



# Ethyl nitrosourea(ENU)の経胎盤投与による実験的脳腫瘍

埜本, 勝司

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1977-07-27

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙0490

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2000490>

※ 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） | たお かつ し<br>埜 本 勝 司 （広島県）                                                                                            |
| 学位の種類   | 医学博士                                                                                                                |
| 学位記番号   | 医博ろ第415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52年7月27日                                                                                                          |
| 学位論文題目  | 「Ethylnitrosourea（ENU）の経胎盤投与による実験的脳腫瘍」<br>第1編：Microtumor の経時的、部位的考察と組織学的性状について<br>第2編：Autoradiography による腫瘍増殖動態について |
| 審査委員    | 主査 教授 松本 悟<br>教授 京極 方久 教授 杉山 武敏                                                                                     |

## 論文内容の要旨

### 第1編：Microtumor の経時的、部位的考察と組織学的性状について（第1報）

1964年以来、Druckrey らによって始められた吸収性発癌物質による実験的神経腫瘍作成法の中で、Ethylnitrosourea（ENU）は妊娠中の母 Rat に1回投与するだけで、その子供 Rat の90%以上に中枢神経系腫瘍が発現するという理想的な実験モデルであるが、これらの Rat は生後4.5～5ヶ月以後に神経症状を呈する。脳腫瘍死亡の Rat を組織学的に検索すると、macrotumor の他に直径1～2 mm以下の小腫瘍（以下これを microtumor と呼ぶ）が認められ、これらの macrotumor と microtumor の関係は腫瘍の発育過程を知る上で重要であるが、その連続的な観察が未だない為明らかでない。そこでこの microtumor に注目し、それらの発生時期、発現部位、及び組織学的性状について検討すると共に併せて経時的な発育過程も観察した。

### 研究方法

実験動物は日本 CLEA 産の SD-JCL Rat を用い、妊娠13日目の母 Rat に50mg/kg の ENU を1回腹腔内に投与した。妊娠 Rat のうち1匹は妊娠末期（20日）に屠殺し、その胎仔について、それ以外は出産直後の新生仔 Rat、生後7日目、第3週令、第17週令、第21週令の Rat 計82匹について、各々の時期に屠殺し、ホルマリン固定後厚さ1 mmの前額断で細切ブロックを作り肉眼的観察を行なった後、各ブロックを4～6 μの連続切片又は各ブロックについて厚さ6 μの標本を10数枚作り、H. E., Klüver-Barrera, Luxol fast blue 及び鍍銀染色を施行し光学顕微鏡下に観察した。

対照として生直後の新生仔 Rat、第4週令、第20週令の正常 Rat について連続標本作製し比較検討した。

## 実験結果

① 発生時期：肉眼的に microtumor が認められたのは 8 例で、第 12 週令が最も早期であった。肉眼的には変化を認めなかった第 12 週令以前の Rat でも、連続切片にて詳細に観察すると最も早期の microtumor は第 5 週令に認められた。

② 発生部位：肉眼的に認められた 8 例のうち、7 例が天幕上で、天幕下は脳幹部に認められた 1 例のみであり、光顕下で認められた microtumor 54 例のうち、天幕下は脳幹部 1 例と小脳橋角部 1 例の 2 例のみであった。天幕上腫瘍を、脳室上衣下、皮質内、白質内、及び脳外の 4 つに大別すると、脳室上衣下 32 個、皮質内 30 個、白質内 21 個で、皮質内の大部分は Hippocampus 近傍に認められた。

③ 組織学的性状：Zülch の行なった実験脳腫瘍の予備的分類に従って分けると全例 glioma 系腫瘍であり、Oligodendroglioma 43 個、Astrocytoma 14 個、Isomorphous mixed glioma 23 個、Pleomorphous mixed glioma 1 個、Ependymoma 2 個であった。部位と組織像の間には、はっきりした相関はなかったが、皮質内の microtumor には明らかに oligo 系腫瘍が多く認められた。経時的な組織像の変化としては、microtumor の初期が一般に uniform な腫瘍細胞で構成されているのに比べ、大きくなるにつれて Mixed glioma が多くなり、且つ血管新生や、その内皮の増生など間葉系の混入が次第に著明となり、組織像が多彩となる傾向を認めた。

## 結 論

ENU 50mg/kg 妊娠 13 日目の SD-JCLRat に投与し、生まれた仔 Rat 82 匹の経時的観察で、光顕下における microtumor の最初の発生は生後 5 週令であり、腫瘍の好発部位は主として天幕上の Subependymal layer である。組織学的には Oligo 系腫瘍が多く、その発育につれて Oligo-astro mixed glioma が多くなり、組織像が多彩となることが明らかになった。胎生期の中枢神経系発生過程に及ぼす ENU の影響が、特に Subependymal matrix layer に最も強いことが推測され、1 つの標的部位であると考えられる。

### 第 2 編：Autoradiography による腫瘍増殖動態について（第 3 報）

第 1 編の経時的観察を基礎として、個々の腫瘍がどのような増殖態度をとり、どのように進展して行くかという問題を解析する為の第一歩として、<sup>3</sup>H-thymidine autoradiography を用いて検索を行ない、これ迄に報告された実験的脳腫瘍及びヒト悪性脳腫瘍の増殖動態と比較検討した。

## 研 究 方 法

第 1 編の方法と同様に、妊娠 13～20 日目の SD-JCLRat に ENU 50mg/kg を 1 回腹腔内投与して、生まれた仔 Rat のうち新生仔期から生後 52 週令迄の Rat 18 匹を用いた。17 匹に <sup>3</sup>H-thymidine を 5 %ブドウ糖溶液に稀釈し 5～10  $\mu$ Ci/g Rat 項部皮下に注射し、注射後 3 時間で屠殺した。14 匹は 10 %ホルマリン固定後 4  $\mu$  に薄切、3 匹は電顕用切片を作製した。1 匹は <sup>3</sup>H-thymidine の pulse labeling 法を施行し、光顕オートラジオグラフィーは dipping 法で行ない、各々の labeling index を求めた。

## 結 果

胎生末期から生後 1 週目にかけては、側脳室 matrix layer の細胞は、かなり活発な分裂を繰り返しており、特に前角外側部では最後迄標識細胞が認められる。microtumor は生後 14 週令の 1 例に認めら

れ、光顕的に白質内の Astrocytoma 様腫瘍と考えられたが、Autoradiography では labeling index (L. I.) は 4.7% で、側脳室側に標識細胞がやや多く認められた。21週令から24週令の小～中等大の腫瘍では、毛細血管をとり囲んで小円形腫瘍細胞が集積し、これらに標識細胞が多い。mixed glioma は光顕的に Ependymo-astro 様、Ependymo-oligo 様、或いは、Oligo-astro 様であり、腫瘍内の標識細胞分布は、ほぼ均等で L. I. は 0.1～5% の範囲であった。一方肉眼的に明らかな中等大～巨大腫瘍 7 例中 4 例に、腫瘍内の一部に極めて細胞密度の高い部分が認められ、組織学的には Ependymoblast ないし Ependymoma 様腫瘍細胞で、この部の L. I. は 12～32% と非常に高いのに比べ、その周囲の Oligo 様或いは Astro 様腫瘍細胞の L. I. は 0.5～3% と極めて低く、両者の移行部では互いの細胞が交錯しており、形態学的な移行や細胞の分化を示唆するような所見を得た。pulse labeling を行なった 1 例は Anaplastic glioma で、標識率は高いが腫瘍全域に分布しており、一定の傾向は認めなかった。(電顕所見) Ependymoma 様細胞では cilia や junctional complex など、上皮由来の特徴的な所見は得られなかったが、Oligo 様細胞や Astro 様細胞とは核の形態、細胞質内の organella の分布に差を認めた。

Autoradiography は細胞動態の解析に極めて有利な方法であるが、脳腫瘍に関しては in vitro の解析に比べると in vivo での報告は少ない。flash labeling 法は、ある時点における増殖細胞を示す 1 つの parameter であり、これだけではその動態の一部しか知り得ないが、腫瘍構築ないし腫瘍細胞形態と L. I. の差を検索し、更に pulse labeling 法を用いることによってその進展方向や分化の方向をある程度推測出来る。実験脳腫瘍のこれ迄の報告では L. I. は 2.6~40 % とかなり巾が広い、(Johnson, Kleihues, Bakers)。ヒト悪性 glioma の報告では 0.8~11.4% と実験脳腫瘍に比べると低い値である。今回の検索で得られた 4 例の腫瘍細胞形態と L. I. の著明な差は、単に複数の腫瘍細胞群が相接して認められたとは考え難く、一見「腫瘍内腫瘍芽」とでも形容出来る形態を呈しており、丁度、glia 細胞の分化が、

の如く起っているように、腫瘍細胞でも同様な分化が起っている可能性が考えられる。

第1編の経時的観察及び第2編の Autoradiography による検索結果から、ENU は胎生期における DNA 合成の特に盛んな側脳室の Subependymal matrix cell を1つの主要な標的細胞として carcinogenic な影響を与え、生後5週令頃から発生してくるいわゆる microtumor は、組織学的には Oligo 様腫瘍が主体をなす。経時的にみると、腫瘍が次第に白質に進展していくにつれ、腫瘍形態も多彩となり、mixed glioma が多くなると共に、血管等の間葉系組織が関与して増殖能に部位的差を生じ、小～中等大の腫瘍では L. I. も 0.1～5% と低く且つ均等に標的細胞が分布する腫瘍が多いが、macro tumor の一部には同一腫瘍内に腫瘍芽とも云うべき非常に増殖能の高い部位 (L. I. 12～32%) を認め、形態学的にはより未分化な腫瘍細胞であった。これらは形態学的に、周囲の Oligo 様或いは Astro 様腫瘍細胞へのなめらかな移行を呈しているだけでなく L. I. も次第に低くなっており、電顕的にも両者の微細構造に差

を認めた。

以上の結果から腫瘍増殖形態に2つの type が考えられ、びまん性に発育増殖してゆくものと、一部は腫瘍内により未分化な腫瘍芽様細胞群を有し、そこを中心に増殖しつつ、自らもより分化した glia 系腫瘍に transform していく可能性が示唆される。

## 論文審査の結果の要旨

### 第1編；Microtumor の経時的、部位的考察と組織学的性状について

1964年 Druckrey による吸収性発癌物質投与による実験腫瘍中 Ethylnitrosourea は妊娠ラットに一定時期、一定量、ただ一度投与するだけで、その仔ラットの95%以上に神経腫瘍を発見する理想的な実験腫瘍モデルの一つと考えられている。これら仔ラットは生後5ヶ月を経て漸次神経症候を呈するが、これと相前後して肉眼的にも容易に認め得る macrotumor を現わす。またそれ以前に直径1mm以下の異常な微小細胞集団すなわち microtumor が脳内各部に非連続的に認められる。本申請者は、上記 microtumor に着目し、その発生時期、発現部位組織像を経時的に観察し、腫瘍発現過程を捉えるべく試みた。

〔方法〕日本CLEA・SD-JCL ラットを用い、妊娠13日目のラットに50mg/kg の ENU を腹腔内に投与した。これら動物群に対し、妊娠末期胎仔、出産後仔ラットの各時期すなわち1, 3, 7, 21週令の82匹を屠殺し、脳連続切片により光顕下で観察した。

〔結果〕microtumor の認められた54例の仔ラットにおける最年少は第5週令であった。microtumor は以後、日令を終るにしたがい数を増し、天幕上、脳室上衣下、皮質内白質内に認められた。天幕下脳幹および小脳橋角部には、わずかに1例づつみられた。これら microtumor を Zülch 組織分類にしたがえば、Oligodendroglioma が最も多く、Astrocytoma, Mixed glioma, Ependymoma がつづいた。中でも皮質内 microtumor は Oligodendroglioma が多くみとめられた。組織像の経時変化としては、microtumor では uniformal であるが、腫瘍が大きくなるにつれ間葉系混入が著明になると共に mixed glioma となる傾向をみとめた。以上により、神経系発生過程に及ぼす ENU は特に、脳室上衣下 matrix layer に強く、一つの標的部位と考えられた。

### 第2編；Autoradiography による腫瘍増殖動態について

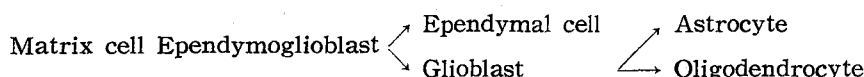
経胎盤投与法による脳腫瘍の経時的観察を基礎にし、個々の腫瘍がどのような増殖態度をとるかを解析する第1歩として  $^3\text{H}$ -thymidine autoradiography を利用した。

〔方法〕第1編同様方法で前処置した仔ラットの新生仔期より生後52週令までの18匹の仔ラットを用い、17匹には  $^3\text{H}$ -thymidine 5~10 $\mu\text{Ci/g}$  を項部皮下に注入、3時間後に屠殺、さらに1匹には、 $^3\text{H}$ -thymidine の pulse labeled mitosis curve 法を用い、腫瘍の labeling index を求めた。

〔結果〕胎生末~生後1週令にかけて側脳室部 matrix layer は活発な分裂をくり返し前角外側部で標識細胞がみられた、生後14週令の microtumor でみられた L.I. は、4.7%で側脳室側に標識細胞が多く認められた。21~24週令の小~中等大腫瘍では、小円型細胞が集積し、これらに標識細胞が多かった。Mixed glioma では標識細胞はほぼ均等で L.I. は0.1~5%であった、さらに大型腫瘍巣では7例

中 4 例に、腫瘍内にきわめて細胞密度がたかく Ependymoblastoma, Ependymoma 様細胞で L.I. は 12～32% ときわめて高い部があった。しかし周辺 Oligodendrocytoma, Astrocytoma 様部位では L.I. が 0.5～3% と低値を示した。pulse labeling 法の 1 例は Anaplastic glioma で L.I. は高値だったが一様に多く、一定の傾向はみられなかった。また電顕所見として、Ependymoma, Astro, Oligo 様腫瘍細胞にそれぞれ特異な微細構造上の差異をみとめた。

以上 in vivo において flash labeling により、腫瘍細胞と L.I. との相関が或程度確認出来た。すなわち両者の相関図は、glia 細胞の分化が、



の過程をたどると同様、腫瘍細胞も変化がおこっていると推測された。

以上 microtumor から macrotumor への経時的变化にしたがい腫瘍細胞の変化がみられ、さらに L.I. にも変動のあることが確認され、と同時に、電顕所見より腫瘍増殖形態には ①びまん性増殖 ②腫瘍内により未分化な腫瘍芽細胞群を有し、これを中心に増殖しながら、より分化した腫瘍に transform される可能性が示された。

以上、本研究は吸収性発癌剤の経胎盤投与による脳腫瘍につき、その形態変化、動態解析を研究したものであるが、従来あまり行なわれなかったこの分野で、microtumor の経時的变化、腫瘍内腫瘍芽につき重要な知見を得たものと考えられる。