

Cobalt

# Gelatineによる実験てんかん焦点巣の電子顕微鏡的研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小山, 善子 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8909">http://hdl.handle.net/2297/8909</a>

## Cobalt-Gelatine による実験てんかん焦点巣の 電子顕微鏡的研究

金沢大学医学部神経精神医学教室 (主任：山口成良教授)

小 山 善 子

(昭和56年3月31日受付)

**Key words** Electron microscopy, Experimental epilepsy, Cobalt-gelatine

1890年 Jackson<sup>1)</sup>は詳細な臨床観察から、てんかん発作を“局所的な灰白質の発射、と生理学的な概念で定義したが、その実体についてはその後も長く不明であった。1929年、Berger<sup>2)</sup>により人の脳波が報告されるや、Gibbs夫妻や Lennox<sup>3)</sup>によりてんかんは“発作性脳律動異常 (paroxysmal cerebral dysrhythmia) を呈する脳疾患”として定義され今日もその概念は支配的である。このてんかん発作あるいは脳波の発作性異常がいかなる機序にもとずいて発現してくるのか、すなわちてんかんの成因に関する研究は、神経生理、神経病理、神経化学などさまざまな分野で行なわれている。その中でも神経病理学的研究は歴史が古く、19世紀前半のてんかん脳の Ammon 角硬化の報告 (1825年、Bouchet & Cazanviella) にまで溯ることができる。近年のこの方面の大きな研究としては、Scholz<sup>4)</sup>の機能的循環障害を中心とした血管痙攣説と、Penfield ら<sup>5)</sup>と Gastaut<sup>6)</sup>らの脳-髄膜瘢痕をてんかん発作の焦点と考える説があり、この二つの説は対立して多くの論議を生んだ。その後のてんかんの神経病理に関する研究は、上記のてんかん焦点の病理を中心として続けられている。すなわち脳外傷や脳腫瘍などの脳外科観察や Strychnine, Picrotoxin, Uabanin, Penicillin などの薬物の脳への局所的塗布、ならびにコバルト、アルミニウム、タングステンなどの金属およびその化合物の脳内投与によって得られた動物の実験的てんかん焦点の神経病理学的研究が行なわれている。

一方、電子顕微鏡が神経病理の分野に導入され、光

学的顕微鏡では明らかにされなかった多くの問題が解明され、てんかん研究の上にも新しい展開がみられた。すなわち電顕による微細構造の観察結果はてんかん発作の発現機序の問題解明にまで立ち入ろうとしている現状である。

本研究は、てんかん研究に関する神経病理学のこのような背景のもとに、家兎脳で、Cobalt-Gelatine (以下 Co-gel) によるてんかん焦点病巣 (以下 Co-gel 焦点) を作り、光顕ならびに電顕を用いて焦点の経時的観察を行ない、てんかん発作現象の解明を意図として行なわれたものである。

### 材 料 と 方 法

実験には体重 2~3 kg の成熟家兎 20 匹を用いた。焦点の作製には、Fischer ら<sup>7)</sup>、伊崎ら<sup>8)</sup>が用いたと同様の Co-gel 棒 (径 0.8 mm、長さ 2.0 mm) を使用した。家兎脳への Co-gel 棒の刺入の手術はすべて無菌的に行った。すなわち、Nembutal の静脈麻酔 (35 mg/kg) 下、家兎の頭部を秋元・石川の装置に固定した後、頭皮を正中で切開し、頭蓋背面を広く露出して、冠状縫合の吻側約 4 mm、矢状縫合より右約 2 mm の部位 (右 Area precentralis agranularis, Rose) を中心に頭蓋骨に径約 5 mm の孔を開け、その孔の中央部の硬膜を小切開し、前記の Co-gel 棒を脳表面に垂直に、かつ Co-gel 棒の上端が脳表面と一致するように刺入した。

焦点形成の有無をみるため、刺入部の頭蓋骨の孔の吻側縁に接した部位、反対側半球の刺入部と同側で刺入部から吻側 5 mm、尾側 5 mm の部位の計 4 個所の硬膜

Electron Microscopic Study of Experimental Epileptogenic Focus Produced by Cobalt-Gelatine Stick. **Yoshiko Koyama**, Department of Neuropsychiatry (Director: Prof. N. Yamaguchi), School of Medicine, Kanazawa University.

上に皮質電極を、前頭洞上壁のほぼ正中部位に不関電極を植え込んだ。これら全ての電極はビニール被覆線にてプラグに接続した。さらに歯科用合成樹脂にて頭蓋骨に固定した。

脳波観察は上記プラグに装着されたコネクターを通して無拘束、無麻酔で行なった。大多数の家兎は Megimide (0.1~0.3 mg/kg/sec) の静脈内投与による賦活記録を行ない、発作焦点の完成を観察した。

実験家兎は、3日、7日、14日後に神経病理学的検査のため、Nembutal 麻酔下で以下の方法で採取した。

光顕観察のためには 10%ホルマリン液で灌流後、広範囲に開頭し、焦点部位を含めて脳全体を摘出し、10%ホルマリン浸漬固定後、各種の染色 (Hematoxylin-Eosin 法, Nissl 法, Bielschowsky 鍍銀法, Klüver-Barrera 法, Cajal 法, Holzer 法, Golgi-cox 法, Rubean 酸 Cobalt 染色法, Sudan III 法, Perdrau 法) 標本を作製した。

電頭資料の採取は次のように行なった。前記の麻酔下で両側頸動脈を露出して、右側頸動脈にカニューレを挿入し、あらかじめ生理食塩水で灌流した後に磷酸緩衝 (pH7.4) 2.5% Glutaraldehyde 液にて約 30 分間灌流した。生理食塩水の灌流開始直後に左頸動脈を結紮、頸部静脈を切開した。灌流固定後直ちに焦点を中心に可及的に広く開頭し、焦点を含めて脳組織を切り出し、磷酸緩衝 (pH7.4) 3.0% Glutaraldehyde 液にて 1~2 時間浸漬固定した。この固定の終了と同時に磷酸緩衝液の中で資料を電頭観察に適した組織片に細片し、磷酸緩衝 (pH7.4) 2%  $O_4$  液にて約 2 時

間固定した。灌流は室温で、その後の固定はすべて 4℃の氷室内で行なった。引き続き順次高濃度の ethanol 系列で脱水し、EPON812 樹脂に包埋した。超薄切切片には酢酸ウランとクエン酸鉛の二重染色を行ない、一部の薄片切片はコバルト顆粒の観察のため、無染色で鏡検した。鏡検には日立 HU-IIDS 型および日本電子 JEM-100B 型電顕を使用した。なお、電顕による観察部位確認のため、あらかじめ EPON 包埋材料から 1~2μ の切片を作り、Toluidine blue 染色標本を作製した。

この実験の対照として、無処置家兎の同一部および Co-gel 棒片と同大の gelatine のみの棒片を脳の同一部位に刺入し、脳波観察を行なうとともに、光顕ならびに電顕にて経時的に観察した。

## 成 績

### I. 実験家兎の臨床および脳波の観察

発作焦点の完成は、実験家兎の臨床観察ならびに頭蓋骨を通して硬膜上に植え込んだ電極より、皮質脳波を記録して確認した。この実験で用いられた大きさの Co-gel 棒 (0.8 mm × 2.0 mm) 刺入家兎では自然発作にみられず、そのために大部分の実験家兎に 0.1~0.3 mg/kg/sec の Megimide 賦活法を施行し、焦点の完成を確認した。すなわち 7 日ないしは 14 日の実験家兎では、全例 Megimide 賦活脳波記録で、同側または Co-gel 植え込み部位と反対側半球の対称部位 (mirror focus) に発作波が出現し、続いて顔面搐搦や上下肢に始まる Jackson 型発作に発展した。なお 3

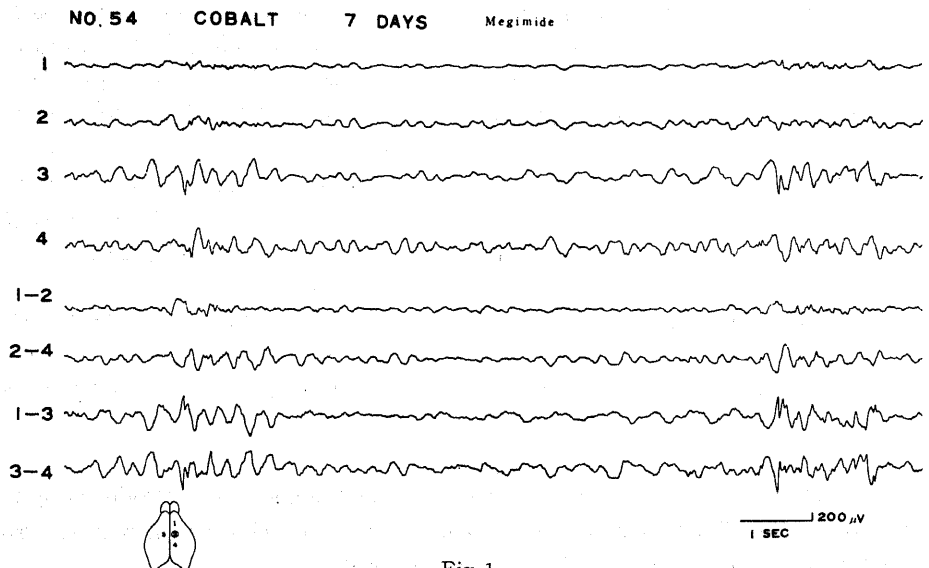


Fig. 1.

日目の受験家兎では半数以上が Megimide 賦活で臨床発作に移行した。これらに対して、対照として用いた gelatine 棒単独刺入家兎では Megimide 賦活による発作波の出現は一定せず、臨床発作に移行するものはなかった。(Fig. 1)

## II. Co-gel 焦点の神経病理学的所見

### 1. 肉眼的所見

Co-gel 焦点は、肉眼上脳表面に径 5 mm 大の円形軟化巣として観察される。軟化巣の性状は、脳表面よりわずかに隆起して灰黄色の外観を呈している。14 日目の観察でもこの軟化巣の中央に Co-gel 片が残存し、病巣内に拡散していない。3, 7 日の焦点では軟化巣の周囲に同心円性の出血帯を伴うことが多い。いずれの時期の観察においても、Co-gel 焦点は限局性で隣接する脳軟膜や脳実質には混濁、腫脹など肉眼上の異常所見は観察されていない。なお対照家兎では 3 日目の観察で gelatine 片や手術の直接の影響がみられるが、7 日以後では刺入部位は癰疽的に認められるにすぎない。

### 2. 光顕所見

光顕による Co-gel 焦点への病理学的検索の詳細は伊崎ら<sup>8)</sup>によって報告されたが、この研究との関連上に、その要旨を以下に述べておく。

Co-gel は肉眼的観察で示されたように起炎症性の強い物質である。焦点は 3 日、7 日および 14 日の観察で、いずれも大脳皮質から皮質下白質にかけて広い楔状ないし U 字形の軟化巣を形成している。焦点は Co-gel を囲んで組織学的に 3 つの帯状組織に区別することができる。すなわち 1) Co-gel に接する壊死帯、2) 出血を含む炎症反応の強い反応帯、3) その外側で正常組織との間の移行帯である。(Fig. 2)

壊死帯は Co-gel による壊死組織や凝血、炎症性渗出物の集合よりなる組織崩壊部とそれを取り囲む凝固壊死部に分けられる。組織崩壊部は 14 日目の観察でも、わずかに fibroblast や macrophage がみられる程度で変化に乏しい。凝固壊死部は H. E. 標本では eosin 好性に均一に染まり、Nissl 標本では染色されない。その中には急性壊死像を示す神経細胞や多核白血球が散存しているが全体には細胞反応は乏しい。

最も変化の激しい反応帯は、3 日目では、内方より出血部、浮腫部に細分することができる。この部には毛細血管の増生や fibroblast もわずかにみられる。浮腫部は基質が浮腫状で、ときに海綿状を呈している。この部に存在する細胞の多くは変性神経細胞や glia cell で、同時に多核白血球を主とする遊走細胞も出現する。

反応帯 3 日目のこのような急性炎症像は、7, 14 日目の観察では、次第に間葉性細胞反応が強まり、慢性炎症の肉芽組織へと移行してゆき、毛細管の増生、lymphocyte, macrophage などの単核細胞の増殖、fibroblast の増加と collagen fibrill の形成と脂肪顆粒細胞の出現など、清掃-癒着の過程に要約される。(Fig. 6)このような過程は皮質表層の出血部より皮質深部に、また隣接する凝固壊死部や浮腫部に広がり、経過とともに反応帯は狭く限局してゆき、周囲脳実質の astrocyte の増生と相まって、14 日目には壊死部を囲む未熟な glio-mesenchymal scar が完成する。(Fig. 4)

これらの過程の中で、神経細胞の変化をみると、各期間を通じて、急性壊死性変化を示す神経細胞は、凝固壊死部にみられる。また反応帯の出血部や浮腫部の肉芽組織内に、埋もれたように mineralization 像を示す壊死神経細胞が多数存在していて、それは主に皮質表層の肉芽組織内に多く、Rubean 酸 Cobalt 染色で黄褐色に可染されるものが多い。(Fig. 3)移行帯の神経細胞は、細胞硬化や陰影化などの退行性変化を示し、細胞脱落は軽微である。なお移行帯は経時的観察でしだいにその巾を減じ、反応帯との境界が不鮮明となってゆく。(Fig. 5)

刺入された Co-gel は、14 日目でもほゞ原型のまま刺入部位(壊死部中心)に認められるが、一部は焦点内に散在し、macrophage 内にも存在している。

なお、本実験では焦点内におよび周囲の正常組織内には、Alzheimer 原線維変化は認められていない。

神経細胞以外では、astrocyte の反応が著明で、3 日目より焦点病巣側の大脳半球、特に髄質には astrocyte の活性化がみられ、焦点病巣周辺に肥大した astrocyte が増殖し、しだいに限局して、肉芽組織の外側に集合し癒着の像に変化するが、14 日目では未だ線維性 glia はみられない。(Fig. 7)その他、焦点病巣周辺に髄鞘の崩壊が、限局性に認められる。

一方、対照とした gelatine 単独病巣の組織像は、3 日目の観察では刺入した gelatine 片と同等の限局した小軟化巣として認められるにすぎず、Co-gel 焦点に比して細胞反応も軽く、14 日目の観察では皮質内に限局した astrocyte に囲まれた小囊胞の形成がみられた。いずれの時期の観察でも周囲実質への影響は軽度で、炎症反応は認めていない。

以上、記載した観察結果より、Co-gel 焦点の光顕所見をまとめると次のようになる。

1) Megimide 誘発による発作波の出現は、Co-gel による焦点病巣の急性炎期を過ぎ、慢性炎期の肉



芽—astrocyte 周壁の形成時期とは一致している。なおこの時期において、collagen fibril の増生はみられるが、線維性 astrocyte は存在せず、glio-mesenchymal scar は未熟、未完成である。

2) 慢性炎症性の肉芽組織内に、細胞の外形を保ちつつ、胞体や突起の周囲に不規則な顆粒が付着して見える。コバルト陽性の壊死神経細胞 (mineralization 神経細胞) が、認められる。

3) 焦点病巣周辺を中心に、焦点側大脳半球には、早期より astrocyte の活性化がみられる。astrocyte は肉芽組織の外側に、多くは血管周囲終足を有して増殖している。

### Ⅲ. 電顕所見

#### 1. 正常対照(無処置)群

Area precentralis agranularis に相当する家兎の大脳皮質は、その名の示す通り、第4層を形成する内顆粒細胞を欠く細胞構築を示している。超薄切片で観察される神経細胞の大半が錐体細胞で、胞体の中心には円形の明瞭な核小体を持つ核を有している。核内の chromatin 顆粒は、一部が核膜に接していて集簇するが、大部分は核内全体に散布されている。核膜は一般に平滑であるが、しばしば ribosome に富む細胞質が湾入し (cytoplasmic invagination)、深い切れ込みを示すことがある。比較的稀ではあるが、格子構造あるいは線維束からなる核内封入体が出現している。これらの封入体は核小体に接近して存在する傾向がみられ、封入体周囲の chromatin 顆粒の分布も粗である。細胞体は Nissl 小体、Golgi 装置、mitochondria、polysome などの細胞内小器官の発達が良好で、これらの小器官の間をぬうようにして neurotubulus neurofilament が分布している。断面でしばしば皮質表面に向う樹状突起が出現し、突起の内部には dendritic tubules が豊富に存在する。これらの神経細胞の胞体の外面の大部分には neuropil が密接しているが、時々 astrocyte、oligodendrocyte の胞体が接している。また胞体の細胞膜の局所に synapse 構造 (axo-somatic synapse) がみられている。皮質表層の神経細胞は、chromatin 顆粒が均等に分布する円形の核を有し、核周辺の胞体は少なく、また Nissl 小体、polysome などの小器官の分布密度も錐体細胞に比してやや粗である。(Fig. 8)

神経細胞、glia cell の突起から形成された neuropil 部は複雑な構造を呈していて、多数の synapse 結合が出現する部位でもある。今回の検索では、neuropil の大部の synapse 結合は axo-dendritic synapse で、postsynapse の dendrite に

は spine apparatus を有す。presynapse は spherical vesicles を多量に含むが、同時に少数の granular vesicles が混在している (Fig. 9)。

皮質表層の glia limitans は2~5層の astrocyte の突起からなっているが稀に astrocyte の胞体が皮質表面に露出している像も認められる。今回の検索では astrocyte の突起間には tight junction 構造は殆ど見出し得なかった。この astrocyte の胞体ならびに突起の細胞膜の外面には一層の基底膜が密接している。またこれらの細胞膜の内側面には電子密度大な物質が部分的に付着した構造 (hemidesmosome 様) がみられた。皮質表面の基底膜の外側には、少数の粗面小胞体、mitochondria、大小の vesicle を含み、断面で薄層の胞体を有する pial cell が接している。これらの pial cell の基底膜に接する細胞膜の内面に astrocyte にみられたと同じ hemidesmosome に類似した構造が部分的に接着している (Fig. 10)。

#### 2. Cobalt-gelatine 群

##### 1) 焦点の経時的観察

光顕所見を参考として3日目の急性炎期を除き、発作焦点の完成した7日目、14日目の家兎脳を検索した。

Co-gel 焦点を電顕にて観察すると、光顕所見から区別された三つの帯状組織、すなわち、1) 壊死帯、2) 反応帯、3) 移行帯はいずれも特徴的な像を呈するが、各々の組織帯は境界が鮮明でなく、相互に入り組みあって複雑に移行している。特に反応帯はきわめて複雑な像を示し、光顕的に移行帯と考えられる部位にも macrophage、赤血球、反応性 astrocyte の胞体が教見される。また光顕で正常大脳皮質にみえる部位にも astrocyte の反応が認められる。したがって電顕的には反応帯と移行帯との境界を明確に決めることは困難である。以下、電顕観察上の反応帯とは光顕観察の反応帯より広く、焦点中央の壊死部の外方を占め、macrophage や反応性 astrocyte の胞体が出現する部位をさし、同様に移行帯とは、反応帯の外方において、反応性 astrocyte の突起がその分布密度を減じつつ正常大脳皮質構造に移行する部位とする。

Co-gel 刺入後7日目の焦点では、光顕上組織崩壊像を呈する部に一致して、組織は高度に破壊され、電子密度の種々な大小の顆粒物質の集塊が散在しているにすぎない。わずかに一層の細胞膜を持つ空胞構造物が時に認められるが、それが何かの同定は困難である。壊死部の外側の反応帯には macrophage、fibroblast collagen fibril などが壊死組織と混在して出現している (Fig. 13)。壊死部より外方に向うにつれて反応帯の像はしだいにこれらの間葉性細胞増殖が顕著とな

り、毛細血管の増生が加わる。これらに加えて astrocyte の増殖も顕著である。反応帯の辺縁（移行帯側）に存在する neuropil では個々の細胞の細胞膜の間隙は離開し、その間隙には astrocyte の突起が延長し、血漿の滲出もみられる（Fig. 14）。一部には赤血球も介在する。増殖した astrocyte はその胞体ならびに突起によって glia limitans を形成し、glia limitans の組織腔側の表面には不連続ではあるが、対照群にみられる glia limitans の基底膜より厚い一層の基底膜が付着している（Fig. 20）。

14 日目では、反応帯に混在していた壊死組織が macrophage に貪喰され、壊死部と反応帯の境界は比較的明瞭となる。反応帯の macrophage, fibroblast, collagen fibril などの増加も顕著となる。一方、出血、血漿の滲出は 7 日目に比較して軽度となる。astrocyte の反応は 7 日目同様著しく、glia limitans の形成はより明確となっている。

Co-gel 焦点の中心部、すなわち Co-gel を刺入した部位に一致して、多数のコバルト片が残存していて、電子密度の極めて大きな比較的均質無構造の粗大な塊として密集している。このコバルトの一部は 7 日目では macrophage に貪喰されて反応帯に移動し（Fig. 26）、14 日目には増殖した反応性 astrocyte の胞体内にも見出される（Fig. 27）。しかし、反応帯、移行帯へ神経細胞の胞体ならびにその突起には見出されていない。

次に焦点の微細構造所見について、個々の細胞成分別に述べる。

## 2) 神経細胞の変化

7 日目焦点病巣では壊死部には神経細胞の胞体として同定できる構造物は観察されていない。壊死組織が混在する反応帯内側部では、胞体が丸みを帯び、全体に明調を示す神経細胞が出現している。この細胞の核は円形、時には cytoplasmic invagination を呈し、chromatin 顆粒の分布もまばらである。また、核周辺部では細胞内小器官の分布が粗で、Golgi 装置は比較的保たれているが、腫大した mitochondria、空胞状の粗面小胞体、polysome、neurotubules などがわずかに存在するにすぎない。これらの神経細胞の細胞膜の外面には、通常の neuropil の接着はみられず、astrocyte の突起がその大部分をとり囲んでいる（Fig. 15）。また、まれな所見として、astrocyte にかわり macrophage が密着する像も観察される。

反応帯の中心部に、特に macrophage, astrocyte の増殖の著しい部位には、細胞膜がやゝ凹凸不整を示す神経細胞が存在する。しかしこの種の神経細胞の細

胞内小器官は、Nissl 小体を構成する一部の粗面小胞体の中等度の拡張と mitochondria の腫大、変形を除いて、ほぼ正常に近い分布を示している（Fig. 16）。また、同部には胞体が比較的暗調を呈する神経細胞も時にみられている。この細胞の胞体の matrix には微細顆粒状、微細線維状の構造物が撒布してみられ、核は chromatin 顆粒の分布密度が高い（Fig. 17）。また胞体の外面には、neuropil の接着する部位は狭く、glio-filament, glycogen 顆粒を持つ astrocyte の突起が取り囲んでいる。しかしこの暗調を呈する神経細胞のすべてが astrocyte に取り囲まれているわけではなく、通常の neuropil が接する像もしばしばみられている（Fig. 17, 18）。

移行帯に分布する神経細胞には著変は認められないが、一部に mitochondria の腫大、胞体の matrix に微細顆粒状、微細線維状の構造が撒布し、胞体の細胞膜の外面を astrocyte によってとり囲まれる神経細胞が散見される。

14 日目の材料では、反応帯には 7 日目同様に胞体の外面を astrocyte に粗に覆われた神経細胞が見出される。この種の細胞では mitochondria、粗面小胞体は著しい空胞状を呈するが、胞体は polysome に、核質は chromatin 顆粒に富み、胞体全体が暗調を呈している（Fig. 21）。反応帯の中心部に出現する神経細胞の微細構造の変化は 7 日目の変化と同様である。すなわち、核内 chromatin 顆粒も豊富で、胞体の polysome の分布密度が高い細胞が比較的多数出現している。逆に胞体、核ともに明調を呈する神経細胞も 7 日目と同様に観察される（Fig. 22）。

なお、Co-gel 群には対照群に見出される神経細胞核内封入体の中で、規則的な配列を示す格子状の封入体は見出し得ず、不規則かつ粗な配列を示す線維が観察される。

## 3) Glia の変化

光顕観察ですでに述べたように、反応帯は細胞反応の著しい部位で、炎症細胞、間葉性細胞とともに反応性の astrocyte の増殖が著明である。これらの増殖した astrocyte の胞体およびその突起は、正常の脳表面にみられるものと類似の glia 膜を形成している。すなわち反応帯の astrocyte の胞体は chromatin 顆粒に富み、明瞭な核小体を有する比較的大型の核と、豊富な細胞内小器官を持つ核周部からなっている。胞体には粗面小胞体、ribosome は比較的少いが、多数の mitochondria、大小の dense body が分布し、Golgi 装置の発達も良好である。またこれらの小器官の間を埋めるようにして glio-filament が束状をなし

て密に分布し, glycogen 顆粒もみられる. さらに, gliofilament に混在して少数の microtubulus が認められる. これらの小器官の出現により, 核周部の胞体は電子密度は高い. またこれらの astrocyte から延びた突起も豊富な gliofilament, glycogen 顆粒を有し, 断面では大小, 長短さまざまで, 反応帯および移行帯の神経細胞胞体の周囲ならびに neuropil の間に延び, また, macrophage が多数存在する組織腔にも延びている. この組織腔に延びた astrocyte の突起の多くは, 互いに層状に集積することなく, 個々の突起が無秩序に組織腔に露出している. astrocyte の突起の細胞膜の外表面のごく一部に一層の基底膜の接着像が観察される. 一方, 多数の collagen fibrill と毛細血管が認められる組織腔部では, astrocyte の突起間の細胞間隙は狭小となり, 個々の astrocyte の突起は互いに集積し, 組織腔に面する最外側の astrocyte の突起の細胞膜の外表面には, 一層の基底膜が存在している. しかもこの基底膜に面している astrocyte の突起の細胞膜の内面には hemidesmosome 様構造が部分的に接着している. (Fig. 14. 15. 16. 18. 19. 20)

14 日目の材料では, 反応帯の astrocyte の胞体およびその突起は 7 日目の材料と同様に胞体には細胞内小器官に富み, また多数の gliofilament, glycogen 顆粒を有し, 反応帯の組織腔のみならず, 移行帯に至るまで広く突起を出し, 組織腔側ではこれらの astrocyte の胞体および突起は互いに集積し, 明瞭な glia 膜を形成している. この glia 膜の細胞間隙は, 7 日目の材料に比べて 14 日目では殆ど認められない. 7 日目の材料でみられた hemidesmosome 様構造はより顕著となり, 正常の glia 膜にみられるよりも密に分布することが多い (Fig. 21 - 25). 正常対照群の glia 膜の astrocyte の突起間で観察される tight junction 構造は 7 日目, 14 日目の材料ではともに見出していない.

また, 今回の実験では反応帯に形成された glia 膜の外表面には正常脳の脳表 glia 膜にみられる pial cell に相当する細胞を見出すことはできない (Fig. 20. 25).

さらに今回の検索では反応帯の neuropil の細胞間隙の開大, 同部の毛細血管の終足の一部に腫脹像がみられるが, 終足以外の astrocyte の突起には腫脹像は認められていない.

#### 4) Neuropil の変化

Co-gel 片刺入後 7 日目の材料の反応帯に存在する neuropil は, 壊死部周辺では個々の突起の細胞間隙が離開し, 浮腫状を呈する. この開大した細胞間隙の一部には, 増殖した macrophage および astrocyte 胞

体ならびにその突起が介在している. この部の astrocyte の胞体, 突起の外表面には基底膜は接着していない. 細胞間隙の離開した neuropil の各々の突起は正常の微細構造を失い, 個々の細胞突起の同定は極めて困難である. しかし axon terminal と dendrite とは両者の間に synapse 構造が認められる時のみ, 同定は比較的容易である. 今回の検索では概して前 synapse の axon terminal の形態が比較的良好に保たれているのに比して, 後 synapse の dendrite は著しく腫大し, 内部には大小さまざまの空腔が出現し, dendritic tubules は著しく減少している. この dendrite の基質には微細な顆粒, 線維状物質が散在し, しばしば spine apparatus も残存している (Fig. 13. 14. 17. 18. 19). しかし, 同一切片ですべての dendrite が腫大像を示すことはなく, 正常像を示す後 synapse の dendrite も混在している. 特に比較的大きな dendrite では, dendritic tubulus が明瞭に存し, 上述の変化は乏しい. synapse 部の外表面には増殖した astrocyte の突起が粗に取り囲んでいるが, synapse 間隙に astrocyte の突起が介在する所見を見出すことはできない.

astrocyte の反応性増殖が著しく, glia 膜の形成がみられる部位, すなわち反応帯の中央部の neuropil は, 上述の部位に比し個々の突起間の細胞間隙の離開は軽度で, neuropil の一部が増殖した astrocyte の突起に埋もれる像を呈することが多い (Fig. 14). これらの astrocyte の突起は gliofilament, glycogen 顆粒を持ち, 突起全体は電子密度大で暗調を呈していて, 正常な neuropil でみられる明調の astrocyte の突起はまれにしか認められていない. この部の neuropil にも, 後 synapse の dendrite が腫大し, 内部に大小さまざまの空腔が出現しているものが多数みられる. また, この部位の neuropil の中にしばしば変性した有髄・無髄神経線維の軸索が散見される (Fig. 14). 時には皮質表層において, 多数の変性無髄線維の軸索が同一切面で出現することがある.

上記の neuropil の変化は移行帯ではきわめて軽度となり, 後 synapse の一部の dendrite に少数の vacuole を認めるのみで, 腫大した dendrite は認められず (Fig. 19), 変性軸索もみられなくなる. しかし反応帯から移行帯に移るに従い, 反応帯では認められていない少数の glycogen 顆粒を含む比較的明調を呈する astrocyte の突起が散見される. これらの astrocyte の突起は正常対照にみられるもので, 特に腫脹像を示さない.

14 日目の材料では, 壊死部に接する反応帯にも glia 膜の形成が明確になり, macrophage が密に存在

する部位には neuropil は認められない。すなわち glia 膜によって組織腔と神経要素とは完全に区別される。この glia 膜に接する neuropil では軽度の細胞間隙の離開がみられるにすぎない。7 日目と同様にこの neuropil 部には増殖した astrocyte の突起が延び、しばしば数層に重なり合って neuropil の個々の突起を取り囲んでいる (Fig. 23)。

この部の neuropil の変化は、7 日目の材料ですでに述べたように、後 synapse の dendrite の著しい腫脹がみられ、その細胞膜はしばしば凹凸を示すが、全体として楕円形を呈するものが多い。この腫脹した dendrite の微細構造は 7 日目の材料と殆ど同一である (Fig. 23)。

また、移行帯の neuropil の変化は極く一部の後 synapse の dendrite に腫脹像がみられるのみで著変は認められない。

### 5) 毛細血管の変化

毛細血管の変化は反応帯においてのみみられる。7 日、14 日目とともに反応帯に多数の毛細血管が出現する。特に macrophage が密集した部の組織腔に存在する毛細血管の内皮細胞には、多数の pinocytotic vesicles が認められ、これらの vesicles は内、外側の細胞膜に接して出現することが多い。また血管の内腔に向って内皮細胞の胞体の小突起が突出する。これらの変化は、反応帯の neuropil 内でも認められるが、移行帯の毛細血管には対照に比して微細構造上の差は見られていない。いずれの部位の毛細血管の内皮細胞においてもその他の細胞内小器官には著変がなく、内皮細胞の細胞膜間の接着構造 (zonula occludens) も保たれている。

### 3. Gelatine 対照群

Co-gel 焦点に比し、gelatine による病巣は全体にきわめて小さい。組織崩壊産物は病巣の中心にわずかに残存するのみで、14 日目ではほとんど認められない。Co-gel 焦点の反応帯に相当する部は、間葉性組織と glia 膜が形成されるが、macrophage、結合組織、毛細血管および astrocyte などの増殖はいずれも軽い。特に astrocyte によって形成された glia 膜は Co-gel 焦点のそれに比較して、astrocyte の突起の周囲組織への突出が少なく、単純な形態をとっている。また glia 膜は astrocyte の突起が互に密接し、突起間の細胞間隙は 14 日目ではほとんど認めることは出来ない。macrophage、毛細血管、astrocyte のいずれも Co-gel 焦点と同様の微細構造を示す。上記の glia 膜に接して核質、胞体ともに明調を呈し、胞体の外面を astrocyte の突起が取り囲む神経細胞が認められる。

この種の細胞は、Co-gel 焦点で見出された円形で明調を呈する神経細胞と同種のものである。なおこの神経細胞の一部に格子構造を呈する核内封入体が見出される。neuropil の変化は、glia 膜に接する部での細胞間隙の開大のみで、おのおの神経突起および glia の突起には著変は認められない (Fig. 11, 12)。

## 考 察

### 1. Co-gel のてんかん焦点形成について

純金属あるいは金属塩を動物脳に投与することにより、実験てんかんモデルを作製する方法は 1942 年 Kopeloff ら<sup>9)</sup>の報告に始まる。彼らは Alumina cream をネコ、家兎、サルの大脳皮質運動領に投与して自発性発作を見ている。

種々の薬物や金属がてんかん焦点病巣を作ることが知られているが、Chusid と Kopeloff<sup>10)</sup>は、40 匹のサルを使用した慢性実験で、サルの前運動領皮質に 26 種の純金属 pellet を植え込んで各々比較検討している。その結果では Nickel や Antimony が最も有効で、その他、Bismuth, Cadmium, Zirconium, Tin, Titanium, Iron, Molybdenum, Mercury, Vanadium, Tungsten, Tantalum もてんかん原性焦点の作成に有効であったと述べている。

Kopeloff<sup>9)</sup>の報告以来、安定した発作焦点を作る Alumina cream (以下 Al-cream と略)を用いた報告が多い (Westrum ら<sup>11)</sup>, Ward<sup>12)</sup>, Mayman ら<sup>13)</sup>, Klatzo ら<sup>14)</sup>, Wisniewski ら<sup>15)</sup>, 沼辺<sup>16)</sup>。コバルト(塩)を用いたてんかん焦点との対比上、Al-cream による焦点巣の病理像およびその発作波発現機構について、従来の報告を概述する。

まず、Westrum ら<sup>11)</sup>は、サルで Al-cream による発作焦点を作り、神経細胞の減少、グリオーゼ、著明な樹状突起の変化を観察している。そして dendritic arborizations のゆがみや枝分れの減少、dendritic spine の減少がてんかん異常波の発現原因と仮定している。また、ネコを使った Mayman ら<sup>13)</sup>によれば、Al-cream の epileptic effect は炎症過程、low-grade injury の持続性焦点が原因と主張している。沼部<sup>16)</sup>は Al-cream の注入にて実験的脳癲癇を作り、pentalol けいれんにより癲癇部周辺の血行障害をベンチン法で観察し、癲癇周辺の貧血出現と発作異常波の出現が一致すると述べている。Klatzo ら<sup>14)</sup>は家兎を用いて、神経細胞の神経原線維様変化を観察している。

しかし、ラットは Al-cream に抵抗を示し、動物の種属により実験てんかん原性物質が必ずしも有効でない場合がある (Kopeloff<sup>17)</sup>, Dow<sup>18)</sup>)。

Al-cream に次いでコバルトが焦点原性薬物として多く用いられている。コバルトは純金属コバルト、Cobalt-powder, Cobalt-gelatine, Cobalt-pellet やコバルト溶液などの種々の形で脳内に投与されている。コバルトを使った報告は Dow ら<sup>18)</sup>, Henjyoji ら<sup>19)</sup>, Chusid ら<sup>20)</sup>, Payan ら<sup>21)</sup>, Levin ら<sup>22)</sup>, Fischer ら<sup>7), 23)~27)</sup>, Engel<sup>28)</sup>, Payan<sup>29), 30)</sup>, Baleyrier ら<sup>31)</sup>, Bogolepov ら<sup>32)</sup>, Malzone ら<sup>33)</sup>, Dow ら<sup>34)</sup>, Butler ら<sup>35)</sup>, Willmore ら<sup>36)</sup>, Nagy ら<sup>37)</sup>, Hartman<sup>38)</sup> などである。

コバルト投与後、てんかん発作波の発現までの期間は動物の種類と投与されたコバルトの形状に左右されるが、Dow ら, Mayersdorf らは金属コバルトはネコやサルで非常に速やかに作用し、有力な作用物であると言う。マウス、ラット、家兎の場合は金属コバルトでは数日で、Co-gel では7日前後で焦点が形成され、4週間前後必要とされる Al-cream より早期に発作波の出現をみている。また、Malzone ら<sup>33)</sup>はネコを用いて、Cobalt-gelatine disc を硬膜下に置き、48 - 72 時間内で発作波を記録している報告もある。

Payan<sup>30)</sup>はラットを用いて、Cobalt rod や Cobalt pellet 投与はてんかん焦点形成に有効であると述べ、その機序としてコバルト焦点巣の慢性炎症が low-grade injury and irritation として作用すると考えた。

本実験と同様 Co-gel をラットに投与した Fischer ら<sup>24)</sup>によれば、てんかん性異常放電は焦点巣における glia-mesenchymal, pia-cerebral scar の形成に一致して出現しており、その発生機序として前述の Penfield<sup>5)</sup>の説を引用している。また他の論文で、Fischer ら<sup>24)</sup>は Co-gel 焦点を組織化学的に検索し、神経細胞の deafferentation をてんかん誘発の重要因子と推測している。

Baleyrier ら<sup>31)</sup>は Cobalt-pellet を用いててんかん焦点を作製し、組織学的には高度の浮腫とそれに関与する astrocyte の buffering system の障害に基く、 $K^+$  の増加をてんかん性発作波の発現機序として重視している。また Butler<sup>35)</sup>も最近これと類似のイオン homeostasis の障害を示唆する研究報告を発表している。

以上述べたように、てんかん性発作波の発生機序については多様な説明がなされているが、コバルト塩はアルミニウム化合物と同様に動物のてんかんモデル作成に有用な物質であることが分る。また、概してアルミニウムより早期にてんかん焦点が完成するが、それは動物の種の違いならびにコバルト塩の投与法の

差異により、発作波出現までの期間にかなりのばらつきがみられているが、本実験の Co-gel 刺入家兎では、EEG による観察で7 - 14 日で焦点の形成が確認された。

## 2. てんかん焦点の完成について

これまでに報告されたコバルト焦点の脳波学的観察によると、大多数の報告で自発性発作あるいは臨床発作の発現がみられるが、著者の今回の実験では自発波および臨床発作のいずれも観察し得なかったため、大多数の実験動物で Megimide の賦活法を施行して焦点の存在を確認した。すなわち、Megimide 誘発法 (0.1 ~ 0.3 mg / kg / sec) で、Co-gel 刺入部に一致してあるいは反対側半球の対称部位から発作波が局限して記録され、続いて臨床発作が観察された。Pow らもラット脳内の前頭領野 (皮質運動領)、頭頂領の2局所に Co-gel を刺入した実験で、前者の前頭領野においては発作波の出現部位は反対側半球の対称部位 (mirror focus) に優位に出現することを報じている。このように誘発されたてんかん性発作波が脳の一定部位に局限して出現する場合、すなわち発作波が局在性を示す時には、この所見はてんかん原性焦点の存在を示唆するものと考ええる。なお今回の実験で Co-gel 刺入3日目の材料では Megimide 賦活により60%に臨床発作が観察されたが、これは焦点の形成によるものか、手術による影響が加ったためかは急性炎症像を伴う本実験結果のみでは決め難い。

## 3. Co-gel 焦点の光顕所見について

Co-gel 焦点は断面でU字形の軟化巣を中心として、3つの帯状組織に区別された。すなわち、病巣の中心から1)壊死帯、2)反応帯、3)移行帯である。Co-gel 焦点を3種の組織帯に区分したのは、この焦点の病巣が示す形態的特徴に基くものである。また、上記の区分に関しては従来一、二の研究者によって提唱されているところでもある。Fischer ら<sup>24)</sup>はラット脳の Co-gel 焦点において、病巣の内側から first zone (壊死帯)、second zone (浮腫帯)、third zone (移行帯)と命名し区別したが、この区分は著者の1), 2), 3)のそれぞれの組織帯に相当するものである。彼らが second zone と呼んだ組織帯は炎症に基く細胞反応が強い部位であり、伊崎ら<sup>8)</sup>がこの部に対して使用した“反応帯”(reactive zone)という用語がこの組織帯の形態学的な特徴を的確に表現する命名ではないかと考える。光顕的にはこの反応帯は時間の経過とともに最も形態変化を示す部位であり macrophage を含めた間葉性の反応に glia の反応が加わり、終局的には glia-mesenchymal scar が形成される。この瘢痕形

成は alumina cream による実験てんかんの焦点においても認められており、一般に金属(塩)を使用した亜急性あるいは慢性の実験てんかん焦点が示す共通の所見である。一方、てんかん原性作用を持たない合成樹脂(アラルグイド)、鉛などの脳内投与によっても類似の癍痕が形成されるという。これらの類似の癍痕が Co-gel, Al-cream などのてんかん原性の癍痕と質的に異種のものであるか否かの判断は、光顕レベルの観察のみでは明確な見解は示し得ない。

Co-gel 焦点に見出された光顕所見の中で、主な変化は神経細胞の変性と astrocyte の反応性増殖である。神経細胞の変性像としての壊死部の急性壊死性変化、反応帯における mineralization 変化および硬化性や陰影化などの細胞病変である。これらの所見は焦点の時間的経過による影響を基本的には受けない。また、これらの神経細胞の変化のうち、急性壊死および細胞硬化や陰影化病変は特殊な病的過程によって生ずる特異的な細胞変化ではなく、Noxe に対する非特異的な変化である。

一方、神経細胞の mineralization 変化は、細胞の壊死性変化の一つで石灰沈着 (calcification) とも呼ばれている像である。それは必ずしも Calcium 沈着に限らず、種々の金属塩の複雑な沈着によっても、この像がみられるために、mineralization とも呼ばれている。神経細胞の mineralization は普通壊死に陥った組織にみられ、早いものではロボトミー創で術後 13 日目に観察されている。本実験では 7 日目の肉芽組織内に出現し、しかもルベアン酸によるコバルト染色で、黄褐色に可染されていることより、コバルトに関連する mineralization 変化と考える。コバルトイオンにより焦点巣を観察した Butler ら<sup>35)</sup>も、皮質表層の錐体細胞に、核や胞体が萎縮し、腫脹した astroglia や dendrite に囲まれた hyperosmophilic な dark neuron を観察し、硫酸アンモニウム処置により、組織化学的に胞体や突起に沈着したコバルトを確認している。Butler ら<sup>35)</sup>はこの所見を人工産物と考えている。Fischer ら<sup>25)</sup>は焦点巣周囲の腫大した dendrite 内の glycogen 顆粒について考察し、種々の病的状態における神経細胞内の glycogen 顆粒の出現を検討したのちに、この腫大した dendrite 内の glycogen 顆粒は、コバルトイオンの組織内への侵入の結果生じたものだろうと推測している。

Al-cream によるてんかん焦点やアルミニウム化合物による脳症には、特異な神経細胞変化として、ヒトの加齢変化として知られている Alzheimer 原線維変化様細胞病変の出現が見られている。それはアルミ

ニウムによる神経細胞の特異的な反応によるとおもわれるが、本実験で観察されたコバルトによる mineralization 変化も、コバルトによる神経細胞の特異的な蛋白代謝異常に関連するものと推測され、両者のてんかん惹起性とも関連して、興味ある知見とおもわれる。

Co-gel 焦点のグリアの変化としては、反応帯における反応性 astrocyte の増殖が特徴的である。すなわちすでに 3 日目で焦点側大脳半球全体に astrocyte の活性化がみられ、時間の経過とともに次第にその数を増し、かつ、焦点巣に限局し、14 日目では脳組織と間葉性組織との間にグリア性癍痕が形成された。しかし、この癍痕は Holzer 染色標本ではグリア線維は染まらず、未熟なグリア癍痕とみなすことが出来る。

Co-gel 焦点におけるその他の所見として間葉性の変化、すなわち毛細血管の新生、macrophage および collagen fibril の増加などが認められたが、これらの所見についてはすでに多数の報告がある。

#### 4. Co-gel 焦点の電顕所見について

Co-gel 焦点は光顕観察に基き特徴的な組織像を示す三つの帯状組織に細分された。それら個々の組織帯を電顕で観察すると、病変の中心である反応帯に形成される glia 膜が複雑な構造を呈するため個々の組織帯の境界は不鮮明で、光顕観察のように明確に各部を区分することは困難である。そこで著者は前述のような新たな規準で電顕による三つの組織帯の境界の設定を行なった。

Co-gel 焦点の微細構造に関する電顕による検索は、Fischer ら<sup>25)</sup>、Baleydier ら<sup>31)</sup>の二、三の報告があるにすぎない。今回の実験で著者が得た所見を要約すると：

1) 壊死部は組織の破壊産物のみからなり、同定可能な微細構造は観察されない。

2) 神経細胞の変化は主に反応帯に認められる。

3) neuropil は神経細胞同様に反応帯で顕著な変化を示す。

4) グリアの変化として、反応帯において astrocyte の増殖からなるグリア膜が存在する。また、この astrocyte は周囲組織に多数の突起を出している。

5) 間葉性細胞反応として macrophage の著しい増殖と結合組織性成分の形成がみられる。

6) 間葉性組織内には毛細血管の新生が認められる。

7) Co-gel 片の cobalt 顆粒は刺入部に一致して残存するが、その一部は macrophage に貪喰される。きわめて稀ではあるがグリア膜の astrocyte に取り込まれた像が認められる。

以下の電顕所見の個々について考察をする。

#### i) 神経細胞の変化

光顕的に見出された反応帯の神経細胞病変 mineralization はコバルトとの関連を示唆する所見として注目されたが、電顕的検索ではこの種の細胞は見出し得なかった。この mineralization に陥った神経細胞は高度な変性細胞すなわち壊死神経細胞であり、このために電顕的には同定が不可能となったものと推測される。

壊死組織が混在する反応帯内側部の神経細胞病変の中で、細胞内小器官および核内 chromatin に乏しい円形の明調を呈する神経細胞は光顕観察では陰影化を示す神経細胞に対応する像と思われる。この種の細胞の外側は通常 neuropil がなく、astrocyte の突起により粗に取り囲まれている。Fischer ら<sup>24)</sup>はこの像を神経細胞の抵抗性を示す所見と考え、且、これが somatic deafferentation として機能する細胞と想定し、てんかん性放電の成因をこれに求めた。しかし著者の今回の検索では gelatine 対照群にも同様の所見を見出し、Co-gel 焦点におけるこの種の細胞の生理的意義は乏しいものと判断される。一方、Co-gel 焦点の反応帯の中心部にも astrocyte によって取り囲まれた明調を呈する神経細胞がしばしば出現している。しかしこの明調細胞の胞体内の微細構造は前者より比較的良好に保存されている。この明調神経細胞の微細構造は Ghatti ら<sup>39)</sup>がサルの外側漆状体の deafferentation された神経細胞の一部に見出した明調細胞の微細構造と同一である。また、Bogolepov ら<sup>32)</sup>はラット脳のコバルトによる 2 次焦点において、chromatolysis を示す神経細胞の中にも上記の明調細胞と同様の所見がみられることを報告している。そして彼らはこの chromatolysis を示す細胞はてんかん焦点において特異的作用を有する細胞と推測している。以上の各報告者はまた神経細胞の胞体を包む glia 組織の存在を重視している。

Fischer ら<sup>24)</sup>は、前述のごとく反応帯内側部の明調な細胞(光顕観察では陰影化を呈する細胞)を somatic deafferentation を営む神経細胞と考えたが、本実験や Ghatti ら<sup>39)</sup>、および Bogolepov ら<sup>32)</sup>の観察を基に考察すれば、deafferentation 機能を示す神経細胞は、反応帯中心部に見られる後者の明調神経細胞と考えるのが妥当と思われる。なお、前者の変性神経細胞には線維束から成る核内封入体が認められた。この神経細胞核内封入体は微細構造上、Siegesamud ら<sup>40)</sup>、Willey ら<sup>41)</sup>が、サル、家兎、ネコなどの嗅脳で見出したものとは異なる像を示し、また、正常対照家兎に

も存在している。

反応帯中心部にはまた比較的多量の polysome を持つ暗調神経細胞も出現している。この細胞の微細構造の特徴は胞体内の各種の小器官の間の matrix を埋めるようにして、微細顆粒状、微細線維状物質が散布する像である。中村<sup>42)</sup>は、軸索切断による起始細胞の逆行性変性を電顕的に検索し、neurofilament の断裂像を観察しているが、その所見と著者の対照群および実験群で観察された、neurofilament 密度を定量的に比較検討すると、上記の微細物質は胞体自体に拡がっていて、この点よりも、それが neurofilament より生成されたとは考え難い。さらに、この微細物質は本実験においては、反応帯の暗調細胞に観察され、前述の somatic deafferentation に関与すると云われる明調細胞には認められない。したがって、Bogolepov ら<sup>32)</sup>が強調する神経細胞の chromatolysis 現象に直接結びつく変化とも考え難い。この微細顆粒状、微細線維状物質を含む暗調神経細胞の Co-gel 焦点における所見の意味は今のところ不明である。

#### ii) Astrocyte について

Co-gel 焦点の反応帯に増殖した astrocyte は、Holzer 法による光顕検索ではグリア線維は染色されないが、間葉性組織と脳組織の間では明瞭なグリア膜を形成し、いわゆる glial scar の像を呈していた。金属塩などによる亜急性、慢性的焦点で観察される glial scar の微細構造についてはすでにいくつかの報告がある。Harris<sup>43)</sup>はサルの大脳皮質の Al-cream 焦点を電顕にて詳細に観察し、glia 膜の表面を覆う 1 層の基底膜や、その astrocyte の突起の細胞膜に接する hemidesmosome 構造、astrocyte の突起の細胞腔への突出によって生じた glia 膜の凹凸不整、および glia 膜の astrocyte の突起間の tight junction 構造などを報告している。ヒトのてんかん脳の皮質焦点病巣を外科的に切除し、電顕にて観察した Ramsey は、皮質表面の著しい astrocyte の増殖や、脳表面における glia 膜の凹凸不整およびこれらの glia 膜の表面には基底膜が常に接着していることなどを観察している。これら諸家の報告は著者の今回の所見とはほぼ一致する。著者が示した glia 膜に接着する基底膜の部分的欠損は glia 膜を形成する astrocyte が未熟であったことに起因する所見と考えられる。Harris<sup>43)</sup>は、Al-cream の焦点で増殖した astrocyte の突起間の tight junction 構造が有意に増加することを強調したが、Baleyrier ら<sup>34)</sup>はラットの大脳皮質のコバルト焦点でも同様の構造を観察している。彼らの一連の実験で、これらの tight junction 構造はてんかん焦点でのみ

特異的に増加することはなく単に脳に切開を加えた対照群においても見出されていて、また出現頻度にも差のないことを報告している。彼らはグリア瘢痕における astrocyte 増殖によって、tight junction 構造は単に相対的に増加したものに過ぎないと判断している。今回の著者の実験では、この構造は見出していないが、これは前にも述べたように glia 膜を形成する astrocyte がより未熟であったためと思われる。いずれにしてもこの astrocyte 間の tight junction 構造は、てんかん焦点における必須の構造とは云い難い。

反応帯で増殖した astrocyte はさらに外方の移行帯にまで多数の突起を出し、neuropil の細胞間隙を埋め、また neuropil を分断するように延びている。これらの増加した astrocyte の突起に関しては次の neuropil の所で論述する。

### iii) Neuropil について

Co-gel 焦点の neuropil で著者が観察した二つの特徴的な所見、すなわち neuropil の細胞間隙の開大と dendrite の腫脹について考察する。反応帯の neuropil の細胞間隙の開大は滲出物の介在と増殖した astrocyte の突起の侵入が主な原因と考える。Baleydier ら<sup>31)</sup>によるネコ脳のコバルト焦点において、中間帯 (intermediate zone) - 著者の反応帯に相当する - では neuropil はその正常構造を全く失い、細胞間隙は開大し、そこに血漿が滲出し、astrocyte の突起が網状に広がっている。彼らはこの変化も灰白質の浮腫と呼んでいるが、この浮腫を実験てんかん焦点における共通の所見であり、またこの浮腫は慢性に持続する所見とみなしている。そして、これらの変化がてんかん焦点における neuron のイオン環境を乱し、そのために neuron の電気活動に変化を生ぜしめ、てんかん性放電が出現するであろうと述べている。しかし、今回の著者の Co-gel 焦点の反応帯では時間の経過とともに、astrocyte の増生がきわめて顕著となり、Baleydier ら<sup>31)</sup>の指摘した neuropil における細胞間隙の浮腫性変化は次第に減衰していく。この所見は、Co-gel 焦点においては neuron のイオン環境に変化を及ぼす要因として Baleydier ら<sup>31)</sup>の主張する浮腫性変化のみならず、astrocyte 自体の増生も重視されなければならない所見と考える。

腫大した dendrite は従来各種の薬物を用いた急性の実験てんかん脳で報告されている。これらの報告によれば dendrite が特異的に腫大し、その他の脳組織の変化は軽微であるという。Ouabain は細胞膜の  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , ATPase を特異的に阻害し、 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  の移動輸送を障害することが知られている。田中<sup>44)</sup>はネコの

大脳皮質に Ouabain を投与して、neuropil の dendrite が特異的に腫大し、この腫大 dendrite に  $\text{Na}^+$  が対照に比し多量に存在すると報告している。Penicillin 投与による急性実験てんかんでも同様の報告がなされている。さらに、コバルトイオンを使用した Butler ら<sup>30)</sup>の急性実験も neuropil の dendrite が腫脹することが示された。この所見について彼らは neuronal soma からかなり遠隔の dendrite の陽イオンの homeostasis がコバルトイオンによって障害され、dendrite の膜の  $\text{Ca}^{++}$  流出に直接影響を及ぼすことによって神経細胞の脱分極が生ずると推定した。この Butler ら<sup>30)</sup>の研究から推測して本実験の Co-gel 焦点においてもコバルト顆粒が反応帯の neuropil に直接作用を及ぼした可能性が大きい。すなわち、Co-gel のコバルト顆粒が一部コバルトイオンと化し、これが神経細胞や neuropil 部に到達し、特徴ある病変が生じたと考えることも可能である。

一般にてんかんの病態生理に関して、神経細胞の細胞膜の興奮を惹起させる物質が研究されているが、なかでも電解質は神経細胞の細胞膜の電気活動に直接結びつくもので、特に  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  は膜電位に重大な影響を持つ陽イオンである。 $\text{Na}^+$  の透過性の亢進による  $\text{Na}^+$  の流入、 $\text{K}^+$  の流出の増大は膜電位を不安定化し、脱分極をまねき、神経細胞の過活動を惹起する原因となる。中枢神経系において、glia cell は spatial buffer を有し、 $\text{K}^+$  を高濃度な部位から摂取し、低濃度の部位に移送する作用を持つことが知られていて、また、てんかん焦点のグリア細胞では  $\text{K}^+$  の buffering system 能に低下がみられるとの報告もある。Zuckermann ら<sup>45)</sup>はネコの海馬に Al-cream とコバルトによる慢性潜在性のてんかん焦点を作り、焦点に  $\text{K}^+$  を注入した。その結果は一定濃度以上の  $\text{K}^+$  の投与で、正常対照群に比して、潜在性てんかん焦点では有意に発作波が記録され、ついで臨床発作が生ずることが明らかにされた。彼らはこの発作の発生根拠を、脳局所の細胞間隙で増加した  $\text{K}^+$  濃度を正常に調整する protective barrier が障害された結果と考え、その protective barrier を glia cell に求めている。著者の今回の Co-gel 焦点の反応帯および移行帯で著しく増殖した astrocyte は、諸家が推測しているように、astrocyte としての正常な buffering 機能を持たず、逆に神経細胞の胞体ならびに dendrite と周囲の細胞間隙との  $\text{K}^+$  平衡を乱し、Co-gel 焦点の神経細胞の過活動を招来したためと判断される。一方、Heinermann ら<sup>46)</sup>は連続電気刺激法、および Penicillin を用いて焦点局所の細胞間隙において  $\text{Ca}^{++}$  の減少が発作波に先行す



ること、その後には  $K^+$  の増加が生じ、発作波が出現することを見出し、それらの焦点では  $Ca^{++}$  に依存性を持つある種の機構の変化が発作波の発生に寄与していると主張している。この  $Ca^{++}$  の焦点での動きは Butler ら<sup>35)</sup> のコバルトイオンを使用した実験でも指摘されているところである。これらの知見は急性のてんかん焦点では glia が関与せず、単にてんかん原性の諸物質が神経細胞特に dendrite に対し直接作用していることを示唆するもので、本実験の Co-gel 焦点においても同様の機序、すなわちコバルトイオンの neuropil 部の dendrite の直接作用が想定される。

今回、著者の Co-gel 焦点で得た神経細胞々体の種々の変化、glia 膜の形成、neuropil の諸変化は以上のてんかん成因の諸説に対して形態学的根拠を与えたものと考えらる。

## 結 論

家兎大脳皮質 (Area precentralis agranularis) に Co-gelatine 棒を刺入して実験てんかん焦点病巣を作成し、脳波的、光学顕微鏡的、電子顕微鏡的に検索し、次の結果を得た。

1) 脳波学的には Megimide 賦活法を施行し、原焦点および反対側半球の対称部位 (mirror focus) からけいれん性発作波が記録される。

2) 光学顕微鏡所見

焦点病巣は肉眼的には皮質表面に向かって U 字型の病巣として認められ、中心から外側に向かって、1) 壊死帯、2) 反応帯、3) 移行帯の三つの異った組織帯に細分される。

反応帯中心部には、急性壊死性変化、硬化性変化、陰影化およびコバルトに関連すると思われる mineralization 変性を示す変性神経細胞が見出される。また、反応帯には未熟ではあるが、glia-mesenchymal scar が形成されている。

3) 電子顕微鏡所見

1) 壊死帯には組織の破壊産物のみで、同定可能な微細構造は見出されない。

2) 反応帯には増殖した astrocyte によって glia 膜が形成される。これらの astrocyte から周囲に多数の突起が延び、その結果 glia 膜は複雑な形態を示す。glia 膜の表面には 1 層の基底膜が接着する。また、反応帯では astrocyte 同様に間葉性成分の増殖が著明である。

3) 反応帯には細胞内小器官の乏しい明調神経細胞と polysome に富み微細顆粒状、微細線維状物質が散布した暗調神経細胞が存在する。

4) 反応帯の neuropil では細胞間隙の開大があり、滲出物が侵入し、この間隙は狭小となる。また、この部の neuropil 内に腫大した dendrite が多数出現する。astrocyte の浮腫性変化は認め難い。

5) 間葉組織内には毛細血管の新生が見られ、その内皮細胞には pinocytic vesicles の増加がみられる。

6) 刺入された Co-gelatine のコバルト顆粒は壊死部の中心に残存するが、一部の顆粒は macrophage に貪食され、稀ではあるが glia 膜の astrocyte にも存在する。

以上の結果より、Co-gelatine 焦点病巣におけるてんかん原性の根拠を、焦点巣の反応帯に生じた神経細胞の変化、astrocyte の増殖および neuropil の変化などの微細構造所見に求めることが可能であることを論述し、さらに焦点病巣でのコバルト金属の動きとコバルトのてんかん原性作用について論及した。

稿を終えると臨み、御指導、御校閲を賜った恩師山口成良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、終始直接御指導、御教示を頂いた伊崎公德助教授、富山医科薬科大医学部神経精神医学教室、中村一郎助教授に深く感謝いたします。また種々の御協力を頂いた勝川和彦先生に感謝いたします。

なお電顕所見について御示唆いただきました本学病理学第一堀川欽一郎教授に謝意を表します。

## 文 献

- 1) Jackson, J. H. : The lumbian lectures on convulsive seizure. Brit. Med. J., 1, 765 - 771 (1890).
- 2) Berger, H. : Über das Elektrenkephalogramm des Menschen. Arch. Psychiat., 87, 527 - 570 (1929).
- 3) Gibbs, F. A., Gibbs, E. L. & Lennox, W. G. : Epilepsy : A cerebral paroxymal dysrhythmia. Brain, 60, 377 - 388 (1937).
- 4) Scholz, W. : Die Krampfschädigungen des Gehirns. Monographien aus den Gesamtgebiete der Neurologie und Psychiatrie. Springer, Berlin, (1951).
- 5) Penfield, W. & Jasper, H. : Epilepsy and the Functional anatomy of the Human Brain. Little-Brown, Boston, (1954).
- 6) Gastaut, H., Toga, M., Roger, J. & Gibson, W. C. : A correlation of clinical electroencephalographic and anatomical findings in nine autopsied cases of "temporal lobe epilepsy".

- Epilepsia, **1**, 56-85 (1959).
- 7) Fischer, J., Holubar, J. & Malik, V. : A new method of producing chronic epileptogenic cortical foci in rats. *Physiol. Bohemoslov.*, **16**, 272-277 (1967).
- 8) 伊崎公徳, 中村一郎, 渋谷禎三, 小山善子, 勝川和彦, 山口成良 : Cobalt-gelatine による実験てんかんモデル-光顕観察による基礎的研究-, 十全医会誌, **89**, 588-605 (1980).
- 9) Kopeloff, L. M., Barrear, S., & Kopeloff, N. : Recurrent convulsive seizures in animals produced by immunological and chemical means. *Amer. J. Psychiat.*, **98**, 881-902 (1942).
- 10) Chusid, J. G. & Kopeloff, L. M. : Epileptogenic effects of pure metals implanted in motor cortex of monkeys. *J. Appl. Physiol.*, **17**, 697-700 (1962).
- 11) Westrum, L. E., White, L. E., Jr. & Ward, A. A. Jr. : Morphology of the experimental epileptic focus. *J. Neurosurg.*, **21**, 1033-1046 (1964).
- 12) Ward, A. A. Jr. : Autorhythmic activity of epileptic neurons, Comparative and cellular pathophysiology of epilepsy, In Servit. Z. (Ed.), *Proceeding of symposium in Liblice*, 60-74 (1964).
- 13) Mayman, C., Manlapaz, J., Ballantine, M. & Richardson, E. : A neuropathological study of experimental epileptogenic lesions in the cat. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **24**, 502-511 (1965).
- 14) Klatzo, I., Wisniewski, H. & Streicher, E. : Experimental production of neurofibrillary degeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **24**, 187-199 (1965).
- 15) Wisniewski, H., Karczewski, W. & Wisniewska, K. : Neurofibrillary degeneration of nerve cells after intracerebral injection of aluminum cream. *Acta Neuropathol.*, **6**, 211-219 (1966).
- 16) 沼部敏夫 : 実験の脳瘢痕を中心とした血行障害に関する研究. *精神神経誌*, **61**, 208-219 (1959).
- 17) Kopeloff, L. : Experimental epilepsy in the mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **104**, 500-504 (1960).
- 18) Dow, R., Guardiola, A. & Manni, E. : The production of cobalt experimental epilepsy in the rat. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, **14**, 399-407 (1962).
- 19) Henjyoji, E. Y. & Dow, R. : Cobalt-induced seizures in the cat. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, **19**, 152-161 (1965).
- 20) Chusid, J. & Kopeloff, L. : Epilepsy after implants of pure metal powders into monkeys' cerebral cortex. *Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, **25**, 637 (1965).
- 21) Payan, H., Strebel, R. & Levine, S. : Epileptogenic effect of extradural and extracranial cobalt. *Nature*, **208**, 792-793 (1965).
- 22) Levine, S. & Payan, H. : Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil. *Exp. Neurol.*, **16**, 255-262 (1966).
- 23) Fischer, J. : Electron microscopic alterations in the cerebral cortex of the rat. A contribution to the ultrastructure of "plasmatic infiltration" of the central nervous system. *Acta Neuropath.*, **14**, 201-214 (1969).
- 24) Fischer, J., Holubar, J. & Malik, V. : Neurohistological study of the development of experimental epileptogenic cortical cobalt-gelatine foci in rats and their correlation with the onset of epileptic electrical activity. *Acta Neuropath.* **11**, 45-54 (1968).
- 25) Fischer, J. & Brinzinger, K. : Vorkommen von Glycogen in geschwollenen Dendriten bei experimenteller Kobaltnekrose des Rattengehirns. *Virchows Arch. Abt. B. Zellpath.*, **1**, 201-210 (1968).
- 26) Fischer, J., Holubar, J. & Malik, V. : Dehydrogenase patterns of the experimental epileptogenic cortical focus in the rat. A Correlation of histochemical and electrophysiological findings. *Acta Histochem.*, **31**, 296-304 (1968).
- 27) Fischer, J. : Attempt at an ultrastructural analysis of blood-brain barrier damage in the epileptogenic zone round experimental cobalt-gelatine necrosis in the rat. *Physiol. bohemoslov.*, **21**, 171-176 (1972).
- 28) Engel, J., Jr. : Secondary epileptogenesis in rats. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, **25**, 494-498 (1968).
- 29) Payan, H. M. : Cerebral lesions produced in rats by various implants ; epileptogenic effect of cobalt. *J. Neurosurg.*, **27**, 146-152 (1967).

- 30) Payan, H. M. : Morphology of cobalt experimental epilepsy in rats. *Exp. Molec. pathol.*, **15**, 312-319 (1971).
- 31) Baleydier, C. & Quoex, C. : Epileptic activity and anatomical characteristics of different lesions in cat cortex. Ultrastructural study. *Acta Neuropath. (Berl.)* **33**, 143-152 (1975).
- 32) Bogolepov, N. N. & Pushkin, A. : Submicroscopic changes of cortex nerve cells in chronic mirror epileptic focus in rat. *Brain Research*, **94**, 173-184 (1975).
- 33) Malzone, W. F., Wilder, B. J. & Mayerdorf, A. : A method of modifying the rapidity of cobalt-induced epileptogenesis in the cat. *Epilepsia*, **13**, 643-648 (1972).
- 34) Dow, R. C., McQueen, J. K. & Townsend, H. R. A. : The production and detection of epileptogenic lesions in rat cerebral cortex. *Epilepsia (Amst.)* **13**, 459-465 (1972).
- 35) Butler, A. B., Willmore, L. J., Fuller, P. M. & Bass, N. H. : Focal alteration of dendrites and astrocytes in rat cerebral cortex during initiation of cobalt-induced epileptiform activity. *Experimental Neurology*, **51**, 216-228 (1976).
- 36) Willmore, L. J., Fuller, P. M., Butler, A. B. & Bass, N. H. : Neuronal compartmentation of ionic cobalt in rat cerebral cortex during initiation of epileptiform activity. *Experimental Neurology*, **47**, 280-289 (1975).
- 37) Nagy, Z. & Fischer, J. : Developmental of perifocal edema in experimental epilepsy induced by cobalt-gelatin. *Acta Neuropath. (Berl.)*, **41**, 191-195 (1978).
- 38) Hartman, E. R., Colasanti, B. K. & Craig, C. R. : Epileptogenic properties of cobalt and related metals applied directly to cerebral cortex of rat. *Epilepsia*, **15**, 121-129 (1974).
- 39) Ghatti, B., Dikran, S. M. & Wisniewski, H. M. : Transsynaptic response of the lateral geniculate nucleus and the pattern of degeneration of the nerve terminals in the rhesus monkey after eye enucleation. *Brain research*, **45**, 31-48 (1972).
- 40) Siegesmud, K. A., Dutta, C. R. & Fox, C. A. : The ultrastructure of the intranuclear rodlet in certain nerve cell. *J. Anat., Lond.*, **98**, 93-97 (1964).
- 41) Willey, T. J. & Schultz, R. C. : Intranuclear inclusions in neurons of the cat primary olfactory system. *Brain Research*, **29**, 31-45 (1971).
- 42) 中村泰尚 : Neuronの変性に関する電顕的研究 - 下オリブ核における逆行変性 -. *神経進歩*, **13**, 767-776 (1970).
- 43) Harris, A. B. : Ultrastructure and histochemistry of alumina in cortex. *Exp. Neurol.*, **38**, 33-63 (1973).
- 44) 田中隆一 : Oubain浮腫脳の電子顕微鏡的研究. *脳と神経*, **21**, 853-864 (1969).
- 45) Zuckermann, E. C. & Glaser, G. M. : Activation of experimental epileptogenic focus. *Arch. Neurol.*, **23**, 358-364 (1970).
- 46) Heinemann, V., Lux, H. D. & Gutrick, M. J. : Extracellular free calcium and potassium during paroxysmal activity in the cerebral cortex of the cat. *Exp. Brain. Res.* **27**, 237-243 (1977).

#### 写真説明

- Fig. 1: Epidural EEG showing focal epileptic discharges by means of Megimide activation.
- Fig. 2: U-shaped lesion. Pathological changes of the reactive zone are marked in the cortical surface. H.E. stain  $\times 20$
- Fig. 3: Mineralizing change of nerve cell in the granular tissue. Klüver-Barrera stain  $\times 50$
- Fig. 4: Glio-mesenchymal scar formation, showing the necrotic (right) and normal (left) brain tissue. Klüver-Barrera stain  $\times 40$
- Fig. 5: Degenerating nerve cells and active astrocytes in the transition zone. Klüver-Barrera stain  $\times 200$
- Fig. 6: An increased number of connective tissue fibers and capillary neoformation in the subpial region. Perdrau stain  $\times 40$
- Fig. 7: Proliferating astrocytes borders on mesenchymal scar. Cajal stain  $\times 100$
- Fig. 8: Pyramidal neuron, astrocytes and the neuropil in the normal cerebral cortex.  $\times 7560$
- Fig. 9: The neuropil in the normal cerebral cortex.  $\times 7020$

Fig. 10: Pia mater and glia limitans in the normal cortical surface.  $\times 10080$

Fig. 11: The neuropil at the control lesion induced with gelatine stick alone.

The proliferation of astrocytes is observed mildly, but the structure in the neuropil is well preserved. (14 days after operation)  $\times 11760$

Fig. 12: Glia limitans at the control lesion induced with gelatine stick alone. (14 days after operation)  $\times 12420$

Fig. 13 – Fig. 20: The focus of 7 days after implantation of cobaltgelatine stick.

Fig. 13: The active increase of mesenchymal cells in the reactive zone  $\times 5670$

Fig. 14: The reactive zone with a marked proliferation of astrocytes.

The infiltration of blood plasma is observed in the widened extracellular space.  $\times 10080$

Fig. 15: A light neuron in the reactive zone. The number of cytoplasmic organelles in the neuron has decreased markedly. The neuron is surrounded by astrocytic processes.  $\times 7700$

Fig. 16: A dark neuron in the reactive zone.  $\times 10640$

Fig. 17: A dark neuron in the reactive zone. The neuropil is observed to be adjacent to some of a neuron.  $\times 12880$

Fig. 18: A neuron and the neuropil in the reactive zone.  $\times 4050$

Fig. 19: Transitory zone.  $\times 4320$

Fig. 20: Glia limitans. There are no pial cells to be observed.  $\times 8400$

Fig. 21 – Fig. 27: The focus of 14 days after implantation of cobaltgelatine stick.

Fig. 21: A dark neuron in the reactive zone.  $\times 2100$

Fig. 22: A light neuron in the reactive zone.  $\times 18480$

Fig. 23: The neuropil in the reactive zone.

The swelling of the dendrites of postsynapses and an increase of astrocytes among processes of the neuropil are observed to be present.  $\times 10080$

Fig. 24: The neuropil in the transitory zone. Most of dendrites are well preserved.  $\times 11760$

Fig. 25: Glia limitans. The astrocytic processes are piled up and form a glia limitans, but it is irregular in contrast to the normal one. Outside the processes of the glia limitans, a continuous basal lamina forms a lining.  $\times 16000$

Fig. 26: Some of the metallic cobalts of the implanted cobaltgelatine stick are phagocytized within macrophages.  $\times 10640$

Fig. 27: Some of the metallic cobalts are taken within astrocytes.  $\times 10080$

List of abbreviations used in figures.

A : Astrocyte

AP : Process of astrocyte

B : Basal lamina

C : Collagen fibril

D : Dendrite

DN : Dark neuron

ER : Rough endoplasmic reticulum

ES : Extracellular space

F : Fibroblast

G : Golgi apparatus

GF : Gliofilament

I : Intracytoplasmic invagination

LN : Light neuron

M : Mitochondria

MP : Macrophage

N : Nucleus

NT : Neurotubulus

P : Pial cell

R : Red blood cell

S : Synapse

TS : Tissue space

↑ : Hemidesmosome

**Electron Microscopic Study of Experimental Epileptogenic Focus Produced by Cobalt-Gelatine Stick** Yoshiko Koyama, Department of Neuropsychiatry (Director: Prof. N. Yamaguchi), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 – J. Jusen Med. Soc., 90, 373–395 (1981)

**Key words:** Electron microscopy, Experimental epilepsy, Cobalt-gelatine

#### Abstract

The experimental epileptic focus in the rabbit cerebral cortex was produced by the intracortical implantation of the cobalt-gelatine stick. The epileptic discharges were recorded either in the primary lesion or in the contralateral site (mirror focus) on the 7-14th day by means of the Megimide activating method. The region of the epileptogenic focus was examined neuropathologically.

The results obtained were summarized as follows:

1. The cobalt-gelatine lesion showed a U-shaped appearance characterized by three different zones: the necrotic zone, the reactive zone and the transitory zone.

In the reactive zone, where the pathological changes were most marked, changes of the nerve cells such as ischemic, sclerotic, homogenizing and occasionally mineralized were observed. Then a glio-mesenchymal scar was finally developed around the necrotic lesion.

2. Electron microscopic findings were as follows:

In the necrotic zone, there were only destructive products of brain tissues.

In the reactive zone, marked proliferation of astrocytes, cells of mesenchymal origin and blood capillaries, the changes of the nerve cells, the wide intercellular spaces of the neuropil, inflammatory exudates in tissue space were observed.

A glia limitans was formed by astrocytes. A large number of astrocytic processes which contained many gliofilaments and glycogen particles, stretched among both neuropils and tissue spaces.

Two types of neurons were observed: one was a light neuron with a sparse distribution of the cytoplasmic organelles, while the other was a dark neuron with many polysomes and granulo-filamentous materials. The former was not surrounded with the neuropils, but with astrocytic processes.

The intercellular spaces between the structures of the neuropil were wide and edematous, and were also filled out with exudates and astrocytes. On close observation of the characteristic changes in the neuropil, swelling of the dendrites of postsynapses was also found to be present.

Most of the metallic cobalts of the implanted cobaltgelatine stick remained at the center of the necrotic zone of the focus. Some of them were phagocytized by macrophages and very rarely by astrocytes of glia limitans.

The author believes that these cytopathological findings might provide morphological evidences for the epileptogenesis of cobalt-gelatine experimental epilepsy.

