

学 位 論 文 題 名

欠指症ラット胎仔手板における細胞増殖と
細胞凝集過程の検討

学位論文内容の要旨

I. 研 究 目 的

器官形成期に薬剤を投与することによりヒト類似の四肢奇形を実験動物に誘発し、ヒトにおける四肢奇形の発生機序を検討する試みが行われている。しかし、正常手板における指放線形成過程に関する研究は少ない。また、特定の奇形の動物実験モデルを作成することが困難であることから四肢奇形の発生過程の経時的に観察した報告はほとんどない。最近, myleran (Busulfan) 投与による一連の奇形誘発実験が確立し、妊娠12日目のラットに myleran を投与すると、全ての胎仔の前肢に第2, 3指列の欠指症が発現することが判明してきた。この欠指症の発現機序を検討する目的で、胎仔の手板における細胞の DNA 合成能を BrdU (5-bromodeoxy-2'-uridine) と抗 BrdU monoclonal 抗体による免疫酵素抗体法(以下 BrdU 法と略す)により、細胞障害を macrophage の出現頻度により、経時的に定量的に観察した。

II. 研 究 方 法

妊娠12日目の雌 Wistar ; Gun ラットに myleran を経口投与した。myleran 投与ラットと正常ラットに妊娠12日目より15日目まで0.5日間隔で BrdU を腹腔内投与した。30分後に開腹して胎仔を摘出し、パラフィン包埋後、右手手板掌面に平行な切片を作成した。この切片を抗 BrdU monoclonal 抗体を用いて、ABC 法による免疫染色を行った。隣接切片を hematoxylin-eosin 染色 (HE 染色) 標本とし、BrdU 染色標本と対比して検討した。定量的観察に際しては手板の間葉を第2指の指放線部、第2, 3指の指間部、第3指の指放線部、第3, 4指の指間部、第4指の指放線部の計5区域に分けてそれぞれを A, B, C, D, E 区域とした。指放線形成前の手板においてはそれぞれの予定域を A, B, C, D, E 区域とした。また、上皮は間葉の各区域を覆っている範囲をそれぞれ a, b, c, d, e 区域とした。これらの区域について以下の3点について解析した。

- 1) HE 染色標本により手板における指放線の形成過程を観察し、正常と myleran 投与群で比較した。
- 2) 手板内の細胞増殖能の局在を BrdU 陽性細胞の出現頻度を Micro Computer Imaging Device を用いて定量的に観察した。
- 3) 細胞死の局在を macrophage 出現頻度を指標として各区域で計測した。

Ⅲ. 研究 結 果

1) 手板における指放線の形成。

myleran 投与群では正常に比較し指放線の形成が遅れており、胎生13.5日目までは指放線の形成はみられなかった。胎生14.0日目では、軸後側の第4指の指放線が出現したが、軸前側の指放線の形成はみられなかった。胎生14.5日目以降も軸前部の指放線は形成されなかった。

2) 手板内の DNA 合成能

間葉細胞：myleran 投与群では、BrdU 陽性細胞の出現率は胎生12.5日目までは正常との差はみられなかったが、胎生13.0日目では、正常に比較し有意に減少した。しかし、胎生13.5日目、胎生14.0日目では BrdU 陽性細胞の出現率には正常との間に有意な差はみられなかった。BrdU 陽性細胞出現率が有意に減少していた胎生13.0日目の BrdU 陽性細胞の出現率を各区域毎に正常と比較すると、BrdU 陽性細胞は myleran 投与群では全区域で有意に減少しており、区域による差にみられなかった。

上皮細胞：BrdU 陽性細胞の出現率は、胎生13.5日目、胎生14.0日目では正常に比較し有意に減少した。BrdU 陽性細胞の出現率を上皮の各区域で正常と比較すると、胎生13.5日目には、軸前部の a - c 区域で有意な減少がみられた。胎生14.0日目には、c 区域を除く a, b, d, e の区域で有意に減少していた。

3) 手板内の細胞障害

間葉：myleran 投与群では、macrophage の出現は胎生12.5日目までは正常と差が認められなかった。胎生13.0日目、胎生13.5日目に macrophage の出現数は正常に比較し有意に増加した。macrophage 出現数の局在をみると全区域で増加しており区域による明らかな差はみられなかった。

上皮：胎生13.5日目、14.0日目に正常と比較して有意に増加した。区域による局在をみると胎生13.5日目では c 区域、胎生14.0日目では b - e 区域で有意に増加していた。

IV. 考 察

著者らは既に BrdU 法を用いて指放線が細胞移動により形成されることを示した。これら細胞の移動によって誘導される指放線の形成には上皮が重要な役割を果たすことが注目されている。今回、著者は手板内の BrdU 陽性細胞すなわち DNA 合成細胞の定量を行い正常と myleran 誘発ラット欠指症の発生過程を比較検討した。myleran 誘発ラット欠指症の手板における間葉細胞の DNA 合成能は myleran 投与後24時間目の胎生13.0日目にのみ正常より抑制されていた。しかし、間葉細胞の DNA 合成能の抑制は軸前、軸後で差は認められなかった。一方、細胞障害の指標とした macrophage の出現をみても胎生13.0日目以降、正常に比較し有意に増加しているものの軸前部と軸後部で macrophage の出現率に明らかな差はみられなかった。以上の結果は、薬剤による直接の細胞障害が手板の間葉においては、ほぼ一様に起こったことを示している。

今回の実験モデルと同様に均一な細胞障害が認められる脛骨列形成障害では手板形成前の障害による肢芽の間葉細胞の壊死および増殖の障害による間葉細胞の量的な不足が奇形発現の主要な原因であることが推定されている。今回の欠指症の発現にも、細胞増殖の障害と細胞死による間葉細胞の量的な不足が関与していると考えられる。しかし、間葉細胞の量的な不足のみでは、なぜ軸前性に欠指症が発現したかを説明できない。脛骨列形成障害と今回のモデルで異なった点は、上皮の障害が前者では均一であったのに対して、後者では軸前部に出現したことである。すなわち DNA 合成細胞の頻度が強く抑制されていた上皮軸前部と欠指症の出現部位が一致していたことである。

指列形成の機序およびその際の上皮の役割については多くの報告がある。Rowe らは手板の上皮頂堤を局所的に切除した後の指列の形成を観察した。その結果、上皮頂堤の軸前部、中央部の切除では正常肢または第2、3指の欠損が出現した。一方、軸後部の切除では、第2、3、4指が全て欠損した。著者の欠指症のモデルにおける組織障害と欠指症の発現は、Rowe らの実験における頂堤の軸前部、および中央部の切除モデルに類似していた。

従って上皮の DNA 合成能が抑制された結果、指列誘導作用に何らかの障害が加わり手板内に均一に分布している細胞の軸前部の指放線への誘導凝集が起らず欠指症が発現したと推測された。

V. 結 語

BrdU/anti-BrdU 免疫酵素抗体法等を用いて、正常および妊娠12日目 myleran 投与ラッ

ト欠指症胎仔手板における細胞増殖および細胞障害を経時的, 定量的に検討し以下の結果を得た。

- 1) 欠指症手板の DNA 合成能は, 間葉においては胎生13.0日目に最も障害が強かったが手板内での障害部位に局在はみられなかった。
- 2) 欠指症手板の上皮における DNA 合成能は, 胎生13.5日目には軸前部で, 14.0日目には手板全体で抑制されていた。
- 3) 欠指症において macrophage を指標にした細胞壊死の出現は手板内で明らかな局在は見られなかった。

以上の結果よりラット欠指症で間葉細胞の不足と上皮の障害による指列誘導の障害が欠指の発現に関与した可能性を推察した。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	長 嶋 和 郎
副 査	教 授	葛 巻 暹
副 査	教 授	細 川 眞澄男

目 的

先天性の手の奇形の発症機構は不明である。実験的欠指症の発現機序を検討する目的で, 胎仔の手板における細胞の DNA 合成能を BrdU (5 -bromodeoxy - 2' -uridine) と抗 BrdU monoclonal 抗体を用いる方法 (BrdU 法) 等により, 経時的に定量的に観察し, 細胞分裂能とその移動過程における障害の解析を試みた。

方 法

妊娠12日目のラットに myleran を投与すると, 全ての胎仔の前肢に第2, 3 指列の欠指症が発現する。欠指症ラットと正常ラットに妊娠12日目より15日目まで0.5日間隔で BrdU を腹腔内投与した。胎仔の右手手板掌面に平行な切片を抗 BrdU monoclonal 抗体を用いて, ABC 法による免疫染色を行った。隣接切片を hematoxylin - eosin (HE) 染色標本とし, BrdU 染色標本と対比して観察し以下の3点について解析した。1) HE 染色標本により指放線の形成過程を観察し, 正常と欠指症で比較した。2) 手板内の DNA 合成細胞の局在を BrdU 陽性細胞

の出現頻度を指標に Mico Computer Imaging Device を用いて定量的に観察した。3) 細胞死の局在を macrophage の出現頻度を指標として計測した。

結 果

実験の結果、欠指症では正常に比較し指放線の形成が遅れており、軸後側の指放線で出現したが、軸前側の指放線の形成はみられなかった。欠指症の間葉部における DNA 合成細胞の出現率は胎生12.5日目までは正常との差はみられなかったが、胎生13.0日目では、正常に比較し有意に減少した。しかし、胎生13.5日目、胎生14.0日目では DNA 合成細胞の出現率には正常との間に有意な差はみられなかった。DNA 合成細胞出現率が有意に減少していた胎生13.0日目の DNA 合成細胞は欠指症では手板全体で有意に減少しており、部位による差はみられなかった。欠指症の上皮部における DNA 合成細胞の出現率は、胎生13.5日目、胎生14.0日目では正常に比較し有意に減少した。DNA 合成細胞の出現率を上皮の部位毎に正常と比較すると、胎生13.5日目には、欠指の発現した軸前部に比較的強い抑制がみられ、胎生14.0日目には、全体で抑制されていた。欠指症の間葉部では、macrophage の出現は胎生12.5日目までは正常と差が認められなかった。胎生13.0日目、胎生13.5日目に macrophage の出現数は正常に比較し有意に増加した。上皮部では胎生13.5日目、14.0日目に正常と比較して有意に増加した。macrophage 出現数の局在をみると手板全体で増加しており部位による明らかな差はみられなかった。

考 察

細胞の移動によって誘導される指放線の形成には上皮が重要な役割を果たすことが注目されている。手板内の BrdU 陽性細胞すなわち DNA 合成細胞の定量を行い正常と myleran 誘発ラット欠指症の発生過程を比較した。その結果、欠指症の手板における間葉細胞の DNA 合成能は myleran 投与後24時間目の胎生13.0日目にのみ正常より抑制されていた。しかし、間葉細胞の DNA 合成能の抑制は軸前、軸後で差は認められなかった。一方、細胞障害の指標とした macrophage の出現をみても胎生13.0日目以降、正常に比較し有意に増加しているものの軸前部と軸後部で macrophage の出現率に明らかな差はみられなかった。以上の結果は、薬剤による直接の細胞障害が手板の間葉においては、ほぼ一様に起こったことを示していた。発表者は、以上の実験結果より本欠指症の発現には、細胞増殖の障害と細胞死による間葉細胞の量的な不足に加え、DNA 合成細胞の頻度が強く抑制されていた上皮軸前部と欠指症の出現部位が一致していた点に注目し、上皮の DNA 合成能が抑制された結果、指列誘導作用に何らかの障害が加わ

り手板内に均一に分布している細胞の軸前部の指放線への誘導凝集が起こらず欠指症が発現したと推測した。

口頭発表に当たり、葛巻教授、細川教授、阿部（和厚）教授より細胞死の形態と判定法、間葉細胞の区別、上皮由来の細胞誘導因子の実体、myleran の奇形誘発機構、および障害の局在を規定する因子等に関する質問がなされたが、発表者は、概ね適切な回答をしたものと考えられた。また、副査の葛巻教授、細川教授による個別の審査を受け合格と判定された。以上、本研究は正常ラット手板の形態発生を明確にし、これを基礎として実験的四肢奇形発生に関する一つの見解を呈示したものであり、学位論文に値するものと判断された。