

氏名・(本籍) 藤野 英俊 (滋賀県)  
 学位の種類 博士 (医学)  
 学位記番号 博士 (論) 第264号  
 学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当  
 学位授与年月日 平成12年3月27日  
 学位論文題目 Immunohistochemical distribution of HNK-1 and N-CAM in rat embryos treated with bis-diamine  
 (ビスダイアミン投与ラット胎仔における HNK-1、N-CAM の免疫組織学的分布)

審査委員 主査 教授 野田 洋一  
 副査 教授 今本 喜久子  
 副査 教授 島田 司巳

## 論文内容の要旨

### 【目的】

ビスダイアミンを妊娠ラットに投与すると胎仔に高率に心血管奇形が生じる。当教室における実験では、妊娠10.5日のラットにビスダイアミンを投与した場合、93%の胎仔にファロー四徴症や総動脈幹遺残など動脈幹分割異常に基づく心奇形が認められた。しかし、その心奇形発生機序については未だ十分解明されていない。近年、神経堤細胞が動脈幹分割に関与することが明らかにされた。したがって、ビスダイアミンは神経堤細胞に何らかの影響を与え、動脈幹分割異常をきたすことが推察される。そこで本研究では、ビスダイアミンの催奇形機序を明らかにするため、神経堤細胞あるいはその移動に関与するマーカーと考えられる抗 HNK-1 抗体、及び抗 N-CAM 抗体を用いた免疫組織染色を行い、ビスダイアミン投与胎仔における神経堤細胞の分布を正常胎仔と比較検討した。

### 【方法】

動物は Wistar 系ラットを使用した。雌雄ラットを交配し、膣スメアで精子を確認した日の午前0時を妊娠0日と定義した。妊娠10.5日に1%アラビアゴム溶液に溶解したビスダイアミン200mgを胃チューブを用いて経口投与し、妊娠11.5日、12.5日、13.5日にエーテル深麻酔下に母ラットを屠殺後ただちに胎仔を摘出した(実験群)。胎仔は2%パラホルムアルデヒドにて24時間固定した後パラフィン包埋し、5 $\mu$ mの連続切片を作成した。切片は型のごとく脱パラフィンし、一次抗体と抗 HNK-1 モノクロナール抗体、及び抗 N-CAM モノクロナール抗体を用いて ABC 法により免疫組織染色を行った。対照として、1%アラビアゴム溶液を投与した母ラットから摘出した胎仔(対照群)を用い、同様に免疫組織染色を施行した。両群における HNK-1 と N-CAM 陽性細胞の分布を比較するため、組織切片の顕微鏡写真をパーソナルコンピュータ Apple 社製 Power Macintosh 8100/80AV へ取り込み、胎仔の輪郭、主要な器官と HNK-1、N-CAM の分布をトレースして、NIH Image 1.61 を用い三次元的に再構築像を作成した。

### 【結果】

- ①胎生11.5日：対照群では耳原基レベルの横断面において、神経管の外側に沿って抗 HNK-1 陽性細胞が認められた。実験群でも同様な抗 HNK-1 陽性細胞の分布を認めたが、その数は対照群に比し少なかった。形態的には、実験群で神経管閉鎖の過程が遅延していた。
- ②胎生12.5日：対照群では耳原基レベルの横断面において神経管は閉鎖していた。耳原基レベルの神経堤から前腸背側の間葉組織、第3、4鰓弓を通り動脈幹に至る一連の N-CAM 陽性細胞群が認められた。実験群では、N-CAM 陽性細胞の分布は対照群と同様であったが、その数は少なく、神経堤から間葉組織への連続性はみられなかった。また、実験群では神経管の閉鎖が遅延していた。
- ③胎生13.5日：対照群では神経管は完全に閉鎖していた。第4、6動脈弓周囲の背側間葉組織には N-CAM 陽性細胞が散在しており、特に前腸周囲の N-CAM 陽性細胞群が第6動脈弓と連続性をもつ

て認められた。形態的に動脈幹円錐隆起が明らかに認められた。実験群でも、神経管は完全に閉鎖しており対照群と差はみられなかったが、心臓では動脈幹円錐隆起は認められなかった。背側間葉組織内の N-CAM 陽性細胞数は対照群と比較して少なく、また前腸周囲の陽性細胞群と第 6 動脈弓との連続性は認められなかった。

#### 【考 察】

鶏胚におけるウズラキメラ実験より、耳原基から第 3 体節にかけての神経堤細胞は第 3、4 鰓弓から動脈弓、動脈幹へと移動・分化して、大動脈弓の形成や動脈幹の分割に関与していることが明らかにされた。また、鶏胚における心臓神経堤細胞の切除実験では、総動脈幹遺残や大動脈奇形が生じる。ビスダイアミン投与により、ラット胎仔にみられる心血管奇形はこれらと酷似することから、ビスダイアミンの催奇形機序として神経堤細胞の正常な発生を阻害することが考えられる。今回の実験では、ラットの神経堤細胞が心臓へ移動する胎生 11.5 日、及び 12.5 日において、実験群の HNK-1 と N-CAM 陽性細胞の分布が対照群に比して少なく、神経堤から動脈幹への連続性が乏しかった。さらに胎生 13.5 日では、対照群と比較して実験群では心臓周囲間葉組織内の N-CAM 陽性細胞が少なく、心臓への連続性は欠けており、動脈幹円錐隆起の発達が遅れていた。この結果、ビスダイアミンにより心臓へ到達する神経堤細胞は数的に減少することが明らかになった。また、形態的には神経管の閉鎖が実験群で遅延していたので、ビスダイアミンは神経組織の発生過程を抑制し、その結果として神経堤から移動する神経堤細胞を減少させたものと考えられた。

#### 【結 論】

ビスダイアミンは神経組織の正常な発生を阻害し、心臓へ移動する神経堤細胞数を減少させることにより、心血管奇形をきたすことが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、ビスダイアミンの心大血管に対する催奇形性について神経堤細胞における影響を免疫組織学的手法により解析したものである。鰓弓動脈や心臓へ移動し動脈幹の分割や大動脈の発達に関与する神経堤細胞は、ビスダイアミンによりその数が減少し、総動脈幹遺残をはじめとする円錐動脈幹奇形を誘発することが明らかにされた。

妊娠 10.5 日の母ラットにビスダイアミン 200mg を経口投与し、胎生 11.5 日から 13.5 日のラット胎仔において神経堤細胞のマーカーである HNK-1 ないし N-CAM の分布を検討した。実験群と対照群では抗体の陽性細胞に分布の差は認められなかったが、陽性細胞数は実験群で減少していた。また、形態的には神経管の閉鎖が実験群で遅延していた。以上より、ビスダイアミンは神経組織の発達を抑制し、さらに神経堤細胞数を減少させることにより動脈幹分割を阻害して心大血管奇形を誘発すると結論づけられた。

本研究は先天性心疾患の発生機序の一部を解明したものであり、従って、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。