



Histochemical studies of the differentiation of microglial cells in the cerebral hemispheres of chick embryos and chicks

藤本, 悦子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1987-11-11

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1117

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001117>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	藤 ^{ふじ} 本 ^{もと} 悦 ^{えつ} 子 ^こ (大阪府)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博ろ第948号
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位授与の日付	昭和62年11月11日
学位論文題目	Histochemical studies of the differentiation of microglial cells in the cerebral hemispheres of chick embryos and chicks (ニワトリおよびニワトリ胚の大腦半球における小膠細胞の分化に関する組織化学的研究)
審査委員	主査 教授 溝口 史郎 教授 杉山 武敏 教授 山鳥 崇

論文内容の要旨

緒言

中枢神経系の発生過程で、胞体内に空胞を含む円形の細胞(アメボイド細胞)が一過性に出現することは古くから知られている。Rio-Hortega (1930) が、この細胞は完成した中枢神経系に存在するミクログリアの幼若型であるという仮説を発表して以来、ミクログリアの起源に関する多くの形態学的研究がなされてきた。しかしミクログリアの由来やアメボイド細胞の起源および運命については未だ意見の一致は得られていない。本研究では、アメボイド細胞とミクログリアの関係を明らかにする目的で、早期ニワトリ胚から幼若ニワトリまでの前脳胞に出現するアメボイド細胞とミクログリアをacid phosphatase (AcPase), nucleoside diphosphatase (NDPase), thiamine pyrophosphatase (TPPase) の組織化学を用いて検出し、それらの細胞の経時的な分布および形態変化を光顕と電顕で調べた。

材料及び方法

孵卵1日から21日までのニワトリ胚(白色レグホン種)と孵化後1日から24日のニワトリの前脳胞または大腦半球を、0.1Mカコジル酸緩衝液(pH7.4)に溶かした4%パラフォルムアルデヒドで4時間固定した後、同緩衝液で一日洗浄し、ピプラトームで厚さ約50 μ mの末凍結切片を作製した。AcPase活性は β -グリセロリン酸を基質としてGomoriの方法で、またTPPaseとNDPase活性はチアミンピロリン酸およびウリジンニリン酸をそれぞれ基質として、Novikoff&Goldfis-

cherの方法で検出した。

反応終了後、光顕用には1%硫化アンモニウムで発色し、グリセリンに封じて観察した。また電顕用には1%オスミウム酸で後固定をした後、アルコールで脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。超薄切片を酢酸ウランとクエン酸鉛で軽く二重染色して観察した。

所 見

1) 前脳胞および大脳半球胞における組織形成

前脳胞は初めは単一の管である。発生が進むにつれて、そこから左右に膨らみが生じ、孵卵4日には半球胞として識別されるようになる。孵卵5日までは前脳胞や半球胞の壁は一樣な厚さで、未分化な神経上皮細胞の層（胚芽層）のみから構成されている。孵卵6日になると半球胞の腹外側部の壁が肥厚し始める。これは、この部分で胚芽層の外側に神経細胞と神経線維とから成る外套層が形成され始めたことによる。外套層の急速な肥厚によって半球胞の腹外側壁は脳室中に大きく膨隆してゆき、やがて脳室の大部分を占拠する線条体を形成する。線条体における胚芽層は、孵卵10日ぐらいまではほぼ一定の厚さで核が7-8段配列しているが、その後徐々に薄くなってゆき、孵卵19日では核が1-3段配列する細胞層となる。

これ以降、線条体はほとんど外套層のみによって構成されることになるが、孵化後1日から24日のニワトリの大脳半球は組織学的にあまり変化しない。

2) 組織化学による細胞の同定

円形細胞：強いAcPase活性と弱いNDPase活性を示す卵円形の細胞で、胞体内に種々の大きさの空胞を持っている。この細胞は、その形態的特徴から判断してアメボイド細胞であると考えられる。AcPase活性は空胞の中および空胞を囲む膜の内側に沿って認められる。またNDPase活性は空胞を囲む膜の内側および細胞膜の外側に沿って認められる。

少数の突起を持つ細胞：短い突起を有する細胞で、中等度のAcPase活性およびNDPase活性を示す。この細胞は不規則な形の核を持ち、クロマチンは核の周辺部に遍在している。細胞質にはいくつかの小さな空胞が認められる。また空胞の数も円形細胞より少ない。AcPase活性は空胞の中および空胞を囲む膜に沿って観察される。またNDPase活性は空胞を囲む膜および細胞膜に観察される。

よく発達した突起を持つ細胞：分岐した長い突起を有する細胞で、中等度あるいは強いNDPaseおよびTPPase活性を示す。この細胞は典型的なミクログリアの形態を呈している。この細胞の核は少数の突起を持つ細胞のものとほぼ同じ形態学的特徴を示す。核を取り巻く細胞質は極めて乏しく、空胞はほとんど認められなかった。NDPaseおよびTPPase活性はこれらの細胞の細胞膜に沿って認められた。

3) 以上3種類の細胞の経時的分布の変化

孵卵6日頃、AcPaseおよびNDPase陽性の円形細胞が形成され始めた外套層内に初めて認められた。これは半球胞の壁の中に血管が進入を開始する時期と一致している。円形細胞はこれに続

く2-3日の間に急速に増加するが、孵卵13日頃をピークにして徐々にその数は減少し、孵卵19日以降ではほとんど観察されなくなった。この細胞はほとんど常に、胚芽層直下の外套層の脳室側に観察されたが、ここは比較的広い細胞間隙が存在し、血管新生が盛んに行われている所である。円形細胞は胚芽層内には全く観察されなかった。AcPaseおよびNDPase活性を示す少数の突起を有する細胞は孵卵10日頃、初めて外套層の中間部および脳膜側部に観察された。この細胞は発生が進むにつれて急速に増加し、孵卵14日以降外套層の全体にわたって一様に分布していたが、一般的に、脳室側部よりも脳膜側部に分布する細胞のほうがよく発達した突起を持っていた。この細胞は孵卵19日以降急速に減少する。NDPaseおよびTPPase活性を示すよく発達した突起を持つ細胞は孵卵19日頃、外套層の脳膜側部に初めて観察された。以後この細胞は急速に増加し、孵化後のニワトリの線条体においては外套層全体に分布していた。

考 察

1) アメボイド細胞の起源と脳実質への侵入経路

アメボイド細胞の起源については(1)脳軟膜の間葉細胞由来説、(2)血中の単球由来説、(3)神経上皮細胞由来説が提示されており、また脳実質内への侵入経路については(1)脳軟膜からアメーバー運動による直接侵入説、(2)脳軟膜から蓋板、脳室、胚芽層経由説、(3)血管経由説などが挙げられている。本研究において、神経上皮細胞はAcPaseやNDPase活性を示さず、これらの酵素活性陽性の円形細胞（アメボイド細胞）が胚芽層や脳軟膜近傍には観察されなかったことから、神経上皮細胞由来説や脳軟膜からアメーバー運動による直接侵入説、あるいは蓋板、脳室、胚芽層経由説は否定される。本研究が示すように、大脳半球泡の壁においては血管の進入時期と円形細胞の出現の時期、および円形細胞の分布と血管新生の場所が一致しており、しかも血管内には円形細胞が認められなかった。このことは、脳軟膜に分布する未分化な間葉細胞が脳実質内へ侵入し、ある細胞群は血管形成に関与し、ある細胞はアメボイド細胞に分化してゆく可能性を示唆している。

2) アメボイド細胞とミクログリアの関係

本研究において、円形細胞（アメボイド細胞）は強いAcPase活性と中等度のNDPase活性を示し、少数の突起を持つ細胞は中等度のAcPaseおよびNDPase活性を、またよく発達した突起を持つ細胞（ミクログリア）は中等度あるいは強いNDPaseおよびTPPase活性を示した。すなわちこれら三種類の細胞は常にNDPase活性を示していた。また大脳半球泡の発生過程において、これら三種類の細胞の分布には明らかな経時的および空間的連続性が認められた。以上の所見は、アメボイド細胞、少数の突起を持つ細胞およびミクログリアが一つの細胞集団に属していることを示唆している。さらに今回の電顕観察から、アメボイド細胞の少なくとも一部は少数の突起を持つ細胞を経由してミクログリアに分化してゆくが、その分化の過程で、核周囲の細胞質の縮小、細胞内空胞の減少及び消失、ならびに細胞突起の伸張、分岐が起こるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

ミクログリアは中枢神経系の組織学において多くの未解決の問題をかかえた細胞である。中枢神経系の発生の途上で、細胞体内に大小の空胞を含む円形の細胞、いわゆるアメボイド細胞が一過性に出現することは古くから知られており、ミクログリアの発見者であるRio-Hortegaによってこれがミクログリアの幼若形であるとされた。以来ミクログリアの起源について多くの研究が行われて来たが、しかし、ミクログリアの由来についても、アメボイド細胞の運命についても、今日なお意見の一致は得られていない。

本研究はミクログリアの起源およびアメボイド細胞とミクログリアの関係を解明する目的で、主として酵素組織化学の手法を用いて行われたものである。

材料と方法：材料としては孵卵1日から21日までのニワトリ胚と、孵化後1日から24日までのニワトリの脳半球を用いた。酵素活性としてはアメボイド細胞およびミクログリアに特徴的とされている酸性フォスファターゼ (AcPase), ヌクレオシッドダイフォスファターゼ (NDPase), およびチアミンピロフォスファターゼ (TPPase) を選び, AcPaseはGomori法により, NDPaseとTPPaseとはNovikoff&Goldfischer法で検出し, その後型の如く光顕および電顕で観察した。

所見：AcPaseおよびNDPase活性陽性の円形の細胞が、孵卵6日頃、形成されはじめた外套層の中にはじめて認められた。これは半球胎の壁に血管が進入する時期と一致する。この細胞はこれに続く2～3日の間に急速に増加するが、孵卵13日目頃をピークにして減少しはじめ、孵卵19日目以後には殆んど見られなくなる。この細胞は胚芽層内には全く認められず、殆んど常に胚芽層直下の外套層内に認められたが、この場所は血管の新生が盛んに行われているところである。この細胞は胞体内に種々の大きさの空胞を有し、形態的特徴からアメボイド細胞と同定された。

次にAcPaseおよびNDPase活性陽性で、少数の短かい突起を有する細胞が孵卵10日目頃から外套層の中間部および脳膜に近い外側部に認められた。この細胞は発生が進むにつれて急速に増加し、孵卵14日以後になると外套層の全体に一樣に分布するようになるが、孵卵19日目を過ぎると急速に減少した。一般的傾向として脳膜に近い外側部に存在するものがよく発達した突起を有していた。

更に、孵卵19日目頃からNDPaseおよびTPPase活性を示し、高度に発達した長い突起を持つ細胞が出現した。はじめは外套層のうち脳膜に近い外側部にあらわれ、以後急速に増加して外套層全体に一樣に分布するようになる。この細胞は形態的特徴および酵素活性の存在部位から判断すると、ミクログリアそのものである。

考察：本研究によると胚芽層の神経上皮細胞はAcPaseやNDPase活性を示さず、またこれらの酵素活性陽性のアメボイド細胞は胚芽層にも脳軟膜の近傍にも見られなかった。このことはアメボイド細胞が神経上皮細胞に由来するという説や、脳軟膜から直接アメーバ運動によって、或は蓋板・脳室・胚芽層経由で脳実質に進入するとうい従来の説を否定するものである。一方、大脳

半球胞の壁における血管の進入時期と円形細胞の出現時期が一致し、また円形細胞の分布と血管新生部位が一致しており、しかも血管内に円形細胞が認められなかったことは、脳軟膜に存在する未分化な間葉細胞が脳実質内に侵入し、あるものは血管形成に関与し、あるものはアメボイド細胞に分化してゆく可能性を強く示唆するものである。

次に本研究において円形細胞すなわちアメボイド細胞は強いAcPase活性と中等度のNDPase活性を示し、少数の短かい突起を持つ細胞は中等度のAcPaseおよびNDPase活性を示し、よく発達した長い突起を有する細胞すなわちミクログリアは中等度ないし強度のNDPaseおよびTPPase活性を示すことが明らかになった。また大脳半球胞の発達過程においてこれら3種類の細胞の分布には、明らかな時間的および空間的連続性が認められた。

これらのことは、アメボイド細胞、少数の短かい突起を持つ細胞およびミクログリアが一つの細胞集団に属すること、およびアメボイド細胞が発生の進行につれて次第に形態を変化させてミクログリアに分化してゆくものであることを強く示唆するものである。

総括：以上のように本研究は従来未解決であったミクログリアの起源および形態分化の過程に関し、これを一元的に解決する新しい知見を提示したものであり、学術上価値ある集積であると認める。よって本研究者は医学博士の学位を得るに十分な資格を有するものと判定した。