

脳血管をとりまく「グリア境界膜」について

佐々木 宏

了徳寺大学・医学教育センター

要旨

脳におけるグリア細胞のひとつであるアストロサイトはその突起の一部が「血管終足」となって、血管壁をとりまいており、「グリア境界膜」を形成している。しかしながら、動脈、毛細血管、静脈といった血管の種類に応じて、「グリア境界膜」の形態に違いがあるのかどうかという点については、これまでほとんど言及がありませんでした。そこで、この問題に対する筆者自身の研究結果を概説いたします。また最後に、筆者がなぜ「グリア境界膜」に着目するようになったかについても触れます。

キーワード：アストロサイト，血管終足，グリア境界膜，脳血管

“Glial Limiting Membrane” Surrounding Blood Vessels in the Brain

Hiroshi Sasaki

Center of Medical Education, Ryotokuji University

Abstract

Regardless of the type of intra-cerebral blood vessel, the vessel walls are completely surrounded by astrocytic processes, which form the so-called perivascular glial limiting membrane (Glm). However, the question of whether some morphological correlation exists between the blood vessel type and the Glm still remains unknown. The author addresses this question. Finally, the author describes why he became interested in the Glm from the viewpoint of tissue architecture of the brain and phylogeny.

Keywords: astrocytes, vascular endfeet, glial limiting membrane, intra-cerebral blood vessels

I. はじめに

脳血管を取りまく、いわゆる「グリア境界膜」について概説いたします。概説するに先立ち、脳の基本構造に少し触れます。脳は大きく、神経細胞（ニューロン）とグリア細胞から成っております。グリア細胞には3種類あり、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアとよばれております。脳においてもっとも重要な機能をもつ細胞はニューロンであり、グリア細胞はニューロンを補助する細胞と考えられております。グリア細胞の中でもっとも機能が明らかになっているのはオリゴデンドロサイトで、髄鞘（ミエリン鞘）を形成しております。アストロサイトはニューロンと血管の間に介在していることから、この細胞を介して血液とニューロンとの間で物質のやり取りがなされているだろうと長く考えられてきましたが、その詳細は未だに不明です。最近になり、アストロサイトは、細胞膜を通じて水を輸送する水チャネルであるアクアポリンを発現していることが判明しました¹⁾。ミクログリアについては、その形態や機能はほとんど不明といった状態です。

アストロサイトは、細胞体から多数の突起が周囲に伸びだしており、その突起の拡がる様子は夜空に輝

く星によく似ております。そこで、星型をなす細胞ということでアストロサイト（星状膠細胞）とよばれてきました。鍍銀染色法で染め出されたアストロサイトは、細胞体ならびに細胞体から派生する突起の表面から無数の“とげ”のような小突起が出ております（図1）。一般に、細胞体から派生している突起を「一次突起」、細胞体ならびにそこから派生する突起の表面から出る“とげ”状突起を「二次突起」とよんでおります。さらに突起の一部は血管壁に終わっていることがアストロサイトの形態学的特徴であり、この突起終末部を「血管終足」とよんでおります。おそらく「血管終足」と血液との間で物質交換がやりとりされているものと長く想像されてきました。1960～70年代になって、電子顕微鏡が主な観察手段になってくるにつれ、脳の血管はすべてアストロサイトの突起によって包まれていることが判明しました²⁾。そして、血管をとりまく突起を「血管周囲グリア境界膜」（以下「グリア境界膜」と略する）とよぶようになりました。また、「グリア境界膜」は脳の最表面にも存在し、「脳表面グリア境界膜」とよばれております。

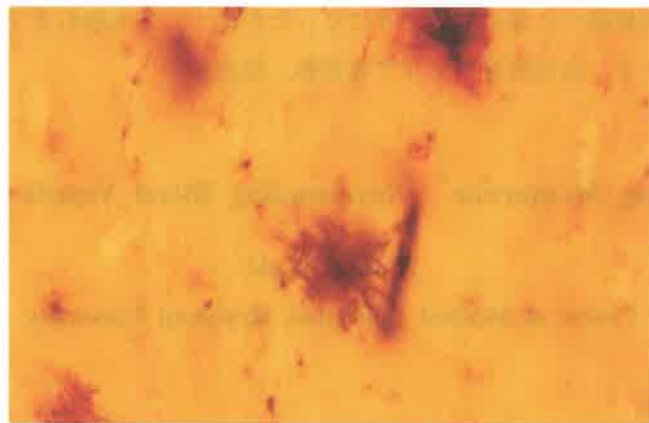


図1. 鍍銀染色のひとつであるGolgi染色法で染色されたアストロサイトの光学顕微鏡像。細胞体ならびに細胞体から伸び出る突起の表面から無数の“とげ”のような小突起が出ており、また突起の一部は血管壁に終わっている。ラット大脳皮質

脳内を走る血管については、これまであまり関心が払われてきませんでした。主役を演じるニューロンに研究者の関心が向き、グリア細胞にもあまり眼が向けられてきませんでした。脳内の血管は脳に進入する動脈、毛細血管、脳から出て行く静脈の3つに分かれます。アストロサイトの突起はこれらすべての血管をとりまいております。筆者は、動脈や静脈のような太い血管と細い毛細血管との間で、「グリア境界膜」の構造に違いがあるのではないかと予想し、それを明らかにしようと思いついたのです。グリア細胞の形態学的研究の長い歴史の中で、この点に注目した論文は著者の知る限りではただひとつしかありません³⁾。

II. 観察結果

Frederiksonら⁴⁾ およびBär⁵⁾ の報告に従い、本稿では齧歯類の脳内血管を小動脈、毛細血管、小静脈の3つに分類します。

1. 血管構築像

図2に血管色素注入法によって得られたラット大脳皮質の血管構築像を掲げます。この方法は麻酔した動物の血管内に心臓から色素を注入して、血管だけを染め出して観察するというものです。もっとも大きな特徴は、大脳皮質（灰白質）と大脳髄質（白質）との間で、血管密度に大きな差があることです。この違いは大脳皮質に限らず脳のどの領域についても該当します。小動脈や小静脈が脳表面からほぼ垂

直に出入りしております。小動脈（細い矢印）がやや細いのに対し、小静脈（太い矢印）は太く見えます。これらの小動脈と小静脈の間の空間で、毛細血管が密な血管網を作っております。よく注意してみると、(1) ニューロン細胞体が乏しいI層も、ほかの層と同様な血管密度を持っていること、(2) 太い小静脈の周囲には毛細血管の乏しい空隙が見られること、および(3) II~V層にかけて、緻密な毛細血管網がコイル状を呈して蛇行しており、コイルとコイルの間は血管密度がやや低いことなどが分かります。

2. アストロサイトの光学顕微鏡像

古典的グリア染色法で染め出されたアストロサイトを図3に示します。黒く染まった細胞体から周囲に向かって突起が伸びだしており、その中のいくつかは血管壁に終わっており、いわゆる「血管終足」(図3A)を形成しております。しかしながら、赤血球が一列に並んでいる毛細血管の壁にはこのような「血管終足」は見られません(図3B)。この染色法によると、アストロサイトの突起は動脈や静脈のような太い血管に終わっており、毛細血管には終わっておりません。

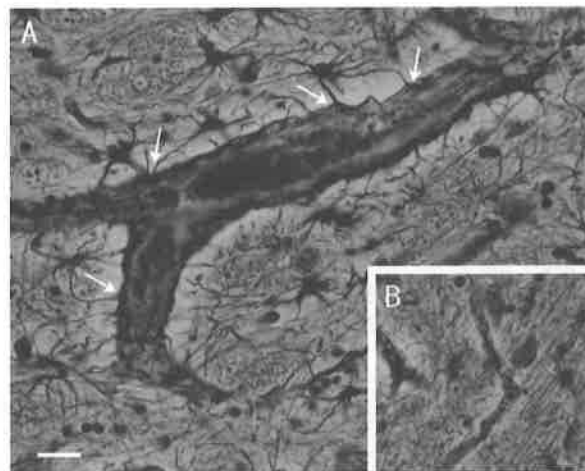


図3. 辻山法で染色されたアストロサイトの光学顕微鏡像 A.星型をしたアストロサイトがみられる。細胞体からまっすぐな突起が伸び出ており、その中には静脈壁に終わるものがある(矢印)。B.赤血球が一列に並んだ毛細血管壁にはアストロサイト突起は見出されない。スケール：20 μ m

3. アストロサイトの透過型電子顕微鏡像

1) 毛細血管における「グリア境界膜」を図4に示します。血管壁は血管腔側から内皮細胞、基底膜、周皮細胞、基底膜からなっております。最外側にある基底膜にはアストロサイトの薄い突起が接触しております。形態学者はこの薄い突起を“シート状突起”とよんでおります。“シート状突起”は毛細血管の全周を包囲しております。

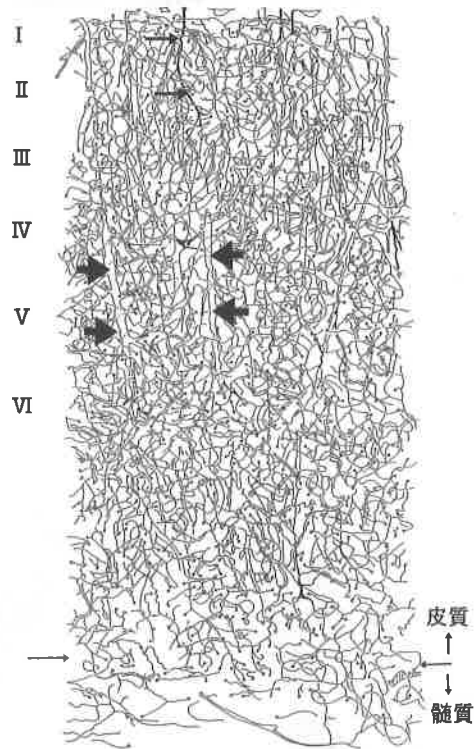


図2. ラット大脳皮質における血管構築像 大脳皮質と髄質との境界を2つの水平方向の矢印で示す。小動脈を細い矢印で、小静脈を太い矢印で示す。大脳皮質の各層をローマ数字で示す。

2) 小動脈における「グリア境界膜」を図5と図6に示します。血管壁は管腔側から内皮細胞，基底膜，平滑筋細胞，基底膜，外膜細胞，基底膜からなっております。最外側にある基底膜にはアストロサイトの突起が見られます。この基底膜はところどころで“杭”のように伸びだし，アストロサイトの突起に食いこんでおります（図6の矢印）。食い込んだ基底膜に接触しているアストロサイト突起の細胞質には，接着装置である接着斑がみられ，近傍にはグリアフィラメント束が存在しております（図6の矢頭）。



図5. 小動脈全周の透過型電子顕微鏡像 動脈の内膜，平滑筋層，外膜が観察される。波打つような基底膜が外膜を包んでいる。右下には，基底膜に接触するアストロサイト形質膜の直下に接着斑が認められる（3つの矢印）。マウス大脳皮質

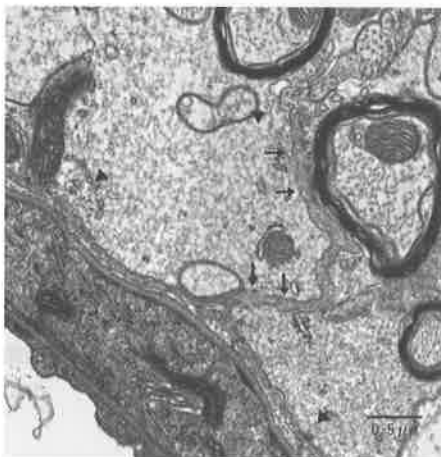


図6 図5の電子顕微鏡像の一部拡大図 外膜をとりまく基底膜が所々で柵状にアストロサイト突起に食い込んでいる（矢印）。食い込んだ基底膜に接触しているアストロサイト形質膜直下には接着斑が見られ，これにグリアフィラメント束が近接している（矢頭）。マウス大脳皮質

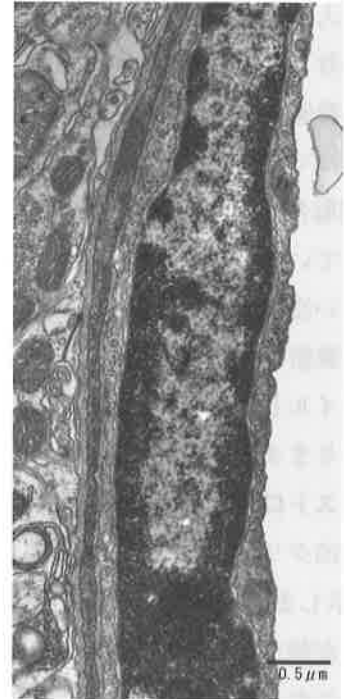


図4. 毛細血管の透過型電子顕微鏡像 毛細血管の壁は，写真の右側から見て，内皮細胞，基底膜，周皮細胞，基底膜からなっている。基底膜にアストロサイトのシート状突起が接触しており，その細胞質には接着斑は観察されない。マウス大脳皮質



図7. 小静脈の透過型電子顕微鏡像 静脈管壁は内皮細胞，基底膜，外膜細胞，基底膜からなっている。最外側にある基底膜にはアストロサイトの突起が見られ，基底膜と接触しているアストロサイト形質膜の直下には接着斑が認められる（3つの矢印）。マウス大脳皮質

3) 小静脈における「グリア境界膜」を図7に示します。血管壁は内皮細胞、基底膜、外膜細胞、基底膜からなっております。最外側にある基底膜にはアストロサイトの突起が見られます。基底膜と接触しているアストロサイト形質膜の直下には接着装置である接着斑が必ず認められます(図7の矢頭)。

電子顕微鏡による観察結果を要約しますと、アストロサイト突起は接着装置である接着斑をもって小動脈・小静脈壁に接着しており、これに対して毛細血管壁には単に接触しているということになります。

4. 共焦点レーザー顕微鏡による観察

最新の観察法である共焦点レーザー顕微鏡を使って、血管壁を包囲するアストロサイト突起の形態を観察してみますと、図8Aに示したように、グリアフィラメントが厚い束状をなした突起が太い血管壁を包んでおります。それに対して毛細血管壁にはグリアフィラメントを持った突起が接触している像はまず観察されません(図8B)。このことは、先ほど「2. アストロサイトの光学顕微鏡像」で説明した古典的グリア染色法で染め出されたアストロサイト突起は実はグリアフィラメント束をもった突起であって、それが鍍銀法で選択的に染め出されていることを示しております。

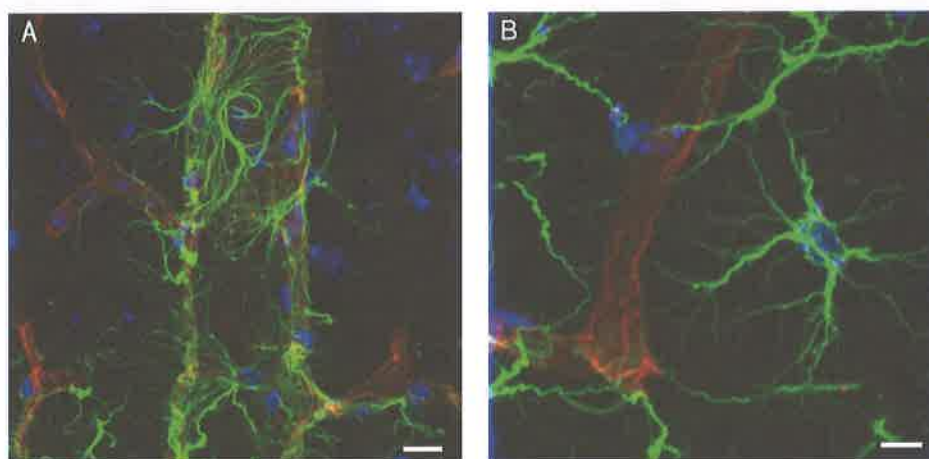


図8. 血管壁を取りまくアストロサイト突起を示す共焦点レーザー顕微鏡像。血管内腔をフェリチンで、グリアフィラメントをその構成たんぱく質であるGFAPの抗体で染め出している。ロゼット状、コイル状、ループ状に染まったグリアフィラメントを持ったアストロサイト突起が太い血管壁にまとわりついている(A)。一方、毛細血管壁にはグリアフィラメントを持ったアストロサイト突起はまとわりついていない(B)。マウス大脳皮質。スケール：10 μ m(A), 5 μ m(B)

5. 走査型電子顕微鏡によるグリア境界膜の立体観察。

次に、「グリア境界膜」を立体構築してみても、3次元的に境界膜に形態的違いがあるかどうかを調べてみます。ここで使用した方法について少し触れてみることにいたします。

透過型電子顕微鏡で用いられる超薄切片はせいぜい0.1ミクロンの厚さです。100枚の連続切片を作成しても、観察される像の厚さはせいぜい10ミクロンであり、小型細胞の細胞体がやっと観察できる程度のものであります。そこで同じ枚数を使うのであれば、切片の厚さを厚くすればその分だけ、観察できる厚みが(ここでは観察される血管の長さになります)増えることとなります。しかしながら、この厚さでは透過型電子顕微鏡の電子線が切片を透過しないため、観察できません。そこで私どもが採用した方法は0.3ミクロンの厚さを持った切片をシリコンウエーハー上に添付し、これにエッチング処理を施し、プラスチック樹脂を取り除いて生物試料だけを残して凹凸をつけた後、これを走査型電子顕微鏡で観察するというものです。あまり使われていない観察法ですから、1例を提示します(図9)。密に絡み合った突起

どうしをきちんと識別することができます。この突起の中からアストロサイト突起のみを抽出して(図10),これを連続切片上で観察して立体構築していくのです。



図9. イオンエッチングした樹脂包埋の走査型電子顕微鏡像。輪切りになった毛細血管腔が白く抜けた孔として観察される。右下にはアストロサイト細胞体が存在する。マウス大脳皮質。スケール:5 μm



図10. 図9において、アストロサイトの細胞体や突起をすべて抽出し、これを赤でマークしている。マウス大脳皮質

1) 小動脈

図11に提示した小動脈のグリア境界膜では、突起ではなくて、2つの細胞体がちょうど向き合う形で動脈壁を取り囲んでおります。細胞体の外表面から多くの突起が周囲に伸びだしております。特に注目すべき構造は、血管周囲の基底膜が“柵”のように細胞体の中にくい込んでいることです。この形は脳表面にある軟膜下基底膜とほぼ同様の構造を呈しております。

2) 小静脈

図12に示した小静脈のグリア境界膜では、2本の一次突起が静脈壁に終止しております。さらに、右上には血管壁の直ぐ近くに細胞体があり、そこから派生した一次突起が血管壁に直接終わっております。

3) 毛細血管

図13～図14に示した毛細血管のグリア境界膜では、いずれも一次突起を見出すことができず、二次突起が血管壁をとりまいております。毛細血管が小静脈に連絡する部位でのグリア境界膜をみますと(図15), 静脈壁には一次突起が終止しており、一方毛細血管壁には常に二次突起がまとわりついております。

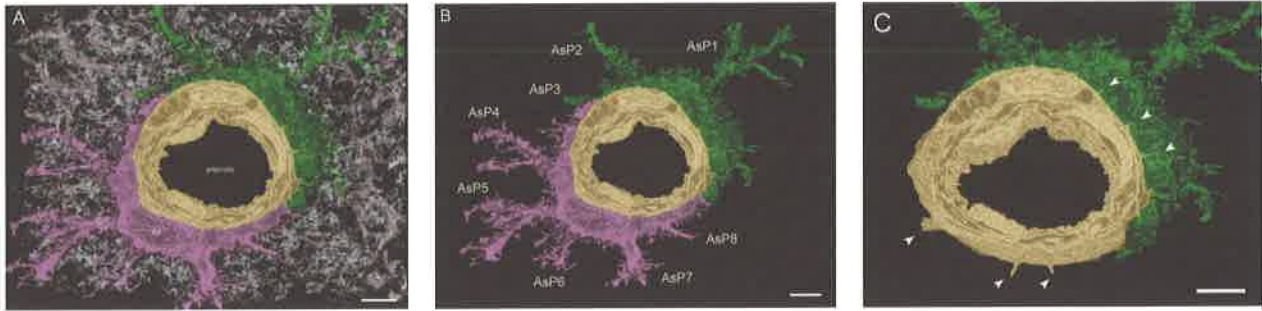


図11. 小動脈グリア境界膜の立体構築像 2つの細胞体が向き合う形で動脈壁をとりまいている (A). 右上の細胞体表面から3本の一次突起 (AsP1~AsP3) が、左下の細胞体表面から5本の一次突起 (AsP4~AsP8) が派生している (B). 動脈壁からは“柵”状の基底膜がアストロサイト細胞体にくいこんでいる (C). ラット大脳皮質 スケール: 5 μ m

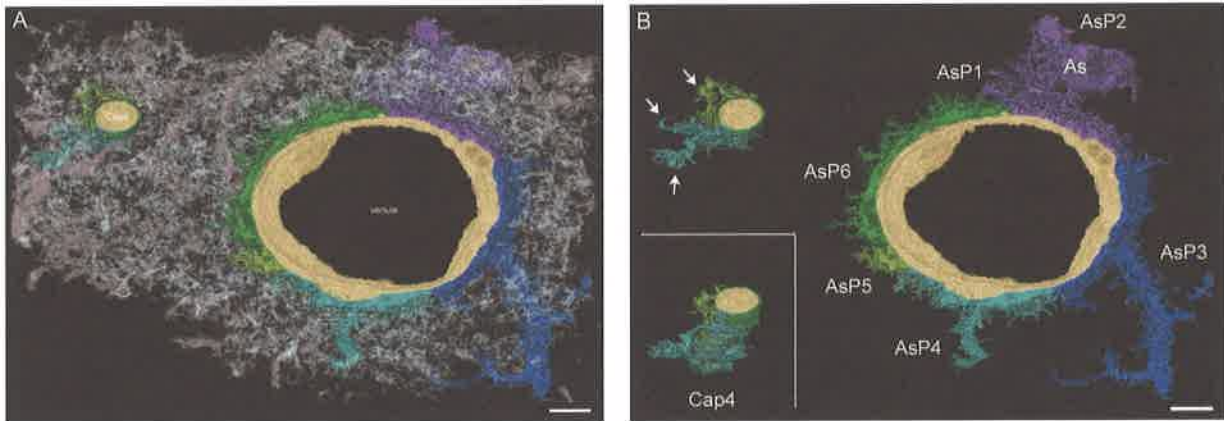


図12. 小静脈グリア境界膜の立体構築像 5本のアストロサイト突起が静脈壁に終わっている。右上には、アストロサイト細胞体があり、それから起こる太い一次突起 (AsP1) が血管壁に終わっている。2本の一次突起 (AsP3, AsP4) が下方~右下に見られる。左上にある毛細血管には二次突起がまとわりついている (図12B)。ラット大脳皮質 スケール: 5 μ m

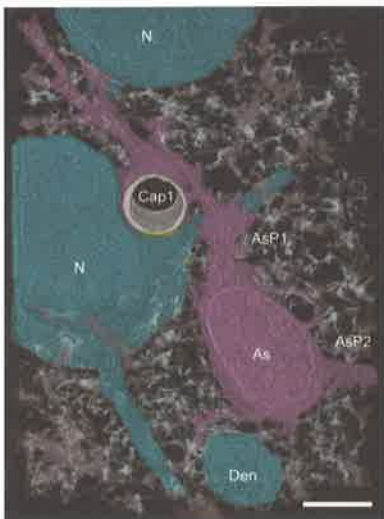


図13. 毛細血管境界膜の立体構築像1 2本の一次突起 (AsP1, AsP2) が細胞体から伸びだし、AsP1は左上に向かい、2個のニューロン細胞体の間を抜けている。途中で、近傍にある毛細血管壁に二次突起を出してこれを取りまいている。毛細血管壁は2つの二次突起によって包まれている。マウス大脳皮質 スケール: 5 μ m

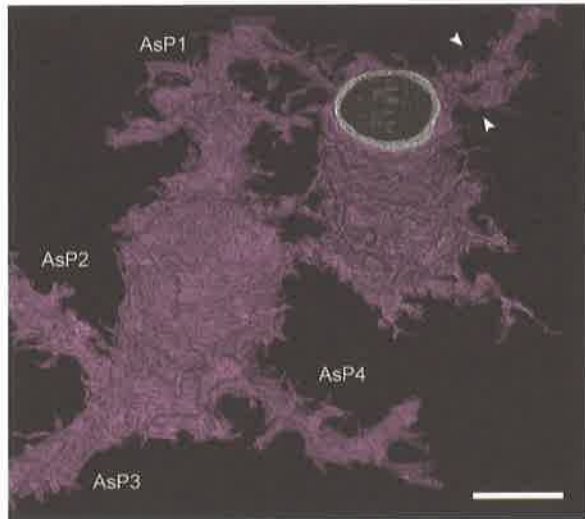


図14. 毛細血管境界膜の立体構築像2 アストロサイト細胞体から4本の一次突起が出ている (AsP1~AsP4)。右上には比較的に太い一本の突起が分岐し、シート状突起になって毛細血管壁をとりまいている。AsP1から2本の二次突起が伸びだし血管壁にまとわりついている。スケール: 5 μ m



図15. 毛細血管および小静脈の境界膜の立体構築像 2本の毛細血管が同時に小静脈に合流している (A). 毛細血管壁には毛羽立った二次突起が包囲するのに対して, 小静脈壁には6本の一次突起 (AsP1~AsP6) が終わっている (B). 比較的太い突起が毛細血管周囲にあるが, それらの突起は直接毛細血管壁には終わらず, きわめて細い突起で血管壁とつながっている (Cの矢印). また境界膜の厚さが毛細血管と静脈で明らかに異なっていることに注意. スケール: 5 μ m

Ⅲ. 考察

以上の観察結果から, 動脈・静脈の太い血管には一次突起が, 毛細血管には二次突起が取りまいており, 「グリア境界膜」は動脈・静脈の太い血管と毛細血管の間で, 明らかに形態的違いがあることが判明しました. そして電子顕微鏡の所見から, 「グリア境界膜」は前者の血管の基底膜には接着斑をもって接着しており, 後者の血管の基底膜には単に並置という形で接触していると思われます. しかしながら, それら2つの境界膜の間に機能的な違いがあるのかどうかという点については, 現在何も分かっておりません. 最近, 水を透過させる水チャネル (アクアポリン) が細胞膜に存在し, その構造が明らかにされました^{1), 6)}. 脳では, アクアポリン4がアストロサイト突起に局限して発現していることが明らかになってきました. 免疫組織化学法でアクアポリン4の局在を調べてみると, あらゆる血管基底膜の境界膜に局限していることが判明したのです⁷⁾. ということは血管の種類に関係なく, アクアポリン4は発現していることになり, 水の動きについては, 大血管と小血管の間に機能的差異は見出せません. 果たして両者の血管の間で「グリア境界膜」に機能的違いがあるかどうかは今後の研究にゆだねられます.

Ⅳ. なぜグリア境界膜に注目することになったのか

最後に, なぜ筆者は「血管周囲グリア境界膜」に興味を抱くようになったのかについて, 触れたいと思います. 筆者が大学を卒業して神経解剖学を志すようになってしばらくしてから抱くようになった疑問は, “いったい脳では, ニューロン, グリア細胞 (特にアストロサイト), および血管のお互いの位置関係はどうなっているのだろうか?” (これを専門的には「組織構築」とよんでおります) でありました. しかし実験動物として手ごろなラットやマウスのような哺乳類の脳を調べたのでは, あまりにも構造が複雑すぎてわからないのではないかと思います, もっと構造が簡単だと思われる両生類の脳を調べることに思い至ったのです. そこで用いた動物は食用ガエルであり, これを使って, 脳の組織構築を調べた結果, 「両生類アストロサイトは, その1次突起が, 電子密度の高い層によって軟膜下基底膜に接着し, その2次突起は単に並列という形で血管壁を包囲している細胞である」という結論に至ったのであります⁸⁾. つまり, 「軟膜下基底膜, ニューロン, アストロサイトの位置関係は, 感覚上皮における感覚細胞, 支持細胞, 上皮基底膜の関係に等価である」ということです (図16)⁹⁾. ただし, 脳は管腔構造をなしているので, 図17に示したような模式図になります. 支持細胞であるアストロサイトは脳表面にある基底膜に接着しており, 脳に進入してくる血管の基底膜には接着しないで, 単に“並置”という形で接触しているのです. 両生類で得られた結果は当然哺乳類の脳にも該当するものと考えられます (もしも該当しないということになれば, それこ

その両生類と哺乳類の脳の間には“真の質的”な進化があるということになります)。哺乳類の脳では、「アストロサイトは脳表面基底膜ならびにこれと等価な動脈・静脈を取り巻く基底膜に接着して、毛細血管には単に“並置”という形で接触しているのではあろう」と予想したのであります(図18)。そこで、動脈・静脈のような太い血管と毛細血管のような細い血管の間で、「グリア境界膜」が構造的に違っているのではないかと予想し、その立体構造を調べることに思い至ったのであります¹⁰⁾。現在、筆者の頭の中に描かれている脳の組織構築図を図19に示して、本稿を終えることにいたします。

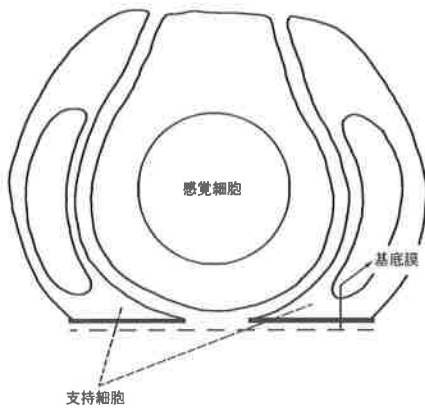


図16. 感覚上皮における感覚細胞, 支持細胞, 基底膜との関係を示す模式図 支持細胞は基底膜に接着装置(太い実線部分)を持って接着し, 感覚細胞を基底膜から隔てている。

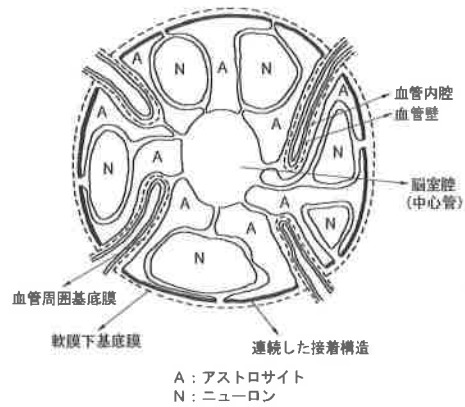


図17. 両生類脳におけるニューロン(N), アストロサイト(A), 血管, 基底膜(破線)との関係を示す模式図 アストロサイトは脳表面にある基底膜(軟膜下基底膜)に連続した接着装置(太い実線)で接着しているのに対して, 血管壁をとりまく基底膜には単に接触している(細い実線)。

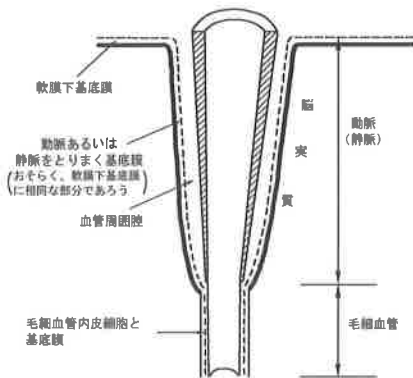


図18. 哺乳類脳において予想される脳表面, 動脈(または静脈), 毛細血管, 基底膜との関係を示す模式図 アストロサイトは脳表面にある基底膜(軟膜下基底膜)ならびに動脈・静脈をとりまく基底膜に接着し(太い実線で示す), これに対して毛細血管をとりまく基底膜には単に接触している(細い実線で示す)。

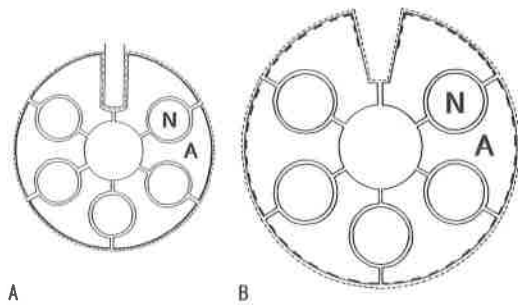


図19. 両生類と哺乳類におけるニューロン, アストロサイト, 血管壁, 基底膜の関係を示す模式図 A 両生類ではアストロサイト(A)は脳表面にある基底膜に連続した接着装置で接着しているのに対して, 血管壁をとりまく基底膜には単に接触している。N: ニューロン B. 哺乳類ではアストロサイト(A)は脳表面にある基底膜ならびに動脈・静脈をとりまく基底膜に接着斑で接着しているのに対して, 毛細血管をとりまく基底膜には単に接触している。

文献

- 1) Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam et al(1998) Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci.* 17: 171-180.
- 2) Peter A, Palay SL and Webster H deF(1991) *The Fine Structure of the Nervous System: the Nervous and their Supporting Cells*, Oxford University Press, New York. 273-295.
- 3) Wolff JR and Bär TH(1976) *The Cerebral Vessel Wall*, Raven Press, New York. pp7-13.
- 4) Frederickson RG and Low FN(1969) Blood vessels and tissue space associated with the brain of the rat. *Am J Anat.* 125: 123-145.
- 5) Bär TH(1980) The vascular system of the cerebral cortex. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 59: 1-62.
- 6) Nagelhus EA, Veruki ML, Torp R et al(1998) Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Müller cells and fibrous astrocytes. *J Neurosci.* 18: 2506-2519.
- 7) Nico B, Frigeri A, Nicchia GP et al(2001) Role of aquaporin-4 water channel in the development and integrity of the blood-brain barrier. *J Cell Sci.* 114: 1297-1307.
- 8) Sasaki H and Mannen H(1981) Morphological analysis of astrocytes in the bullfrog (*Rana catesbeiana*) spinal cord with special reference to the site of attachment of their processes. *J Comp Neurol.* 198: 13-35.
- 9) 佐々木宏(1983) 両棲類アストロサイトの形態について. *神経研究の進歩.* 27: 66-78.
- 10) Watanabe K, Takeishi H, Hayakawa T, et al(2010) Three-dimensional organization of the perivascular glial limiting membrane and its relationship with the vasculature: A scanning electron microscope study. *Okajima Folia Anat.* 87: 109-121.

(平成23年11月30日稿)

査読終了年月日 平成24年1月30日