

---

---

原 著

---

---

## Ethylnitrosourea 投与によるラット終脳発生 第1期の脳障害とその修復

新潟大学脳研究所実験神経病理学部門 (主任: 生田房弘教授)

川崎 浩一

Ethylnitrosourea-induced Brain Lesion and  
Its Repair Process During the Early  
Stage of Development of the Rat  
Telencephalic Pallium

Koichi KAWASAKI

*Department of Pathology, Brain Research  
Institute, Niigata University  
(Director: Prof. Fusahiro IKUTA)*

We observed the histological features of the repair process in a destructive lesion of the rat brain during the proliferation of neuroepithelial cells (NECs). Pregnant rats on day 12 of gestation were given a single intravenous injection of 40 mg/kg ethylnitrosourea (ENU), and the cytotoxic effects on the brains of the embryos (E12) and the subsequent repair process were studied chronologically. The results are summarized as follows.

- 1) There hours after ENU administration, shrunken and darkened degenerating cells appeared in the NEC layer.
- 2) NECs engulfed and digested these degenerating cells.
- 3) These NECs still appeared to perform elevator movement and had the potential to proliferate.
- 4) The width of the NEC layer diminished after administration of ENU, reached a minimum at 6 h, and recovered rapidly by 10 h. On E14, there was no significant difference in the width between the ENU-treated rats and the untreated controls.
- 5) On postnatal day 21, there was no significant difference between the ENU-treated rats and the controls in gross appearance and brain weight. Histologically, the

---

Reprint request to: Koichi KAWASAKI,  
Department of Pathology, Brain  
Research Institute, Niigata  
University, 1 Asahimachi-dori,  
Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町  
新潟大学脳研究所実験神経病理学部門  
川崎 浩一

former showed no distinct changes, including neuron loss or gliosis, compared with the latter.

In this experiment, a single intravenous injection of ENU caused degeneration and death of the NECs. On postnatal day 21, we were unable to find any significant differences between the treated rats and the controls. We consider that in the early stage of brain developments, NECs participate actively in the process of brain lesion repair; eliminating the degenerating NECs and having the potential to compensate for the loss.

Key words: ENU, repair process, neuroepithelial cell, developing, rat  
ENU, 病巣修復, 神経上皮細胞, 発達, ラット

## はじめに

Ethylnitrosourea (ENU) は、一定時期のラット胎仔に投与されると、一定期間後、神経系に造腫瘍作用を発現する<sup>1)-3)</sup>ことが知られている。他方、投与直後には細胞毒<sup>4)-6)</sup>としても作用し、種々の程度の奇形脳が形成されると報告されている<sup>7)-9)</sup>。

われわれは、これまで ENU を用い発生第2期の脳<sup>9)10)</sup>および脊髄<sup>11)</sup>障害とその修復について観察してきた。今回は、胎生第12日 (E12) すなわち、neuroepithelial cell (NEC) のみが増殖、分裂している発生第1期終脳において、この極めて作用時間の短い DNA 合成阻害剤である ENU を投与することにより、NEC に障害を与え、その後生ずる病巣修復過程、およびその結果として最終的にどのような脳が形成されるかについて検討した。

## 材料と方法

実験動物は生後3~6カ月の Wistar 系雌ラット (体重 250~300 g) を用いた。午後11時から翌朝午前8時まで雄ラットと同居させ午前10時に膣スミアを採取し、光顕下に精子が確認された日を胎生第1日 (E1) とした。

使用直前に生理食塩水に溶解させた ENU 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 mg/kg・体重、多くは 40 mg/kg・体重を E12 の胎仔をもつ妊娠ラットの尾静脈より1回投与した。投与量による病変の程度を投与後4, 24時間の組織標本で検討した後、40 mg/kg 投与群を、エーテル吸入麻酔下に開腹により胎仔を1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 24時間後と E14, 15 で採取した。また仔の生まれた日を生後第1日 (P1) とし、P1 にて仔を8匹に間びき、P21 で採取を行なった。

この際、発達の個体差および ENU に対する反応の個体差を除外する為、同一経過時間では2匹以上の母ラッ

トからそれぞれ1匹以上の胎仔を採取した。

対照群としては正常発育中の上記各胎生時期と同一経過時間の E12, E13, E14, E15 の胎仔および P21 成熟ラットを用い、形態学的に観察した。それぞれの胎仔を3%グルタルアルデヒド1%パラホルムアルデヒド0.1 M 磷酸緩衝液 (3G1P) (pH 7.3) で、24時間浸漬固定、0.1 M 磷酸緩衝液で洗浄後、それぞれの組織は1% OsO<sub>4</sub> で後固定した。エタノールで脱水、プロピレンに浸漬後、エポン 812 で包埋した。約 1.0 μm 厚の大脳冠状断の Toluidin-blue (T-B) 染色標本を作成、観察した。また、電顕の検索には、選択した部位の超薄切片を作成し、酢酸ウランおよび塩化鉛で二重染色を行ない、透過型電顕 (日立 H-7100, 75KV) で観察した。

また、P21 成熟ラットについては、4%パラホルムアルデヒドで経心的環流固定し、パラフィンに包埋後、Hematoxylin-Eosin (HE), Klüver-Barrera (KB) 染色を施行した。

## 結 果

### 1. ENU 投与量の選択

E12 に ENU を1回投与することにより組織学的に十分な病変を惹起させ、かつ胎生期に胎仔が死亡することなく、生後にまで観察可能な投与量を決定するため、E12 の仔をもつ妊娠ラットに、それぞれ 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 mg/kg 体重、投与した。

その結果、60, 80, 100 mg/kg 体重投与したものでは、4時間後に変性細胞は出現するものの、24時間後で、中心管の壁が壊れ、NEC が中心管内へ落ち込むという強い変化を示し、また、胎仔や妊娠ラットの死亡数が増加し、経時的長期観察には不相当と考えられた。10, 20, 30 mg/kg 体重投与したものでは、少数の変性細胞の出現は認められるものの、その変化は軽微で、病変を光顕下に解析することは、むしろ困難であった。結局 40 mg/

kg 投与群が、後述のごとく変性細胞の出現と、その後の修復機転を観察するうえで適切と考えられた。

## 2. ENU による終脳発生の第1期の細胞障害

E12 では (図 1-A), 神経系の細胞発生からみると、終脳外套では NEC のみが増殖、分裂する第1期とされている。すなわち、神経管 (neural tube) が形成されており、終脳は NEC 層のみから構成されており、分裂期にある円形細胞を除き、胞体が中心管側から external limiting membrane (ELM) 側にまで伸び、核の位置が重層性にみえる偽重層上皮性配列をとっていた。電顕では、胞体内には多数の ribosome と少数の mitochondria (Mt), filament が認められた。胞体の突起状の部には、核近傍部に比べ、より多くの Mt や filament が認められた。胞体内に濃染した構造物を持っている NEC が、少数認められた。

ENU 投与1, 2時間後では、核分裂像の数の減少を認める以外、明らかな形態変化は認められなかった。電顕下には、2時間後で、核が通常の楕円形ではなく、不整形となっている NEC を、少数認めた。

3, 4時間後になると (図 1-B), NEC の間に、T-B 染色で濃染する、柱状や円形の構造物が出現した。濃染した構造物は、いわゆる radial fiber<sup>21)</sup> の方向に沿った配列を示して、NEC 層全層に存在していた。また、NEC 層は凹凸となり、波打つような形となっていた。電顕では (図 2-A), これらの構造物は、変性した NEC と考えられた。つまり、それらの胞体および突起は萎縮し、電子密度を増しており、核は濃縮して認められた。これらが、健常と思われる NEC 間に存在したが、少数ながら健常と思われる NEC 胞体内にも認められた。

6時間後になると (図 1-C), この様な変性細胞は NEC 層の ELM 側に、多数集まって認められるようになり、変性した細胞突起は目立たなくなった。

10時間後になると (図 1-D), 中心管側に核分裂像を示す細胞が数多く認められるようになった。電顕では (図 2-B), 変性細胞が、健常と思われる NEC からの突起で取り囲まれているもの、健常と思われる NEC 胞体内に限界膜で囲まれて周囲に free space を残しながら存在するもの、限界膜を欠き健常と思われる NEC 胞体内に存在するもの、などが数多く認められ、健常と思われる NEC が変性した細胞を取り込んでいると思われる。変性細胞を取り込んだ、健常と思われる NEC には、胞体内に多くの ribosome と少数の Mt が認められ、対照と比べて、構造上とくに変化は認めなかった。

12時間後では、さらにより多くの変性細胞が、NEC の胞体内に取り込まれる形で認められた。これらの変性細胞は、もはや内部構造がはっきりせず、種々の大きさを示す電子密度の高い物質の集族として捉えられた。同様の所見は (図 2-C), 中心管側にある、round な mitosis を示す NEC 胞体内にも認められた。

24時間後では、上記電子密度の高い物質の集族を有する NEC は、中心管と ELM 間の NEC 層全層にわたって認められた。

48時間後 (E14) では (図 1-E), NEC 層は、幅が僅かに少なく、NEC 数も少ないように見えたが、対照 (図 1-F) とほとんど等しい幅を示していた。電顕下では、ごく少数の NEC の胞体内に、電子密度の高い小型不整形の構造物が存在していた。

## 3. NEC 層の厚さの変化 (図 3)

投与3時間後に NEC 層は波打つように凹凸となり、その厚さは6時間後に最少の値を示した。しかし、10時間後までにその厚さは急速に増加 (回復) し、それ以降は、緩やかな増加傾向を示した。

## 4. E12 での ENU 投与を受けたラットの P21 における大脳

ENU を投与したラットを P21 (図 4-A, B 右) で見ると、大脳外表及び冠状断の肉眼像では、対照 (図 4-A, B 左) との間に差異を指摘することは困難であった。また、脳重においても (図 5), 統計学的に有意な差異は認められなかった。光顕による組織学的検索のかぎり、大脳各部位においてその細胞構築に異常は認められず、神経細胞脱落や gliosis を指摘することもできなかった。

## 考 察

ENU を生体に投与した際、細胞毒性<sup>4)-6)</sup>を示すのはS期およびG2期におけるDNAの合成を抑制することによる<sup>9)</sup>とされ、生理的条件下でその生物学的活性の半減期は10分以内<sup>13-15)</sup>と言われている。したがって、今回のように発生途上にある脳にENUを投与した場合、その細胞毒性は短時間、S期およびG2期にある細胞に発現されると考えられる。

この様な性質を有するENUが、胎生第16日目の大脳発生第2期のラット胎仔に投与された場合、その終脳では、投与後に産生されたneuroblastのみならず、S期以降のNECにも変性をひき起こすことが示されている<sup>4)9)11)</sup>。

胎生12日目のラット、すなわち大脳発生期第1期の胎仔にENU 40 mg/kg 体重を経胎盤的に投与した今回

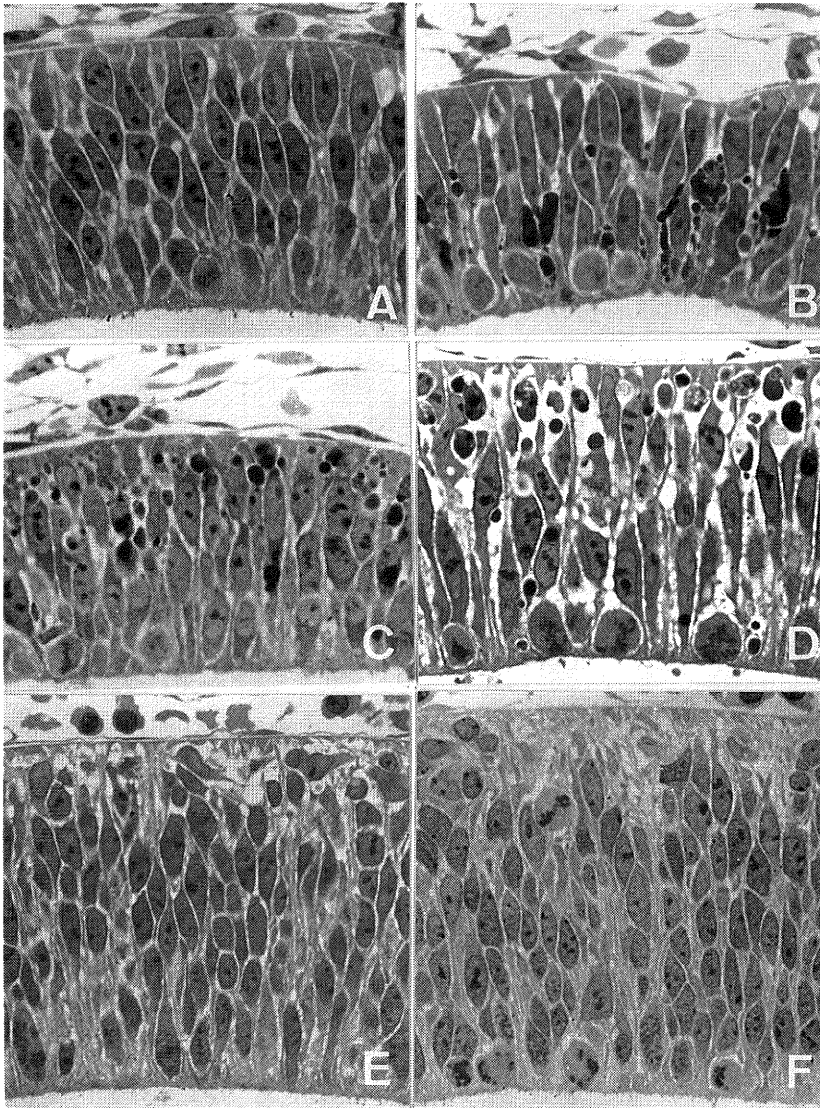


図 1 E12 で ENU を 40 mg/kg 体重投与した，ラット終脳外套部の Epon 光顕像 Toluidin-Blue 染色 (T-B) x520

- A : E12 対照. neuroepithelial cell (NEC) は，中心管側から external limiting membrane (ELM) にまで伸び，偽重層上皮性配列をとっている。中心管側には，分裂期にある円形細胞が認められる。
- B : 投与の3時間後. T-B で濃染する柱状や円形の構造物が初めて認められた。NEC 層は凹凸となっていた。
- C : 投与の6時間後. 変性細胞は比較的 EML 側に集まって認められた。T-B で濃染する柱状の構造物は目立たなくなった。
- D : 投与の10時間後. 中心管側には分裂像を示す細胞が数多く認められた。
- E : 投与の48時間後 (E14). NEC 層の幅は僅かに少なく，NEC 数も少ないように見えたが，対照と殆ど等しい幅を示していた。
- F : E14 対照

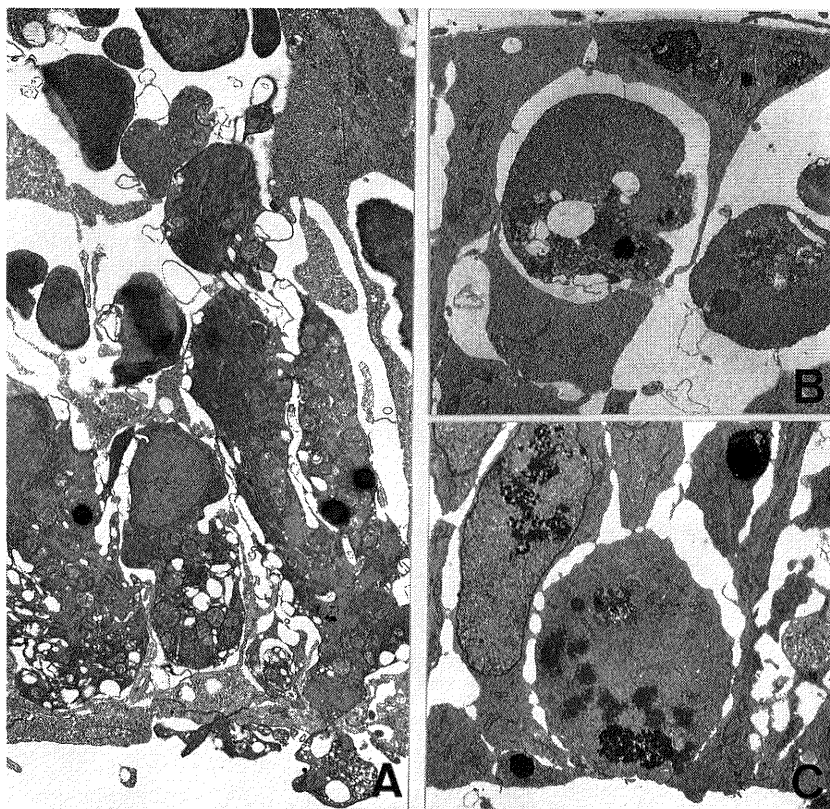


図2 E12でENUを投与した後の経時的電顕像

- A：投与の3時間後，T-B染色で濃染する構造物は，変性したNECの細胞突起及び変性細胞と考えられた。それらの胞体は萎縮し，電子密度を増し，核は濃縮して認められた。x5000
- B：投与の10時間後，変性細胞が健常と思われるNECからの細胞突起で取り囲まれ，胞体内に取り込まれていくように見えた。x3700
- C：投与の12時間後，中心管側に存在し，その細胞胞体内に変性物を示す細胞にも分裂像が認められた。x2200

の実験では，投与3時間後から，NEC層内に核および胞体の濃縮を示す変性細胞の出現が観察された。これら変性細胞は，NECそのものであり，ELMおよび中心管壁へと伸ばしていた突起を縮めつつ，最終的には小型円形化していくという変性過程が考えられた。これら変性したNECは，3時間後および6時間後では健常と思われるNECの間に存在したが，10時間後からは，その多くは健常と思われるNECから伸びる突起により取り囲まれており，一部は明らかにNEC胞体内にphagocytosisされた像として認められた。この健常と思われるNECは，エレベーター運動<sup>16)</sup>をしつつ，NEC自身も分裂，増殖する一方で，変性したNECを胞体

内に取り込み，分解していく能力をもつ細胞と考えられた。

変性したNECをNEC自身が清掃除去するという現象は，これまで正常発育過程において，中心管が形成されるとき癒合部<sup>17)</sup>あるいは，retinaの形成部<sup>18)</sup>などの局所で観察されてきており，今回のE12対照例においてもごく少数ではあるが観察された。したがって，NECは本来phagocytosisする能力を持ち，病巣修復に積極的に参加する細胞と考えられた。しかし，Oyanagiraの第2期での実験<sup>10)</sup>では，変性細胞の清掃除去には，NEC層およびmigrating zoneに浸出するmacrophageがその主たる役割を果たしており，NECが自ら変性細胞の清掃除去することは大脳発生第1期における特徴的

Control	E12							E13	E14
NEC layer width( $\mu\text{m}$ ) (n=number)	67.5 $\pm$ 6.2 (n=2)							82.6 $\pm$ 1.7 (n=4)	88.5 $\pm$ 3.0 (n=4)
ENU: after administration		2hrs	6hrs	7hrs	8hrs	10hrs	12hrs		
NEC layer width( $\mu\text{m}$ ) (n=number)		67.3 $\pm$ 5.3 (n=2)	53.4 $\pm$ 1.1 (n=2)	61.0 $\pm$ 3.3 (n=4)	69.1 $\pm$ 2.1 (n=4)	73.9 $\pm$ 3.9 (n=4)	71.8 $\pm$ 1.0 (n=3)	74.3 $\pm$ 4.6 (n=2)	84.3 $\pm$ 2.4 (n=4)

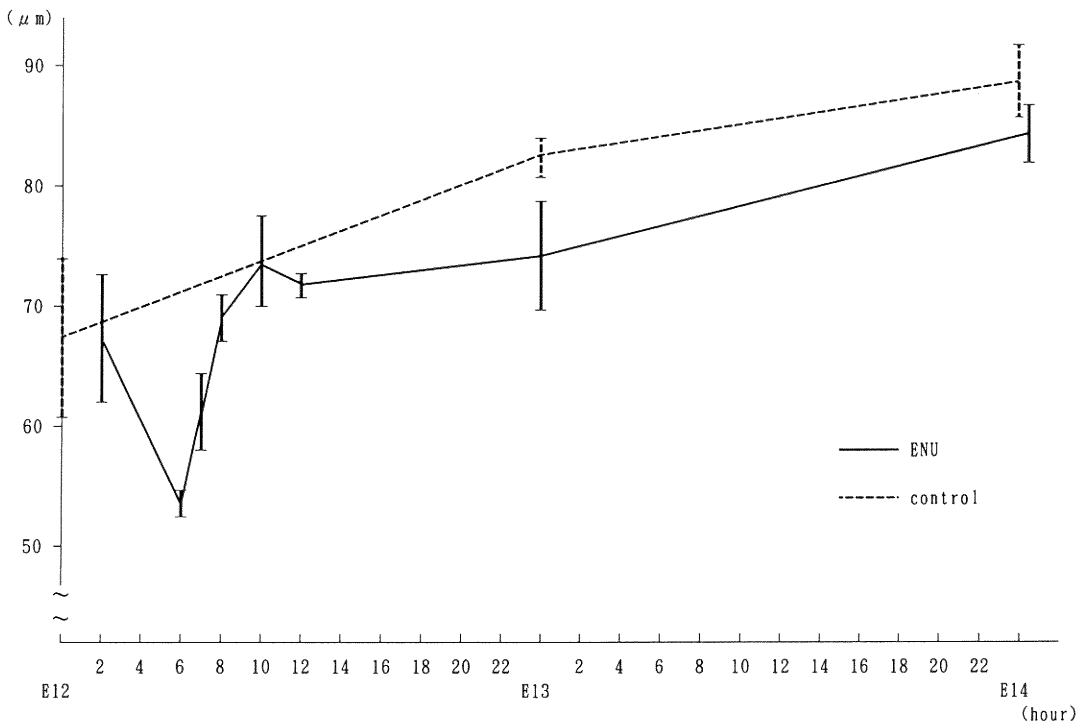


図3 対照群とE12でENUを40 mg/kg体重投与した群のNEC層の厚さの経時的变化。ENU投与されたものは6時間後に厚さが最少となり、その後10時間後までにその厚さは急速に回復し、それ以降は緩やかな増加傾向を示していた。

な現象と考えられた。このことは、正常発育過程で中枢神経系に macrophage が初めて出現するのは第2期である<sup>19)</sup>という事実と強く関連していると思われた。つまり、大脳発生第1期の病巣修復の担い手は NEC 自身であり第2期のそれは、その時期に出現する macrophage に移行するものと考えられた。同様の結果は、これまでE13のラットに radiation<sup>20)</sup>、E12のマウスに FudR<sup>21)</sup>、

E12のラットに ENU 投与<sup>7)</sup>で観察されてきている。

さて、このような障害を受けた大脳発生第1期の脳は、以後どのように修復され、発育していくかは重要な問題である。今回、NEC層の厚さを経時的に検索すると、ENU投与3時間後よりその厚さを減少しはじめ、6時間後でその厚さが最少となったが、その後、10時間後までは急速に回復し、それ以後も緩やかながら増加を続け、

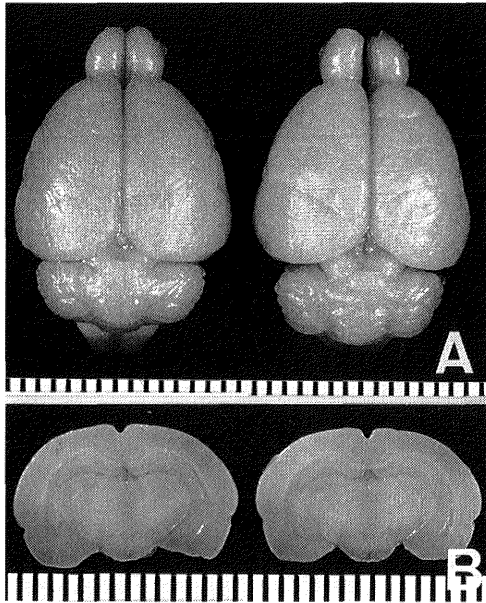


図 4-A, B 対照群 (左) と E12 で ENU を 40 mg/kg 体重投与した群 (右) の P21 時点での固定脳外表および冠状断。肉眼的に両者に差は認められなかった。

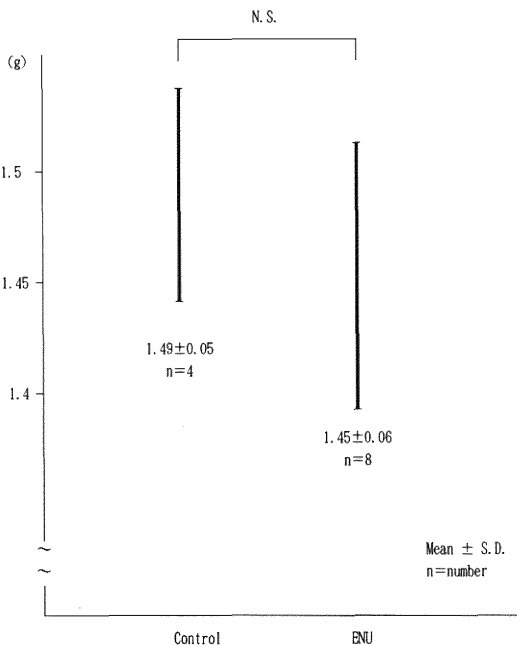


図 5 対照群と E12 で ENU を 40 mg/kg 体重投与した群の、P21 時点での固定後脳重の比較。両者の間に、統計学的に有意な差異は認められなかった。

すでに E14 では対照に比べ有意な差を認めなくなっていた。

そして、P21 の大脳では、肉眼的にも対照との間に差を指摘できず、また脳重においても、統計的に有意な差を認めなかった。第 2 期で ENU を投与した場合には、P21 で肉眼的にも明らかな microcephaly となることが知られている<sup>10)</sup>。今回の実験条件下では、第 1 期の NEC 障害は、その後 NEC 自身の分裂増殖によって急激にその減少が補われ、P21 の時点では、対照脳との間に統計的に有意差が認められないまでに修復され得ることが示された。NEC がどのような機序でこのような修復能力を示し得るのか、現在不明であるが、今後 NEC の cell cycle の解析を含め検討してゆく必要があると思われた。

## 結 語

胎生期の脳の病巣修復には、成熟脳とは異なった修復過程があることは、以前より報告<sup>7)9)-11)20)21)</sup>がある。大脳発生第 2 期、つまり neuroblast を産生し、glioblast 産生以前の時期、の ENU 障害では、microcephaly が帰結されるものの、その細胞構築にはほとんど異常なく、gliosis も認められていない。今回の第 1 期、つまり NEC のみが分裂増殖する時期、の ENU 障害では、対照と比べ、明らかな変化を指摘することはできないまでに強い修復能力を示していた。このことは、第 1 期には NEC 自身が関与する極めて特徴的な病巣修復機序および強い回復能が存在することを示すものと考えられた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始変わらぬ温かい御指導を戴きました、恩師 生田房弘教授に深く感謝致します。また、高橋 均、山田光則、林 森太郎、小柳清光の各先生には適切な御助言を戴きました。さらに、江川重公、長谷川富淑、市川富夫、小林一雄、村山佳代子、鶴見純子、大田裕子、貝沼素子、丹智恵子の諸兄姉には多くの技術的援助を受けました。有難うございました。

## 参 考 文 献

- 1) Bosch, D. A.: Short and long term effects of methyl- and ethylnitrosourea (MNU and ENU) on the developing nervous system of the rat. I: Long term effects: the induction of (multiple) gliomas, Acta Neurol Scand., 55: 85~105, 1977.

- 2) **Druckrey, H., Ivankovic, S., Preussmann, R., Zülch, K.J. and Mennel, H.D.:** Selective induction of malignant tumors of the nervous system by resorptive carcinogens, In: Kirsch, W.M., Grossi-Paoletti, E. and Paoletti, P. (ed) *The Experimental Biology of the Brain Tumors.*, Chap 3, Charles C Thomas, Springfield, pp 85~147, 1972.
- 3) **Ivankovic, S. and Druckrey, H.:** Transplacentare Erzeugung maligner Tumoren des Nervensystems. I. Äthylnitrosourea (ÄNH) an BD IX-Ratten, *Z. Krebsforschung.*, **71**: 320~360, 1968.
- 4) **Bosch, D.A.:** Short and long term effects of methyl- and ethylnitrosourea (MNU and ENU) on the developing nervous system of the rat. II: Short term effects: concluding remarks on chemical neuro-oncogenesis, *Acta Neurol Scand.*, **55**: 106~122, 1977.
- 5) **Bosch, D.A., Ipema, A. and Ebels, E.J.:** Different cytotoxic effects of methyl- and ethylnitrosourea on developing rat tissues and influence of cycloheximide on cell death, *Z. Krebsforsch.*, **79**: 255~266, 1973.
- 6) **Bosch, D.A., Gerrits, P.O. and Ebels, E.J.:** The cytotoxic effect of ethylnitrosourea and methylnitrosourea on the nervous system of the rat at different stage of development, *Z. Krebsforsch.*, **77**: 308~318, 1972.
- 7) **Fujiwara, H.:** Cytotoxic effects of ethylnitrosourea on central nervous system of rat embryos. Special references to carcinogenesis and teratogenesis, *Acta Pathol. Jpn.*, **30**: 375~387, 1980.
- 8) 小山素麿: 向神経性発癌物質 Methyl-nitroso-urea, Ethyl-nitroso-urea の SD-JCL rat の脳に対する催奇形効果, *日外宝*, **39**: 233~254, 1970.
- 9) 吉田泰二, 小柳清光, 生田房弘: Ethylnitrosourea による胎生期脳障害の早期変化について, *脳神経*, **36**: 175~182, 1984.
- 10) **Oyanagi, K., Yoshida, Y. and Ikuta, F.:** The chronology of lesion repair in the developing rat brain: Biological significance of the pre-existing extracellular space, *Virchow Arch [Pathol Anat]*, **408**: 347~359, 1986.
- 11) 小柳清光, 吉田泰二, 生田房弘: Ethylnitrosourea 投与による胎生期脊髄障害の細胞選択性および組織修復機序の特徴に関する観察, *脳神経*, **39**: 1077~1082, 1987.
- 12) **Sidmann, R.L. and Rakic, P.:** Neuronal migration, with special reference to developing human brain: A review., *Brain Res.*, **62**: 1~35, 1973.
- 13) **Kleihues, P.:** Blockierung der DNA-Synthese durch N-Metyl-N-Nitrosourea in vivo, *Arzneim Forsch.*, **19**: 1041~1043, 1969.
- 14) **Kleihues, P. and Patzschke, K.:** Verteilung von N-[14C] Metyl-N-Nitrosourea in der Ratte nach systemischer Applikation, *Z. Krebsforsch.*, **75**: 193~200, 1971.
- 15) **Kleihues, P. and Magee, P.N.:** Reaction of N-methyl-N-nitrosourea with DNA of neuronal and glial cells in vivo, *FEBS Lett*, **32**: 105~108, 1973.
- 16) **Fujita, S., Horii, M., Tanimura, T. and Nishimura, H.:** H<sup>3</sup>-thymidine autoradiographic studies on cytokinetic responses to X-ray irradiation and to Thio-TEPA in the neural tube of mouse embryos, *Anat. Rec.*, **149**: 37~48, 1964.
- 17) **Schlüter, G.:** Ultrastructural observations on cell necrosis during formation of the neural tube in mouse embryos, *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.*, **141**: 251~264, 1973.
- 18) **Gracia-Porrero J.A. and Ojeda J.L.:** Cell death and phagocytosis in the neuroepithelium of the developing retina. A TEM and SEM study, *Experimentia.*, **35**: 375~376, 1978.
- 19) 松本 陽: モノクローナル抗体を用いたマウス脳内マクロファージの免疫組織学的検討—胎仔・新生仔での分布について, *脳神経*, **35**: 1247~1254, 1983.
- 20) **D'agostino, A.N. and Brizzee, K.R.:** Radiation necrosis and repair in rat fetal cerebral hemisphere, *Arch Neurol.*, **15**: 615~628, 1966.
- 21) **Langman, J. and Cardell, E.L.:** Ultrastructural observation of FUdR-induced cell death and subsequent elimination of cell debris, *Teratology.*, **17**: 229~270, 1978.

(平成6年7月15日受付)