

ENU 誘発ラットグリオーマと 9L 細胞移植ラットグリオーマの腫瘍血管の超微形態学的観察

陣内 敬文・柴田 尚武・福嶋 政昭・森 和夫

Differences in Microvasculature between Ethylnitrosourea-induced Brain Tumor and Transplanted 9L Cell Brain Tumor in the Rat

Takafumi JINNOUCHI, Shobu SHIBATA, Masaaki FUKUSHIMA and Kazuo MORI

Department of Neurosurgery, Nagasaki University, Nagasaki

Abstract

The microvasculature of ethylnitrosourea (ENU)-induced brain tumors and transplanted 9L cell brain tumors were studied in ultrathin sections and by the freeze fracture replica method. The vessels in ENU-induced tumors were similar to human glioma vessels in that they had endothelial tight junctions and increased pinocytotic vesicles. In the 9L cell tumors, the vessels lacked endothelial tight junctions and had fenestrated endothelium. Macroscopically, Evans blue dye penetrated the 9L cell tumors but not the ENU-induced tumors. Judging from the ultrastructure of the microvessels, the ENU-induced tumor appears more suitable as a human glioma model.

Key words: microvasculature, ethylnitrosourea, 9L cell, experimental brain neoplasms

I はじめに

実験脳腫瘍モデルとして用いられることの多い ENU 誘発ラットグリオーマと 9L 細胞移植ラットグリオーマの腫瘍血管を観察し、比較検討した。

II 実験方法

ENU 誘発ラットグリオーマは、N-ethyl-n-nitrosourea (岩井科学, 東京)を妊娠14日目の雌性 Wistar rat (Charles River, 静岡)に体重 kg 当り 50 mg を尾静脈より投与したのち、出生した仔ラットのうち、生後 4~6 ヶ月目の症状(体重減少, 片麻痺, 眼球突出など)を有するもの 40 匹を用いた。9L 細胞移植ラットグリオーマは、継代培養された 9L グリオーマ細胞(CD 344 Fischer ラットに ENU を投与して出現した脳腫瘍を complete medium 中で培養し、得られた自立株の gliosarcoma cell) 7×10^5 個を半定位的に雄

性 CD 344 Fischer ラット(Charles River)の右頭頂葉(矢状縫合の 2 mm 外側, 冠状縫合の 2 mm 後方, 皮質下 3 mm)にハミルトンシリンジを用い、注入移植して 15 日目の 30 匹を用いた。

各腫瘍ラットはハローセン麻酔下に胸部正中切開し、左心室にカニューレを挿入し、100 cm 水柱圧で Karnovsky 固定液(3% glutaraldehyde, 2.5% paraformaldehyde, 0.1 M phosphate buffer) 100 ml で灌流固定し、脳腫瘍を取り出した。この後、組織を細切し、4 時間にわたり Karnovsky 固定液で浸潤固定し、2% OsO₄ を用いて後固定を行った。これを常法に従い、アルコール脱水、エポン包埋して超薄切片を作製した。組織の一部は固定後、30% グリセリン、燐酸緩衝液を 2 時間浸透させたのち、液体窒素のシャーベットで急速凍結させ、凍結切断装置(JFD-7000; 日本電子, 東京)を用い、-120°C の条件下で切断し、切断面に白金パラジウムの真空蒸着を施したのち、ブリーチ液で組

長崎大学脳神経外科

Address reprint requests to: T. Jinnouchi, M.D., Department of Neuropathology, Montefiore Medical Center, 111 East 210th Street, Bronx, New York 10467-2490, U.S.A.

受稿 1988年 8月 5日 受理 1989年 1月 20日

織を溶解させてレプリカ膜標本を作製した。また、残りの組織は光顕用にホルマリン固定し、パラフィン包埋してHE染色プレパラートを作製した。これらの標本を透過型電子顕微鏡(JEM-1200EX; 日本電子)と光学顕微鏡を用い、観察した。両脳腫瘍ラットの他の各10匹において、sacrificeする30分前にEvans blue (2%, 2 ml/kg)を大腿静脈より注入し、染色の程度を肉眼で確認した。

III 結 果

1. ENU 誘発ラットグリオーマ

1) 光顕所見

ENU 誘発ラットグリオーマは、光顕上、大脳皮質下に限局し、軟膜あるいは脈絡叢との連続性のみられないもの30匹を選択した。HE染色ではmixed oligo-astrocytoma (MOA) 23例, anaplastic astrocytoma (AA) 7例であった。Evans blueを静注した群のラットはMOAが7例, AAが3例であったが、MOAでは全例, AAでは2例で静注されたEvans blueによる染色を認めず、AAの残り1例は直径2 cmほどの巨大な腫瘍で、側脳室やクモ膜に達して軟膜や脈絡叢を広く浸潤しており、腫瘍実質内に不規則な染色を認めた。

2) 電顕所見

超薄切片では直径5~10 μm のさまざまな成長段階の微小血管が增生しており、血管内皮には不規則な肥厚、菲薄化がみられ、surface infolding, vacuoleの増加を認めた。perivascular spaceは拡大し、浮腫性変化が著明であった。basal laminaは不連続に3~4層と多層化しているところがあり、不規則な肥厚、狭小化を認めた(Fig. 1A)。血管内皮間結合はabluminal側でopeningを認めるが、tight junction (TJ)と考えられた(Fig. 1B)。細動静脈の直径に相当する比較的大きな血管にはopen junctionと思われる構造を認めた(Fig. 1C)。菲薄化した血管内皮にはpinocytotic vesicles (PV)が集簇して存在している箇所が散見された(Fig. 1D)。

レプリカ膜では血管内皮間結合に7条のstrandsより成るTJを認めた(Fig. 2A)。血管内皮にはPVが著明に増加しており、1 μm^2 当り平均18個存在していた(Fig. 2B)。

2. 9L 細胞移植ラットグリオーマ

1) 光顕所見

9L細胞移植ラットグリオーマは、硬膜に進展しているものも存在したが、光顕上、皮質下に限局し、軟膜や脈絡叢との直接の連続のみられないもの15匹を選択した。静注

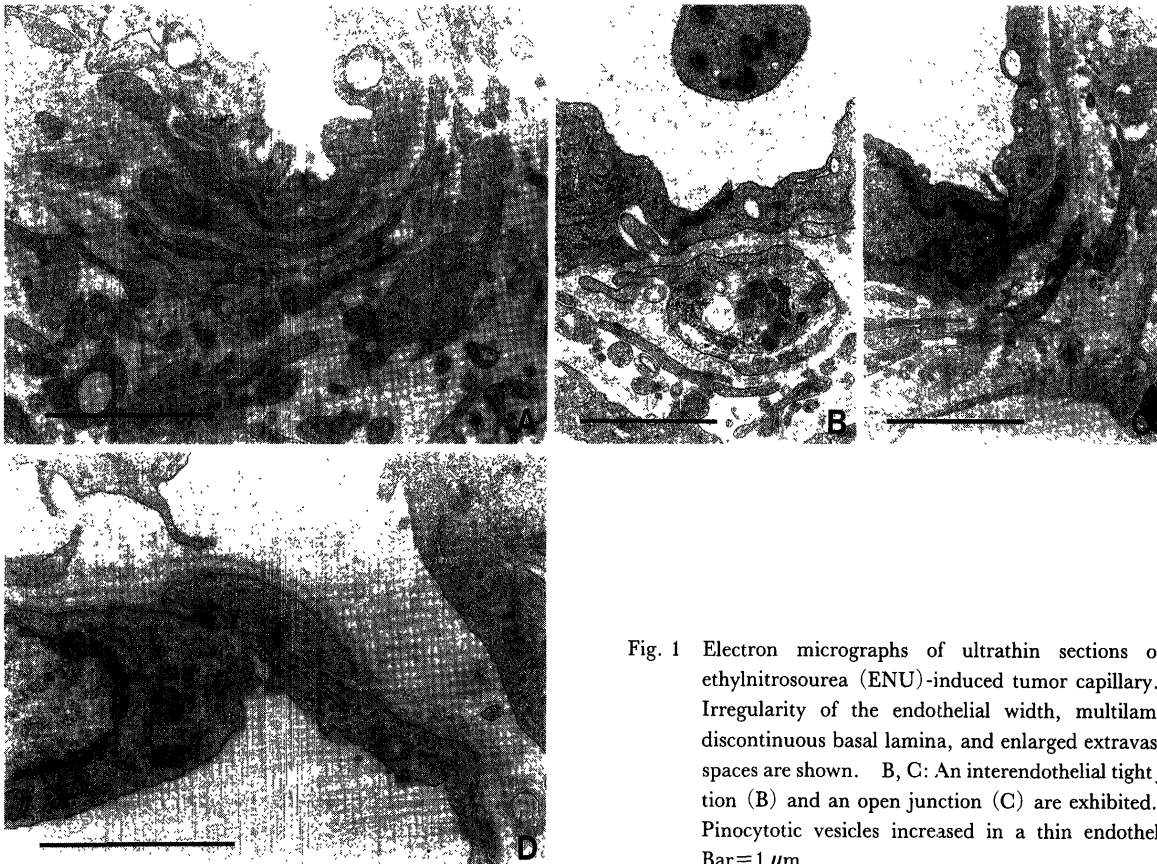


Fig. 1 Electron micrographs of ultrathin sections of an ethylnitrosourea (ENU)-induced tumor capillary. A: Irregularity of the endothelial width, multilamellar, discontinuous basal lamina, and enlarged extravascular spaces are shown. B, C: An interendothelial tight junction (B) and an open junction (C) are exhibited. D: Pinocytotic vesicles increased in a thin endothelium. Bar=1 μm .

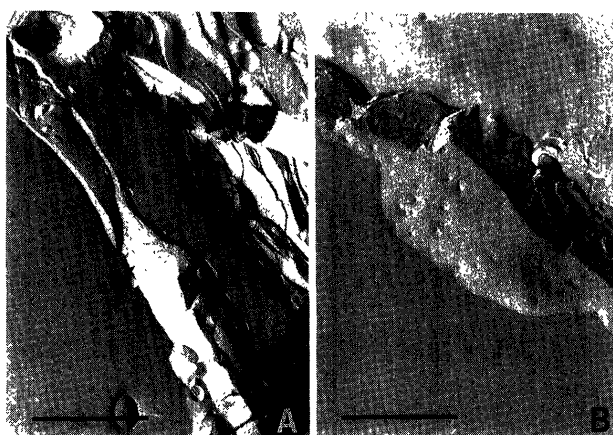


Fig. 2 Electron micrographs of replica specimens of an ENU-induced tumor capillary, showing a seven-stranded tight junction (A, arrows) and increased pinocytotic vesicles, numbered $18/\mu\text{m}^2$ (B). Bar = $1\ \mu\text{m}$.

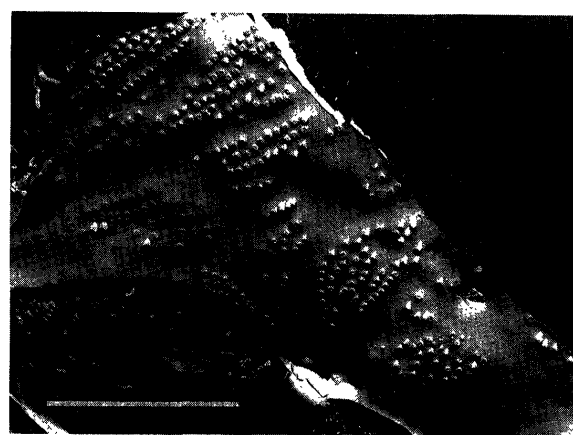


Fig. 4 Electron micrograph of replica specimen of a 9L cell tumor capillary, showing converged fenestrations but no tight junctional complex. Bar = $1\ \mu\text{m}$.

された Evans blue は10匹全例で腫瘍内に局限して漏出し、染色されていた。

2) 電顕所見

超薄切片では腫瘍血管は比較的大型のものが多く、 $10\ \mu\text{m}$ 以下のものはほとんど存在しなかった。血管内皮は全体的に菲薄化し、随所に fenestration (FN) を認めた (Fig. 3A)。腫瘍細胞間の間隙は広く、著明な腫瘍内浮腫を認め、血管内皮間結合は short なものでは open junction (Fig. 3B), elongate なものでは TJ (Fig. 3C) の構造を認めた。

レプリカ膜では血管内皮に集簇して存在する多数の FN を認めた。血管内皮間結合には TJ を認めることはできなかった (Fig. 4)。

IV 考 察

ヒト脳腫瘍のモデルを扱う場合には、さまざまな面で類似性の高いことが望まれる^{9,12}。今回観察した二つのラット脳腫瘍モデルには、その腫瘍血管内皮細胞に形態学上、相異なる特徴が存在していた。すなわち、原発性脳腫瘍モデルとして用いられることの多い ENU 誘発ラットグリオーマでは FN を有せず、PV の増加による血管透過性亢進¹⁵をきたしており、ヒトの glial tumor と同様の所見で、モデルとして適当であると考えられた。一方、一樣な大きさの同質の腫瘍を作製することが可能なため、薬剤や放射線の治療効果判定モデルに用いられることの多い^{1,22} 9L 細胞移植ラットグリオーマでは、ヒトの non-glial tumor や転移性脳腫瘍と同様に腫瘍血管の内皮細胞に FN が存在

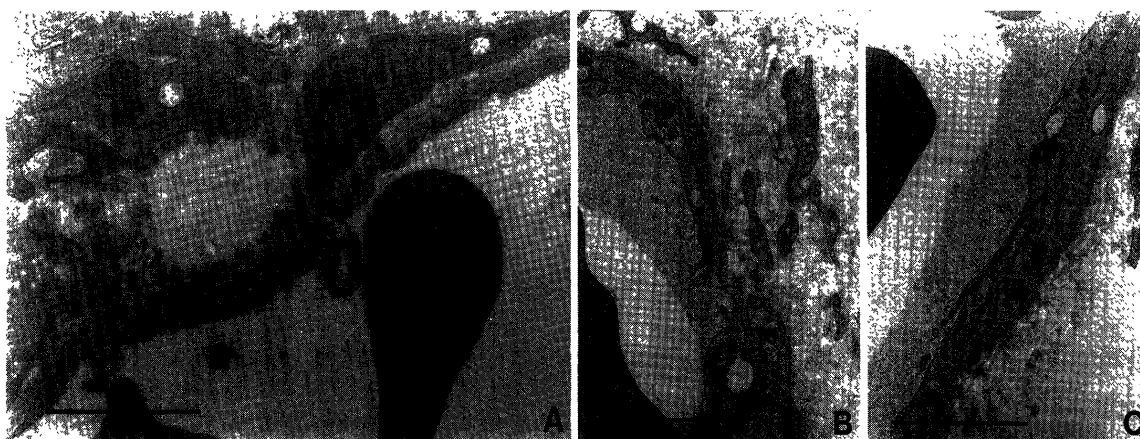


Fig. 3 Electron micrographs of ultrathin sections of a 9L cell tumor capillary. A: Typical fenestration is shown. B, C: A short open junction (B) and an elongated tight junction (C) are exhibited. Bar = $1\ \mu\text{m}$.

し、脳血液関門の破綻をきたしている¹⁸⁾ものと考えられた。また、超薄切片ではTJと思われる所見を見出したが、レプリカ標本ではこれを証明することはできず、TJ¹⁷⁾は存在しない可能性もあると考えられた。

ENU誘発ラットグリオーマおよび9L細胞移植ラットグリオーマの腫瘍血管の超微形態学的観察の報告は少ない^{3,5,10,19)}。Nishioら¹⁴⁾はENU誘発ラットグリオーマの腫瘍血管を四つのタイプに分類し、FNを有する血管の存在したことを報告しており、我々の観察と異なっていた。しかしながら、ここで観察された腫瘍には浸潤範囲の記載がなく、他の報告にあるようにクモ膜あるいは脈絡叢に浸潤した腫瘍ではこの両者の本来有するFNを模倣する¹⁸⁾可能性があり、腫瘍そのものがFNを形成したと断定するには注意を要すると思われる。ENU誘発ラットグリオーマは光顕上、良性的ことが多く、巨大な腫瘍以外は白質内で脳室外に存在することがほとんどであることも併せ、ヒトグリオーマの腫瘍血管の特徴^{6,16,20,23)}に近似していると考えられた。また、9L細胞移植ラットグリオーマのFNは全例で認められ、軟膜や脈絡叢とは直接の接合を認めず、したがって移植腫瘍塊と正常脳実質間のなんらかの反応で出現したと考えられた。FNは他の報告にあるように、転移性脳腫瘍^{7,11,13)}、原発性悪性リンパ腫⁴⁾、原発性黒色腫²¹⁾で存在が確認されており、脳内に異所性に腫瘍組織が出現することで発現することが予想され、9L細胞移植ラットグリオーマにおいてもこの理論は適応されると考えられた。FNは脳血液関門の基本構造を逸脱しており、このモデルを用いて薬剤の血管透過性、延命効果などを検討^{8,9)}するには色々な不都合な問題を加味して検討する必要があると思われた。たとえば、ヒトの原発性グリオーマでは移行の悪い親水性抗癌剤⁸⁾でもFNを持ったこの腫瘍には良好に移行することが予想される。また、ENU誘発ラットグリオーマではEvans blueが漏出しにくいことより脳血液関門はある程度保持されており、さらにENUで出現した末梢神経鞘腫ではFNが存在していること⁵⁾から腫瘍化しても発生母地元来の形態学上の²⁾、あるいは機能的な特徴は温存されていると考えられた。以上のように、超微形態学的にみた脳腫瘍血管はENUラットグリオーマのほうがヒトグリオーマに近似していると考えられた。

V 結 語

ENU誘発ラットグリオーマの微小血管内皮細胞の形態はヒトのglial tumorと無窓性の点で類似しており、脳血液関門は比較的保持されていた。一方、9L細胞移植ラットグリオーマではヒト転移性脳腫瘍などの腫瘍血管内皮と同様に有窓性と未熟なjunctionが特徴的であり、脳血液関

門の破綻を認めた。

文 献

- 1) Barker M, Deen DF, Baker DG: BCNU and X-ray therapy of intracerebral 9L rat tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 5: 1581-1583, 1979
- 2) Bennett HS, Luft JH, Hampton JC: Morphological classifications of vertebral blood capillaries. *Amer J Physiol* 196: 381-390, 1959
- 3) Davaki P, Lantos PL: The development of brain tumours produced in rats by the intracerebral injection of neoplastic glial cells: A fine structural study. *Neuropathol Appl Neurobiol* 7: 49-61, 1981
- 4) Hirano A, Ghatak NR, Becker NH, Zimmerman HM: A comparison of the fine structure of small blood vessels in intracranial and retroperitoneal malignant lymphoma. *Acta Neuropathol (Berl)* 27: 93-97, 1974
- 5) Hirano A, Hasson J, Zimmerman HM: Some new fine structural observations of ethylnitrosourea-induced nerve tumors in rats. *Lab Invest* 27: 555-560, 1972
- 6) Hirano A, Matsui T: Vascular structures in brain tumors. *Hum Pathol* 6: 611-621, 1975
- 7) Hirano A, Zimmerman HM: Fenestrated blood vessels in a metastatic renal carcinoma in the brain. *Lab Invest* 26: 455-464, 1972
- 8) 星野孝夫: 悪性脳腫瘍の化学療法—その pharmacokinetics—. *脳神経外科* 8: 1007-1016, 1980
- 9) 星野孝夫, Tel E, Barker M, Rosenblum ML, 野村和弘: 脳腫瘍動物モデルと治療法の考え方. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 16 [Part II]: 201-206, 1976
- 10) Huerter T, Mennel HD: Experimental brain tumors and edema in rats. I. Histology and cytology of tumors. *Acta Neuropathol (Berl)* 55: 105-111, 1981
- 11) 陣内敬文, 柴田尚武, 福嶋政昭, 森 和夫: 脳腫瘍血管透過性の超微形態—第6報: Metastatic brain tumorにおける浮腫—. *脳神経外科* 16: 563-568, 1988
- 12) Kobayashi N, Allen N, Clendenon NR, Li-Wen K: An improved rat brain-tumor model. *J Neurosurg* 53: 808-815, 1980
- 13) Long DM: Capillary ultrastructure in human metastatic brain tumors. *J Neurosurg* 51: 53-58, 1979
- 14) Nishio S, Ohta M, Abe M, Kitamura K: Microvascular abnormalities in ethylnitrosourea-induced rat brain tumors: Structural basis for altered blood-brain barrier function. *Acta Neuropathol (Berl)* 59: 1-10, 1983
- 15) Raimondi AJ: Localization of radio-iodinated serum albumin in human glioma. An electron-microscopic study. *Arch Neurol (Chicago)* 11: 173-184, 1964
- 16) 柴田尚武, 福嶋政昭, 井上 優, 堤 健二, 森 和夫: 脳腫瘍血管透過性の超微形態—第1報 グリオーマ周囲低吸収域について—. *脳神経外科* 13: 275-281, 1985
- 17) Tani E, Yamagata S, Ito Y: Freeze-fracture of capillary endothelium in rat brain. *Cell Tissue Res* 176: 157-165, 1977
- 18) 土田 正: 脳腫瘍血管の超微細構造と血液脳関門に関する

- 研究. 神研の進歩 18: 362-377, 1974
- 19) 土田 正: 脳腫瘍血管の超微細構造と血液脳関門に関する研究—第2報 実験脳腫瘍から—. 神研の進歩 18: 595-602, 1974
- 20) Waggener JD, Beggs JL: Vasculature of neural neoplasms. *Adv Neurol* 15: 27-49, 1976
- 21) Ward J, Hadfield MG, Becker DP, Lovings ET: Endothelial fenestrations and other vascular alterations in primary melanoma of the central nervous system. *Cancer* 34: 1982-1991, 1974
- 22) Weizack M, Deen DF, Rosenblum ML, Hoshino T, Gutin PH, Barker M: The 9L rat brain tumor: Description and application of an animal model. *J Neurol* 224: 183-192, 1981
- 23) Weller RO, Foy M, Cox S: The development and ultrastructure of the microvasculature in malignant gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 3: 307-322, 1977