を解析し、アプリン酸消失の過程は DNA の安定性に相關するとした。Miyoshi ら<sup>34)</sup>は、ラット脳内の細胞で Feulgen 反応の相違を調べ、K<sub>2</sub> は加令とともに増大することを示し、同様の結論を述べた。本研究では、K<sub>2</sub> は照射後 6 カ月に最小、12 カ月に最大となり、アプリン酸の最大生成量である I<sub>p</sub> とほぼ逆の位相関係を示した。すなわち、アプリン酸消失過程の遷延によりアプリン酸の最大生成量が増加し、DNA の不安定性が増していることが示唆された。

以上、本研究で得られた成績より、放射線照射後に生ずる遅発性脳壊死の成因として、照射によって生じた脳内血管内皮細胞の潜在的 DNA 障害および細胞周期の同調が重要な役割を果すことが示唆された。

## 結 論

放射線照射後に生ずる遅発性脳壊死の発生と脳内血管内皮細胞障害との関連について、雑種成犬の大脳半球にライナック X 線 15Gy を 1 回照射し、組織学的ならびに生化学的検索を行った。

1. 放射線照射後 9 カ月より主として前頭葉の白質内に壊死巣が出現し、15 カ月でほぼ完成した。
2. 光頭的には、壊死巣周囲の血管は小円形細胞の

浸潤や内皮細胞の増殖およびその肥厚による血管内腔の閉塞などを示した。

3. 電顕的には、血管内皮細胞は核の真正クロマチンの増加、ピノサイトシスの亢進、フリーリボゾームや Weibel-Palade 小体、微絨毛の増加および基底膜の多層化などを示した。

4. 血管内皮細胞の増殖期細胞比率は、照射群ではいずれも対照群より高値を示し、照射後 9 カ月で最大であった。

5. DNA よりのアプリン酸の生成速度定数は、照射後 9 カ月で最大となり、同時期における DNA の転写活性の高さを示唆した。

6. 以上より、放射線照射による遅発性脳壊死の発生に、脳内血管内皮細胞の細胞周期の部分的同調と DNA 障害が重要な役割を果すことが示唆された。また、放射線照射 9 カ月後に脳壊死が生ずるのは、照射による内皮細胞の DNA 障害が次期分裂期に入つて初めて顕在化するためであると推定された。

#### 謝 詞

稿を終えるに臨み、終始御懇意な御指導と御校閲を賜わりました恩師山本信二郎教授に深甚の謝意を表します。また、本研究の遂行にあたり常に適切な御指導と御教示を頂きました山嶋哲盛講師他教室員の皆様に深く感謝致します。また、実験動物の作製にあたり御協力頂いた本学放射線部松本進氏ならびに村田秀雄氏に厚く御礼申し上げます。さらに、コンピュータープログラムを作製して頂いた石川工業高等専門学校深見哲男氏に深謝致します。本研究の要旨は、第 46 回日本脳神経外科学会総会（1987）において発表した。

#### 文 献

- 1) Kramer, S.: The hazard of therapeutic irradiation of the central nervous system. In R. G. Ojemann (eds.), Clinical Neurosurgery (Proceedings of the Congress of Neurological Surgeons, 1968), Vol.15, p310-318, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1968.
- 2) Lampert, P. W. & Davis, R. L.: Delayed effects of radiation on the human central nervous system. Neurol. 14, 912-917 (1964).
- 3) Eyster, E. F., Nielsen, S. L., Sheline, G. E. & Wilson, C. B.: Cerebral radiation necrosis simulating a brain tumor. J. Neurosurg., 39, 267-271 (1974).
- 4) Ghatak, N. R. & White, B. E.: Delayed radiation necrosis of the hypothalamus. Arch. Neurol., 21, 425-430 (1969).
- 5) Martins, A. N., Johnston, J. S., Henry, J. M., Stoffel, T. J. & Dichiro, G.: Delayed radiation necrosis of the brain. J. Neurosurg., 47, 336-345 (1977).
- 6) 大原茂幹, 高木照正, 柴田太一郎, 永井 肇: 遅発性放射線壊死の進展過程について. 神經外科, 23, 295-334 (1983).
- 7) Llена, J. F., Cespedes, G., Hirano, A., Zimmerman, H. M., Felring, E. H. & Fine, D.: Vascular alternation in delayed radiation necrosis of the brain. Arch. Pathol. Lab. Med., 100, 531-534 (1976).
- 8) 松村豪一: 人脳の遅発性放射線壊死の血管病変とその発生機序. 日臨電顕会誌, 14, 1-23 (1981).
- 9) Clemente, C. D. & Holst, E. A.: Pathological changes in neurons, neuroglia, and blood-brain barrier induced by X-irradiation of heads of monkeys. Arch. Neurol. Psychiat., 71, 66-79 (1954).
- 10) Maxwell, D. S. & Kruger, L.: Electron microscopy of radiation induced laminar lesions in the cerebral cortex of the rat. In T. J. Haley & R. S. Snider (eds.), Response of the nervous system to ionizing radiation, 1st ed. p54-83, Little Brown and Company, Boston, 1964.
- 11) McDonald, L. W. & Hayes, T. L.: The role of capillaries in the pathogenesis of delayed radio-necrosis of brain. Am. J. Pathol., 50, 745-764 (1967).
- 12) Haymaker, W., Ibrahim, M. Z. M., Miquel, J., Call, N. & Riopelle, A. J.: Delayed radiation effects in the brains of monkeys exposed to X- and  $\gamma$ -rays. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 27, 50-79 (1966).
- 13) Olsson, Y., Klatzo, I. & Carsten, A.: The effect of acute radiation injury on the permeability and ultrastructure of intracerebral capillaries. Neuropath. Appl. Neurobiol. 1, 59-68 (1975).
- 14) Caveness, W. F.: Experimental observations: Delayed necrosis in normal monkey brain. In H. A. Gilbert & Kagan (eds.), Radiation Damage to the Nervous System, 1st ed., p1-39, Raven Press, New York, 1980.
- 15) 吉井与志彦, 牧 豊, Phillips, T. L.: 脳血管に対する放射線晚発効果に関する研究. 脳神経, 34, 281-289 (1982).
- 16) Goetz, I. E., Warren, J., Estrada, C., Roberts, E. & Krause, D.: Long-term serial cultivation of arterial and capillary endothelium from adult bovine brain. In Vitro, 21, 172-180 (1985).
- 17) Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Sharpless,

- T. & Melamed, M. R.** : Recognition of cells in mitosis by flow cytofluorometry. *J. Histochem. Cytochem.*, **25**, 875-880 (1977).
- 18) **Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Sharpless, T. & Melamed, M. R.** : Cell cycle-related changes in nuclear chromatin of stimulated lymphocytes as measured by flow cytometry. *Cancer Res.*, **37**, 4635-4640 (1977).
- 19) **Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Sharpless, T. & Melamed, M. R.** : Different sensitivity of chromatin to acid denaturation in quiescent and cycling cells as revealed by flow cytometry. *J. Histochem. Cytochem.*, **27**, 478-485 (1977).
- 20) **Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Sharpless, T. & Melamed, M. R.** : Interphase and metaphase chromatin: Different stainability of DNA with acridin orange after treatment at low pH. *Exp. Cell Res.*, **110**, 201-214 (1977).
- 21) **Duijndam, W. A. L. & Duijn, P. V.** : The influence of chromatin compactness on the stoichiometry of the Feulgen-Schiff procedure studied in model films. I. Theoretical kinetics and experiments with films containing isolated deoxyribonucleic acid. *J. Histochem. Cytochem.*, **23**, 882-890 (1975).
- 22) **Duijndam, W. A. L. & Duijn, P. V.** : The influence of chromatin compactness on the stoichiometry of the Feulgen-Schiff procedure studied in model films. II. Investigations on films containing condensed or swollen chicken erythrocyte nuclei. *J. Histochem. Cytochem.*, **23**, 891-900 (1975).
- 23) **Rasch, R. W. & Rasch, E. M.** : Kinetics of hydrolysis during the Feulgen reaction for deoxyribonucleic acid: A reevaluation. *J. Histochem. Cytochem.*, **21**, 1053-1065 (1973).
- 24) **Decosse, J. J. & Aiello, N.** : Feulgen hydrolysis: effect of acid and temperature. *J. Histochem. Cytochem.*, **14**, 601-604 (1966).
- 25) **Böhm, N., Seibert, H. U.** : Zur bestimmung der Parameter der Bateman-Funktion bei der Auswertung von Feulgen-Hydrolysekurven. *Histochemie*, **6**, 260-266 (1966).
- 26) **Matsumura, H. & Ross, E. R.** : Delayed cerebral radionecrosis following treatment of carcinoma of the scalp: clinicopathologic and ultrastructural study. *Surg. Neurol.*, **12**, 193-204 (1979).
- 27) **Engerman, R. L., Pfaffenbachm D. & Davis, M. D.** : Cell turnover of capillaries. *Lab. Invest.*, **17**, 738-743 (1967).
- 28) **Goldsmith, J. C., McCormick, J. J., & Yen, A.** : Endothelial cell cycle kinetics: Changes in culture and correlation with endothelial properties. *Lab. Invest.*, **51**, 643-647 (1984).
- 29) **Tannock, I. F. & Hayashi, S.** : The proliferation of capillary endothelial cells. *Cancer Res.*, **32**, 77-82 (1972).
- 30) **Elkind, M. M., Gilbert, H. S., Moses, W. B., Alescio, T. & Swain, R. W.** : Radiation response of mammalian cells grown culture. IV. dose dependence of division delay and postirradiation growth of surviving and nonsurviving chinese hamster cells. *J. Nat. Cancer Inst.*, **30**, 705-721 (1963).
- 31) **Elkind, M. M., Han, A. & Volz, K. W.** : Radiation response of mammalian cells grown in culture. V. temperature dependence of the repair of X-ray damage in surviving cells. *Radiol. Res.*, **25**, 359-376 (1965).
- 32) **Pöppé, C., Pellicciari, C. & Bachmann, K.** : Computer analysis of Feulgen hydrolysis kinetics. *Histochemistry*, **60**, 53-60 (1979).
- 33) **Fukuda, M., Miyoshi, N., Sugihara, H., Hosokawa, Y. & Nakanishi, K.** : Different instability of nuclear DNA at acid hydrolysis in cancerous and noncancerous cells as revealed by fluorescent staining with acridine orange. *Histochemistry*, **84**, 556-560 (1986).
- 34) **Miyoshi, N. & Fukuda, M.** : Quantitative detection of DNA damage in the neuronal cells of the cerebellum and cerebrum by the analysis of Feulgen hydrolysis curves. *Histochemistry*, **84**, 561-565 (1986).
- 35) **Bachmann, k.** : On the interspecific comparison of nuclear DNA amounts using the Feulgen and galloycyanin chromalum methods. *Histochemie*, **17**, 145-150 (1969).
- 36) **Mayall, B. H.** : Deoxyribonucleic acid cytophotometry of stained human leukocytes. I. differences among cell types. *J. Histochem. Cytochem.*, **17**, 249-257 (1969).
- 37) **Comings, D. E. & Mattoccia, E.** : DNA of mammalian and avian heterochromatin. *Exp. Cell Res.*, **71**, 113-131 (1972).
- 38) **Polacow, I. & Sompson, R. R.** : Circular

- dichroism spectra of putative transcribed and repressed chromatin. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 202-207 (1973).
- 39) Frenster, J. H., Nakatsu, S. L., & Masek, M. M.: Ultrastructural probes of DNA templates within human bone marrow and lymph node cells. *Adv. Cell Mol. Biol.*, **3**, 1-19 (1974).
- 40) Killander, D. & Rigler, R.: Initial changes of deoxyribonucleoprotein and synthesis of nucleic acid in phytohemagglutinin-stimulated human leucocytes *in vitro*. *Exp. Cell Res.*, **39**, 701-704 (1965).
- 41) Gledhill, B. L., Gledhill, M. P., Rigler, R. & Ringertz, N. R.: Changes in deoxyribonucleoprotein during spermiogenesis in the bull. *Exp. Cell Res.*, **41**, 652-665 (1966).
- 42) Nicolini, C.: Chromatin changes during the cell cycle of HeLa cells. *J. Biological Chemistry*, **250**, 3381-3385 (1975).
- 43) Spelsberg, T. C., Mitchell, W. M., Chytil, F., Wilson, E. M. & O'Malley, B. W.: Chromatin of the developing chick oviduct: Changes in the acidic proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **765**-778 (1973).
- 44) Andersson, G. K. A. & Kjellstrand, P. T. T.: Exposure and removal of stainable groups during Feulgen acid hydrolysis of fixed chromatin at different temperatures. *Histochemistry*, **27**, 165-172 (1971).
- 45) Andersson, G. K. A. & Kjellstrand, P. T. T.: A study of DNA depolymerization during Feulgen acid hydrolysis. *Histochemistry*, **43**, 123-130 (1975).
- 46) Andersson, G. K. A. & Kjellstrand, P. T. T.: Influence of acid concentration and temperature on fixed chromatin during Feulgen hydrolysis. *Histochemistry*, **30**, 108-114 (1972).

**Histological and Biochemical Study of Delayed Cerebral Necrosis after Irradiation with reference to the Endothelial Injuries** Narihito Yamaguchi, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-J. Juzen Med. Soc., **97**, 83-96 (1988)

**Key words:** delayed radiation necrosis, endothelial cell, flow cytometry, Feulgen hydrolysis

### Abstract

The pathophysiogenesis of delayed cerebral necrosis after irradiation was studied histologically and biochemically in 25 dogs with special attention to the vascular endothelial injuries. The animals were sacrificed 3, 6, 9, 12, 15 and 30 months after the single irradiation of 15Gy X-ray at the hemisphere. Specimens of the irradiated brain were resected for the light and electron microscopic investigation, and vascular endothelial cells were prepared for the flow cytometry. The cell ratio in the growth ( $S+G_2+M$ ) phase was calculated to assay the transfer of cell cycles. Furthermore, the relative amount of apurinic acid was measured to assay qualitative changes of DNA. Microscopically, no marked change was noted 3 months after irradiation. After 6 months, spongy changes were observed especially in the frontal white matter. After 9 months, spongy changes developed with resultant necrotic foci, and blood vessels showed endothelial proliferation with a lymphocytic infiltration. These changes developed until 15 months, but fresh necrotic foci were no more observed 30 months after irradiation. By electron microscopy, capillaries and venules showed increased pinocytosis of endothelial cells 6 months after irradiation and marked luminal narrowing due to the swollen nuclei 9 months after irradiation. Endothelial nuclei showed an increase of infoldings and euchromatin, while the cytoplasm had a number of intermediate filaments, free ribosomes, Weibel-Palade bodies and microvillous projections. The endothels were surrounded by multilayered basal lamina and a number of collagen fibrils. The

vessels showed these ultrastructural changes until 15 months after irradiation, but became almost normal 30 months after irradiation. The cell ratio in the growth phase was 15.0% (3 months), 14.7% (6 months), 23.3% (9 months), 14.5% (12 months) 15.7% (15 months) and 20.1% (30 months), respectively, all of which were higher than 6.4% of the control. The rate constant of apurinic acid formation ( $K_1$ ) was minimum 3 months after irradiation while it was maximum after 9 months. The rate constant of apurinic acid destruction ( $K_2$ ) was minimum 6 months after irradiation while it was maximum after 12 months. Furthermore, the maximal yield of apurinic acid was in inverse proportion to  $K_2$ . It is suggested from these data that vascular endothelial injuries due to the impairment of cell cycles and DNA following irradiation contribute to the delayed occurrence of cerebral necrosis.