



Title	Long-EvansラットMyeloschisisモデルにおける神経上皮のOvergrowthとDNA合成
Author(s)	蝶野, 吉美; Chono, Yoshimi
Description	MyeloschisisにおけるOvergrowthとDNA合成
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	乙第4127号
Issue Date	1992-09-30
DOI	<a href="https://doi.org/10.11501/3090796">https://doi.org/10.11501/3090796</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/51169">https://hdl.handle.net/2115/51169</a>
Type	doctoral thesis
File Information	000000255468.pdf



Long-EvansラットMyeloschisisモデルにおける  
神経上皮のOvergrowthとDNA合成

蝶野吉美



①

Long-Evansラット Myeloschisisモデルにおける 神経上皮のOvergrowth と DNA合成  
(Myeloschisis における Overgrowth とDNA合成)

蝶野吉美

Overgrowth and DNA synthesis of neuroepithelium in embryonic stages of  
induced Long-Evans rat myeloschisis

Yoshimi Chono

Department of Neurosurgery,  
Hokkaido University School of Medicine,  
Sapporo 060, Japan

総計表2枚、図6枚

Summary

Overgrowth of the myeloschisis, namely the excessive amount of the neural plate tissue, has been reported in the human myeloschisis. However, it is still debatable how the overgrowth develops and whether the overgrowth is the cause, or the secondary effect of spinal dysraphism. The author induced myeloschisis in the fetuses of Long-Evans rats by the administration of ethylenethiourea (ETU) to pregnant rats on day 10 of gestation. The fetuses were removed 1 hour after the treatment with bromodeoxyuridine (BrdU) to the dams on day 14 and 21. The fetuses were fixed in alcohol and embedded in paraffin. H-E staining and the immunohistologic examination were performed on the staining patterns to anti-neurofilament (NFP), anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) and anti-BrdU antibody by ABC method.

On day 14, the lateral portion of everted neural plate showed a loose arrangement of cells and there was rosette formation in the mesoderm. On day 21, Cell necrosis was observed at the dorsolateral portion of myeloschisis, although the ventral portion showed almost normal cytoarchitecture and was positive to NFP and GFAP. The cause of myeloschisis in this model is supposed to be the local and direct cytotoxic effect of ETU to neuro-ectodermal junction.

On day 14, control animals contained few BrdU-incorporated cells at the basal plate of neural tube. In contrast, everted neural plate showed an active uptake of BrdU diffusely in the subependymal matrix layer cells. Overgrowth was not yet identified. On day 21, overgrowth of myeloschisis was found in spite of a few positive cells to BrdU which was identical to the control animals. These findings seem to suggest that cells in the myeloschisis retain their ability of DNA synthesis for longer periods of development and overgrowth found on day 21 is possibly a secondary effect of spinal dysraphism in this model.

Key Words : myeloschisis, DNA synthesis, overgrowth, bromodeoxyuridine,  
Long-Evans rat, ethylenethiourea,

## 抄 録

脊 髄 裂 ( 以 下 Myeloschisis と す る ) 部 分 の  
overgrowth、すなわち神経上皮組織の体積の  
増大は、ヒト myeloschisis において報告され  
てきた。しかし overgrowth が いか に し て お こ  
る の か、ま た 神 経 管 閉 鎖 不 全 の 原 因 か 二 次 的  
な 結 果 か は、議 論 の あ る と こ ろ で あ る。著 者  
は、妊 娠 10 日 の Long-Evans ラ ッ ト に ethylene  
thiourea ( ETU ) を 投 与 し、胎 仔 に myelo-  
schisis を 誘 発 し た。胎 仔 は 妊 娠 14 日 と 21 日 に、  
母 胎 に bromodeoxyuridine ( BrdU ) を 投 与 し た  
1 時 間 後 に、帝 王 切 開 に て 採 取 さ れ た。胎 仔  
は ア ル コ ー ル 固 定 後、パ ラ フ ィ ン 包 埋 切 片 と  
さ れ、H-E 染 色 な ら び に、neurofilament ( NF  
P )、glial fibrillary acidic protein ( GF  
AP ) お よ び BrdU に つ き、A B C 法 に よ り 免 疫 組 織  
学 的 に 検 索 さ れ た。

胎 令 14 日 の 本 モ デ ル で は、外 反 翻 転 し た 神 経  
上 皮 の 外 側 部 分 は 細 胞 数 の 減 少、配 列 の 乱 れ  
を 示 し、神 経 上 皮 下 の 中 胚 葉 に ロ ゼ ッ ト の 形

成がみられた。胎令21日では、myeloschisis背外側部分に細胞壊死の所見がみられた。しかし、myeloschisisの腹側部分は、ほぼ正常の細胞構築を保ち、かつコントロール同様NF P、GFAPに陽性であった。本モデルのmyeloschisisの原因は、neuro-ectodermal junction部に限局した、ETUによる直接の細胞毒性が推定された。

胎令14日の対照群では、神経管の基板には、ほとんどBrdU陽性細胞は認められなかった。これに比し、同胎令のmyeloschisisモデルでは、上衣下の胚芽層のほぼ全域の細胞に、一様なBrdUの取り込みがみられた。しかしmyeloschisis部分のovergrowthは、まだ認められなかった。胎令21日の本モデルでは、myeloschisis部分は明らかにovergrowthしていたが、BrdU陽性細胞は対照群と同様に小数であった。これらのことから、本モデルのmyeloschisis部分の細胞は、発生のより長期間にわたってDNA合成能を有し、胎令21日にみ

られたovergrowthは、神経管閉鎖不全の二次的な結果である可能性が示唆された。

はじめに

脊髄裂（以下 myeloschisis とする）の病因として従来さまざまな説が提唱されてきたが、<sup>1, 2, 3, 4, 5, 6, 7)</sup> これらのなかで最新のもの、overgrowth and reopening 説<sup>7)</sup>で、ニワトリ胚に誘発された myeloschisis モデルの組織学的検討から導かれたものである。この myeloschisis 部分の overgrowth、すなわち神経上皮の過剰発育による体積の増加の所見は1946年、Patten<sup>2)</sup>がヒト胎芽（8 mm）の仙骨部 myeloschisis の切片において、その体積の増加をはじめて指摘し用いたものである。その後、ヒト myeloschisis における overgrowth は人工産物によるものではなく、広くみられる所見とされた<sup>8, 9, 10)</sup>。同様の所見が、さまざまな薬剤により誘発された myeloschisis 動物モデルにおいても報告されている<sup>7, 11, 12, 13)</sup>。しかしいつごろ overgrowth が起こり、また overgrowth 自体が myeloschisis の原因か結果かは議論のあるところである。前述の Patten<sup>2)</sup>は、

発生学的に神経管形成がおこる前段階にあるヒト胎芽（8 mm）の myeloschisis 部に overgrowth がみられたことより、局所的な overgrowth が神経管閉鎖不全の一次的な原因であることを示唆した。Osaka<sup>14)</sup> はやはり、神経管閉鎖の前段階にあるヒト胎芽の myeloschisis 部に overgrowth を認めたが、これは神経管閉鎖不全を補おうとする二次的な反応と解釈した。一方、Hsu<sup>15)</sup> は、myeloschisis をおこす変異マウスにおいて、神経管形成の初期には、神経上皮の全長がむしろ短縮していることを示し、overgrowth は神経管閉鎖不全の一次的な原因ではないとしている。

さらには最近、colchicine による細胞分裂の研究や<sup>3</sup>H thymidine autoradiography による細胞周期の研究により、overgrowth を細胞増殖の意味からとらえようとする試み<sup>15, 16, 17)</sup>や、免疫組織学的検討により病変部神経上皮の分化度を明かにしようとする試みもされつつある<sup>7)</sup>。本研究は、myeloschisis におけ

る神経上皮の overgrowth の意味を、神経組織の体積の増加のみならず、DNA合成ならびに中間径線維の発現の面から、より総合的にとらえようとするものである。

#### 方法

##### I. Myeloschisisモデルの作製と BrdU の標識

Myeloschisisモデルの作製は Sato<sup>11)</sup> に従い、Long-Evansラット胎仔に、元来抗真菌薬である ethylenethiourea (2-Imidazolidinethione、以下 ETU、東京化成工業) を用いて誘発した。方法の概略を Fig. 1 に示す。まず膣ス Fig. 1  
メアの検鏡にて発情前期にあることが確認された 12-14 週令の雌 L-E ラットを一晩、雄と同居させた。翌朝、再度膣スメアを検鏡、精子が認められたものを交配が成立と判定し妊娠第 0 日 (Sato<sup>11)</sup> は第 1 日) とした。以後妊娠を継続させ、胎仔の神経管形成が始まるとされる妊娠第 10 日<sup>18)</sup> の 8:00 - 10:00 a.m. に、ETU を体重あたり 160 mg/kg、生理食塩水溶液として母獣に経口投与した。妊娠第 14 日と 21 日に

bromodeoxyuridine (以下 BrdU) を体重あたり 20 mg/kg、生理食塩水溶液として母ラットの腹腔内に投与、その 1 時間後に帝王切開を施行し、胎令 14 日と 21 日の胎仔を得た。なお対照群として ETU および BrdU 投与の際、生理食塩水のみ与えた母ラットから胎仔を用いた。

##### II. 免疫組織染色と使用抗体

得られた胎仔を 70% アルコールで固定後、腰仙部を体軸に垂直に薄切し、6 $\mu$  のパラフィン包埋切片を作製した。これらにつき、ヘマトキシリン-エオジン染色 (以下 H-E 染色) とともに、中間径フィラメントと BrdU につき ABC 法にて免疫組織染色を施行した。使用した抗体は中村脳神経外科記念病院、鎌田一先生より供与された抗 glial fibrillary acidic protein (以下 GFAP) ウサギ血清、抗 160 k neurofilament protein (以下 NFP) ウサギ血清と抗 BrdU マウスモノクローナル抗体 (Becton Dickinson, Inc.) である。内因性ペルオキシダーゼは 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> メタノー

ル溶液にて不活化した。BrdU染色の際は、一次抗体を作用させる前に、2N塩酸にて30分間の加水分解操作を加えた。発色はdiaminobenzidine tetrahydrochlorideにて行い、ヘマトキシリンにて核染した。

## 結 果

### I. 催奇形頻度とその種類

得られた胎仔の概略をTable 1に示す。胎Table 1  
令14日のmyeloschisisモデルは3匹の母獣から生存13胎仔中計4仔、30.7%に得られ、胎令21日のmyeloschisisモデルは5匹の母獣から生存34胎仔中計6仔、17.6%に得られた。明かな体表合併奇形は尾の低形成ないし無形成のみで、このほか鎖肛が疑われるものを少数認めた。

#### I I. 胎令21日のmyeloschisisモデル

A. 形態学的所見: 外観上胎仔は対照群に比しひとまわり小さく、尾は欠損し、腰仙部に皮膚に覆われない小腫瘤を認めた(Fig. 2 a)。Fig. 2  
組織学的にも皮膚、椎弓の欠損、露出した脊髄背側部の癒合不全と中心管の開放、脊髄前

方に嚢胞腔の形成と脊髄神経節の残存等が認められ、myeloschisisの所見であった(Fig. 2 b)。同胎令の対照群(Fig. 3 左側)と比較Fig. 3  
すると病変部で脊髄組織の体積は著明に増大しており、脊髄腹側部の細胞構築は保たれていたが、脊髄背外側部は炎症細胞浸潤を伴う壊死組織であった(Fig. 3 右側)。

B. 免疫組織学的所見: 前角の腹外側部の大型細胞(Fig. 4 a)および脊髄神経、脊髄神Fig. 4  
経節細胞はNFP陽性であり、脊髄背外側部を除いて軟膜表面に向かう細胞性線維はGFAP陽性であった(Fig. 4 b)。これらは脊髄背外側部を除くと対照群と同様の所見であった。BrdU染色も対照群と同様で上衣細胞と脊髄実質内の小型細胞にBrdUの取り込みが散見されるのみであった(Fig. 4 c)。

#### I I I. 胎令14日のmyeloschisisモデル

A. 形態学的所見: 外観上は尾芽が欠損し、後肢芽レベルの背側正中部に皮膚ごと外側に翻転開裂した病変を認めた(Fig. 5 a)。組織Fig. 5

学的にも神経上皮が外側に翻転露出したいわゆる placode を呈し、その最外側部分で皮膚への移行部は細胞数の減少、配列の乱れがあった。また神経上皮下の中胚葉内には脊髄神経とともにロゼットが形成されていた (Fig. 5b)。同胎令の対照群 (Fig. 6a) と比較して、神経上皮の体積の増大はなかった (Fig. 6b)。

このほか小数に神経管閉鎖不全部分が placode 構造をとらず、ロゼット状の細胞集塊のみからなるものが認められた。

B. 免疫組織学的所見: NFP は脊髄神経に陽性であったが、GFAP は陰性でいずれも対照群と同様の所見であった。BrdU の取り込みは、対照群においては、神経管腹側の基板ではほとんどみられず、主に背側翼板の中層約 1/3 にみられた (Fig. 6a)。myeloschisis モデルでは細胞数の減少、配列の乱れを呈した placode の最外側部分を除いて、上衣下の胚芽層のほぼ全域の細胞に、一様にみられた (Fig. 6b)。以上 myeloschisis 部分の組織学

的所見を Table 2 にまとめた。 Table 2

#### 考案

Patten<sup>2)</sup> は myeloschisis 部分の神経上皮の overgrowth が神経管閉鎖前の胎生期にあるヒト胎芽 (8 mm) にみられたことより、overgrowth が myeloschisis の原因となる可能性を示唆した。一方、多数の出生前ヒト脊髄髄膜瘤の検討結果から神経管癒合の初期過程との区別が難しいとの指摘もあり<sup>10)</sup>、overgrowth 自体が myeloschisis の原因か結果かは議論のわかれるところである。この検討のためには多くの動物モデルを得、胎生期にさかのぼって組織学的に検索するのがひとつの方法である。しかし、報告されているさまざまな催奇形薬剤のなかで、簡略な方法で、かつ高頻度に二分脊椎を誘発するものは少ない。すなわちトリパン青<sup>19)</sup>、サリチル酸<sup>13)</sup> は複数回の投与を必要とし、ビタミン A<sup>20)</sup> は催奇形率 4.9% とされている。この点、われわれの使用した ETU は 1 回の経口投与で 41.4% ないし

68.8%と高い催奇形率が報告されている<sup>11)</sup>。著者らの誘発率は17.6ないし30.7%で、他の薬剤に比較するとやはり高頻度であった。得られたモデルは組織学的にmyeloschisisの所見を示し、ETUはmyeloschisisに用いる催奇形薬剤として有用と考えられた。

#### I. 本モデルにおけるmyeloschisisの発生機序について

ETUの胎生期中枢神経系に対する作用としてその細胞毒性による神経組織の変性、壊死と、残存する神経細胞の過剰な再生反応によるロゼット形成が指摘されている<sup>11, 21)</sup>。自験例のうち胎令14日の小数にみられたように、神経管閉鎖不全部分がplacode構造をとらずロゼットの集塊のみからなるものは、この細胞毒性による神経組織の変性、壊死が高範囲で、残存する生存細胞の組織再生反応が無秩序におこなわれたものと推定される。一方、胎令14日に細胞配列の乱れ、DNA合成細胞の減少が外反転した神経上皮の外側部に限局し、胎

令21日においても脊髄背外側部に限局して変性、壊死の所見がみられたものは、ETUの細胞毒性がneuro-ectodermal junction部に限局して作用したものと推定された。胎令14日の本モデルにおいて、神経上皮の中胚葉内にみられたロゼットの形成も、神経上皮の細胞障害にたいする組織再生反応を反映するものと思われる。

neuro-ectodermal junction部に限局した細胞配列の乱れ、ロゼットの形成は、Rokosら<sup>2)</sup>もトリパン青を胎令3から14日(精子が認められた日が妊娠第1日)に母獣に投与して得られた二分脊椎ラット胎仔に認め、これより一度閉鎖した神経管が再び開いた可能性を述べている。しかし二分脊椎の発現時期が神経管閉鎖完了の前後いずれかを論ずる上では、組織障害の部位のみからその時期を推定するのは困難である。また授精時間の同定や、薬物の胎児への経胎盤的移行動態が明確でないことなど、催奇形薬剤による神経管閉鎖不全

動物モデルには限界がある。

I I. myeloschisisの組織学的分化度について

ヒト脊髄髄膜瘤の剖検例における組織学的検討から、その最も一般的な細胞構築形態は、前角が正常類似の神経細胞核配列を示すのに対し後角は壊死組織がより多く、細胞構築がはっきりしないというものである<sup>2,3)</sup>。自験例のL-Eラット実験モデルにおいても同様の所見であった。中枢神経系の発生分化度を反映するものとして、形態的基準以外に細胞の起源により特異性を示す細胞内骨格要素である中間径線維がある。しかし従来、臨床例においても実験動物モデルにおいても、これらに関する免疫組織学的検討はほとんどなされていない。Oira<sup>7)</sup>はGFAPに関して、実験的に誘発されたふ卵後18日から21日のニワトリ胚placodeでは陰性であったが、生後4日の剖検によるヒトmyeloschisisでは対照群同様、間質に陽性であることを示した。正常ラット胎

仔の脊髄においては、NFPは授精第12日目に前根が出る脊髄前外側部分に陽性で、GFAPは18日目に前索内を軟膜表面に向かう線維の一部に陽性であることが知られている<sup>2,4)</sup>。しかしラットmyeloschisisモデルにおける報告はない。我々の結果ではmyeloschisis部においても、NFPは14日目ですでに脊髄神経に陽性で、21日目には前角の腹外側部の大型細胞に陽性であった。GFAPは14日目では陰性であったが、21日目では脊髄背外側部を除く部位で軟膜表面に向かう細胞性線維に陽性であった。これらより本myeloschisisモデルにおいては、脊髄腹側部分はETUないし神経管閉鎖不全の影響をまぬがれ、形態的のみならず機能的にも神経細胞ないしグリア細胞へと分化しうることが示された。Oira<sup>7)</sup>は、ふ卵18日から21日目のニワトリ胚において、myeloschisis部分のみがneuron-specific enolaseならびにKluver-Barrera染色に強陽性であったことより、病変部神経組織の早期分化を示唆してい

る。本モデルの胎令14日においては、対照群同様NFP陽性、GFAP陰性で、このような早期分化の所見は得られなかった。

III. overgrowthの発現時期とDNA合成について

myeloschisis部分の神経上皮の体積は対照群に比し、組織切片上の比較からは胎令21日には著明な増大が示されたが、胎令14日には大きな差異はなかった。胎令21日にみられた脊髄組織の体積の増大は少なくとも脊髄前半部においては細胞構築が保たれつつ秩序だっ  
てなされていた。胎令14日に外観上一見体積が増大しているように見えるのは、いわゆるplacodeを呈する神経上皮が、左右に大きく開裂しているためとも考えられる。ラットの正常発生上、神経管の形成は胎令10.5から10.75日に始まり、11.5から12日の後神経孔閉鎖に終わるとされ<sup>18)</sup>、胎令14日は前角運動細胞や後根神経節が形成されている時期である<sup>25)</sup>。技術上の制約から神経管形成時期の本モデルの検索はなされなかったが、overgrowthは神

経上皮の体積の増大という意味では、神経管形成時期を越した胎生中期以後に、神経管閉鎖不全の影響として二次的に起こる可能性が示唆された。Hsuら<sup>15)</sup>も、myeloschisisを呈する変異マウスにおいて、神経管形成の初期には、神経上皮の全長がむしろ短縮しており、胎令13.5日に病変部位の成長加速が明かとなることを報告している。Oira<sup>7)</sup>は、神経管閉鎖時期をすでに越したニワトリ胚に様々な催奇形薬剤を作用させ、局所のovergrowthを伴ったmyeloschisisが誘発されることを示した。

ところで神経上皮の体積の増大は必ずしも盛んな細胞増殖の同時進行を意味せず、overgrowthを細胞増殖の意味からとらえるならば、形態学的な検討だけでは不十分である。正常神経管形成過程における細胞増殖の役割に関して、colchicineによる細胞分裂の研究や<sup>3</sup>H thymidine autoradiographyによる細胞周期の研究の結果が報告されている。すなわち、ニワトリ胚においては、その初期には神経上

皮の細胞分裂能が亢進しているが<sup>26)</sup>、発生の進行とともに神経上皮細胞の世代時間は延長する<sup>27)</sup>。マウスの神経管形成過程においても、やはり発生の進行とともに、神経上皮細胞の世代時間は延長し、かつ標識指数は減少するとされている<sup>28, 29)</sup>。myeloschisisモデルにおいても、いくつかの報告がある。Hsuら<sup>15)</sup>はC57変異マウスにおいて、胎令13.5日に病変部位の成長加速が明かとなり、14.5日に細胞分裂頻度の増加を認めたことより、これを病変部神経上皮のovergrowthの原因とし推定した。しかし、Petersら<sup>16)</sup>はトリパン青により誘発されるmyeloschisisラットで、胎令10.25日(神経管形成の初期)の神経上皮においては、分裂期を含めて細胞分裂周期に異常がないことを示した。そして、トリパン青により誘発される神経管閉鎖不全の原因を中胚葉の分節障害に求めた。Coppら<sup>17)</sup>も、胎令11日の変異マウス(curly tail)において、分裂指数と標識指数が神経上皮では正常であり、

脊索および腸内胚葉で低下していることを報告している。神経管閉鎖不全の原因は多種多様なものがありうるが、Hsuら<sup>15)</sup>とPeters<sup>16)</sup>、Coppら<sup>17)</sup>との結果の相違のひとつの説明として、発生段階の違いが考えられる。すなわち、Hsuらの胎令13.5ないし14.5日のマウスは、マウスの正常の神経管形成開始時期(ほぼ胎令9日)をかなり過ぎた時期にあり、一方Peters、Coppらのものは神経管形成の初期にあるラットないしマウスである。

さて本研究に用いたBrdUは、thymidineの類似体であり、免疫組織学的にDNA合成細胞に特異的に検出されることが示されている<sup>30)</sup>。またこの方法はthymidine autoradiographyに比し、短時間ですむこと、放射性同位元素を用いる煩雑さがなく、解像力にすぐれていることなどの利点がある。ただし核DNA内に取り込まれたBrdU自体が神経上皮細胞の世代時間の延長、細胞壊死をひきおこし<sup>31)</sup>、さらに胎児に細胞毒性、催奇形性を示しうること

も指摘されている<sup>32)</sup>。しかし、われわれの使用した20mg/kgの量はそのような危険性を有せずかつ、免疫組織学的に検出可能な必要最低限量と確認されている<sup>33)</sup>。このBrdUを用いた自験結果では、胎令14日のmyeloschisisモデルでは、細胞数の減少と配列の乱れを認めたplacodeの最外側部分を除いて、上衣下の胚芽層のほぼ全域の細胞に、一様にBrdU陽性細胞がみられた。一方、同胎令の対照群では、脊髓腹側の基板でのBrdU取り込みはほとんどみられず、主に脊髓背側の翼板の中層約1/3に局限してみられた。胎令21日のモデルでは上衣細胞と脊髓実質内の小型細胞にBrdUの取り込みが散見されるのみで、これは対照群と同様の所見であった。正常では発生の進行とともに、神経上皮細胞の世代時間は延長し、かつ標識指数は減少するとされている<sup>28, 29)</sup>。胎令14日の本モデルの所見は、前述のHsuら<sup>15)</sup>の細胞分裂頻度の増加の所見とあわせて、myeloschisis部分においては、神経上皮細胞

のDNA合成能、増殖能が正常に比して、より長期間にわたって残存していることを示していると思われる。よってこの神経上皮細胞の分化の遅れが、後の胎令21日にみられた脊髓神経組織の体積の増大をひきおこす可能性が推定された。

#### ま と め

Long-Evansラットの胎仔にethylene-thiourea、(ETU)を、胎令第10日に母胎を介して経胎盤的に投与し、myeloschisisモデルを作製した。その形態学的検索と中間径線維(GFAP、NFP)およびbromodeoxyuridine(BrdU)に対する免疫組織学的検討結果から以下の結果を得た。

1. 5匹の母獣から得られた胎令21日の生存胎仔34仔中、計6仔、17.6%にの神経間閉鎖不全を認めた。組織学的に皮膚、椎弓の欠損、露出した脊髓背側部の癒合不全と中心管の開放、脊髓前方に嚢胞腔の形成と脊髓神経節の残存がありmyeloschisisの所見であった。

ETU投与によるL-Eラットの本モデルは、  
myeloschisisモデルとして有用である。

2. 胎令14日の本モデルでは、外反翻転した神経上皮の外側部分に、細胞配列の乱れ、DNA合成細胞の減少があり、また神経上皮下にロゼットの形成がみられた。胎令21日においても、脊髓背外側部に変性、壊死の所見がみられた。本モデルの神経管閉鎖不全の原因として、neuro-ectodermal junction部に限局した、ETUによる直接の細胞毒性が推定された。

3. 胎令21日の本モデルの脊髓腹側部分は、細胞構築を保ちつつovergrowthしており、かつNFPが前角の腹外側部の大型細胞に陽性、GFAPが脊髓背外側部を除く軟膜表面に向かう細胞線維に陽性で、機能的分化が示唆された。

4. 胎令14日の本モデルでは、上衣下の胚芽層のほぼ全域の細胞に、一様なBrdUの取り込みが残存していたが、myeloschisis部分の神経上皮の体積の増大はいまだなかった。胎令21日の本モデルでは、myeloschisis部分の

神経上皮の体積の著明な増大が認められるにもかかわらず、BrdU陽性細胞は対照群と同様に小数であった。これらのことから、本モデルの神経上皮細胞は、発生のより長期間にわたってDNA合成能を有し、胎令21日にみられたovergrowthは、神経管閉鎖不全の二次的な結果である可能性が推定された。

#### 謝 辞

本稿を終えるにあたり、研究の機会を与えて頂き、御指導と御校閲を賜りました北海道大学医学部脳神経外科学講座、阿部弘教授、同第2病理学講座、長嶋和郎教授に深謝致します。

また、実験に直接の御指導を頂きました大塩至先生、および御協力頂きました第2病理学講座の諸先生、技師の皆様に厚く御礼申し上げます。実験動物の世話には、脳神経外科学講座実験助手 故川竹真直君の御協力頂きました。ありがとうございました。

最後に貴重な抗体を快く分けて下さいまし

た中村脳神経外科記念病院、鎌田一先生、  
親切な御助言、御励ましを頂きました近畿大  
学解剖学講座、安田佳子助教授に心から深謝  
致します。

文献

1. von Recklinghausen F: Untersuchungen über die Spina Bifida.  
Virchows Arch (A) 105:243-330;373-455, 1886
2. Patten BM: Embryological stages in the development of spina bifida and  
myeloschisis. Anat Rec 94:487, 1946
3. Gardner WJ: Hydrodynamic mechanism of syringomyelia: its relationship  
to myelocele. J Neurol Neurosurg Psychiatry 28:247-259, 1965
4. Browne D: A mechanistic interpretation of certain malformations.  
Adv Teratol 2:11-36, 1967
5. Padget DH: Spina bifida and embryonic neuroschisis —a causal relation  
ship. Definition of postnatal confirmations involving a bifid spine.  
Johns Hopkins Med J 123:233-252, 1968
6. Jones MC, Jones KL, Chernoff GF: Possible mesodermal origin for axial  
dysraphic disorders. J Pediatr 101:845-849, 1982
7. Oi S, Saya H, Matsumoto S: A hypothesis for myeloschisis: overgrowth  
and reopening. An experimental study. J Neurosurg 68:947-954, 1988
8. Lemire RJ, Shepard TH, Alvord EC Jr: Caudal myeloschisis (lumbo-  
sacral spina bifida cystica) in a five millimeter (Horizon XIV) human  
embryo. Anat Rec 152:9-16, 1965

9. McLone DG, Suwa J, Collins JA, et al : Neurulation: biochemical and morphological studies on primary and secondary neural tube defects, in Humphreys RP (ed): Concepts in Pediatric Neurosurgery, 4. Basel: S Karger, 1983, pp15-29
10. Osaka K, Tanimura T, Hirayama A, et al: Myelomeningocele before birth. J Neurosurg 49:711-724, 1978
11. Sato K, Nakagata N, Chi-Fu H, et al: Transplacental induction of myeloschisis associated with hindbrain crowding and other malformations in the central nervous system in Long-Evans rats. Child's Nerv Syst 1:137-144, 1985
12. Smith MT, Wissinger JP, Smith CG, et al: Experimental dysraphism in the rat. J Neurosurg 49:725-729, 1978
13. Warkany J, Wilson JG, Geiger JF: Myeloschisis and myelomeningocele produced experimentally in the rat. J Comp Neurol 109:35-64, 1958
14. Osaka K, Matsumoto S, Tanimura T: Myeloschisis in early human embryos. Child's Brain 4:347-359, 1978
15. Hsu CY, Van Dyke JH: An analysis of growth rates in neural epithelium of normal and spina bifidous (myeloschisis) mouse embryos. Anat Rec 100:745, 1948

16. Peters PWJ, De Geus, D: Cell proliferation of the neuroepithelium in embryonic stages of induced spina bifida. Acta Morphol Neerl. Scand 19:197-204, 1981
17. Copp AJ, Brook FA, Roberts HJ: A cell-type-specific abnormality of cell proliferation in mutant (curly tail) mouse embryos developing spinal neural tube defects. Development 104:285-295, 1988
18. Edwards JA: The external development of the rabbit and rat embryo. Adv in teratol 3:239-263, 1968
19. Gunberg DL: Spina bifida and the Arnold-Chiari malformation in the progeny of trypan blue injected rats. Anat Rec 126:343-367, 1956
20. Yasuda Y, Okamoto M, Konishi H, et al: Developmental anomalies induced by all- trans retinoic acid in fetal mice: 1. Macroscopic findings. Teratology 34:37-49, 1986
21. Teramoto S, Harada T, Kaneda M: Effects of ethylenethiourea upon developing brain and limb buds in the rat. Conj Anom 18:241-249, 1978
22. Rokos J, Cekanova E, Kithierova E: Pathogenesis of trypan-blue-induced spina bifida. J Path 118:25-34, 1976
23. Emery JL, Lendon RG: The local cord lesion in neurospinal dysraphism (meningomyelocele). J Path 110:83-96, 1973

24. 鎌田 一、伊東 民雄、瓢子 敏夫ら：Rat embryoの免疫組織学的検索—Rat embryo central nervous system におけるvimentin, GFAP, NFPの局在について—  
脳神経 40:211-218, 1988
25. Altman J, Bayer SA: Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology  
85. The Development of the Rat Spinal Cord. Springer-Verlag, Berlin  
Heidelberg New York Tokyo, 1984
26. Jelinek R, Friebova Z: Influence of mitotic activity on neurulation  
movements. Nature 209:822-823, 1966
27. Fujita S: Kinetics of cellular proliferation. Exp Cell Res 28:52-60,  
1962
28. Kauffman SL: Lengthening of the generation cycle during embryonic  
differentiation of the mouse neural tube. Exp Cell Res 49:420-424,  
1968
29. Wilson DB: The cell cycle during closure of the neural folds in the  
C57BL mouse. Develop Brain Res 2:420-424, 1982
30. Gratzner HG: Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine:  
A new reagent for detection of DNA replication. Science 218:474-475,  
1982
31. Banningan JG: The effects of 5-bromodeoxyuridine on fusion of the  
cranial neural folds in the mouse embryo. Teratology 32:229-239, 1985

32. Ruffolo PR, Ferm VH: The embryocidal and teratogenic effects of 5-  
Bromodeoxyuridine in the pregnant hamster. Lab Invest 14:1547-1553,  
1965
33. Yoshida Y, Yamada M, Wakabayashi K, et al: Immunohistochemical  
detection of DNA replicating cells in the developing nervous system:  
Use of bromodeoxyuridine and its monoclonal antibody to rat fetuses.  
Biomed Res 8:431-444, 1987

Fig.1 Procedure of the Experiment

<development>	<day of gestation>	<procedure>
	day -1	mating
	0	sperm check
	...	
fusion of neural fold	10	ETU 160mg/kg, P.O
closure of anterior neuropore	11	
closure of posterior neuropore	12	
development of ventral horn	14	BrdU 20mg/kg, I.P Caesarean section
	...	
full term	21	BrdU 20mg/kg, I.P Caesarean section

Table 1.

Transplacental induction of malformations in rat fetuses by ETU

day of gestation	14	21
dam No.	1 2 3 sum	1 2 3 4 5 sum
No. of implantation	7 8 5	6 10 8 9 8
(absorption/hydrrops)	(3) (3) (1)	(2) (4) (0) (0) (1)
No. of fetus examined	4 5 4 13	4 6 8 9 7 34
normal	2 3 1	0 1 3 2 2
short/absent tail	1 0 2	3 4 4 5 4
myeloschisis	1 2 1 4	1 1 1 2 1 6
	(30.7%)	(17.6%)

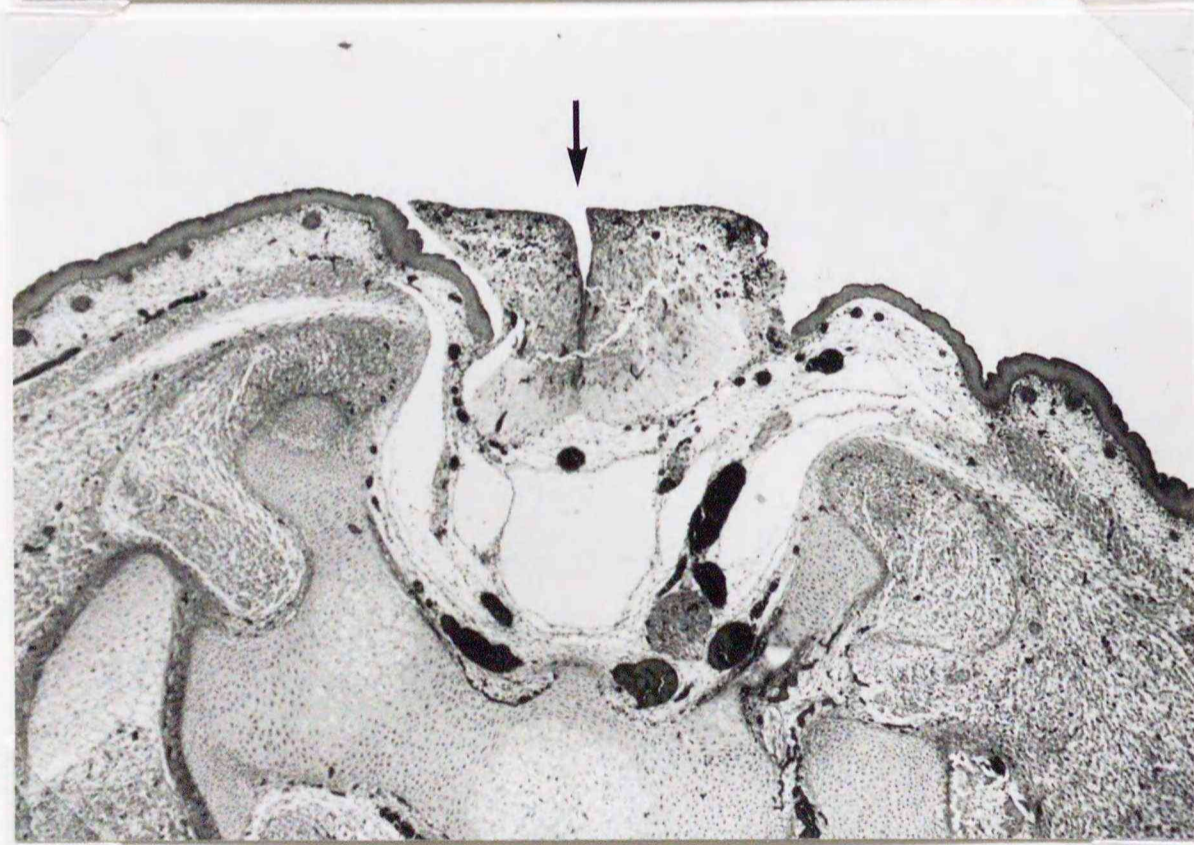


Fig. 2  $\frac{a}{b}$

蝶野吉美



Fig. 3

蝶野吉美

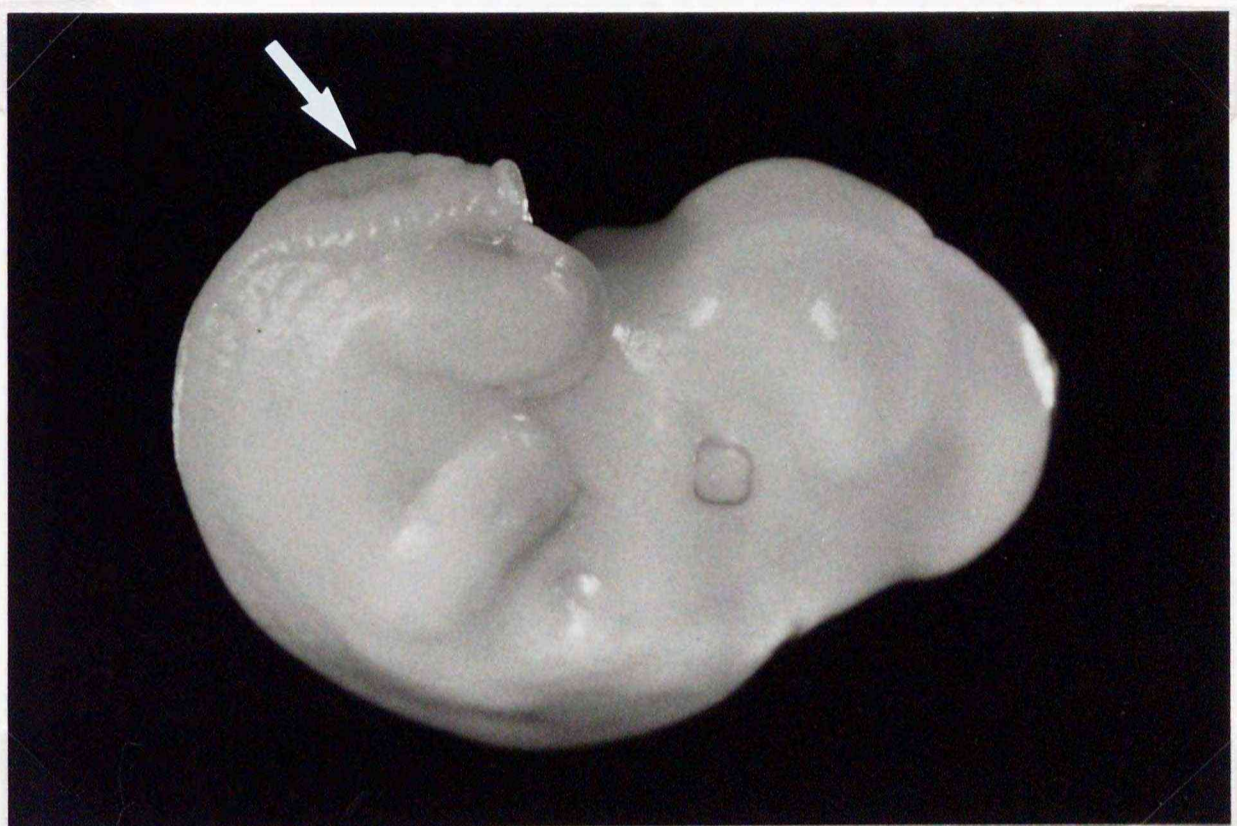
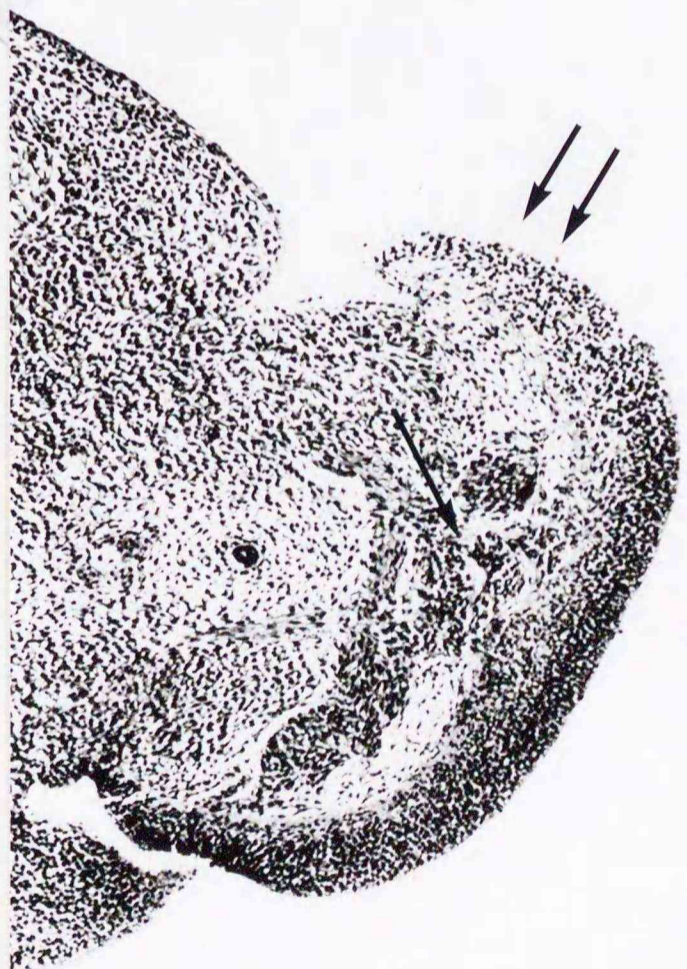


Fig. 5a



b

蝶野吉美

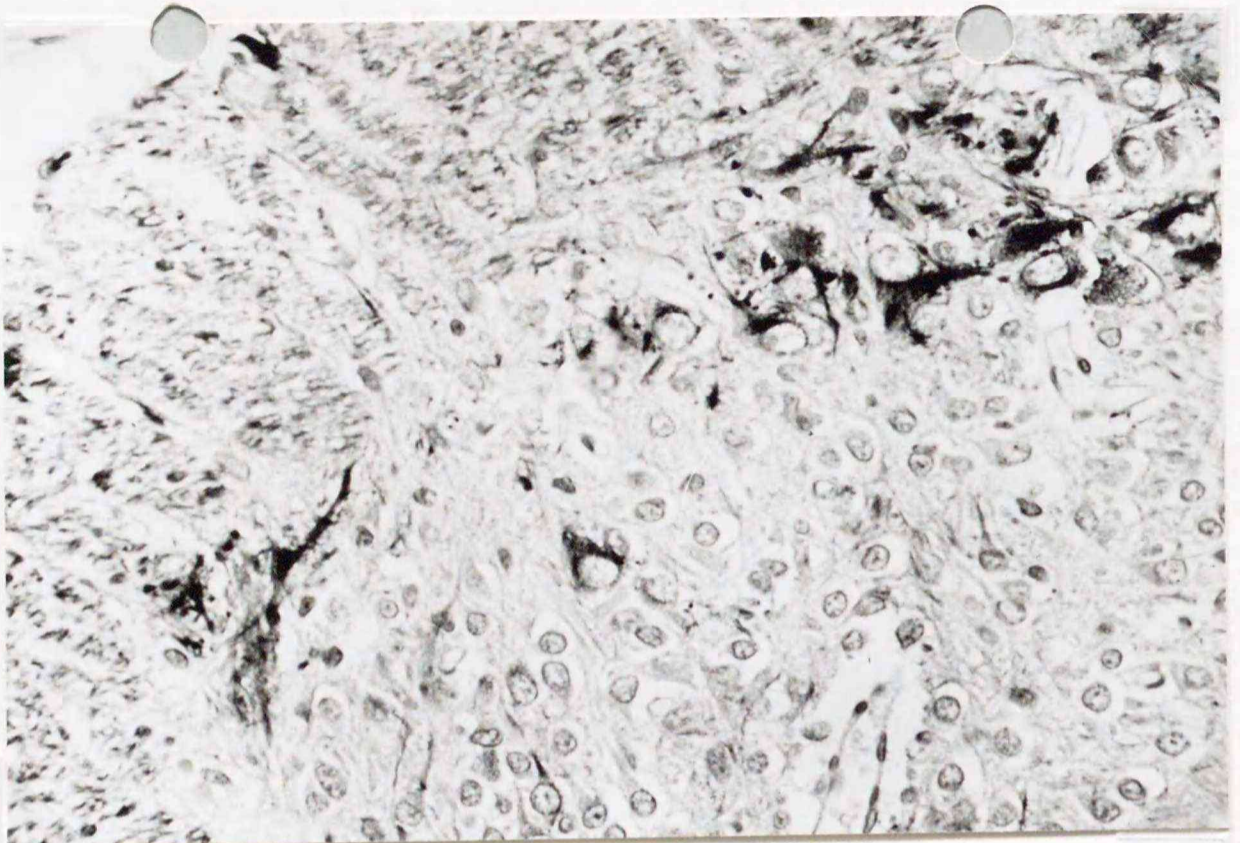
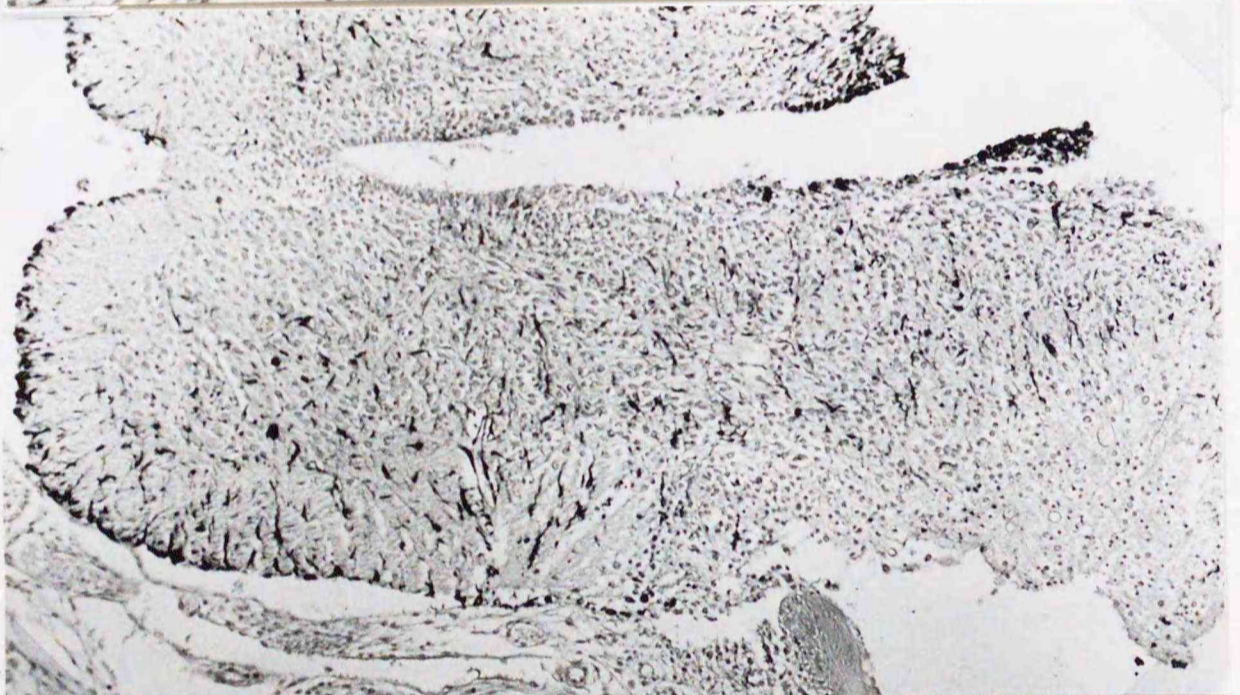
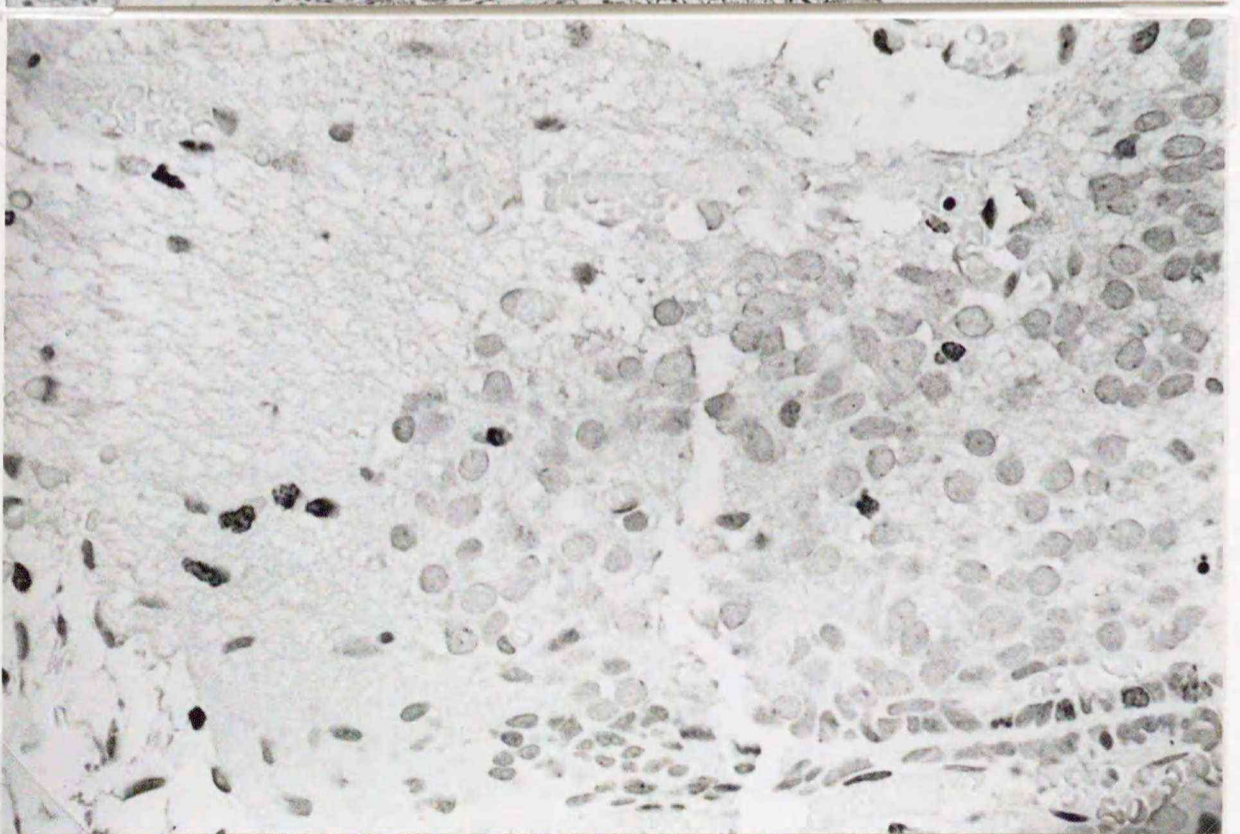


Fig. 4a



b



c

蝶野吉美

Fig. 6a



9



此  
部  
有  
美

Table 2.

Summary of the histologic findings of the neuroepithelium in embryonic stages of induced L-E rat myeloschisis

	day 14 of gestation	day 21 of gestation
H & E	1. no increase in volume 2. sparse, loosely arranged cells 3. delayed differentiation of matrix layer cells	1. marked increase in volume 2. necrosis and infiltration of inflammatory cells at the lateral portion of open plate and rosette formation 3. normal cytoarchitecture of ventral portion
NFP (160k)	positive to nerve root	positive to cells in ventral horn, spinal ganglion and to nerve root
GFAP	negative	positive to fibers at anterolateral funiculus
BrdU	positive diffusely to matrix layer cells	positive to a few of ependymal and parenchyma cells

図表、写真説明

**Table 1**

Transplacental induction of malformations in rat fetuses by ETU.

**Table 2**

Summary of the histologic findings of the neuroepithelium in embryonic stages of induced L-E rat myeloschisis.

**Fig. 1**

Procedure of the experiment.

**Fig. 2**

Rat fetuses on day 21 of gestation.

**a;**Dorsolateral view of a deformed fetus (right), which is smaller than a control (left), shows maldevelopment of tail and a rounded defect in the skin with a small elevation (→) in the lumbosacral region.

**b;**Photomicrograph of a transverse section of the deformed fetus showing the typical appearance of myeloschisis in the lumbosacral region.

The herniated and everted cord (→) out of the spinal canal is observed

. H & E, x4

**Fig. 3**

Photomicrograph of a transverse section of the myeloschistic region (right half) compared with the section of a control (left half) on day 21 of gestation. The myeloschistic region shows an increase in volume, almost normal cytoarchitecture of ventral portion and necrosis of the dorsolateral portion (→). H & E, x10

**Fig. 4**

Photomicrographs of immunohistochemical studies in the myeloschistic regions of rat fetuses on day 21 of gestation.

**a;**Transverse section showing anti-neurofilament protein (NFP)-positive cells in the ventrolateral portion of ventral horn . x40

**b;**Transverse section showing anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive fibers at the anterolateral funiculus. x10

**c;**Transverse section showing a few of 'anti-bromodeoxyuridine (BrdU)-positive cells at the ependyma and parenchyma of the cord. x40

**Fig. 5**

Rat embryo on day 14 of gestation with myeloschisis.

**a;**Lateral view of the embryo. An open neural defect (→) is observed below the level of the leg bud.

**b;**Photomicrograph of a transvers section of the myeloschistic region showing the sparse, loosely arranged cells (↔) at the lateral periphery of the neuroepithelium and rosette formation (→) in the mesoderm. Unfortunately, the plane of the section is not exactly transverse to the spinal cord. H & E, x10

**Fig. 6**

Photomicrographs of transverse sections of spinal cord on day 14 of gestation stained with anti-BrdU antibody. x10

**a;**Normal control. BrdU-incorporated cells are found mainly at the alar plate of the neural tube apart from the surface of central canal. The differentiation of the basal plate to motor column, which contains few BrdU-incorporated cells, is noticed.

**b;**Embryo with myeloschisis. An active uptake of BrdU is diffusely observed in subependymal matrix layer cells. Increase in volume of neural plate tissue is not yet identified in myeloschisis compared with the normal control.

