

ラットの中樞神経における自然発生性神経上皮性腫瘍と悪性細網症
の病理学的研究

永谷 真理子

目 次

緒論	1
第1章 ラットの神経上皮性腫瘍と悪性細網症の発生状況に関する研究	
序	10
材料と方法	12
結果	14
考察	17
要旨	20
図表	21
第2章 ラットの神経上皮性腫瘍における病理組織形態学および免疫組織化学的特徴	
序	30
材料と方法	33
結果	36
考察	41
要旨	47
図表	48
第3章 ラットの星状膠細胞腫と悪性細網症における病理組織形態学および免疫組織化学的特徴	
序	65
材料と方法	67
結果	70
考察	72
要旨	75
図表	76
総括	86
謝辞	90
参考文献	91

緒 論

化学物質の安全性試験に繁用されているラットにおける中枢神経系の自然発生性腫瘍については、1930年に Bullock らにより視神経の神経節神経腫が報告されて[Bullock *et al*; 1930]以降、膠細胞、上衣細胞、脈絡叢細胞あるいは未分化神経細胞由来の神経上皮性腫瘍、髄膜由来の腫瘍およびこれらと由来を異にすると考えられている悪性細網症および血管系腫瘍等が報告されている[Saxton *et al*; 1948, Garner *et al*; 1967, Mawdesley-Thomas *et al*; 1974, Newman *et al*; 1974, Fitzgerald *et al*; 1974, Sumi *et al*; 1976, Hollander *et al*; 1976, Dagle *et al*; 1979, Maekawa *et al*; 1984, Krinke *et al*; 1985, Gopinath; 1986, Wyand *et al*; 1987, Yamate *et al*; 1987, Mitsumori *et al*; 1987, Garman; 1988, Kaspareit-Rittinghausen *et al*; 1989, Frith *et al*; 1990, Solleveld *et al*; 1991, Zwicker *et al*; 1992, Krinke *et al*; 2000, Weber *et al*; 2011, Kaufmann *et al*; 2012, Kolenda-Roberts *et al*; 2013, Nakamura *et al*; 2013]。これらの腫瘍は、従来、HE染色標本上での腫瘍細胞と正常細胞との形態学的相違および腫瘍の発生部位に基づき、ヒトの中枢神経系腫瘍の形態学的特徴を参照して診断されている。しかし、上記の診断基準に従って従来星状膠細胞腫および悪性細網症と診断されてきたラットの腫瘍については、それらの腫瘍細胞の起源が十分

に明確にされておらず、また、両者は組織形態学的に類似していることから、現段階では類症鑑別は困難である。

神経上皮系腫瘍に分類されている膠細胞由来のラットの自然発生性腫瘍は、1948年に Saxton らにより膠芽腫が報告されてから[Saxton *et al*; 1948]、1967年に Garner らにより稀突起膠細胞腫と星状膠細胞腫が報告される[Garner *et al*; 1967]までの間は、膠細胞腫あるいは上衣膠細胞腫という診断名が用いられていた。1991年に毒性病理学診断の国際的なガイドライン[Solleveld *et al*; 1991]が発表され、膠細胞由来の腫瘍は星状膠細胞腫、稀突起膠細胞腫、混合神経膠腫および退形成性神経膠腫に分類され、そして、2012年に発行された International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria (INHAND) [Kaufmann *et al*; 2012]では、悪性稀突起膠細胞腫、悪性星状膠細胞腫および悪性混合神経膠腫の3つに分類されている (Table 0-1)。

INHAND の診断基準では、基本的に悪性星状膠細胞腫は細胞境界の不明瞭な腫瘍細胞の瀰漫性増殖からなる腫瘍で神経細胞周囲の衛星現象や血管周囲の腫瘍細胞浸潤を特徴とし、悪性稀突起膠細胞腫は細胞境界の明瞭な均一円形核細胞のシート状増殖からなる腫瘍でハニカムパターンや内皮増生を伴う血管増殖を特徴としている。悪性混合神経膠腫は腫瘍性星状膠細胞と腫

瘍性稀突起膠細胞がともに 20%以上を占める腫瘍で、どちらか一方が 80%以上を占める腫瘍は優位な腫瘍細胞の腫瘍として診断される (Table 0-2)。

ラットでは、膠細胞由来の腫瘍の中ではヒトやイヌと同様、星状膠細胞腫の発生率が高い[Mawdesley-Thomas *et al*; 1974, Fitzgerald *et al*; 1974, Gopinath; 1986, Haseman *et al*; 1990, Zwicker *et al*; 1992, Charles River Laboratories; 2004. Weber *et al*; 2011]。ヒトやイヌでは腫瘍性星状膠細胞が Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) 陽性であることから、確定診断には GFAP 免疫染色が用いられている[Okazaki *et al*; 1988, Summers *et al*; 1994, Lopes *et al*; 2000, Ide *et al*; 2010, Stoica *et al*; 2011]。一方、ラットでは、ヒトやイヌと異なり、星状膠細胞腫と診断される自然発生性腫瘍の腫瘍細胞は GFAP 陰性である[Krinke *et al*; 1985, Solleveld *et al*; 1991, Krinke *et al*; 2000, Weber *et al*; 2011, Kaufmann *et al*; 2012]ことから、自然発生性星状膠細胞腫の診断における GFAP の有用性については否定的である。ただし、ラットでもヒトやイヌと同様、正常星状膠細胞および反応性星状膠細胞は GFAP 陽性であり [Solleveld *et al*; 1990, Weber *et al*; 2011, Kaufmann *et al*, 2012]、ENU[Yoshimine *et al*; 1987, Raju *et al*; 1990, Zook *et al*; 2000]あるいは avian sarcoma virus[Lee *et al*; 1986]で誘発された星状膠細胞腫や *S100 β -v-erbB* 遺

伝子改変ラットに発生する悪性膠細胞腫[Yokoo *et al*; 2008]でも GFAP 陽性の腫瘍性星状膠細胞が確認されている。

一方、ラットの悪性細網症は、古くは多形性細胞肉腫、細網肉腫あるいは腫瘍性細網症等様々な名称で呼ばれていた[Mawdesley-Thomas *et al*; 1974, Newman *et al*; 1974, Dagle *et al*; 1979, Krinke *et al*; 1985, Gopinath; 1986, Yamate *et al*; 1987]が、1988年に Garman[Garman; 1988]により“悪性細網症”という統一した診断名が提唱されて今日に至っている (Table 0-3)。ところで、かつて細網細胞系腫瘍とされていた腫瘍細胞の起源については免疫組織化学的検索によって、ヒトでは B リンパ球由来、イヌではリンパ球あるいは組織球由来と考えられている[Koestner *et al*; 1999]。一方、ラットでは、現在までのところ、腫瘍細胞がリンパ球系細胞のマーカー陽性という報告は無く、組織球あるいはミクログリアのマーカーである CD68 あるいは Iba1 が陽性である[Nakamura *et al*; 2013, Kolenda-Roberts *et al*; 2013]ことから、組織球あるいはミクログリア由来である可能性が示唆されている。しかし、未だ確定に至らず、INHAND[Kaufmann *et al*; 2012]においては悪性細網症という診断名が引き続き使用されている。

ところで、化学物質の癌原性試験では、腫瘍の発生率は同一起源の腫瘍については合算して統計処理され、その上で癌原性の有無について対照群

と化学物質投与群との間で統計学的な評価が行われる[Brix *et al*; 2010]。したがって、自然発生性腫瘍を腫瘍細胞の起源に基づき的確に診断する必要がある。こうした観点から、ラットの中枢神経系腫瘍については、先ず、星状膠細胞腫およびこの腫瘍と発生母地を同じくする神経上皮性腫瘍の腫瘍細胞の起源および組織発生の解明が求められる。そこで、著者の所属する研究所で長年に亘って蓄積されたラットの脳腫瘍の背景データをINHAND[Kaufmann *et al*; 2012]の診断基準に従って再評価したところ、神経上皮性腫瘍としては、悪性星状膠細胞腫、悪性稀突起膠細胞腫、悪性混合神経膠腫および髄芽腫の発生が確認された。本研究では、ラットの自然発生性神経上皮性腫瘍と悪性細網症について、とくに悪性星状膠細胞腫と悪性細網症の鑑別を目的として、病理組織形態学的検索および免疫組織化学的検索を実施した。

本論文は3章から構成される。第1章では、F344 および SD ラットに自然発生する神経上皮性腫瘍および悪性細網症について、その発生率および発生推定週齢を中心に発生状況をまとめた。第2章では、神経上皮性腫瘍について、病理組織形態学的特徴を比較すると同時に、免疫組織化学的検索を行い、腫瘍細胞の起源について検討した。第3章では、悪性星状膠細胞腫

と悪性細網症について、病理組織形態学的特徴と免疫組織化学的特徴をより詳しく検索し、腫瘍の起源について検討した。

Table 0-1 ラットの膠細胞性腫瘍診断の経緯

報告年	著者	腫瘍診断名
1948	Saxton, <i>et al.</i> ⁵³	Glioblastoma
	↓	Glioma (unspecified) Glioependymoma
1967	Garner <i>et al.</i> ¹⁴	Astrocytoma Glioma (unspecified) Oligodendroglioma
	↓	Astrocytoma Oligodendroglioma Mixed glioma Pleomorphic glioma Glioma Glioblastoma multiforme Glioblastoma
1991	Solleveld <i>et al.</i> / Guides for Toxicologic Pathology ⁶⁰	Astrocytoma Oligodendroglioma Mixed glioma Anaplastic glioma
	↓	Astrocytoma Oligodendroglioma Oligodendroblastoma Mixed glioma Mixed oligodendroglioma/ependymoma Diffuse glioma Circumscribed glioma Glioblastoma Gliomatosis Glioma NOS
2012	Kaufmann <i>et al.</i> / INHAND ²⁵	Astrocytoma, malignant Glioma, mixed, malignant Oligodendroglioma, malignant

Table 0-2 INHANDにおけるラットの膠細胞性腫瘍と悪性細網症

腫瘍	起源	浸潤/配列	腫瘍細胞	特徴/コメント
膠細胞性腫瘍				
悪性 星状膠細胞腫	星状膠細胞	<ul style="list-style-type: none"> ・瀰漫性浸潤 ・病巣境界不明瞭 ・髄膜、血管周囲へ浸潤 	<ul style="list-style-type: none"> ・円形ないし楕円形核をもった均一細胞 ・細胞質は好酸性で乏しく、細胞境界は不明瞭 ・protoplasmic, fibrillary, gemistocytic, pilocyticへ分化 ・高悪性度:多形性 	<ul style="list-style-type: none"> ・神経細胞周囲の衛星現象 ・血管周囲の腫瘍細胞浸潤
悪性 稀突起膠細胞腫	稀突起膠細胞	<ul style="list-style-type: none"> ・病巣境界明瞭 ・シート状/索状配列 	<ul style="list-style-type: none"> ・クロマチンに富む円形核をもった小型の均一細胞 ・細胞質は染色性に乏しく、細胞境界は明瞭 ・高悪性度:細胞異型/多形性 	<ul style="list-style-type: none"> ・ハニカムパターン ・内皮細胞増殖を伴う血管増生
悪性 混合神経膠腫	星状膠細胞と稀突起膠細胞	<ul style="list-style-type: none"> ・病巣境界明瞭 ・高悪性度:病巣境界不明瞭 	<ul style="list-style-type: none"> ・腫瘍性星状膠細胞と稀突起膠細胞がともに20%以上を占める。(腫瘍性星状膠細胞が80%以上を占めるものは星状膠細胞腫と、腫瘍性稀突起膠細胞が80%以上占めるものは稀突起膠細胞腫とする。) ・高悪性度:細胞異型/多形性 	
悪性細網症 (同義語: リンパ細網症 小膠細胞症 脳原発リンパ腫 脳原発 組織球肉腫)	不明	<ul style="list-style-type: none"> ・瀰漫性浸潤 ・髄膜、血管周囲、脳室周囲へ浸潤 	<ul style="list-style-type: none"> ・多形性細胞 ・多形核を有するリンパ球/組織球様細胞 ・多核巨細胞 	<ul style="list-style-type: none"> ・基質に多量の細網線維増生 ・星状膠細胞腫との鑑別困難

Table 0-3 ラットの悪性細網症診断の経緯

報告年	著者	腫瘍診断
1974	Mawdesley-Thomas, <i>et al.</i> ³⁶	Reticulo-sarcoma Polymorphic cell sarcoma
1974	Newman, <i>et al.</i> ⁴¹	Reticulo-sarcoma Polymorphic cell sarcoma
1979	Dagle, <i>et al.</i> ⁸	Noeplastic reticulosis
1985	Krinke, <i>et al.</i> ²⁹	Noeplastic reticulosis
1986	Gopinath ¹⁵	Polymorphic sarcoma Lymphosarcoma
1987	Yamate, <i>et al.</i> ⁶⁹	Reticulosarcoma
1988	Garman <i>et al.</i> ¹³	Malignant reticulosis
1991	Solleveld <i>et al.</i> / Guides for Toxicologic Pathology ⁶⁰	Malignant reticulosis
1992	Zwicker, <i>et al.</i> ⁷⁴	Malignant reticulosis
2011	Weber <i>et al.</i> ⁶⁵	Malignant reticulosis
2012	Kaufmann <i>et al.</i> / INHAND ²⁵	Malignant reticulosis
2013	Kolenda-Roberts, <i>et al.</i> ²⁷	Malignant microglial tumor
2013	Nakamura, <i>et al.</i> ⁴⁰	Malignant reticulosis

第 1 章

ラットの神経上皮性腫瘍と悪性細網症の発生状況に関する研究

序

腫瘍は、しばしば発生率、発生時期、性差あるいは好発系統の有無等について特有な発生状況を有し、それらを把握することは、各腫瘍の生物学的特性の解析に役立つ。

National Toxicology Program (NTP) で行われたラット癌原性試験では、10 試験のうち 9 試験で発生した脳腫瘍が自然発生性腫瘍か、誘発腫瘍かの決定的な評価を下すことができなかった[Sills *et al*; 1999]。この原因として、ラットでは自然発生性脳腫瘍は発生率が低いため、その生物学的特性が十分に解明されていないことが考えられる。

ラットの脳腫瘍において悪性星状膠細胞腫と悪性細網症とを鑑別する際には、悪性星状膠細胞腫と発生母地を同じくする他の神経上皮性腫瘍についても発生状況を把握しなければならない。また、悪性細網症については、腫瘍細胞の起源としてミクログリアあるいは組織球の可能性が考えられていること[Nakamura *et al*; 2013, Kolenda-Roberts *et al*; 2013]から、組織球由来の自然発生性腫瘍であり、骨髄、リンパ節、肝臓、脾臓あるいは皮下等に発

生するリンパ造血器系組織の組織球肉腫[Ogasawara *et al*; 1993]についても、発生率を把握する必要がある。

そこで本章では、著者の所属する研究所で実施された癌原性試験の対照群または背景データとして用いた F344/DuCrI CrIj ラットおよび CrI:CD(SD)ラットについて、神経上皮細胞由来の腫瘍と悪性細網症の発生率および発生推定週齢など発生状況に加え、リンパ造血器系組織における組織球肉腫の発生率を検索した。

材料と方法

検索したのは日本チャールスリバー株式会社から購入した雌雄各 1363 匹の F344/DuCrjCrlj (以下 F344) ラットで、1991 年から 2009 年に本研究所で行われた 17 の癌原性試験の対照群動物 (このうち 4 試験は対照群が 2 群あり) と 2 つの背景データ収集用動物である。また、同社から購入した雄 1650 匹、雌 1705 匹の CrI:CD(SD) (以下 SD) ラットを用いて、1996 年から 2009 年に当研究所で行われた 22 (雄) ないし 23 (雌) の癌原性試験 (このうち雌雄とも 3 試験は対照群が 2 群あり) の対照群動物と 3 つの背景データ収集用動物も検索した。

動物は、温度 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 20\%$ 、換気回数 1 時間あたり 10-15 回、1 日 12 時間照明の動物飼育室で、個別飼育し、飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株) と水道水を自由に摂取させた。

試験は、「動物の愛護及び管理に関する法律 (法律第 105 号)」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (環境省告示第 88 号)」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン (日本学術会議)」および本研究所の「株式会社ボゾリサーチセンター動物実験指針、動物実験委員会規定および動物実験委員会の定める各種規定」を遵守して実施され、本研究所の動物実験委員会の承認を受けた。

中枢神経系組織に発生したすべての腫瘍を、INHAND [Kaufmann *et al*; 2012]に従って再評価し、このうち神経上皮性腫瘍と悪性細網症について、それぞれ発生状況をしらべた。リンパ造血器系組織の組織球肉腫については、本研究所で保管する背景データのうち上記の中枢神経系腫瘍検査に用いた試験とほぼ同時期のデータについて検索した。

結 果

神経上皮細胞由来の腫瘍として、F344 ラットでは悪性星状膠細胞腫、悪性稀突起膠細胞腫、悪性混合神経膠腫および髄芽腫が、SD ラットでは悪性星状膠細胞腫および悪性稀突起膠細胞腫が認められた。

F344 ラット (19 年間:1991-2009 年) と SD ラット (14 年間:1996-2009 年) を用いて実施された試験における神経上皮性腫瘍と悪性細網症の発生状況を Table 1-1 から 1-4 に示した。F344 および SD ラットとも、投与媒体や投与が腫瘍の発生に影響しているとは考えられなかった。すなわち、F344 ラットでは、検査を行った全 46 グループ (無処置グループ、試験固有の媒体を混餌、静脈内、経皮あるいは強制経口投与したグループ、メチルセルロース、蒸留水あるいはトラガン末を強制経口投与したグループ、グルコースを皮下投与したグループ) 中、雄 9 グループと雌 6 グループ (無処置グループ、試験固有の媒体を静脈内、経皮あるいは強制経口投与したグループ、蒸留水を強制経口投与したグループ、グルコースを皮下投与したグループ) で少数例の神経上皮性腫瘍 (悪性星状膠細胞腫: 雄の 6 グループと雌の 4 グループで 1/55-2/50 例、悪性稀突起膠細胞腫: 雄の 4 グループと雌の 3 グループで 1/55-1/50 例、悪性混合神経膠腫: 雄の 2 グループで 1/55 および 1/50 例、髄芽腫: 雌の 1 グループで 1/55 例) がみられた。また、全 46 グループ

中、雌雄各 1 グループ(雄:メチルセルロースの強制経口投与グループの 1/55 例、雌:無処置グループの 1/50 例)で悪性細網症がみられた。一方、SD ラットでは、全 57 グループ(無処置グループ、メチルセルロース、トラガン末、蒸留水、試験固有の媒体、myglyol 含有エタノールあるいはアラビアゴムを強制経口投与したグループ)中、雄 21 グループと雌 15 グループで数例の神経上皮性腫瘍(悪性星状膠細胞腫:雄の 18 グループと雌の 13 グループで 1/55-4/60 例、稀突起膠細胞腫:雄の 7 グループと雌の 3 グループで 1/60-1/50 例)がみられた。また、悪性細網症は、全 57 グループ中雄の 1 グループ(メチルセルロースの強制経口投与グループ)の 1/60 例にのみみられた。これらの腫瘍の発生に経時的変動はなかった。

F344 および SD ラットにみられた神経上皮性腫瘍および悪性細網症の発生率はいずれも低く、F344 ラットではすべての腫瘍が 1%未満であり、SD ラットでも最も頻度の高い悪性星状膠細胞腫が雄で 2.06%、雌で 1.17%で、その他の腫瘍は 1%未満であった (Table 1-5)。悪性星状膠細胞腫については、F344 ラット (0.48%) に比べ SD ラット (1.61%) の方が、また、雌 (F344 ラット:0.29%、SD ラット:1.17%) に比べ雄 (F344 ラット:0.66%、SD ラット:2.06%) の方が発生率がやや高かったが、その他の腫瘍については発生率に系統差および性差はみられなかった。

神経上皮性腫瘍と悪性細網症について、動物が死亡した、瀕死期に安楽死処置した、あるいは計画的に安楽死処置した時の日齢を、各腫瘍の検出日齢として Table 1-6 に示した。このうち悪性星状膠細胞腫と悪性稀突起膠細胞腫について、検出日齢を比較すると、後者（F344 ラット：290 日齢、SD ラット：212 日齢）の方が前者（F344 ラット：589 日齢、SD ラット：350 日齢）より若い日齢で検出された。また、悪性星状膠細胞腫は SD ラット（雄：371 日齢、雌：350 日齢）の方が F344 ラット（雄：589 日齢、雌：616 日齢）より若い日齢で発生する傾向にあった。

F344 ラットおよび SD ラットのリンパ造血器系組織における組織球肉腫の発生率を Table1-7 に示した。組織球肉腫の発生率は、F344 ラット（0.92%）に比べ SD ラット（2.14%）の方が、また、雌（F344 ラット：0.61%、SD ラット：1.24%）に比べ雄（F344 ラット：1.22%、SD ラット：3.04%）の方が高かった。

考 察

ラットでは、自然発生性脳腫瘍として、悪性星状膠細胞腫、悪性稀突起膠細胞腫、悪性混合神経膠腫、髄芽腫などの神経上皮性腫瘍がみられた。

F344 ラットおよび SD ラットの神経上皮性腫瘍発生率は、投与媒体や投与方法による影響をうけず、経時的変動もみられなかった。本研究データにおける腫瘍の発生率はこれまで報告されている他の動物生産所におけるそれらと概ね類似していた。したがって、ラットの神経上皮性腫瘍の発生に対して飼育環境の影響は少ないと考えられた。

悪性星状膠細胞腫、悪性稀突起膠細胞腫、悪性混合神経膠腫および髄芽腫を発生率について比較すると、悪性星状膠細胞腫が他の腫瘍より高かった。また、悪性星状膠細胞腫では SD ラットは F344 ラットより、また雄は雌より高い傾向がみられた。

神経上皮性腫瘍および悪性細網症の発生率については、F344 ラットでは F344/CrlBR、F344、F344/DuCrj、F344/NTac および F344/N における報告 (Table 1-8) [Charles River Laboratories, Inc.; 1990, Haseman *et al*; 1990, Iwata *et al*; 1991, Haseman *et al*; 1998, Dinse *et al*; 2010, NTP; 2011]が、また、SD ラットでは Crj:SD(IGS)、Crl:SDBR、Crl:SDBR(IGS)、Crj:SD、Crl:SD および Hsd:SD における報告 (Table 1-9) [McMartin *et al*; 1992, Zwicker *et al*; 1992,

Charles River Laboratories, Inc.; 1992, Perry *et al*; 1999, Iwata *et al*; 1999, Charles River Laboratories, Inc.; 2001, Charles River Laboratories, Inc.; 2004, Baldrick; 2005, Dinse *et al*; 2010, NTP; 2011]がある。これらの報告によると、SD ラットで星状膠細胞腫の発生率が13報告中10報告で雌雄あるいは雌雄のどちらか一方で1%以上であったが、その他の神経上皮性腫瘍の発生率はSD ラット、F344 ラットともいずれも1%未満であった。これら両系統ラットの神経上皮性腫瘍の発生率について、各報告による違いはなかった。なお、悪性細網症は、SD ラットの13報告中1報告でのみみられ、その発生率は雄0.1%、雌0.3%で、本研究の結果と同様に低頻度であった。

中枢神経系腫瘍では腫瘍の発生時期を正確に決定することは困難であるが、死亡あるいは瀕死期に安楽死処置した日齢をもとにした推定は可能である。悪性星状膠細胞腫と悪性稀突起膠細胞腫で発生時期を比較したところ、後者の方が前者より早期に発生することがわかった。同様の結果が、RccHan:Wistar ラットでも報告されており[Weber *et al*; 2011]、ラットに共通するものと考えられた。また、髄芽腫は、ヒトでは小児に好発する腫瘍で[Okazaki *et al*; 1988, Lopes *et al*; 2000]、ウシやイヌでも若齢動物に発生すると報告されている[Summers *et al*; 1994]が、ラットでは本研究データも含め、発

生率が極めて低く [Weber *et al*; 2011, Yamate *et al*; 1987]、正確な発生状況を把握するにはさらなるデータの集積が必要と考えられた。

悪性細網症の発生率は本研究の結果、および過去の報告ともに極めて低かった。悪性細網症では腫瘍細胞の起源の一つとして組織球が考えられている。組織球由来の腫瘍である組織球肉腫のラットにおける発生率は、本章の結果から SD ラットは F344 ラットより、また雄は雌より高かった。このような組織球肉腫の発生状況は悪性星状膠細胞腫のそれに類似していた。

以上のことから、ラットの自然発生性神経上皮性腫瘍では、1) 悪性星状膠細胞腫の発生率が最も高いこと、2) 悪性星状膠細胞腫は、F344 ラットより SD ラットの方が、また雌より雄の方が発生率が高く、このような系統差や性差はリンパ造血器系組織に発生する組織球肉腫のそれに類似すること、および3) 悪性稀突起膠細胞腫の方が悪性星状膠細胞腫より早期に発生することが明らかとなった。

要 旨

ラットの自然発生性脳腫瘍において、INHAND に従って診断された自然発生性神経上皮性腫瘍および悪性細網症の生物学的特性を把握するために、これらの発生率および発生推定週齢など発生状況に加えリンパ造血器系組織の組織球肉腫の発生率を検索した。その結果、ラットの自然発生性神経上皮性腫瘍では、1) 悪性星状膠細胞腫の発生率が最も高いこと、2) 悪性星状膠細胞腫は、F344 ラットより SD ラットの方が、また雌より雄の方が発生率が高く、このような系統差や性差はリンパ造血器系組織の組織球肉腫のそれに類似すること、および3) 悪性稀突起膠細胞腫の方が悪性星状膠細胞腫より早期に発生することが明らかとなった。

試験個別番号:	#1	#2	#3	#3	#4	#4	#5	#6	#7	#8	#8	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#18	#19	合計 (例数)	平均 発生率 (%)	変動範囲(%)
試験開始年:	1991	1992	1992	1992	1993	1993	1993	1993	1993	1994	1994	1994	1994	1995	1997	2000	2000	2003	2003	2004	2005	2008	2008	2009			
投与方法:	UT	UT	UT	FD	IV	UT	UT	UT	UT	GA	UT	UT	UT	PC	GA	GA	GA	GA	GA	SC	UT	GA	GA	GA			
浴媒:	UT	UT	ST	ST	ST	ST	UT	UT	UT	MC	MC	MC	MC	ST	MC	DW	DW	MC	TG	GL	DW	ST	ST	MC			
動物総数:	50	238	50	50	50	50	50	50	50	55	55	55	20	50	55	55	55	55	55	55	50	55	55	55	1363		
脳																											
神経上皮性腫瘍																											
悪性星状膠細胞腫																											
	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	2	0	0	0	0	2	0	0	8	0.6	0 - 4.0
悪性稀突起膠細胞腫																											
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	4	0.3	0 - 2.0
悪性混合神経膠腫																											
	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.1	0 - 2.0
悪性細胞網症																											
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.1	0 - 1.8
脊髄																											
神経上皮性腫瘍																											
悪性星状膠細胞腫																											
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.1	0 - 0.0
脳+脊髄																											
神経上皮性腫瘍																											
悪性星状膠細胞腫																											
	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	1	2	0	0	0	0	2	0	0	9	0.7	0 - 4.0
悪性稀突起膠細胞腫																											
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	4	0.3	0 - 2.0
悪性混合神経膠腫																											
	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.1	0 - 2.0
悪性細胞網症																											
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.1	0 - 1.8

UT:無処置, FD:海綿投与, IV:静脈内投与, GA:強制縫口投与, PC:強制投与, SC:皮下投与
ST:試験固有の媒体, MC:メチルセルロース, DW:蒸留水, TG:トラガント末, GL:グルコース,

Table 1-1. F344雄ラットにおける神経上皮性腫瘍と悪性細胞網症の発生状況

試験個別番号:	#1	#2	#3	#3	#3	#4	#4	#4	#5	#6	#7	#8	#8	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#18	#18	#19	合計 (例数)	平均 発生率 (%)	変動範囲(%)	
試験開始年:	1991	1992	1992	1992	1993	1993	1993	1993	1993	1993	1993	1994	1994	1994	1994	1995	1997	2000	2000	2003	2003	2004	2005	2008	2008	2008	2009				
投与方法:	UT	UT	UT	FD	UT	UT	IV	UT	UT	UT	UT	GA	UT	UT	UT	PC	GA	GA	GA	GA	GA	SC	UT	GA	GA	GA	GA				
溶媒:				ST	ST	ST	ST	ST	UT	UT	UT	MC	MC	MC	ST	ST	MC	DW	DW	MC	TG	GL	UT	DW	ST	MC					
動物総数:	50	238	50	50	50	50	50	50	50	50	50	55	55	55	20	50	55	55	55	55	55	55	50	55	55	55	55	1363			
脳																															
神経上皮性腫瘍																															
悪性星状膠細胞腫																															
	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.2	0 - 2.0	
悪性稀突起膠細胞腫																															
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	3	0.2	0 - 2.0		
髓芽腫																															
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.1	0 - 1.8		
悪性細網症																															
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.1	0 - 2.0		
脊髄																															
神経上皮性腫瘍																															
悪性星状膠細胞腫																															
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0.1	0 - 1.8		
脳+脊髄																															
神経上皮性腫瘍																															
悪性星状膠細胞腫																															
	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4	0.3	0 - 2.0		
悪性稀突起膠細胞腫																															
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	3	0.2	0 - 2.0		
髓芽腫																															
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.1	0 - 1.8		
悪性細網症																															
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.1	0 - 2.0		

UT:無処置, FD:混餌投与, IV:静脈内投与, GA:強制経口投与, PC:経皮投与, SC:皮下投与
ST:試験固有の媒体, MC:メチルセルロース, DW:蒸留水, TG:トラガント末, GL:グルコース,

Table 1-2. F344雌ラットにおける神経上皮性腫瘍と悪性細網症の発生状況

試験個別番号:	#1	#2	#3	#4	#4	#5	#6	#7	#8	#8	#9	#9	#9	#10	#11	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20	#21	#22	#23	#24	#25	#26	#26	合計 (例数)	平均 発生率 (%)	変動範囲(%)	
試験開始年:	1996	1996	1998	1999	1999	2001	2001	2003	2003	2003	2004	2004	2004	2004	2004	2005	2005	2005	2006	2007	2007	2008	2006	2008	2008	2008	2008	2008	2009	2009	33	2.0	0 - 6.7	
投与方法:	UT	UT	UT	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	UT	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	6	0.4	0 - 2.0	
溶媒:	UT	UT	UT	MC	MC	MC	MC	MC	TG	GA	GA	GA	GA	MC	DW	MC	DW	MCT	UT	AG	MC	MC	MC	MC	MC	DW	MC	DW	ST	55	1650			
動物総数:	50	50	75	60	60	60	60	60	50	60	60	60	60	60	60	55	60	55	60	60	55	60	60	60	70	60	60	60	55	55	1650			
脳																																		
神経上皮性腫瘍	0	0	3	2	1	3	2	1	2	2	2	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	2	2	4	2	0	0	2	33	2.0	0 - 6.7
悪性星状膠細胞腫	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	6	0.4	0 - 2.0	
悪性稀突起膠細胞腫	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0.4	0 - 2.0	
悪性細網症	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.1	0 - 1.7	
脊髄																																		
神経上皮性腫瘍	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.1	0 - 1.3		
悪性星状膠細胞腫	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.1	0 - 1.7		
悪性稀突起膠細胞腫	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.1	0 - 1.7		
脳+脊髄																																		
神経上皮性腫瘍	0	0	4	2	1	3	2	1	2	2	2	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	2	2	4	2	0	0	34	2.1	0 - 6.7	
悪性星状膠細胞腫	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	7	0.4	0 - 2.0	
悪性稀突起膠細胞腫	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0.4	0 - 2.0	
悪性細網症	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.1	0 - 1.7		

UT:無処置, GA:強補経口投与
MC:メチルセルロース, TG:トラガント末, DW:蒸留水, ST:試験固有の媒体, MCT:myglyol含有エタノール, AG:アラビアゴム

Table 1-3. SD雄ラットにおける神経上皮性腫瘍と悪性細網症の発生状況

試験個別番号:	#1	#2	#3	#4	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20	#21	#22	#23	#24	#25	#26	#26	合計 (例 数)	平均 発生率 (%)	変動範囲(%)		
試験開始年:	1996	1996	1998	1999	1999	2001	2001	2003	2003	2004	2004	2004	2005	2005	2005	2005	2006	2007	2007	2007	2008	2008	2008	2008	2008	2008	2008	2009	2009	2009				
投与方法:	UT	UT	UT	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	UT	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA	GA				
溶媒:	UT	UT	UT	MC	MC	MC	MC	TG	TG	DW	DW	MC	DW	DW	MC	DW	MCT	AG	AG	MC	MC	MC	MC	MC	DW	MC	MC	DW	ST					
動物総数:	50	50	75	60	60	60	60	60	50	60	60	60	55	55	60	55	60	60	55	60	60	60	60	70	60	60	60	60	55	55	1705			
脳																																		
神経上皮性腫瘍																																		
悪性星状膠細胞腫																																		
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	1	0	2	0	0	0	1	0	1	0	1	0	2	2	0	1	3	1	19	1.1	0 - 5.0		
悪性稀突起膠細胞腫																																		
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0.2	0 - 1.8		
脊髄																																		
神経上皮性腫瘍																																		
悪性星状膠細胞腫																																		
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.1	0 - 1.7		
脳+脊髄																																		
神経上皮性腫瘍																																		
悪性星状膠細胞腫																																		
0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	3	0	1	0	2	0	0	0	1	0	1	0	1	0	2	2	0	1	3	1	20	1.2	0 - 5.0		
悪性稀突起膠細胞腫																																		
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0.2	0 - 1.8		

UT: 無処置, GA: 強制経口投与
MC: マサルセルロース, TG: トラガント末, DW: 蒸留水, ST: 試験固有の媒体, MCT: myglyol含有エタノール, AG: アラビアゴム

Table 1-4. SD雌ラットにおける神経上皮性腫瘍と悪性細胞症の発生状況

Table 1-5 F344ラット および SD ラットにおける神経上皮性腫瘍および悪性細網症の発生頻度

系統:	F344			SD		
	雄	雌	雌+雄	雄	雌	雌+雄
合計(例数):	1363	1363	2726	1650	1705	3355
神経上皮性腫瘍						
悪性星状膠細胞腫	9 (0.66%)	4 (0.29%)	13 (0.48%)	34 (2.06%)	20 (1.17%)	54 (1.61%)
悪性稀突起膠細胞腫	4 (0.29%)	3 (0.22%)	7 (0.26%)	7 (0.42%)	3 (0.18%)	10 (0.30%)
悪性混合神経膠腫	2 (0.15%)	0	2 (0.07%)	0	0	0
髄芽腫	0	1 (0.07%)	1 (0.04%)	0	0	0
悪性細網症	1 (0.07%)	1 (0.07%)	2 (0.07%)	1 (0.06%)	0	1 (0.03%)

Table 1-6 F344ラットおよび SD ラットにおける神経上皮性腫瘍および悪性細網症の検出日齢

	系統: F344				SD			
	性: 雄		雌		雄		雌	
	動物総数: 1363		1363		1650		1705	
	腫瘍 総数	検出日齢	腫瘍 総数	検出日齢	腫瘍 総数	検出日齢	腫瘍 総数	検出日齢
神経上皮性腫瘍								
悪性星状膠細胞腫	9	589 - 772	4	616 - 773	34	371 - 773	20	350 - 771
悪性稀突起膠細胞腫	4	538 - 772	3	290 - 776	7	212 - 772	3	677 - 721
悪性混合神経膠腫	2	770 - 772	0		0		0	
髄芽腫	0		1	773	0		0	
悪性細網症	1	771	1	738	1	711	0	

Table 1-7 F344ラット および SD ラットのリンパ造血器系組織における
組織球肉腫の発生率

	系統: F344			SD		
	性: 雄	雌	雌+雄	雄	雌	雌+雄
合計(例数):	490	490	980	1940	1940	3880
リンパ造血器系組織						
組織球肉腫	6 (1.22%)	3 (0.61%)	9 (0.92%)	59 (3.04%)	24 (1.24%)	83 (2.14%)

Table 1-8 F344ラットにおける神経上皮性腫瘍と悪性細網症の発生率

	F344/CrlBR		F344		F344/DuCrj		F344		F344/NTac	F344/N		F344/DuCrj	
	Charles river lab. 1990 ⁴		Haseman et al 1990 ¹⁶		Iwata et al 1991 ²⁰		Haseman et al 1998 ¹⁷		Dinse et al 2010 ¹⁰	NTP 2011 ⁴²		本研究データ	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雌	雄	雌	雄	雌
神経上皮性腫瘍													
星状膠細胞腫	0.7*	0.5	0.5	0.9	0.1	0.1	0.4	0.3		0.2	0.0	0.6	0.2
稀突起膠細胞腫	0.2	0.1	0.1	0.2	0.0	0.1	0.4	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2
混合神経膠腫												0.1	0.0
神経膠腫	0.1	0.1			0.3	0.0	0.1	0.3		0.0	0.3		
混合神経膠腫 あるいは神経膠腫			0.1	0.1									
髄芽腫			0.1	0.1								0.0	0.1
神経芽腫							0.1	0.0					
悪性細網症												0.1	0.1

*: 発生率(%)

	Ctl: SDBR		Ctl: SDBR		Ctl: SDBR (IGS)		Ctl: SDBR (IGS)		Ctl: SDBR		Ctl: SDBR		Hsd: SD		Hsd: SD		Cj: SD(IGS)									
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌								
神経上皮性腫瘍																										
星状膠細胞腫	0.7*	0.5	1.7	1.3	1.3	0.2	1.2	0.4	1.9	0.0	3.6	0.0	2.0	0.0	0.9	0.6	1.2	0.5	1.5	1.2	1.6	0.4	2.0	0.0	2.0	1.1
稀突起膠細胞腫	0.2	0.0	0.3	0.0									0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2					0.4	0.2		
神経膠腫	0.2	0.0			0.4	0.4							0.2	0.1	0.1	0.0									0.0	
混合神経膠腫			0.3	0.1																						
髄芽腫	0.2	0.0																								
神経節性神経腫															0.0	0.1										
神経腫															0.1	0.0										
上衣腫									0.0	0.3			0.1	0.0	0.1	0.0										
上衣芽腫	0.2	0.0																								
脈絡叢乳頭腫															0.1	0.0									0.1	0.0
悪性細網症			0.1	0.3																					0.1	0.0

*:発生率(%)

Table 1-9. SDラットにおける神経上皮性腫瘍と悪性細網症の発生率

第 2 章

ラットの神経上皮性腫瘍における病理組織形態学および 免疫組織化学的特徴

序

2012年に発表された実験動物の中脳神経系腫瘍に関する INHAND 分類[Kaufmann *et al*; 2012]によると、中脳神経系腫瘍は、神経細胞、膠細胞、髄膜細胞、上皮細胞、脈絡叢細胞およびその他の細胞と、腫瘍の由来細胞に基づく分類がなされている。悪性星状膠細胞腫と悪性細網症の鑑別にあたり、星状膠細胞腫と同一起源である神経上皮細胞由来の他の腫瘍について、各腫瘍の病理組織形態学の特徴を把握し、腫瘍細胞の由来を明確にすることは意義があると考えられる。腫瘍細胞の由来を検索するには、特定の細胞に特異的に反応するマーカーが多数市販されている昨今では、免疫組織化学的手法が最も一般的で、かつ信頼性が高い。

星状膠細胞腫では、星状膠細胞の細胞骨格タンパクである GFAP が腫瘍細胞のマーカーとして一般に用いられている。しかしながら、ラットでは正常あるいは反応性星状膠細胞は GFAP 陽性であるが、自然発生性星状膠細胞腫の腫瘍細胞は陰性であること[Solleveld *et al*; 1990、Weber *et al*; 2011、Kaufmann *et al*; 2012]から、通常、星状膠細胞腫の診断に GFAP は用いられない。一方、神経幹細胞やグリア前駆細胞の細胞骨格タンパクである Nestin

は、ヒトやイヌの星状膠細胞の前駆細胞マーカーとして星状膠細胞腫の診断に用いられており [Schiffer *et al*; 2006, Ma *et al*; 2008, Ide *et al*; 2010]、ラットでは ENU 誘発腫瘍で Nestin 陽性の星状膠細胞前駆細胞が報告されている [Jang *et al*; 2006]。これに対し、稀突起膠細胞腫では、核内転写因子である Olig2 が、ヒトと同様にラットにおいてもマーカーとして有用である [Yokoo *et al*; 2004, Mokhtari *et al*; 2005, Yokoo *et al*; 2008, Nakamura *et al*; 2013, Kolenda-Roberts *et al*; 2013]。

一方、悪性星状膠細胞腫と鑑別困難なラットの悪性細網症は、組織球、ミクログリアあるいはリンパ球が由来と考えられている [Garman; 1988, Solleveld *et al*; 1990, Krinke *et al*; 2000, Kaufmann *et al*; 2012]。組織球・ミクログリア系細胞を特定するためのマーカーとして、リゾソームの膜タンパクである CD68 あるいはマクロファージ/ミクログリアに特異的に発現するカルシウム結合タンパクである Ionized calcium-binding adaptor molecule (Iba1) が一般に用いられている [Damoiseaux *et al*; 1994, Wu *et al*; 2005², Kaufmann *et al*; 2012, Rehg *et al*; 2012, Nakamura *et al*; 2013, Kolenda-Roberts *et al*; 2013]。ラットでは、この他に組織球系細胞のマーカーとして、ラットのマクロファージおよび樹状細胞のエンドソーム膜に特異的に発現する RM-1 がある [Iyonaga *et al*; 1997]。また、ラットの T リンパ球では CD3 [Matsushima *et al*;

2010, Rehg *et al*; 2012]が、Bリンパ球ではCD45RA[Quan *et al*; 1999, Rehg *et al*; 2012]がそれぞれマーカーとして使用されている。

髄芽腫については、ラットにおける免疫組織化学的知見に関する報告は見当たらないが、髄芽腫細胞はヒトではGFAP, Nestin、 β III-tubulin および Vimentin[Lopes *et al*; 2000, Parker *et al*; 2005]に、イヌではGFAP、Nestin、Neurofilament、 β III-tubulin、Synaptophysin および Doublecortin[Koestner *et al*; 1999, Ide *et al*; 2010]に陽性と報告されている。

そこで本章では悪性星状膠細胞腫と悪性細網症の鑑別に先立ち、第1章で認められた自然発生性神経上皮性腫瘍について腫瘍細胞を形態別に分類し、病理組織形態学的特徴を比較した。さらに腫瘍細胞の由来を確定するために、悪性星状膠細胞腫、悪性稀突起膠細胞腫および悪性混合神経膠腫についてGFAP、Nestin、Olig2、Iba1、CD68、RM-4、CD3、CD45RA と Vimentin の発現を免疫組織学的にしらべた。また、髄芽腫については、GFAP、Nestin と Vimentin に加え、神経細胞への分化マーカーである Neurofilament、 β III-tubulin、Doublecortin と Synaptophysin、ならびに稀突起膠細胞への分化マーカーである Myelin CNPase の発現を免疫組織学的にしらべた。

材料と方法

【症例】

症例はいずれも日本チャールスリバー株式会社から購入したF344ラットおよびSDラットで、毒性試験および癌原性試験の対照群と中枢神経系に被験物質の影響がみられなかった投与群から集めた。このうち癌原性試験の対照群の症例は第1章で用いたものである。

悪性星状膠細胞腫60例については、1つの慢性毒性試験と15の癌原性試験で、悪性稀突起膠細胞腫26例と悪性混合神経膠腫5例については、2つの短期毒性試験と14の癌原性試験で、髄芽腫4例については、1つの短期毒性試験と2つの癌原性試験でそれぞれ認められた腫瘍を用いた (Table 2-1)。

これらの試験の実施状況および動物の飼育環境については、いずれも第1章で記載されたものと同様である。

【形態観察】

すべての動物を剖検し、脳と脊髄は10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定後、パラフィン包埋し、HE染色を施した。認められた中枢神経系組織腫瘍をINHAND 分類[Kaufmann *et al*; 2012] に従って分類し、このうち神経上

皮性腫瘍について腫瘍細胞を形態により分類すると同時に病理組織学的形態像を比較検討した。

【免疫染色】

悪性星状膠細胞腫、悪性稀突起膠細胞腫および悪性混合神経膠腫について、GFAP、Nestin、Olig2、Iba1、CD68、RM-4 および Vimentin に対する免疫染色を実施した。用いた一次抗体を Table 2-2 にまとめた。Olig2 染色については、悪性星状膠細胞腫 16 例、悪性稀突起膠細胞腫 8 例、悪性混合神経膠腫 3 例についてのみ評価した。他の症例は正常な稀突起膠細胞が陽性でなかったため、評価できなかった。また、悪性星状膠細胞腫の 6 例については、このほかに CD3 と CD45RA の免疫染色も実施した。

髄芽腫では全症例について GFAP、Nestin、Doublecortin、Synaptophysin および Myelin CNPase の免疫染色を実施し、2 例について Neurofilament、 β III-tubulin および Vimentin の免疫染色を実施した。

免疫染色は EnVision kits (Dako North America, CA, USA) を用いた Labeled polymer 法で実施した。脱パラフィン後、切片を 0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) に浸し、Table 2-2 に示す抗原賦活化を行った。その後、すべての切片を 3%過酸化水素・メタノール溶液を用いて室温で 10 分間処理し

て内因性ペルオキシダーゼを不活化し、プロテインブロック (Dako North America) を用いて室温で 10 分間処理して非特異反応を抑制した後、一次抗体と 4°C 一晩で反応させた。標識二次抗体にはポリマー試薬 (EnVision^{TM+} Rabbit/HRP、Dako North America) を用い、室温で 30 分間反応した。発色には DAB(和光純薬工業、大阪)を、後染色にはヘマトキシリンを用いた。

結 果

【腫瘍細胞の形態学的分類】

悪性星状膠細胞腫、悪性稀突起膠細胞腫、悪性混合神経膠腫と膠芽腫の腫瘍細胞を、細胞形態により星状細胞、円形 A 細胞、円形 B 細胞、円形 C 細胞、紡錘形細胞、大型異型細胞および好酸性顆粒細胞に分類し、Table 2-3 にまとめた。

星状細胞は、クロマチンの比較的豊富な楕円形、類円形あるいは分葉状の核を有する細胞境界の不明瞭な小型細胞であった。円形細胞は A、B、C の 3 つに分けられ、円形 A 細胞は明るい細胞質とクロマチンの豊富な円形核を有する小型細胞で、円形 B 細胞は弱好酸性の細胞質とクロマチンの比較的豊富な円形核を有し、円形 C 細胞は好酸性細胞質とやや大型の類円形核を有していた。紡錘形細胞は、クロマチンの比較的豊富な楕円形または紡錘形の核を有する紡錘形ないし短紡錘形細胞であり、大型異型細胞は、好酸性の豊富な細胞質とクロマチンに乏しい大型核を有する細胞であった。好酸性顆粒細胞は、細胞質内の硝子様好酸性顆粒を特徴とし、核はクロマチンに乏しい類円形核でしばしば 2 核あった。反応性星状膠細胞は、大型類円形ないし多角形を呈し、弱好酸性均質の豊富な細胞質と核小体が明瞭でクロマチンに乏しい大型類円形核を有していた。

【各腫瘍の病理組織形態学的特徴】

悪性星状膠細胞腫、悪性稀突起膠細胞腫、悪性混合神経膠腫および髄芽腫における病理組織形態学的特徴を Table 2-4 に示した。

悪性星状膠細胞腫 (Fig. 2-1) の腫瘍細胞は星状細胞が主体で、好酸性顆粒細胞の混在を特徴としていた。星状細胞は、腫瘍中心部では密なシート状に、辺縁部では散在性にみられ、好酸性顆粒細胞は腫瘍内に散在性にみられた。このほか、シート状に配列した円形細胞および束状に配列した紡錘形細胞がときおりみられた。

悪性稀突起膠細胞腫 (Fig. 2-2) の腫瘍細胞は均一な円形 A あるいは B 細胞が主体で、シート状に配列するこれら両細胞には移行がみられた。同病巣内には索状あるいは輪状に配列する円形 C 細胞が混在し、円形 A、B あるいは C 型細胞の合計が全体の 80% 以上を占めていた。円形 A 細胞のシート状増殖巣は、いわゆる honey comb 構造を呈していた。このような病巣に隣接して、後述する悪性混合神経膠腫と同様な紡錘形ないし短紡錘形細胞および大型異型細胞を含む領域がしばしばみられた。

悪性混合神経膠腫 (Fig. 2-3) では、円形 A あるいは B 細胞に加え、紡錘形細胞あるいは大型異型細胞がみられた。円形 A および B 細胞は、病

巢内に限局性あるいは散在性にみられ、紡錘形細胞は病巣内血管周囲で増殖していた。また、大型異型細胞は病巣内に散見された。この腫瘍では、円形 A および B 細胞の合計が全体の 20%以上を占め、かつ紡錘形細胞も全体の 20%以上を占めていた。

髄芽腫 (Fig. 2-4) では、“carrot-shaped”核を有する細胞質に乏しい紡錘形細胞が密にあるいは散在性に増殖していた。これらの腫瘍細胞には有糸分裂像が多く認められた。

悪性星状膠細胞腫では腫瘍の境界は概して不明瞭で、腫瘍細胞は血管周囲および髄膜に頻繁に浸潤していた。一方、悪性稀突起膠細胞腫、悪性混合神経膠腫および髄芽腫では腫瘍の境界は比較的明瞭で、血管周囲および髄膜への浸潤は軽度であった。腫瘍細胞が神経細胞の周りを取り囲む「衛星現象」は、悪性星状膠細胞腫 (Fig. 2-1) で 50/60 例に観察されたが、悪性稀突起膠細胞腫、悪性混合神経膠腫および髄芽腫では観察されなかった。壊死巣周囲の柵状配列は悪性星状膠細胞腫 (Fig. 2-1) の 12/60 例と髄芽腫 (Fig. 2-4) の 1/4 例でみられたが、その他の腫瘍ではみられなかった。また、内皮増生を伴う血管増生は、悪性稀突起膠細胞腫 (Fig. 2-2) の 18/26 例および髄芽腫 (Fig. 2-4) の 1/4 例にみられたが、その他の腫瘍ではみられなかった。なお、反応性星状膠細胞は、各種腫瘍の病変周囲あるいは病変内に散見された。

【腫瘍細胞の免疫染色】

【腫瘍細胞の形態学的分類】で分類した各腫瘍細胞の免疫染色の結果を Table 2-5 に示した。

悪性星状膠細胞腫の腫瘍細胞は星状細胞、円形 B 細胞、紡錘形細胞および好酸性顆粒細胞からなっていた (Table 2-5)。このうち、星状細胞 (Fig. 2-5)、円形 B 細胞 (Fig. 2-6) および紡錘形細胞 (Fig. 2-7) の免疫染色結果は共通しており、Iba1、CD68、RM-4 および Vimentin が陽性で、Olig2、GFAP および Nestin が陰性であった。一方、好酸性顆粒細胞は、いずれのマーカも陰性であった。なお、一部の症例で実施した CD3 と CD45RA についての免疫染色の結果は、いずれの腫瘍細胞も陰性であった。

悪性稀突起膠細胞腫と悪性混合神経膠腫において、腫瘍細胞は円形 A 細胞、円形 B 細胞、円形 C 細胞、紡錘形細胞および大型異型細胞から成っており、これらの両腫瘍では形態別腫瘍細胞の免疫染色結果は共通していた (Table 2-5)。すなわち、円形 A 細胞 (Fig. 2-8)、円形 B 細胞 (Fig. 2-9) および円形 C 細胞 (Fig. 2-10) はいずれも Olig2 陽性であった。円形 B 細胞 (Fig. 2-9) でときおり GFAP に陽性反応がみられた以外、いずれの円形細胞も GFAP と Nestin には陰性であった。紡錘形細胞 (Figs. 2-11, 2-12) はいずれ

も Olig2 陰性で、一部は GFAP 陽性 (Fig. 2-11) または Nestin 陽性 (Fig. 2-12) であった。GFAP 陽性細胞は Nestin 陰性で、逆に Nestin 陽性細胞は GFAP 陰性であった。紡錘形細胞は、しばしば Vimentin 陽性であった。大型異型細胞は、いずれのマーカーも陰性であった。悪性稀突起膠細胞腫および悪性混合神経膠腫では、Iba1、CD68 あるいは RM-4 陽性の反応性ミクログリアあるいはマクロファージが腫瘍周囲または腫瘍内に散見されたが、いずれの腫瘍細胞もこれらのミクログリア/マクロファージのマーカーには陰性であった。

髄芽腫では、腫瘍細胞は GFAP、nestin、myelin CNPase、doublecortin、synaptophysin、neurofilament、beta III tubulin および vimentin のいずれのマーカーも陰性であった。

反応性星状膠細胞 (Fig. 2-13) は GFAP 陽性で、GFAP 陽性の長い突起を特徴としていた。

考 察

本章では、ラットの神経上皮性腫瘍について腫瘍細胞の形態を詳細に検索した。すなわち、細胞形態から円形 A、B あるいは C 細胞を腫瘍性稀突起膠細胞と、星状細胞を腫瘍性星状膠細胞とし、神経細胞周囲の衛星現象や血管周囲の腫瘍細胞浸潤、ハニカムパターンや内皮増生を伴う血管増殖などのそれぞれの腫瘍の特徴所見から診断した。また、紡錘形細胞については、血管を取り囲んで増殖する同様な形態の細胞は、ラットの ENU 誘発混合神経膠腫で腫瘍性星状膠細胞と報告されている[Zook *et al*; 2000]ことから、腫瘍性星状膠細胞とした。悪性混合神経膠腫は腫瘍性星状膠細胞と腫瘍性稀突起膠細胞の両細胞がそれぞれ 20%以上を占める腫瘍とした。

神経上皮性腫瘍の組織形態学的特徴検索と免疫組織化学的検索の結果、悪性星状膠細胞腫では、腫瘍細胞は星状細胞、円形 B 細胞、紡錘形細胞および好酸性顆粒細胞からなり、組織形態学的特徴は、腫瘍の境界が不明瞭、腫瘍細胞が頻繁に血管周囲および髄膜へ浸潤、内皮増生を伴う血管増生の欠如、壊死巣周囲の柵状配列、神経細胞周囲の衛星現象および好酸性顆粒細胞の出現であった。ヒトやイヌの星状膠細胞腫では、腫瘍細胞が周囲組織や血管周囲に浸潤することがよく知られている[Summers *et al*; 1994, Lopes *et al*; 2000]。また、腫瘍細胞の形態は、さまざまに protoplasmic、

fibrillary、 gemistocytic、 pilocytic あるいは pleomorphic と表現されている [Okazaki *et al*; 1988, Summers *et al*; 1994, Lopes *et al*; 2000]。本章で検索したラットの悪性星状膠細胞腫で星状細胞と分類された細胞は、protoplasmic あるいは fibrillary 細胞に、紡錘形細胞は pilocytic 細胞に、胞体の豊かな円形細胞は gemistocytic 細胞にそれぞれ類似していた。また、腫瘍細胞による神経細胞周囲の衛星現象は、ヒトの星状膠細胞腫でも報告されている [Leenstra *et al*; 1992]。好酸性顆粒細胞は、ラットの星状膠細胞腫では二核顆粒細胞として報告されており [Pruimboom-Brees *et al*; 2004]、また、細胞質内にジアスターゼ消化抵抗性の PAS 陽性好酸性顆粒を含有するという点ではヒトの顆粒細胞性星状膠細胞腫 [Saad *et al*; 2006, Shi *et al*; 2008] の腫瘍細胞に類似していた。このような点では、ラットの悪性星状膠細胞腫は形態学的にヒトやイヌのそれに類似していることが明確になった。一方、ヒトやイヌでは、内皮増生を伴う血管増生 (garlands, glomeruloid vascular proliferation, vascular chicken-wire pattern) および壊死巣周囲の柵状配列は悪性度の高い星状膠細胞腫 (膠芽腫) でしばしば観察される [Okazaki *et al*; 1988, Summers *et al*; 1994, Koestner *et al*; 1999, Lopes *et al*; 2000] が、ラットでは、壊死巣周囲の柵状配列はみられるものの、内皮増生を伴う血管増生はみられなかった。これはラットの悪性星状膠細胞腫に特有の所見と考えられた。

悪性稀突起膠細胞腫では、腫瘍細胞は円形 A 細胞、円形 B 細胞、円形 C 細胞、紡錘形細胞および大型異型細胞からなり、組織形態学的特徴は、円形 A 細胞による honey comb 構造と内皮増生を伴う血管増生であった。honey comb 構造はヒトやイヌの稀突起膠細胞腫の特徴像で、内皮増生を伴う血管増生もまた悪性の指標として観察される所見である[Okazaki *et al*; 1988, Summers *et al*; 1994, Lopes *et al*; 2000, Sepulveda Sanchez *et al*; 2009]。したがって、ラットの悪性稀突起膠細胞腫の組織像はヒトやイヌのそれに類似していると考えられた。また、悪性稀突起膠細胞腫には悪性混合神経膠腫で見られる組織像がしばしば混在していたこと、およびこれら両腫瘍を構成する腫瘍細胞の免疫組織学的結果が共通していたことから、両腫瘍は同一起源の腫瘍と考えられた。ヒトやイヌでも稀突起膠細胞腫に腫瘍性星状膠細胞が混在することはよく知られており[Okazaki *et al*; 1988, Summers *et al*; 1994, Lopes *et al*; 2000]、腫瘍性の稀突起膠細胞と星状膠細胞からなる腫瘍は混合神経膠腫 (oligoastrocytoma) として分類されている[Koestner *et al*; 1999, Lopes *et al*; 2000]。

免疫組織化学的には、悪性星状膠細胞腫を構成するいずれの腫瘍細胞も Olig2、GFAP および Nestin に陰性であった。ラットの星状膠細胞腫が GFAP 陰性であることは従来通りの結果であり、またいずれの腫瘍細胞も Olig2 陰

性であったことから、本章で検索した悪性星状膠細胞腫には腫瘍性稀突起膠細胞は混在していないと考えられた。また、腫瘍構成細胞である星状細胞、円形 B 細胞および紡錘形細胞は、いずれもミクログリアあるいは組織球系細胞のマーカである Iba1、CD68 および RM-4 に陽性であったことから、このような悪性星状膠細胞腫の腫瘍細胞は組織球あるいはミクログリア由来である可能性が示唆された。なお、好酸性顆粒細胞については、上述したようにヒトの顆粒細胞性星状膠細胞腫の腫瘍細胞に形態学的に類似していたが、ヒトの本細胞は GFAP および CD68 に陽性である[Shi *et al*; 2008]のに対し、ラットでは GFAP、CD68 とも陰性であり、ラットの好酸性顆粒細胞はヒトの顆粒細胞性星状膠細胞腫細胞とは免疫組織化学的に異なっていた。

悪性稀突起膠細胞腫および悪性混合神経膠腫では、円形 A、B および C 型細胞は稀突起膠細胞のマーカである Olig2 に陽性であったことから稀突起膠細胞由来の細胞、また紡錘形細胞は一部が星状膠細胞のマーカである GFAP あるいは星状膠細胞の前駆細胞のマーカである Nestin に陽性であったことから星状膠細胞へ分化している細胞と考えられた。ただし、反応性星状膠細胞は GFAP 陽性で腫瘍性星状膠細胞は GFAP 陰性が定説となっているラットでは、GFAP 陽性細胞が反応性星状膠細胞か腫瘍性星状膠細胞かを区別しなければならない。反応性星状膠細胞は類円形ないし多角形で、弱

好酸性均質細胞質と GFAP 陽性の長い突起を特徴とし、散在性に認められる。

一方、本研究の悪性稀突起膠細胞腫あるいは悪性混合神経膠腫における GFAP 陽性細胞は、紡錘形で GFAP 陽性の突起は明らかでなく、束状あるいは血管周囲を取り囲んで増殖していたことから、反応性星状膠細胞とは明らかに異なっていた。さらに、本研究でみられた GFAP 陽性の腫瘍性星状膠細胞の組織学的形態は、Zook らが報告している ENU 誘発の混合神経膠腫における腫瘍性星状膠細胞のそれに類似し、Avian Sarcoma virus で誘発された星状膠細胞腫[Lee *et al*; 1986]および *S100 β-v-erbB* 遺伝子改変ラットに発生した悪性膠細胞腫[Yokoo *et al*; 2008]のそれとも同様であった。これらのことから、悪性稀突起膠細胞腫や悪性混合神経膠腫における紡錘形細胞は星状膠細胞への分化を示す腫瘍性星状膠細胞と考えられた。また同時に、GFAP の発現を検索することは、他の動物と同様にラットにおいても中枢神経系腫瘍の診断に有用であると考えられた。

ラットの髄芽腫では、ヒトや他の動物と異なり Homer-Wright ロゼットはみられなかったが、腫瘍細胞核が”carrot-shape”様で、有糸分裂が多く、細胞増殖が密であることはヒトや他の動物の髄芽腫の組織学的特徴[Lopes *et al*; 2000, Summers *et al*; 1994]と類似していた。本章では、ヒトあるいはイヌで髄芽腫細胞が陽性と報告されている GFAP, Nestin, Neurofilament、 β

III-tubulin、Synaptophysin、Doublecortin および Vimentin[Koestner *et al*; 1999, Lopes *et al*; 2000, Parker *et al*; 2005, Ide *et al*; 2010]に加え、稀突起膠細胞への分化マーカーである Myelin CNPase についてもその発現を検索したが、いずれも陰性であり、ラットの髄芽腫の分化方向を解明するには至らなかった。

本章の研究により、ラットでは、1) 悪性星状膠細胞腫の組織形態学的特徴は壊死巣周囲の柵状配列、神経細胞周囲の衛星現象および好酸性顆粒細胞の出現であり、また内皮増生を伴う血管増生が欠如していること、2) 悪性稀突起膠細胞腫および髄芽腫の組織形態学的特徴はヒトやイヌのそれと類似していること、3) 悪性星状膠細胞腫の腫瘍細胞は Iba1、CD68 および RM-4 に陽性で、組織球あるいはミクログリア由来の可能性があること、4) 悪性稀突起膠細胞腫および悪性混合神経膠腫の腫瘍細胞は Olig2、GFAP あるいは Nestin に陽性で、由来は稀突起膠細胞あるいは星状膠細胞であること、および 5) 腫瘍性星状膠細胞はヒトやイヌと同様に GFAP 陽性であることが明らかとなった。

要 旨

本章では、悪性星状膠細胞腫と悪性細網症の鑑別に先立ち、星状膠細胞腫を含む神経上皮性腫瘍について、各腫瘍の病理組織形態学的特徴の把握を試みた。腫瘍細胞を形態学的に分類し、比較した。さらにこれらの腫瘍細胞の由来を検索するために、悪性星状膠細胞腫、悪性稀突起膠細胞腫および悪性混合神経膠腫では、GFAP、Nestin、Olig2、Iba1、CD68、RM-4 および Vimentin の発現を、髄芽腫では GFAP、Nestin、Doublecortin、Synaptophysin、Myelin CNPase、Neurofilament、 β III-tubulin および Vimentin の発現を免疫組織学的にしらべた。その結果、ラットでは 1) 悪性星状膠細胞腫の組織形態学的特徴は、壊死巣周囲の柵状配列、神経細胞周囲の衛星現象および好酸性顆粒細胞の出現であり、内皮増生を伴う血管増生は欠如していること、2) 悪性稀突起膠細胞腫および髄芽腫の組織形態学的特徴はヒトやイヌと同様であること、3) 悪性星状膠細胞腫の腫瘍細胞は Iba1、CD68 および RM-4 に陽性で、組織球あるいはミクログリア由来の可能性があること、4) 悪性稀突起膠細胞腫および悪性混合神経膠腫の腫瘍細胞は Olig2、GFAP あるいは Nestin に陽性で、由来は稀突起膠細胞あるいは星状膠細胞であること、および 5) 腫瘍性星状膠細胞はヒトやイヌと同様に GFAP 陽性であることが明らかとなった。

Table 2-1. 観察した神経上皮性腫瘍の症例数

	系統: F344		SD		計
	性: 雄	雌	雄	雌	
悪性星状膠細胞腫	11	7	28	14	60
悪性稀突起膠細胞腫	13	3	8	2	26
悪性混合神経膠腫	2	2	1	0	5
髄芽腫	2	1	0	1	4
計	28	13	37	17	95

Table 2-2. 免疫染色に使用した一次抗体

抗体	希釈倍率	製造元	認識細胞	抗原賦活化
Iba1	1:40	㈱和光純薬工業、 大阪	小膠細胞、マクロファージ	なし
CD68	1:100	SEROTEC. Co., Ltd. Oxford, UK	マクロファージ、 小膠細胞	マイクロウェーブ、 100℃、15分
RM-4	1:25	㈱トランスジェニック、 熊本	マクロファージ、樹状細胞、 小膠細胞	なし
Olig2	1:100	㈱免疫生物研究所、 群馬	希突起膠細胞	マイクロウェーブ、 100℃、15分
GFAP	1:1000	㈱ダコジャパン、東京	星状膠細胞	オートクレーブ、 121℃、15分
Nestin	1:100	Santa Cruz Biotech, Inc., Santa Cruz, CA, U.S.A.	神経幹細胞～ グリア前駆細胞	オートクレーブ、 121℃、15分
Vimentin	1:100	㈱ダコジャパン、東京	間葉系細胞	マイクロウェーブ、 100℃、15分
CD3	1:400	Becton Dickinson & Company, NJ, USA	Tリンパ球	マイクロウェーブ、 0℃、15分
CD45RA	1:400	SEROTEC. Co., Ltd. Oxford, UK	Bリンパ球	マイクロウェーブ、 100℃、15分
Neurofilament	1:100	㈱ダコジャパン、東京	神経細胞	オートクレーブ、 121℃、20分
β III-tubulin	1:100	CHEMICON international, CA, USA	神経前駆細胞～ 神経細胞	オートクレーブ、 121℃、20分
Doublecortin	1:100	Santa Cruz Biotech, Inc., Santa Cruz, CA, U.S.A.	神経前駆細胞	マイクロウェーブ、 100℃、15分
Synaptophysin	1:500	Leica Biosystems Newcastle Ltd., UK	神経細胞	オートクレーブ、 121℃、20分
Myelin CNPase	1:200	EMD Chemicals, Inc., Gibbstown, NJ, USA	希突起膠細胞	オートクレーブ、 121℃、20分

Table 2-3. 神経上皮性腫瘍における腫瘍細胞の形態

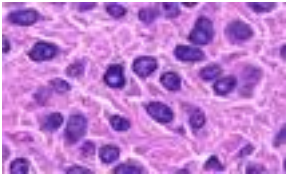
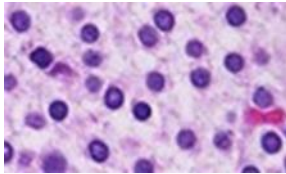
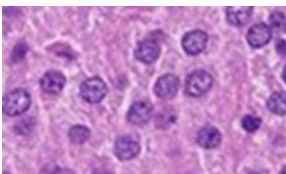
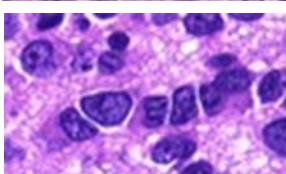
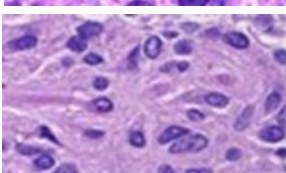
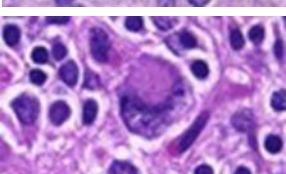
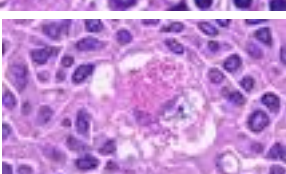
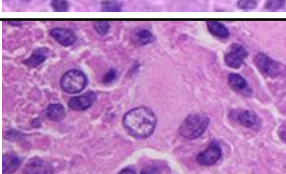
形態別名称	細胞の形状	細胞質	核の形状	クロマチン	配列	HE
星状細胞	細胞境界不明瞭 小型星状 短紡錘形	乏しい 好酸性	楕円形 類円形 分葉状	豊富 比較的豊富	散在性 密なシート状	
円形A細胞	小型類円形	明るく 抜ける	円形	豊富	シート状 索状 散在性	
円形B細胞	類円形	弱好酸性	円形 楕円形	比較的豊富	シート状 索状 散在性	
円形C細胞	類円形	好酸性	異型 大型類円形	豊富 比較的豊富	索状 輪状	
紡錘形細胞	紡錘形 短紡錘形	乏しい 好酸性	楕円 紡錘形 細長い carrot-shaped	豊富 比較的豊富	渦巻状 束状 散在性 密なシート状	
大型異型細胞	大型類円形 多角形	豊富 好酸性	異型 大型類円形	乏しい	散在性	
好酸性顆粒細胞	大類円形	好酸性顆粒 含有	類円形 2核 異型	乏しい	散在性	
反応性 星状膠細胞	大型多角形 類円形	弱好酸性 均質	大型類円形	乏しい	散在性	

Table 2-4 神経上皮性腫瘍の病理組織形態的特徴と腫瘍細胞浸潤パターン

腫瘍型	症例数	腫瘍細胞の形態		腫瘍の境界	腫瘍細胞の浸潤		特徴所見		
		形態	有糸分裂 ^{a)}		血管周囲	髄膜	神経細胞周囲の衛星現象	壊死巣周囲の柵状配列	内皮増生を伴う血管増生
悪性星状膠細胞腫	60	星状細胞 円形B細胞 紡錘形細胞 好酸性顆粒細胞	少数/散在/ 多数	不明瞭/ 明瞭	46/60	43/60	50/60	12/60	0/60
悪性稀突起膠細胞腫	26	円形A、B、C細胞： 80%以上 紡錘形細胞： 20%未満 大型異型細胞	無/少数/ 散在	明瞭/ 比較的明瞭	1/26	2/26	0/26	0/26	18/26
悪性混合神経膠腫	5	円形A、B細胞： 20%以上 紡錘形細胞： 20%以上 大型異型細胞	少数/散在	明瞭/ 比較的明瞭	2/5	1/5	0/5	0/5	0/5
髄芽腫	4	紡錘形細胞	多数	明瞭/ 不明瞭	0/4	1/4	0/4	1/4	1/4

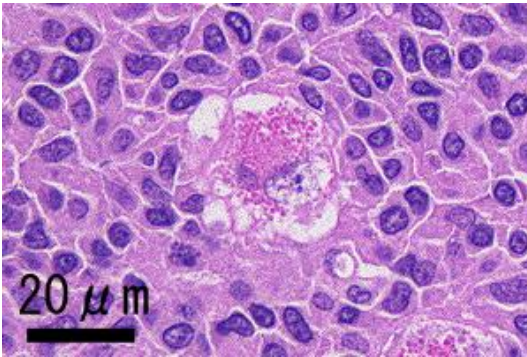
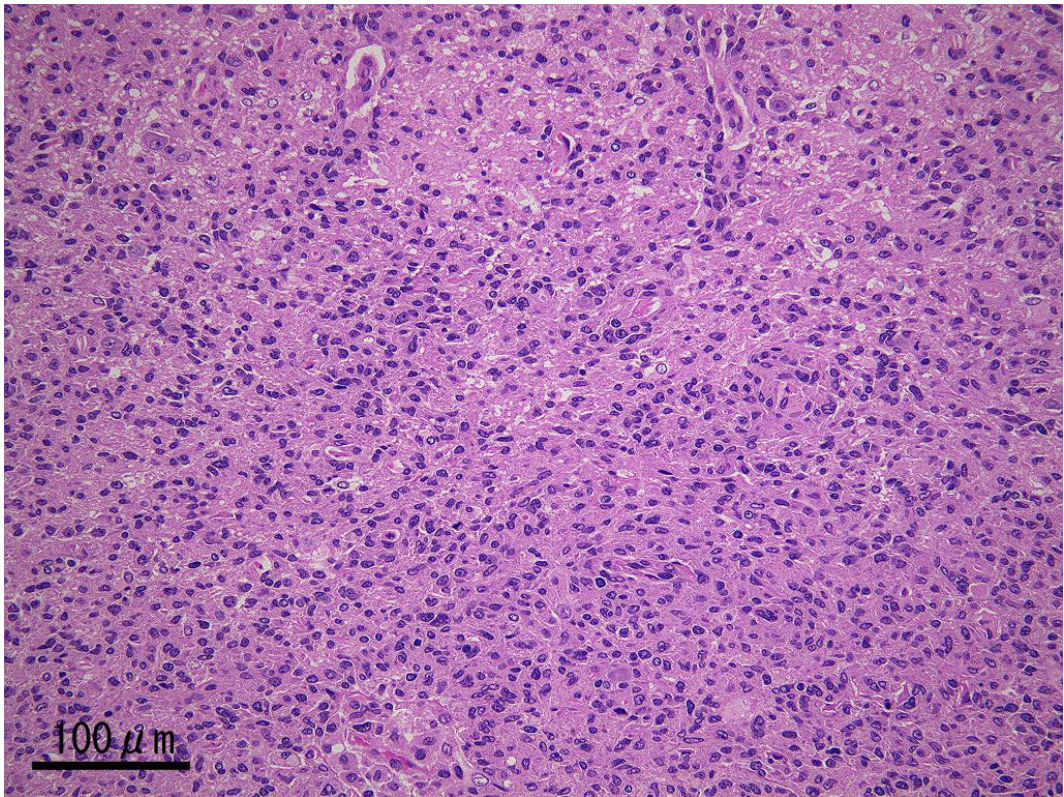
a) 少数:1つの腫瘍巣に1ないし2個程度、散在:対物10倍で、1視野に1ないし2個程度、多数:対物10倍で、1視野に3ないし5個程度。

Table 2-5. 神経上皮性腫瘍の免疫染色結果

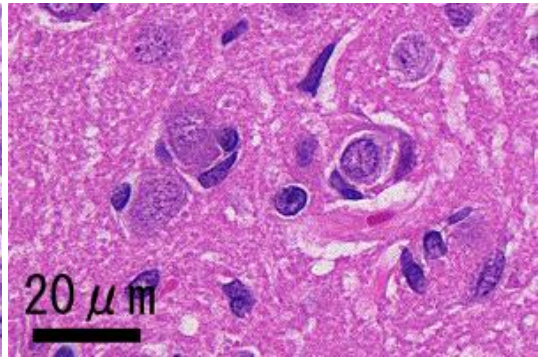
形態別腫瘍細胞	マーカー							
	Iba1	CD68	RM-4	Olig2	GFAP	Nestin	Vimentin	
悪性星状膠細胞腫	星状細胞	+	+ or -	+ or -	-	-	-	+ or -
	円形B細胞	+	+ or -	+ or -	-	-	-	+ or -
	紡錘形細胞	+	± or -	± or -	-	-	-	+ or -
	好酸性顆粒細胞	-	-	-	-	-	-	-
悪性稀突起 膠細胞腫/ 悪性混合神経膠腫	円形A細胞	-	-	-	+	-	-	-
	円形B細胞	-	-	-	+	± or -	-	-
	円形C細胞	-	-	-	+	-	-	-
	紡錘形細胞	-	-	-	-	+ or -	+ or -	+ or -
	大型異型細胞	-	-	-	-	-	-	-

+:陽性、±:弱陽性、-:陰性

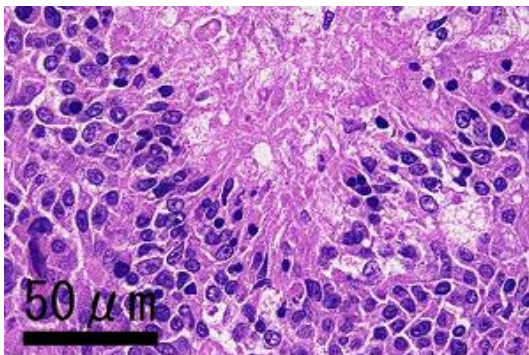
Fig. 2-1 悪性星状膠細胞腫



好酸性顆粒細胞



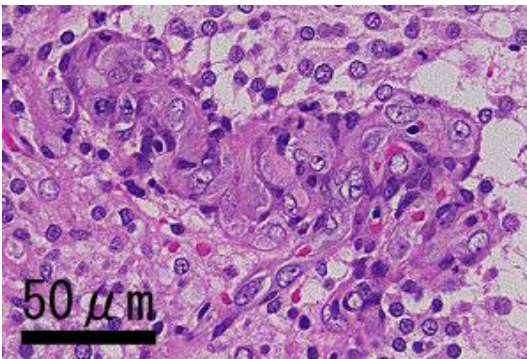
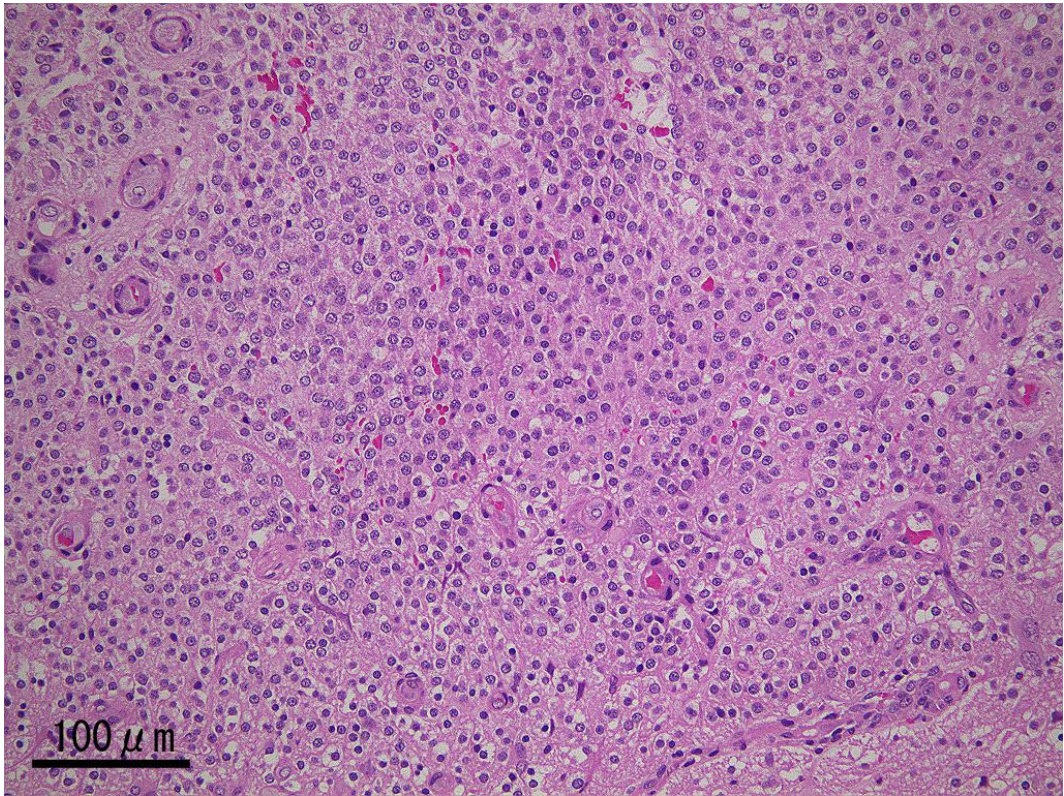
神経細胞周囲の衛星現象



壊死巣周囲の柵状配列

腫瘍細胞は星状細胞が主体で、好酸性顆粒細胞の混在、神経細胞周囲の衛星現象および壊死巣周囲の柵状配列を特徴とする。

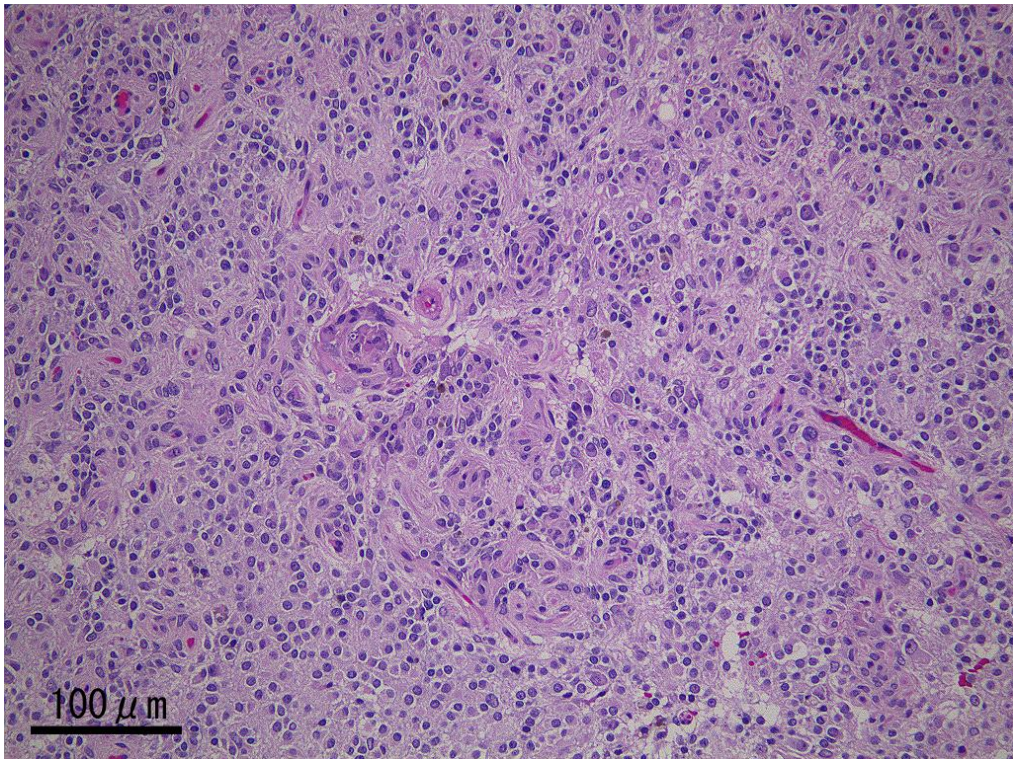
Fig. 2-2 悪性稀突起膠細胞腫



均一な円形細胞がシート状に配列し、内皮の増生を伴う血管増生を特徴とする。

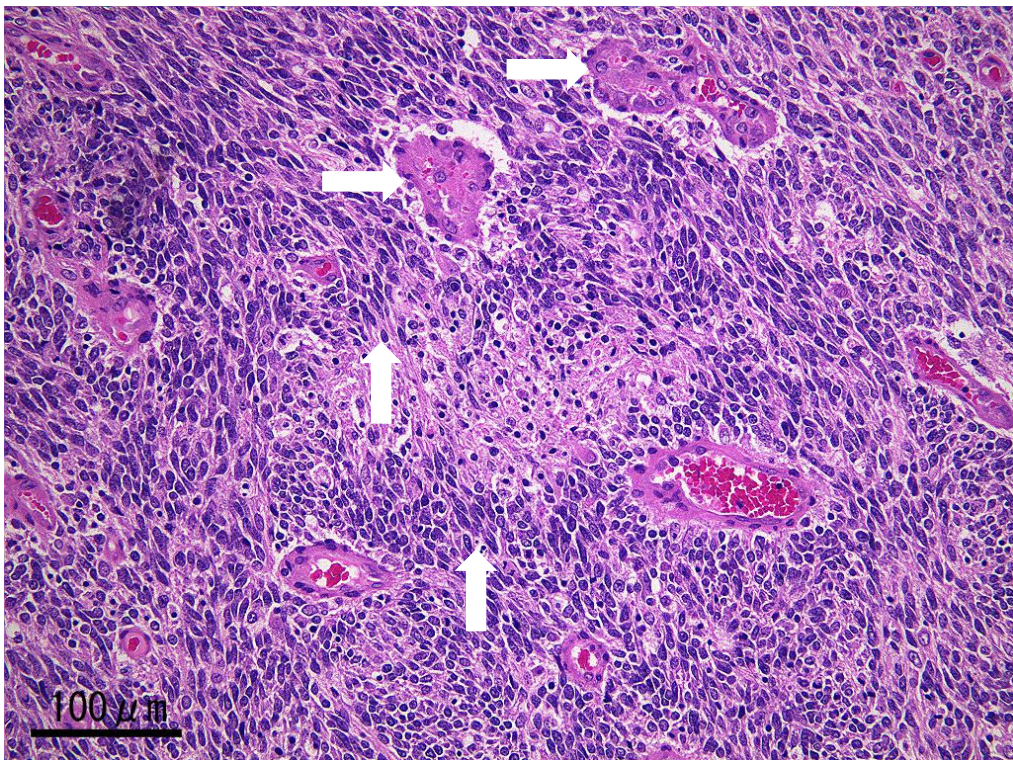
内皮の増生を伴う血管増生

Fig. 2-3 悪性混合神経膠細胞腫



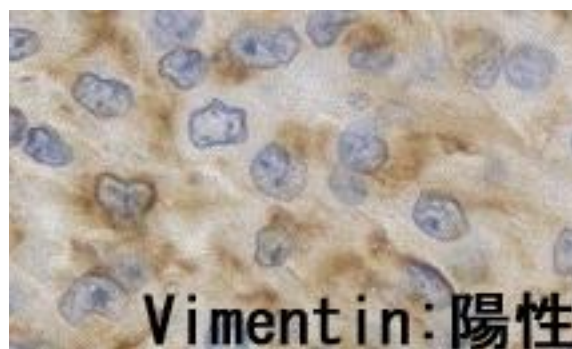
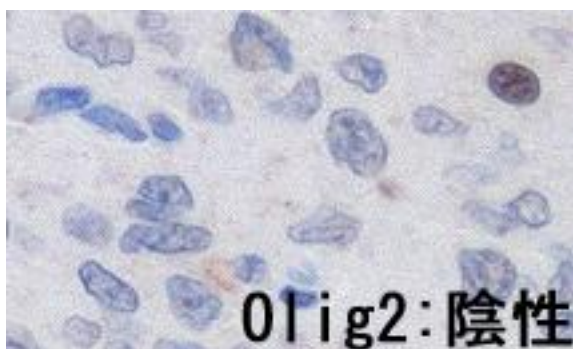
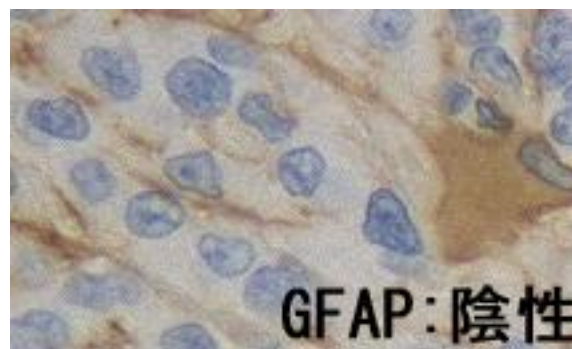
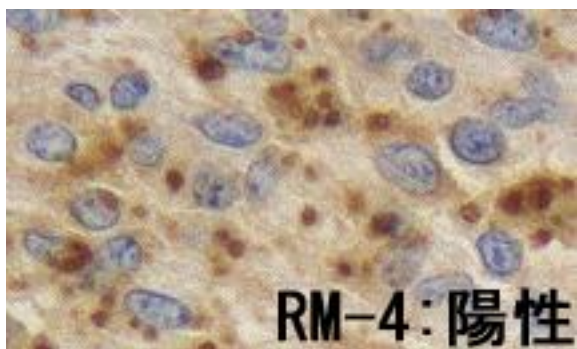
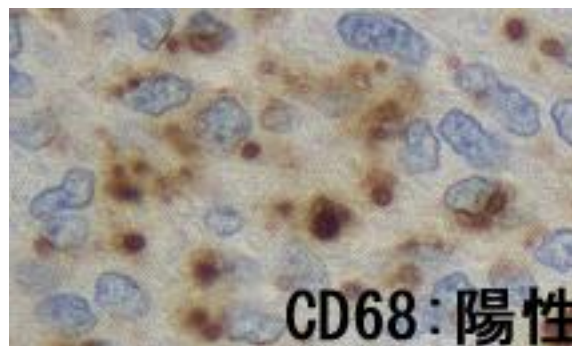
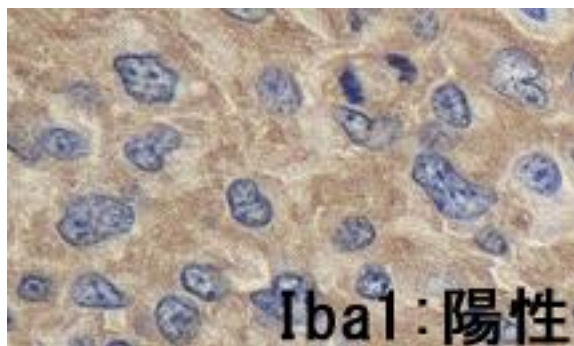
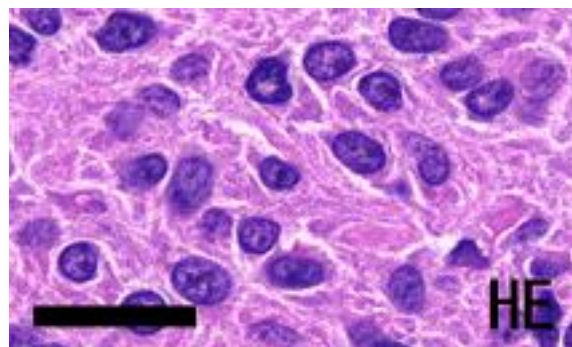
円形細胞と紡錘形細胞が混在している。

Fig. 2-4 髄芽腫



carrot-shape核を有する紡錘形細胞が密に増殖し、内皮の増生を伴う血管増生(横向き矢印)および壊死巣周囲の柵状配列(上向き矢印)がみられる。

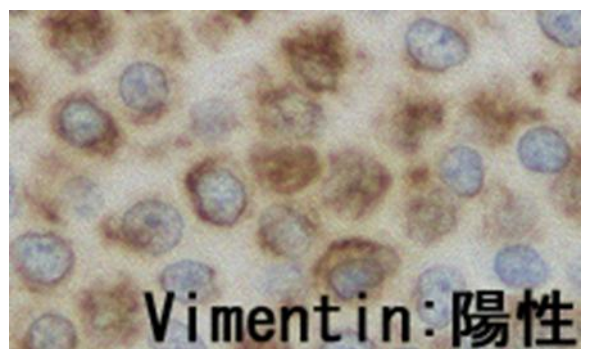
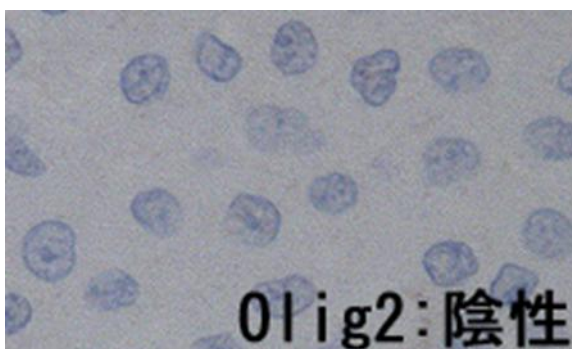
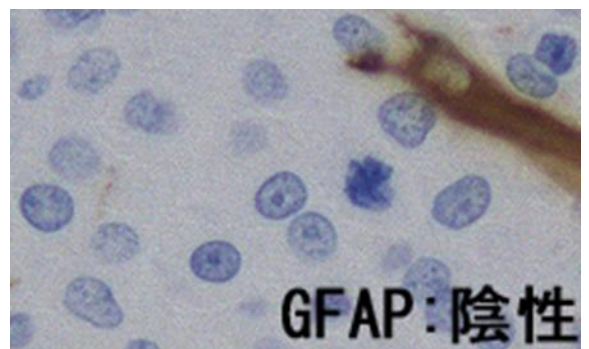
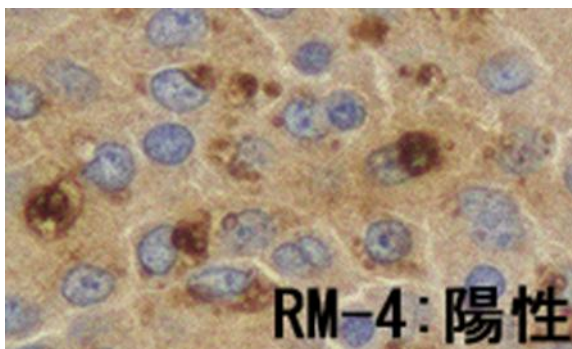
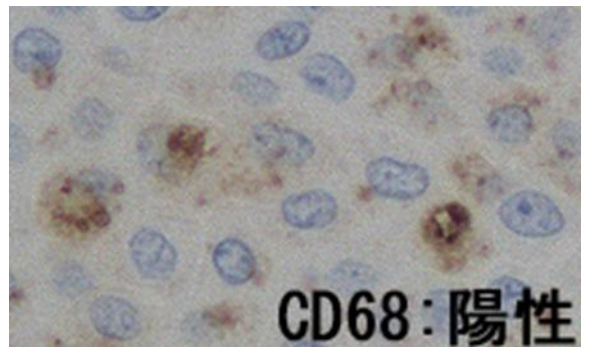
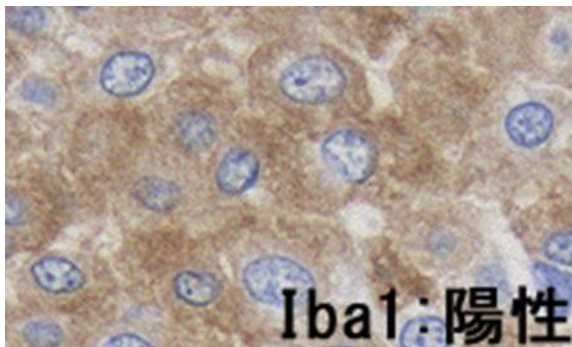
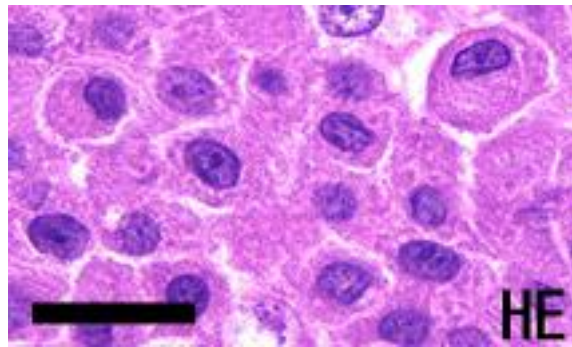
Fig. 2-5 悪性星状膠細胞腫の星状細胞のHEおよび免疫染色



星状細胞は、Iba1, CD68, RM-4とVimentinに陽性であるが、GFAPとOlig2には陰性である。

Bar=20μm

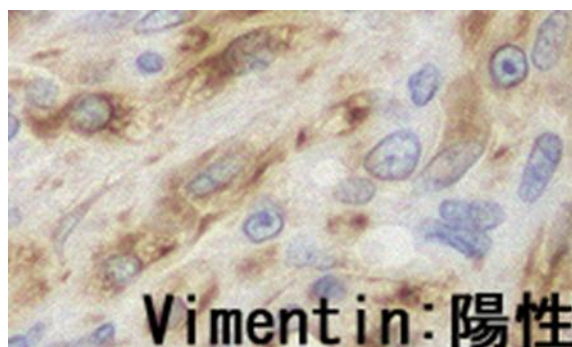
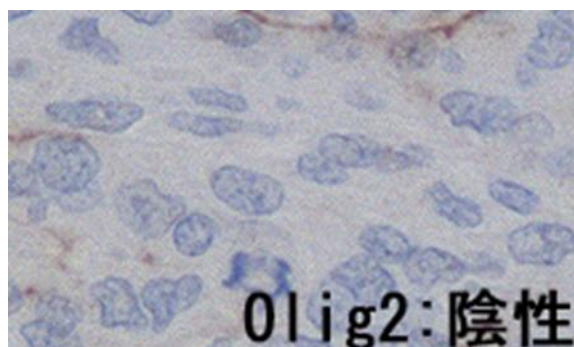
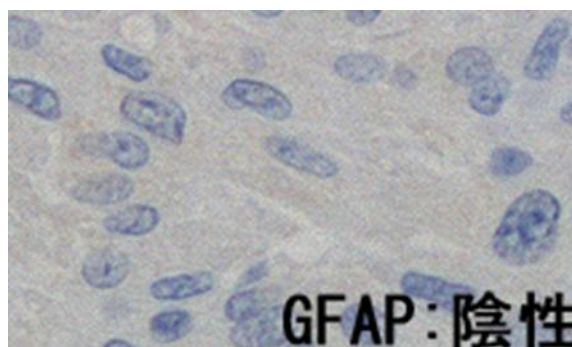
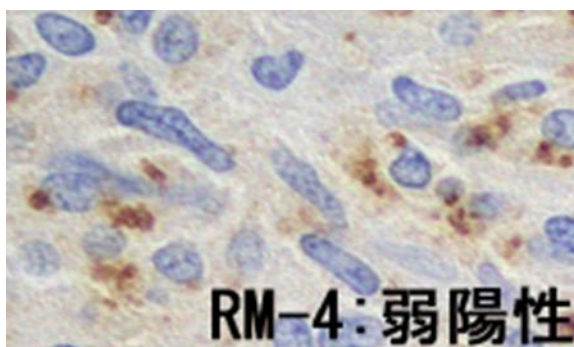
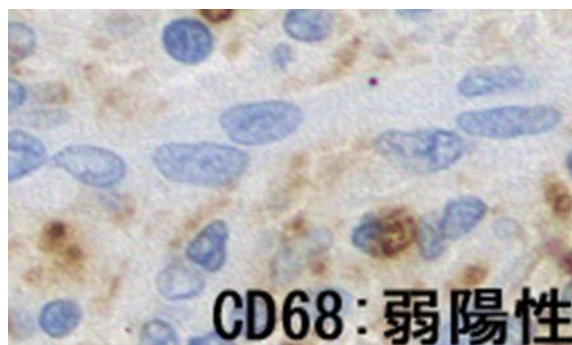
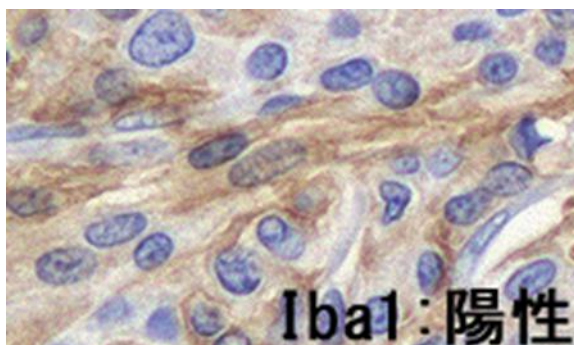
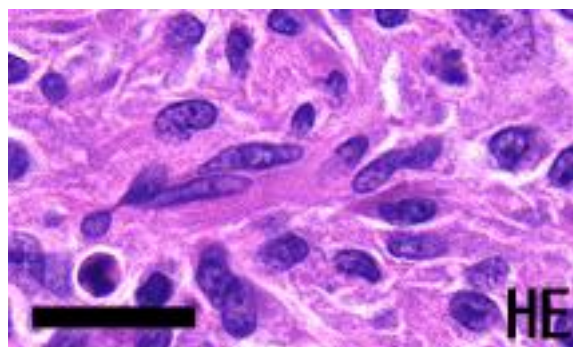
Fig. 2-6 悪性星状膠細胞腫の円形B細胞のHEおよび免疫染色



円形細胞は、Iba1, CD68, RM-4とVimentinに陽性であるが、GFAPとOlig2には陰性である。

Bar=20μm

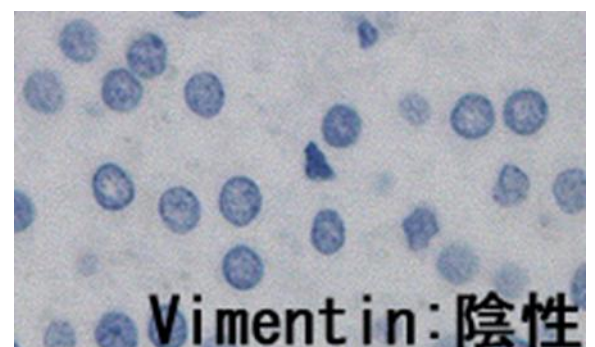
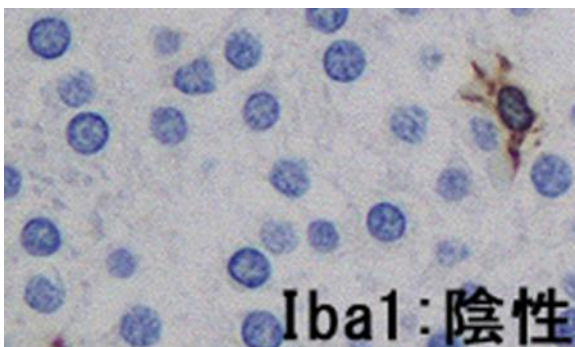
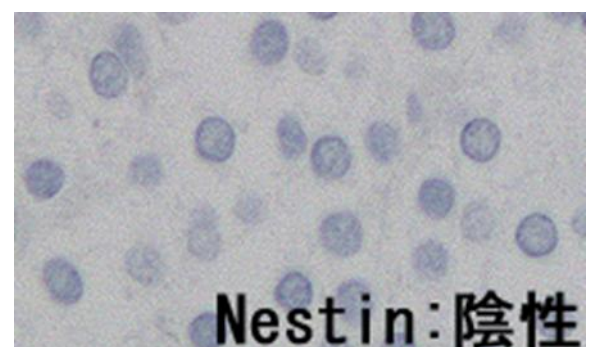
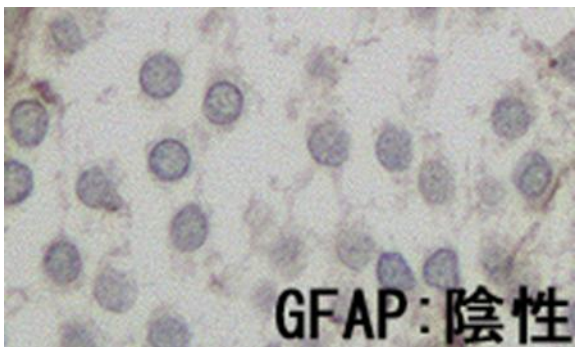
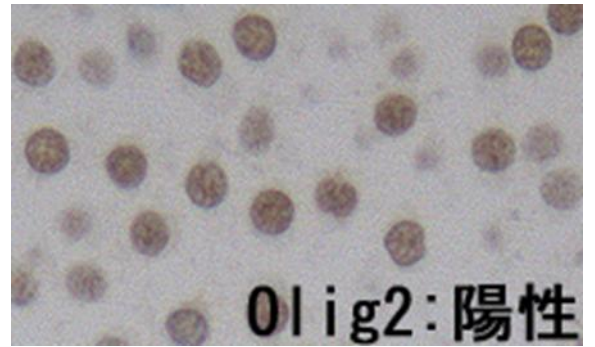
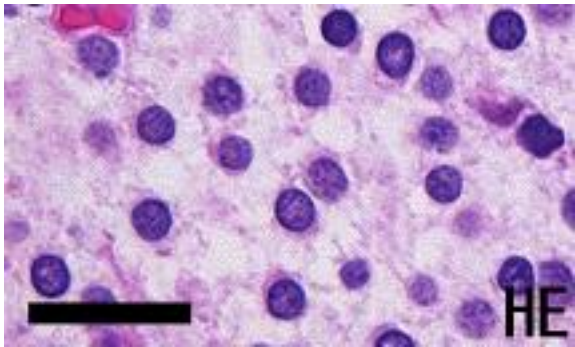
Fig. 2-7 悪性星状膠細胞腫の紡錘形細胞のHEおよび免疫染色



紡錘形細胞は、Iba1, CD68, RM-4とVimentinに陽性ないし弱陽性であるが、GFAPとOlig2には陰性である。

Bar=20μm

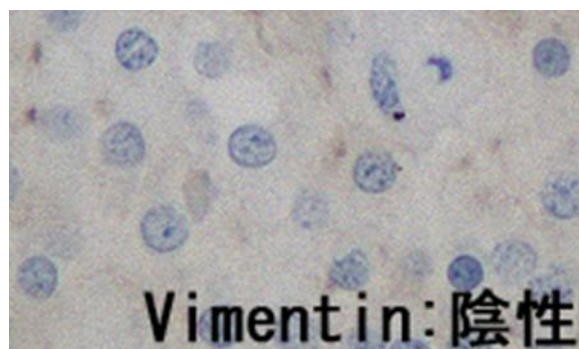
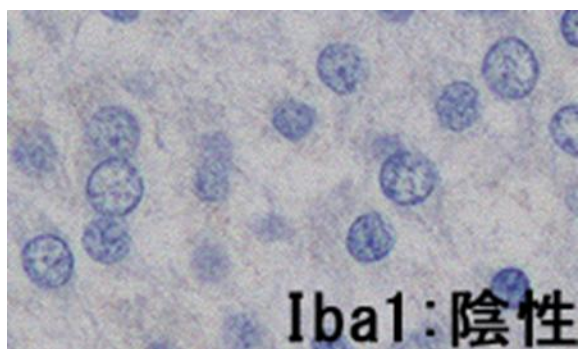
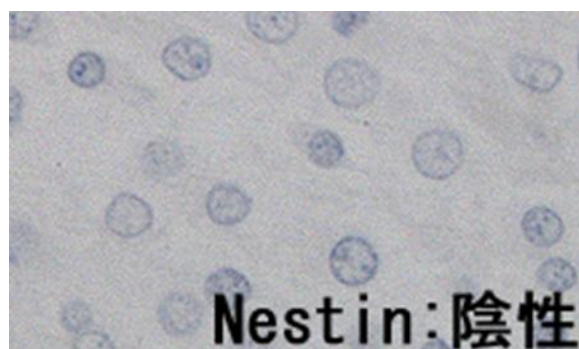
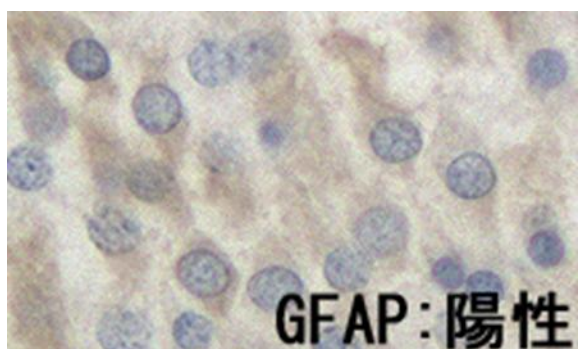
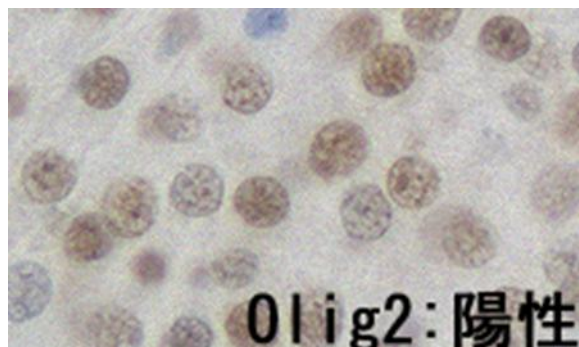
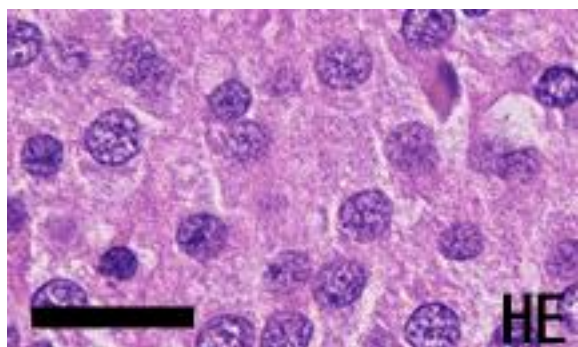
Fig. 2-8 悪性希突起膠細胞腫/悪性混合神経膠腫の円形A細胞の
HEおよび免疫染色



円形A細胞は、Olig2陽性で、GFAP, Nestin, Iba1とVimentinに陰性である。

Bar=20 μ m

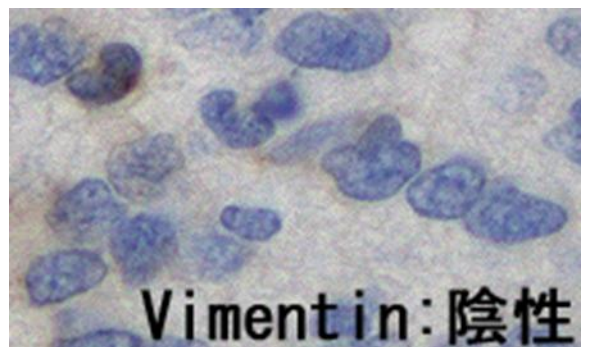
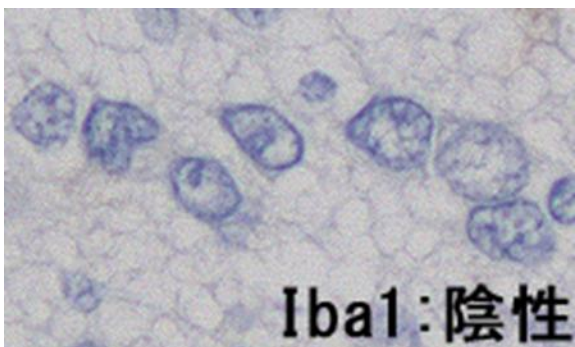
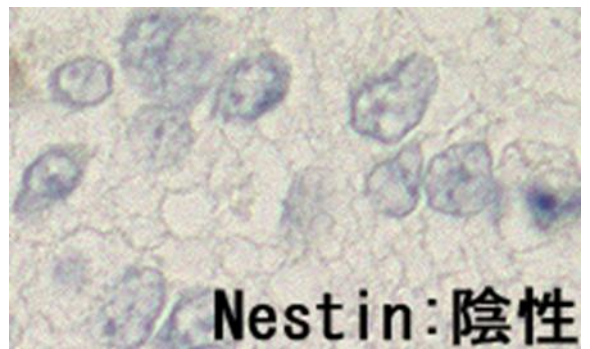
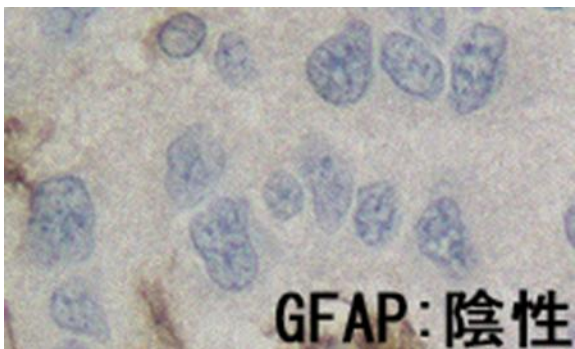
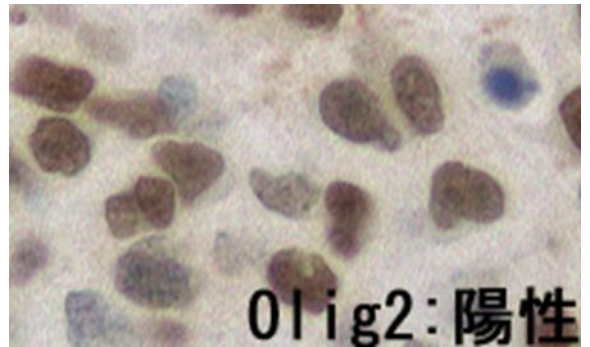
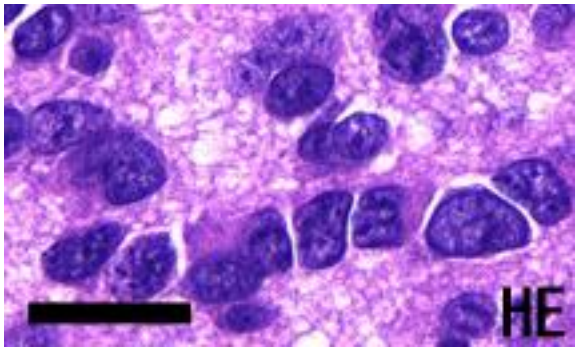
Fig. 2-9 悪性希突起膠細胞腫/悪性混合神経膠腫の円形B細胞の
HEおよび免疫染色



円形B細胞は、Olig2とGFAPに陽性で、Nestin、Iba1とVimentinに陰性である。

Bar=20 μ m

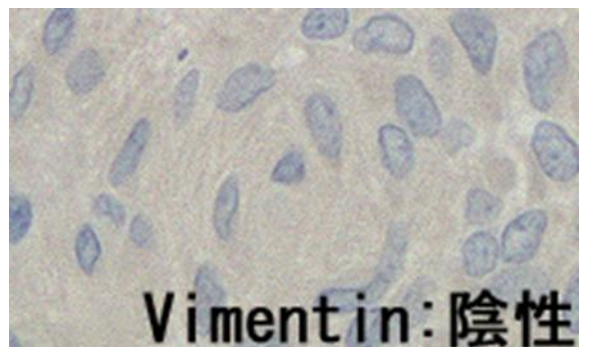
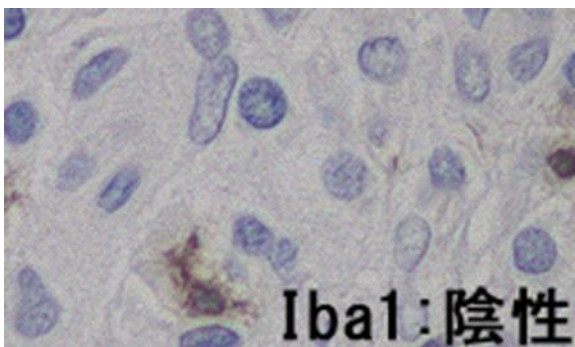
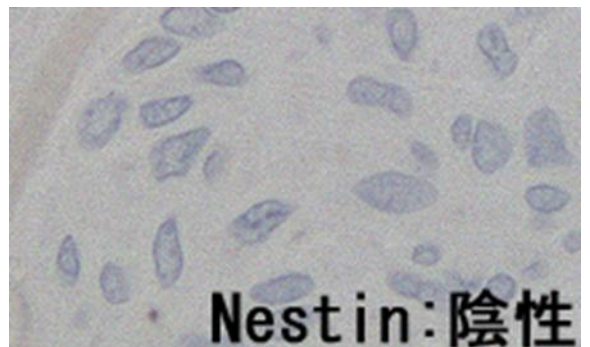
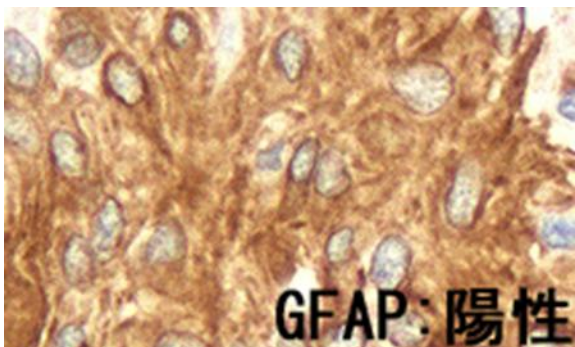
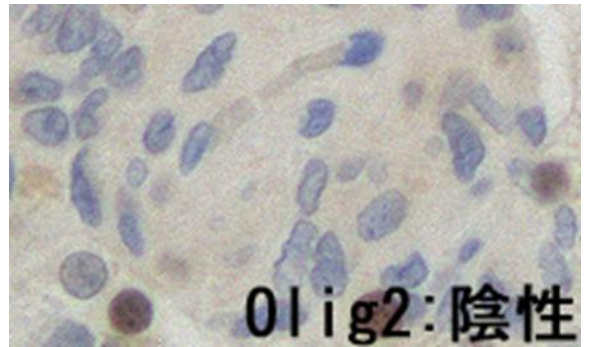
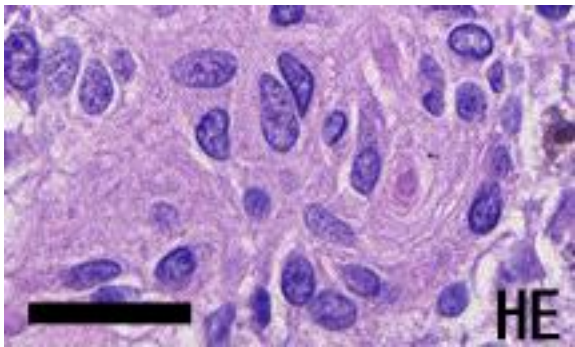
Fig. 2-10 悪性希突起膠細胞腫/悪性混合神経膠腫の円形C細胞の
HEおよび免疫染色



円形C細胞は、Olig2陽性で、GFAP, Nestin, Iba1とVimentinに陰性である。

Bar=20 μ m

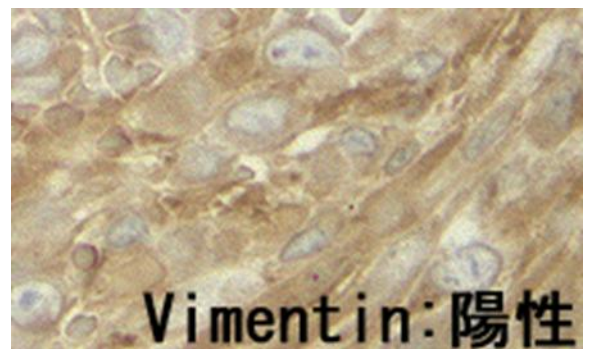
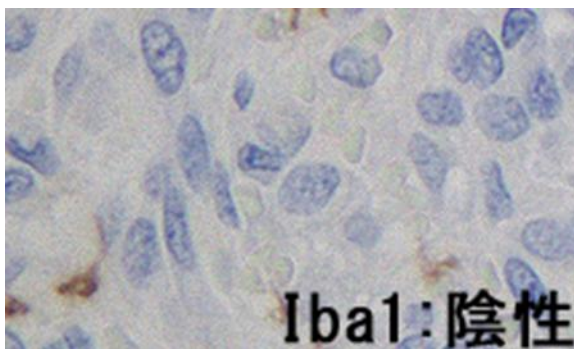
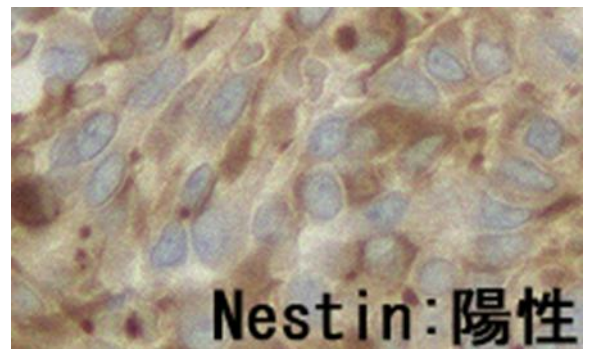
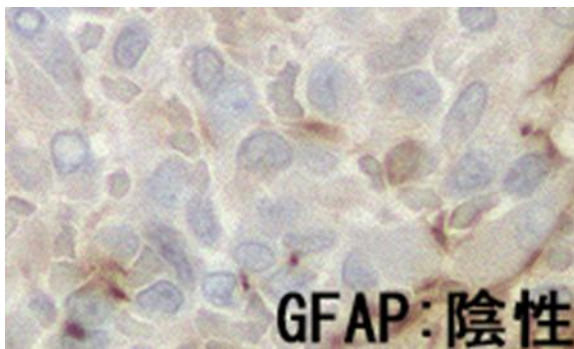
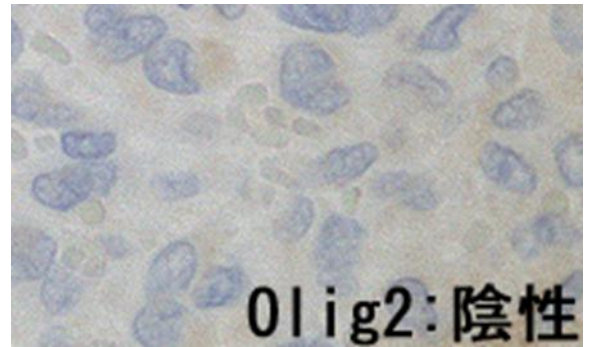
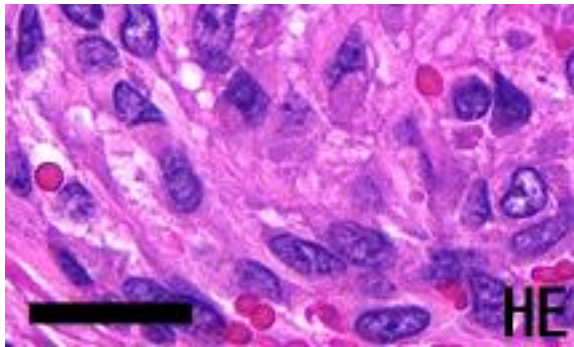
Fig. 2-11 悪性希突起膠細胞腫/悪性混合神経膠腫の
紡錘形細胞(GFAP:陽性)のHEおよび免疫染色



紡錘形細胞は、GFAP陽性で、Olig2, Nestin, Iba1とVimentinに陰性である。

Bar=20 μ m

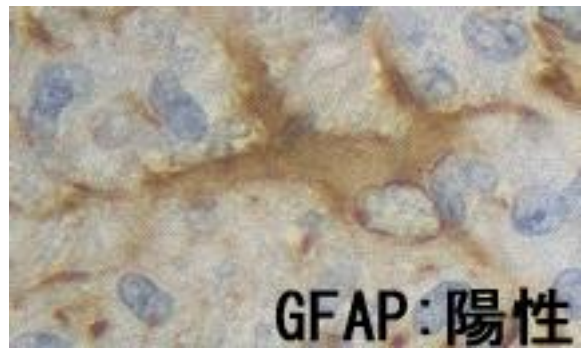
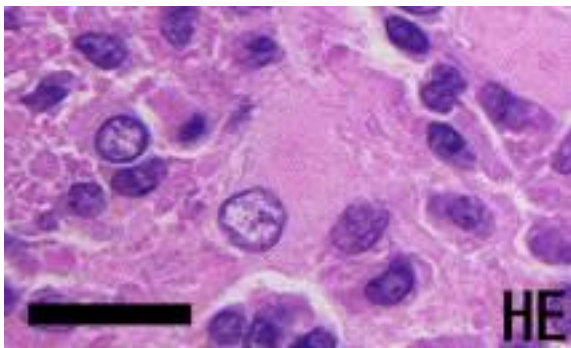
Fig. 2-12 悪性希突起膠細胞腫/悪性混合神経膠腫の紡錘形細胞(Nestin:陽性)のHEおよび免疫染色



紡錘形細胞は、NestinとVimentinに陽性で、GFAP, Olig2とIba1に陰性である。

Bar=20μm

Fig. 2-13 反応性星状膠細胞の
HEおよび免疫染色



反応性星状膠細胞は、GFAP陽性である。

Bar=20 μ m

第 3 章

ラットの星状膠細胞腫と悪性細網症における病理組織形態学および免疫組織化学的特徴

序

第 2 章において、ラットでは悪性星状膠細胞腫以外の自然発生性神経上皮性腫瘍は病理組織形態学的特徴がヒトやイヌのそれに類似し、悪性稀突起膠細胞腫と悪性混合神経膠細胞腫は稀突起膠細胞または星状膠細胞由来の腫瘍であることが確認された。一方、ラットの悪性星状膠細胞腫は特有な形態と免疫組織化学的特徴から他の神経上皮性腫瘍と異なり組織球あるいはミクログリア由来である可能性が示唆された。

ラットの原因性脳腫瘍のひとつである悪性細網症は、組織球、ミクログリアあるいはリンパ球由来であることが示唆されている[Garman; 1988, Solleveld *et al*; 1990, Krinke *et al*; 2000, Kaufmann *et al*; 2012]。実際、第 1 章においてもこの腫瘍は発生率が極めて低いながら確認された。INHAND では、悪性細網症は悪性星状膠細胞腫と組織像が類似し鑑別が困難であることから、これら両腫瘍の鑑別的手段として免疫組織化学的手法を推奨している[Kaufmann *et al*; 2012]。

そこで本章では、形態学的にそれぞれ診断された悪性星状膠細胞腫と悪性細網症について病理組織形態学的特徴をさらに詳細に検討しそれぞれ

を細分類した。加えて腫瘍の由来を検索するために、細分類した各腫瘍について GFAP、Nestin、Olig2、Iba1、CD68、RM-4、CD3、CD45RA、Vimentin の発現をしらべた。

材料と方法

【症例】

症例はいずれも日本チャールスリバー株式会社から購入したF344ラットおよびSDラットで、毒性試験および癌原性試験の対照群と中枢神経系に被験物質の影響がみられなかった投与群から集めた。悪性星状膠細胞腫60例は第2章で用いたもので、悪性細網症4例については、悪性星状膠細胞腫と同じ試験群である1つの慢性毒性試験と15の癌原性試験で認められた腫瘍を用いた。

【形態観察】

動物を剖検後、脳と脊髄は10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定、パラフィン包埋し、HE染色を施した。認められた中枢神経系組織腫瘍をINHAND分類[Kaufmann et al; 2012] に従って分類した。さらに、悪性星状膠細胞腫は3型（A型，B型，C型）に、悪性細網症は2型（D型，E型）に細分類（Table 3-1）し、病理組織学的形態像を比較検討した。

以下にその細分類基準を示す。

- ・悪性星状膠細胞腫A型：脳実質に腫瘍細胞密度の低い病巣が一カ所みられる。

- ・悪性星状膠細胞腫B型：脳実質に腫瘍細胞密度の高い病巣が単発する、または腫瘍細胞が周囲組織、血管周囲あるいは髄膜に浸潤する。
- ・悪性星状膠細胞腫C型：壊死巣周囲に腫瘍細胞の柵状配列がみられる。
- ・悪性細網症D型：腫瘍細胞が髄膜と血管周囲に浸潤し、かつ脳実質にも広範囲に浸潤する。
- ・悪性細網症E型：腫瘍細胞が髄膜と血管周囲に浸潤するが、脳実質への浸潤は明らかでない。

【免疫染色】

悪性星状膠細胞腫については、第2章で実施した Iba1、CD68、RM-4、Olig2、GFAP、Nestin および Vimentin に対する免疫染色標本を用いた。評価した16例の Olig2 染色標本の内訳は、悪性星状膠細胞腫 A 型の3例、B 型11例、C 型2例であった。また、第2章で実施した6例の CD3 と CD45RA 染色標本の内訳は、悪性星状膠細胞腫の A 型の2例、B 型2例、C 型2例であった。

悪性細網症と診断した上述の症例について、Iba1、CD68、RM-4、Olig2、GFAP、Nestin および Vimentin に対する免疫染色を実施した。用いた一次抗体は第2章で用いたものと同様であり、Olig2 染色については、悪性細網症

D 型 1 例と E 型 1 例で評価し、他の症例は正常な稀突起膠細胞が陽性でなかったため、評価できなかった。また、悪性細網症 D 型 1 例と E 型 1 例については、このほかに CD3 と CD45RA の免疫染色を実施した。

免疫染色は第 2 章と同様に、EnVision kits (Dako North America, CA, USA) を用いた Labeled polymer 法で実施した。脱パラフィン後、切片を 0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) に浸し、抗原賦活化を行った。その後、すべての切片を 3%過酸化水素・メタノール溶液を用いて室温で 10 分間処理して内因性ペルオキシダーゼを不活化し、プロテインブロック (Dako North America) を用いて室温で 10 分間処理して非特異反応を抑制した後、一次抗体と 4°C一晩で反応させた。標識二次抗体にはポリマー試薬 (EnVision^{TM+} Rabbit/HRP、Dako North America) を用い、室温で 30 分間反応した。発色には DAB(和光純薬工業、大阪)を、後染色にはヘマトキシリンを用いた。

結 果

【悪性星状膠細胞腫と悪性細網症の病理組織形態学的特徴】

病理組織形態学的特徴により悪性星状膠細胞腫 (Fig. 3-1) を A 型、B 型、C 型に、悪性細網症 (Fig. 3-2) を D 型、E 型に分類した (Table 3-2)。

悪性星状膠細胞腫と悪性細網症の腫瘍細胞の形態は類似し、悪性星状膠細胞腫 A 型、B 型、C 型と悪性細網症 D 型、E 型のいずれの腫瘍においても、腫瘍細胞は星状細胞が主体であった。悪性星状膠細胞腫 A 型以外のタイプ別腫瘍には星状細胞のほかにも円形細胞が混在し、さらに、悪性星状膠細胞腫 B と C 型および悪性細網症 D 型には好酸性顆粒細胞が散見された。

悪性星状膠細胞腫と悪性細網症の病理組織形態学的特徴は類似していた。すなわち、悪性星状膠細胞腫 A 型、B 型、C 型と悪性細網症 D 型、E 型のいずれも腫瘍の境界は不明瞭で、腫瘍細胞は血管周囲および髄膜に頻繁に浸潤していた。また、両腫瘍のすべてのタイプ別腫瘍に共通して、腫瘍細胞が神経細胞の周りを取り囲む「衛星現象」がみられたが、内皮増生を伴う血管増生はみられなかった。なお、悪性星状膠細胞腫の C 型 (Fig. 3-1) の診断基準とした壊死巣周囲の柵状配列は、その他のタイプ別腫瘍にはみられなかった。

【悪性星状膠細胞腫および悪性細網症のタイプ別腫瘍の免疫染色】

悪性星状膠細胞腫の A 型、B 型、C 型および悪性細網症の D 型、E 型のタイプ別腫瘍における免疫染色結果を Table 3-3 に示した。悪性星状膠細胞腫と悪性細網症のタイプ別腫瘍は、いずれも免疫組織化学的に概ね同様の反応性を示した。

悪性星状膠細胞腫（A 型：Fig. 3-3、B 型：Fig. 3-4、C 型：Fig. 3-5、）では、Iba1 は A 型、B 型および C 型のすべての腫瘍、CD68、RM-4 および Vimentin はそれぞれ半数例以上の腫瘍が陽性であった。GFAP および Olig2 に関しては、A 型、B 型および C 型のいずれの腫瘍も陰性であった。Nestin については、少数の B 型および C 型で、陽性細胞が少数個みられた。

悪性細網症（D 型：Fig. 3-6、E 型：Fig. 3-7）では、CD68 が D 型で陽性、Iba1、CD68、RM-4 および Vimentin が D 型および E 型で陽性、GFAP、Olig2 および Nestin が D 型と E 型で陰性であった。

なお、CD3 と CD45RA は悪性星状膠細胞腫の A 型、B 型、C 型および悪性細網症 D 型、E 型で陰性であった。

考 察

本章の結果から、悪性星状膠細胞腫の組織形態学的特徴とされている壊死巣周囲の柵状配列、神経細胞周囲の衛星現象および好酸性顆粒細胞の出現のうち、後二者は悪性細網症でもみとめられ、これまで髄膜および血管周囲への浸潤の程度差で分けられていた悪性星状膠細胞腫と悪性細網症の間に本質的な組織学的相違がないことが明らかとなった。さらに、免疫組織化学的にも両者は同様の反応性を示した。これらのことから悪性星状膠細胞腫と悪性細網症は同一起源の腫瘍と考えられた。

今回組織形態学的に悪性星状膠細胞腫および悪性細網症と診断された症例は、いずれもミクログリアあるいは組織球系細胞のマーカーである Iba1、CD68 および RM-4 に陽性であった。CD68 および RM-4 は、ともにリボソーム膜あるいはエンドソーム膜のマーカー [Iyonaga *et al*; 1997, Damoiseaux *et al*; 1994] で、CD68 陽性細胞は radial glia のマーカーである 3CB2 も陽性であるという報告 [Wu *et al*; 2005¹] がある。一方で、radial glia は GFAP および Nestin 陽性と報告されている [Shibuya *et al*; 2003] が、本研究で検索した悪性星状膠細胞腫および悪性細網症の腫瘍細胞は共通して GFAP 陰性であった。また、数例の悪性星状膠細胞腫で Nestin 陽性細胞がみられ

たが、その数は非常に少なく腫瘍細胞が Nestin 陽性とは考えられなかった。

これらのことから、これら腫瘍の起源として radial glia は除外すべきと考えられた。Iba1 は一般にミクログリアのマーカーとして用いられ[Wu *et al*; 2005²]、Kolenda-roberts らは Iba1 陽性のラットの脳腫瘍をミクログリオーマと診断している[Kolenda-Roberts *et al*; 2013]。しかしながら、Iba1 は、ミクログリアだけでなく種々の組織球にも陽性となる[Rehg *et al*; 2012]ことから、ラットの中枢神経系組織に発生した Iba1、CD68 および RM-4 陽性の細胞から成る腫瘍は、現時点ではミクログリア由来と断定するのではなく、中枢神経系組織原発の組織球あるいはミクログリア由来の腫瘍とするのが妥当と考えられた。

INHAND では「悪性星状膠細胞腫の中には腫瘍性稀突起膠細胞を腫瘍細胞の 20%以下の割合で含むものもある」とされている。今回悪性星状膠細胞腫と診断した症例には、Olig2 陽性の腫瘍細胞がみられなかったことから、これらの悪性星状膠細胞腫は腫瘍性稀突起膠細胞を含んでおらず、真の星状膠細胞腫ではなく、組織球あるいはミクログリア由来の腫瘍である可能性が高いと考えられた。加えて、壊死巣周囲の柵状配列はラットの組織球肉腫の特徴所見でもある[Ogasawara *et al*; 1993]。さらに、第 1 章で診断した悪性星状膠細胞腫のほとんどは本章で検索した同腫瘍と同様な病理組織形

態学的特徴を有していたことから、これまで悪性星状膠細胞腫と診断していたラットの腫瘍の大部分は実は組織球あるいはミクログリア由来の腫瘍であると考えられた。

要 旨

ラットの悪性星状膠細胞腫と悪性細網症の鑑別のために、これらの腫瘍を細分類し病理組織形態学的特徴を比較、検討した。さらに、これらの腫瘍の由来をしらべるために、GFAP、Nestin、Olig2、Iba1、CD68、RM-4、CD3、CD45RA および Vimentin について免疫組織化学的検索を行った。その結果、1) ラットの悪性星状膠細胞腫と悪性細網症の間に本質的な組織学的相違がないこと、2) 悪性星状膠細胞腫と悪性細網症は、いずれも GFAP と Olig2 陰性、Iba1、CD68 と RM-4 陽性であることから、ラットでは悪性星状膠細胞腫の大部分と悪性細網症は組織球あるいはミクログリア由来の腫瘍であることが推察された。

Table 3-1. 悪性星状膠細胞腫と悪性細網症の例数

	系統: F344		SD		計
	性: 雄	雌	雄	雌	
悪性星状膠細胞腫	11	7	28	14	60
A型	3	1	2	1	7
B型	6	6	20	9	41
C型	2	0	6	4	12
悪性細網症	2	1	1	0	4
D型	1	0	1	0	2
E型	1	1	0	0	2
計	13	8	29	14	64

Table 3-2 悪性星状膠細胞腫と悪性細網症の病理組織形態学的特徴と腫瘍細胞浸潤パターン

腫瘍型	症例数	腫瘍細胞の形態		腫瘍の境界	腫瘍細胞の浸潤		特徴所見		
		形態	有糸分裂 ^{a)}		血管周囲	髄膜	神経細胞周囲の衛星現象	壊死巣周囲の柵状配列	内皮増生を伴う血管増生
悪性星状膠細胞腫									
A型	7	星状細胞	少数	不明瞭	4/7	2/7	4/7	0/7	0/7
B型	41	星状細胞 円形細胞 紡錘形細胞 好酸性顆粒細胞	少数/散在	不明瞭	33/41	30/41	38/41	0/41	0/41
C型	12	星状細胞 円形細胞 紡錘形細胞 好酸性顆粒細胞	多数	不明瞭/ 明瞭	9/12	11/12	8/12	12/12	0/12
悪性細網症									
D型	2	星状細胞 円形細胞 好酸性顆粒細胞	少数/散在	不明瞭	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2
E型	2	星状細胞 円形細胞	少数/散在	不明瞭	2/2	2/2	1/2	0/2	0/2

a) 少数:100倍視野に<1個、散在:100倍視野に1ないし2個、多数:100倍視野に3ないし5個。

Table 3-3. 悪性星状膠細胞腫と悪性細網症の免疫染色結果

		マーカー						
		Iba1	CD68	RM-4	GFAP ^{a)}	Olig2	Vimentin ^{a)}	Nestin
悪性星状膠細胞腫								
A型 (7例)	Negative	0/7	2/7	1/7	7/7	3/3	1/7	7/7
	Minimal	0/7	1/7 ^{b)}	3/7 ^{b)}	0/7	0/3	2/7 ^{b)}	0/7
	Mild/Moderate	7/7	4/7	3/7	0/7	0/3	4/7	0/7
B型 (41例)	Negative	0/41	2/41	1/41	41/41	11/11	2/41	38/41
	Minimal	0/41	13/41 ^{b)}	18/41 ^{b)}	0/41	0/11	13/41 ^{b)}	3/41 ^{c)}
	Mild/Moderate	41/41	26/41	22/41	0/41	0/11	26/41	0/41
C型 (12例)	Negative	0/12	0/12	0/12	12/12	2/2	0/12	11/12
	Minimal	0/12	2/12 ^{b)}	3/12 ^{b)}	0/12	0/2	1/12 ^{b)}	1/12 ^{c)}
	Mild/Moderate	12/12	10/12	9/12	0/12	0/2	11/12	0/12
悪性細網症								
D型 (2例)	Negative	0/2	0/2	0/2	2/2	1/1	0/2	2/2
	Minimal	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	0/2	0/2
	Mild/Moderate	2/2	2/2	2/2	0/2	0/1	2/2	0/2
E型 (2例)	Negative	0/2	2/2	0/2	2/2	1/1	0/2	2/2
	Minimal	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	0/2	0/2
	Mild/Moderate	2/2	0/2	2/2	0/2	0/1	2/2	0/2

a): 反応性星状膠細胞を除く。

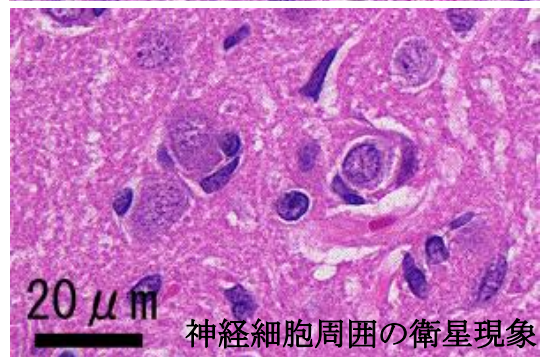
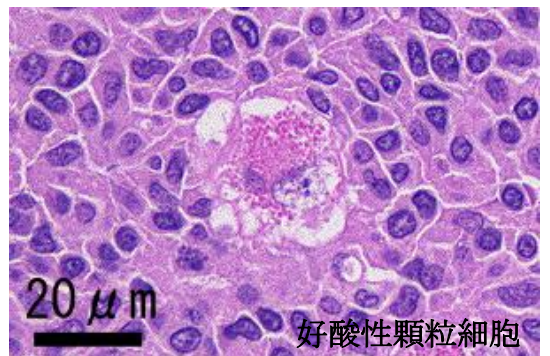
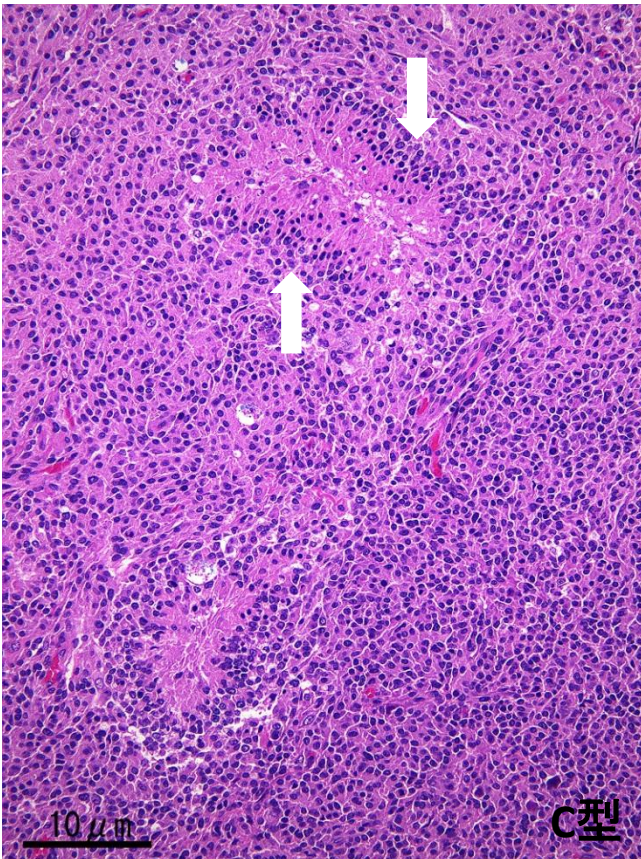
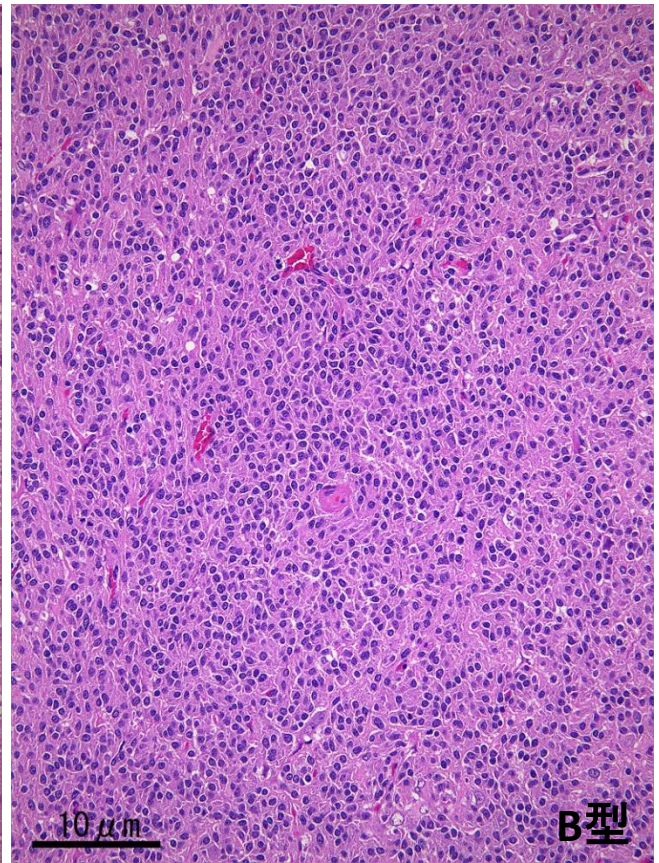
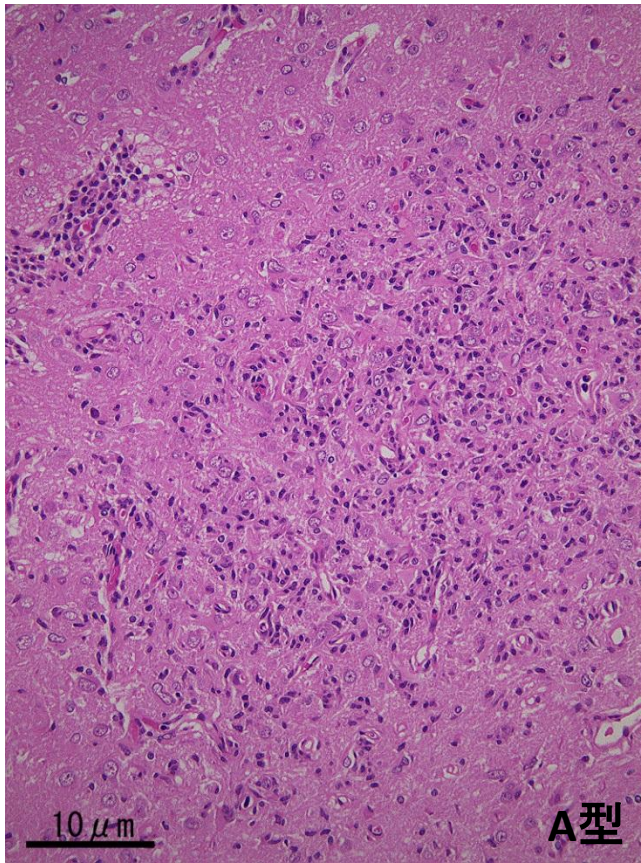
Negative: 陽性細胞はみられない。

Minimal: b) 陽性細胞数が少なく、反応性の小膠細胞あるいはマクロファージの可能性あり。 c) 腫瘍内に陽性細胞が数個みられる程度。

Mild: 1/4から半数程度の腫瘍細胞が陽性を示す。

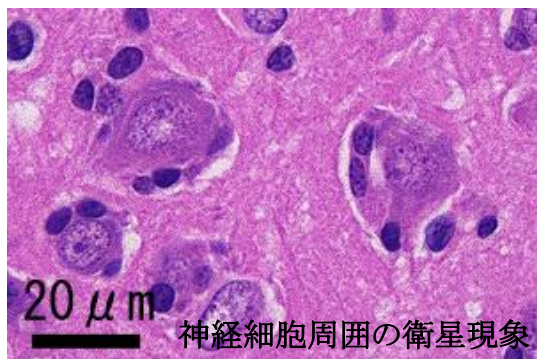
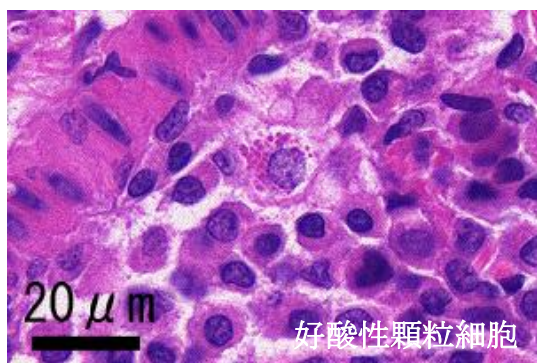
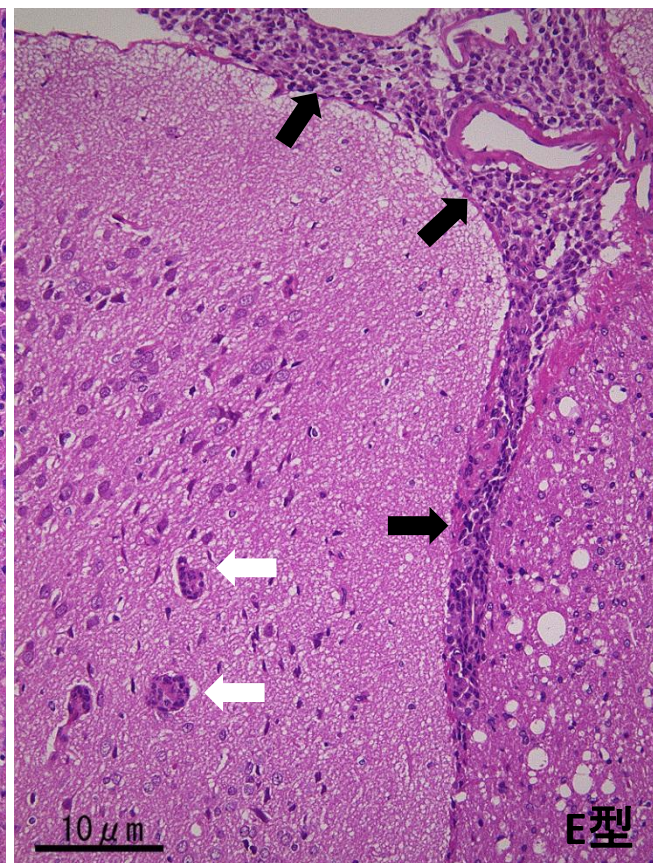
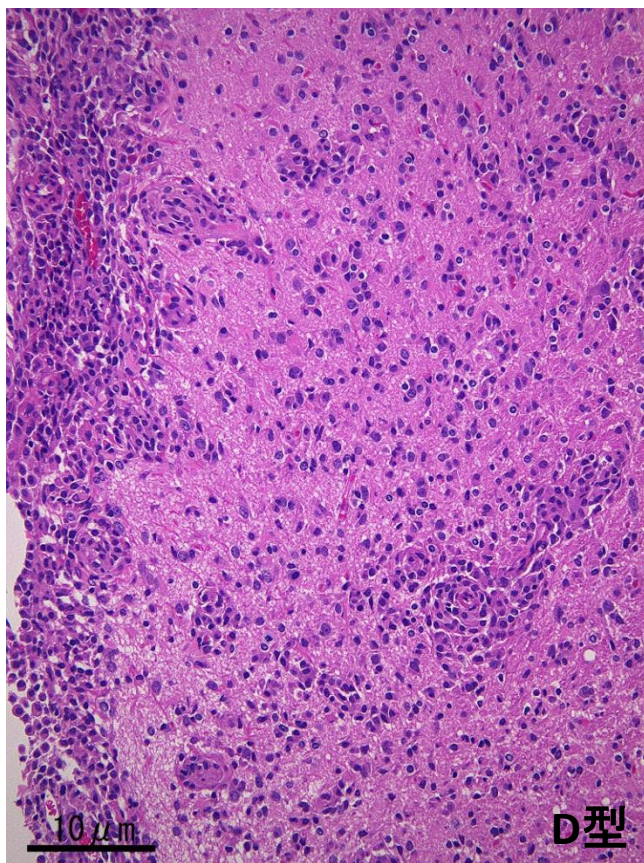
Moderate: 半数以上の腫瘍細胞が陽性を示す。

Fig. 3-1 悪性星状膠細胞腫



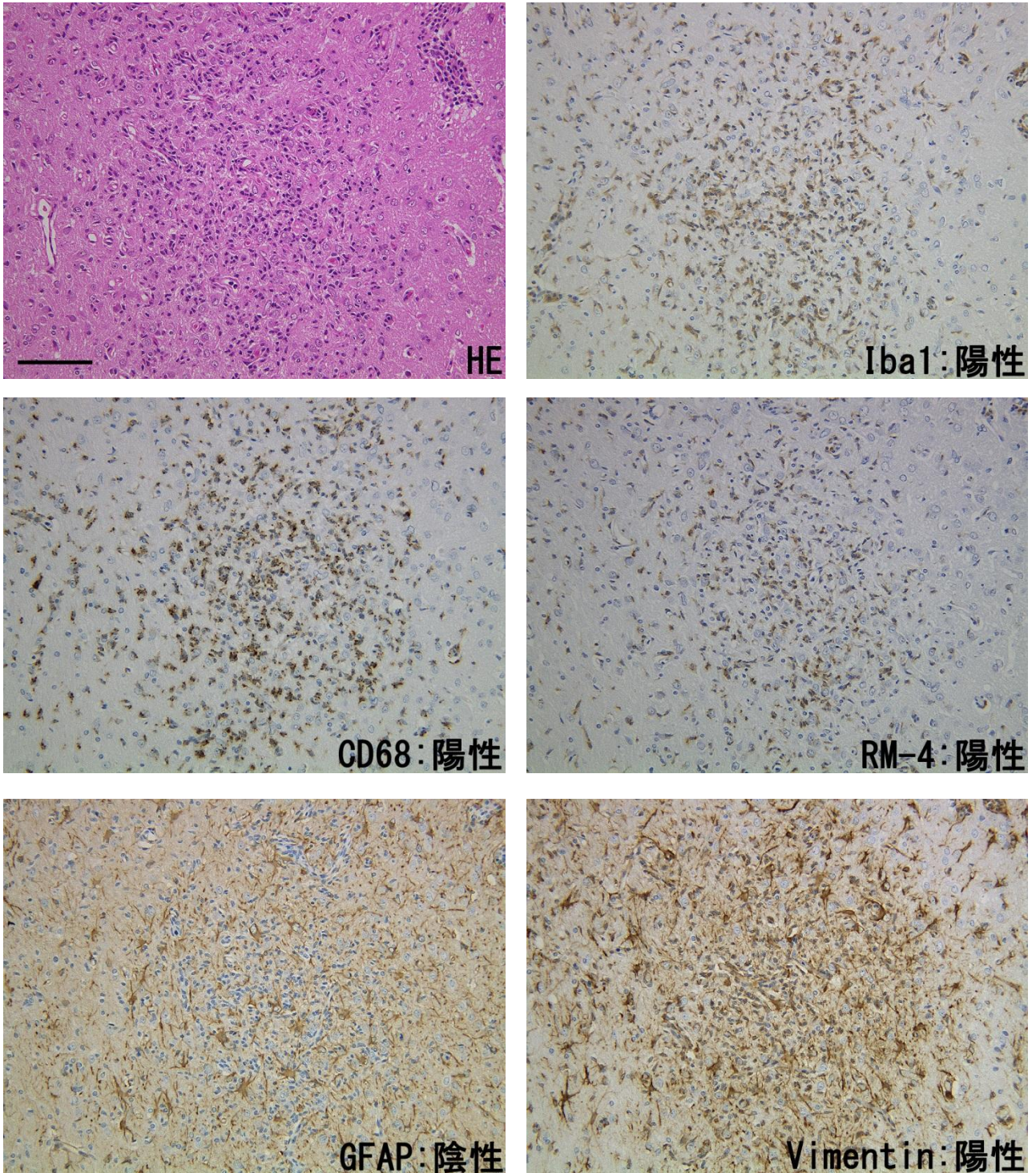
A型は腫瘍細胞密度が低く、B型は腫瘍細胞密度が高い。C型(矢印)には壊死巣周囲の腫瘍細胞の柵状配列がみられる。

Fig. 3-2 悪性細網症



D型では、腫瘍細胞は髄膜、血管周囲および脳実質に浸潤する。
E型では、腫瘍細胞は髄膜(黒矢印)と血管周囲(白矢印)に浸潤するが、脳実質への浸潤は明らかでない。
好酸性顆粒細胞はD型で見られ、神経細胞周囲の衛星現象はD型、E型ともにみられる。

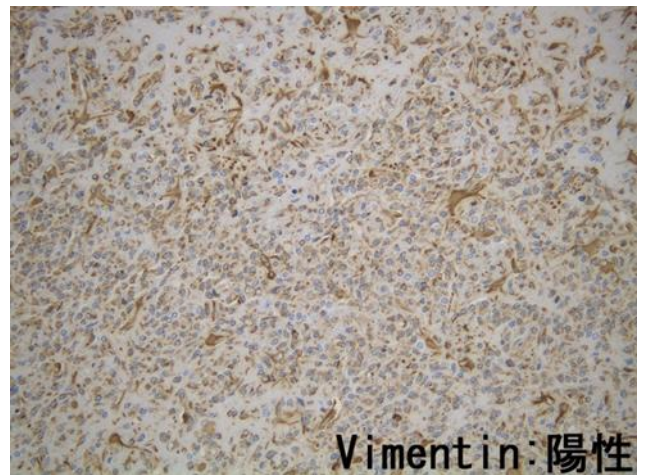
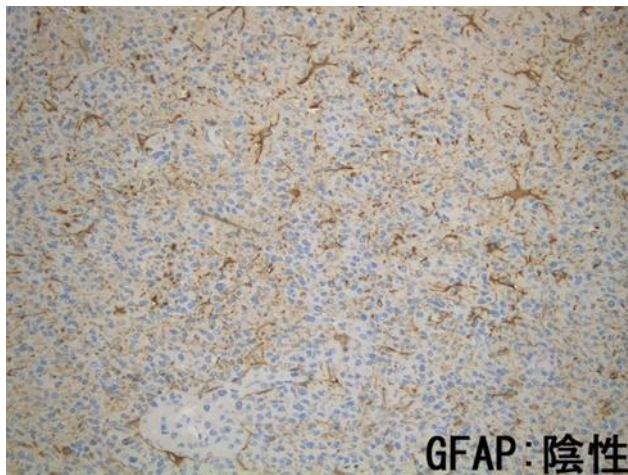
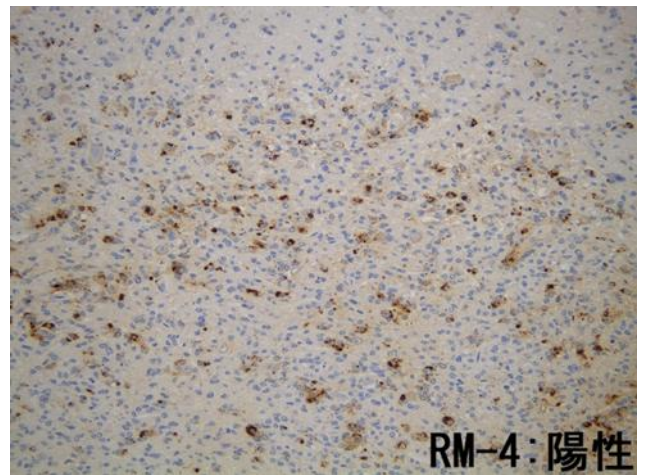
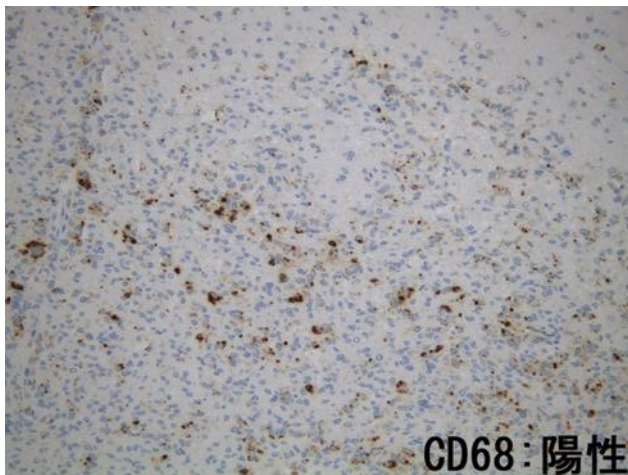
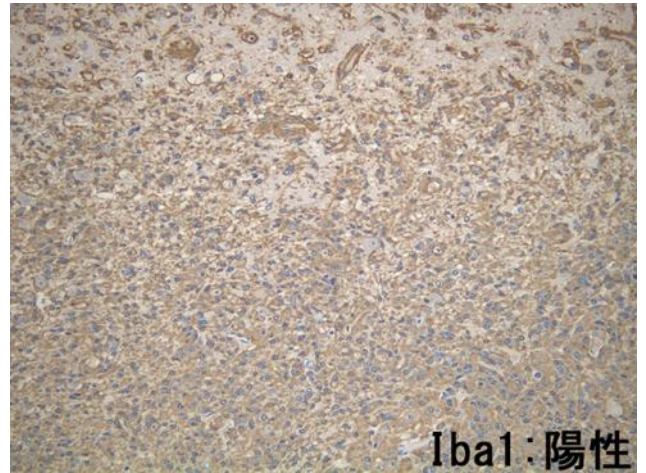
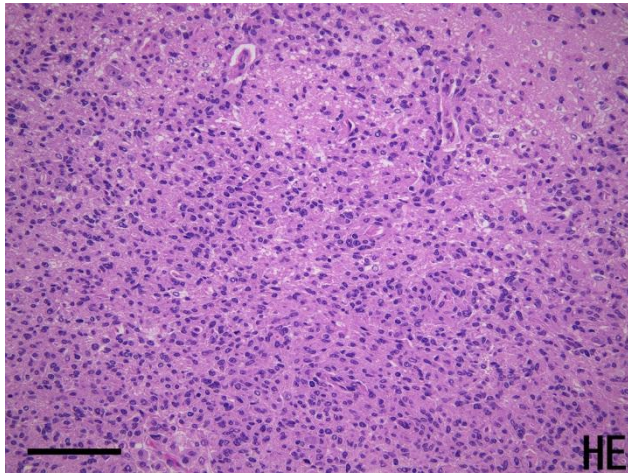
Fig. 3-3 悪性星状膠細胞腫(A型)の免疫染色



悪性星状膠細胞腫のA型は、Iba1, CD68, RM-4とVimentinに陽性であるが、GFAP陰性である。

Bar=100μm

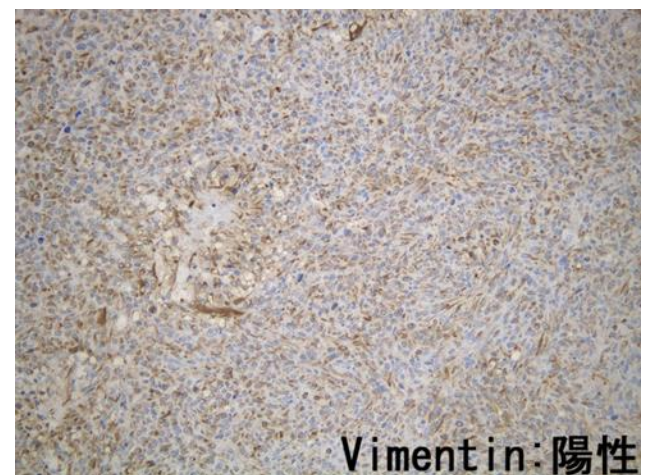
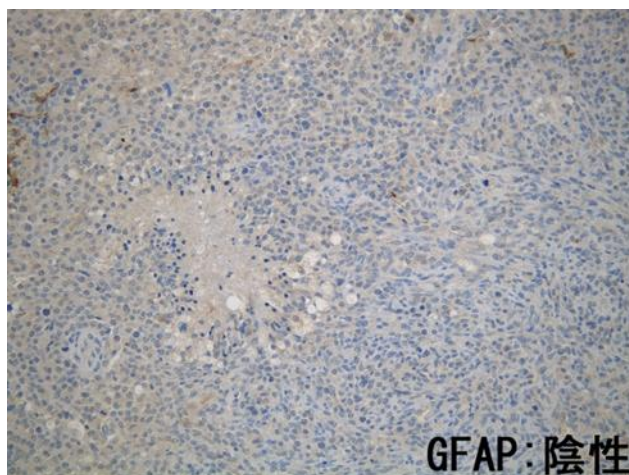
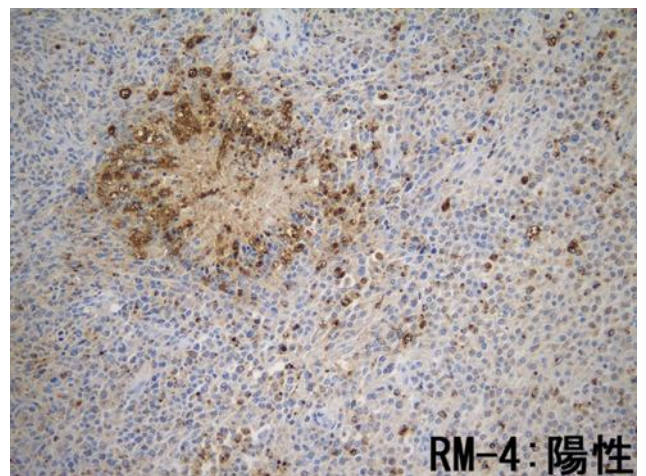
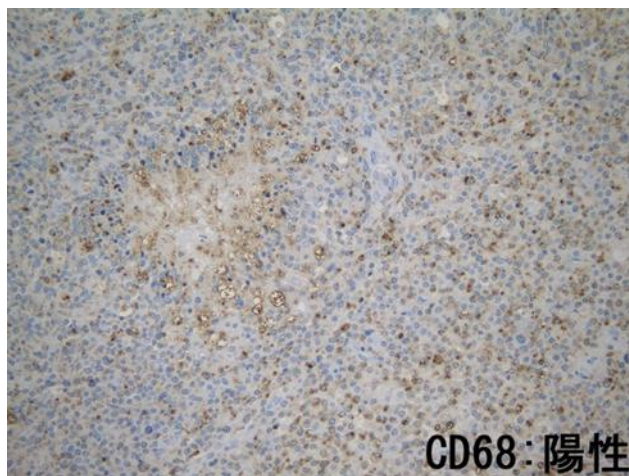
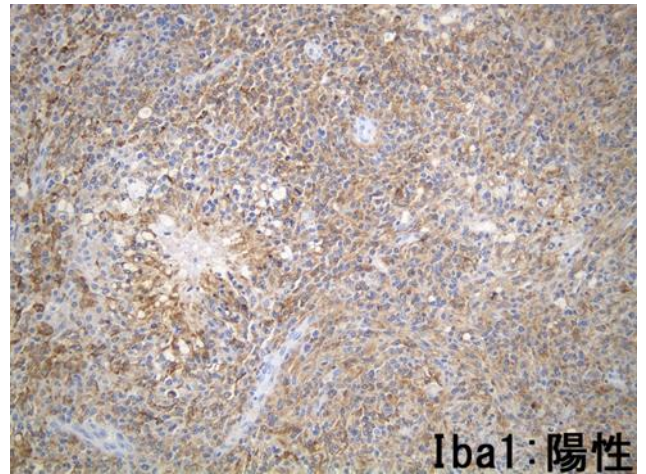
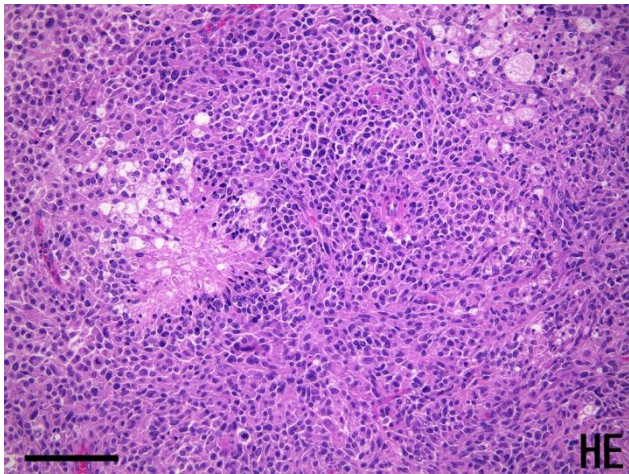
Fig. 3-4 悪性星状膠細胞腫(B型)の免疫染色



悪性星状膠細胞腫のB型は、Iba1, CD68, RM-4とVimentinに陽性であるが、GFAP陰性である。

Bar=100μm

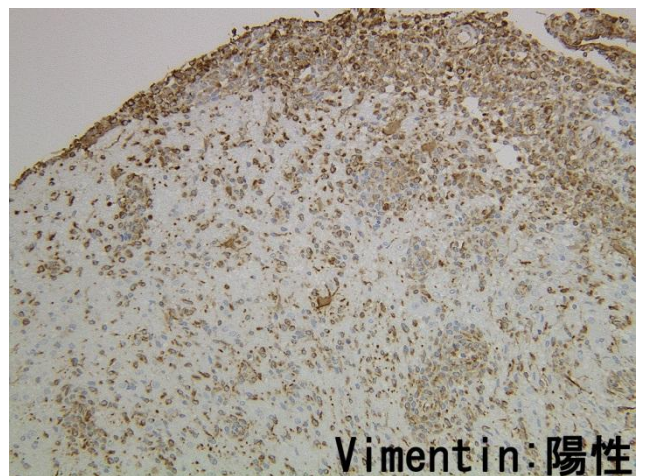
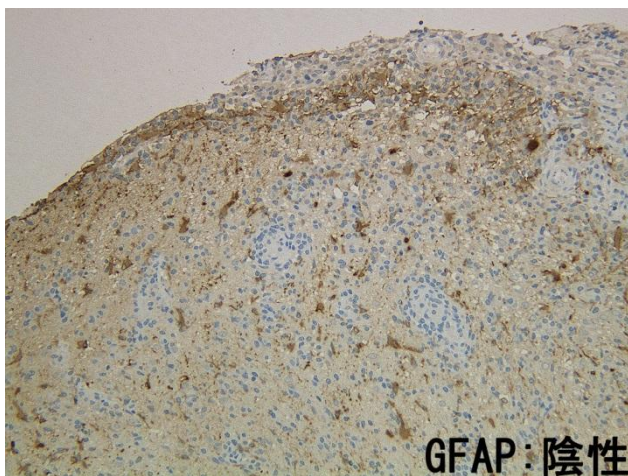
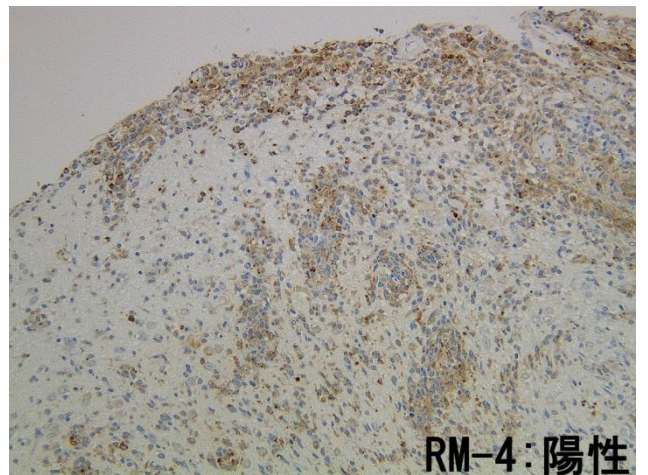
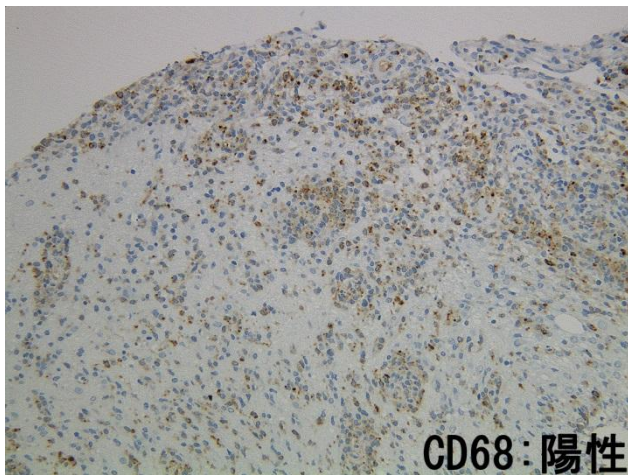
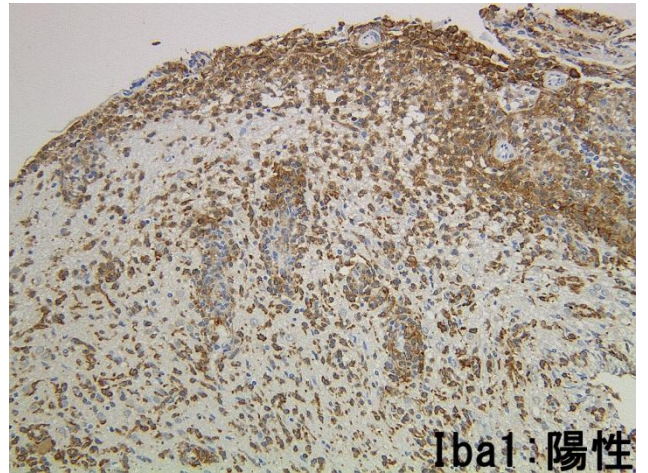
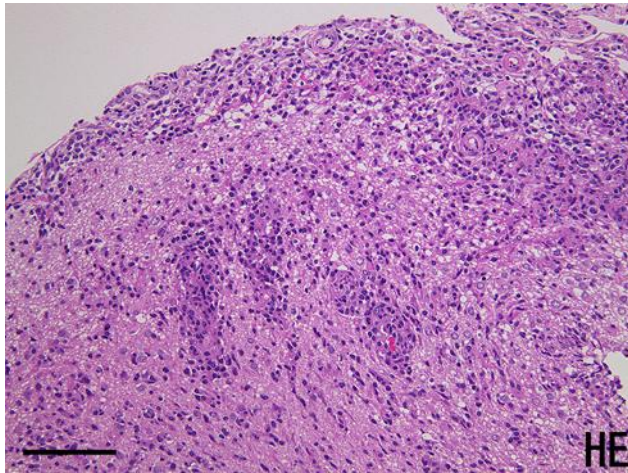
Fig. 3-5 悪性星状膠細胞腫(C型)の免疫染色



悪性星状膠細胞腫のC型は、Iba1, CD68, RM-4とVimentinに陽性であるが、GFAP陰性である。

Bar=100μm

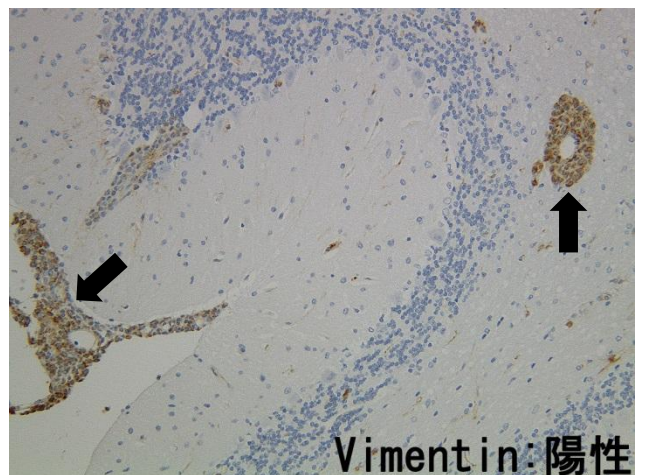
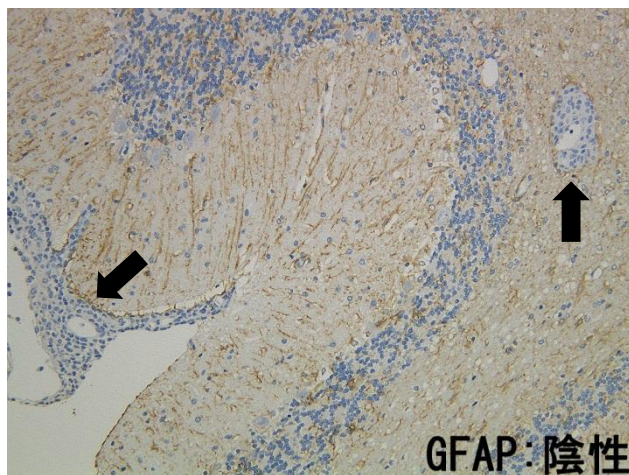
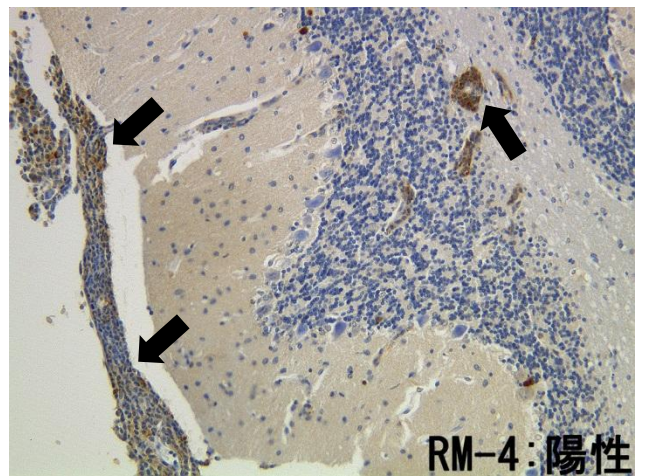
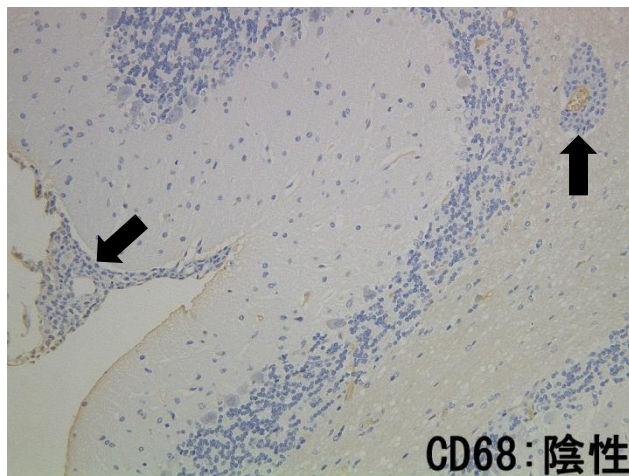
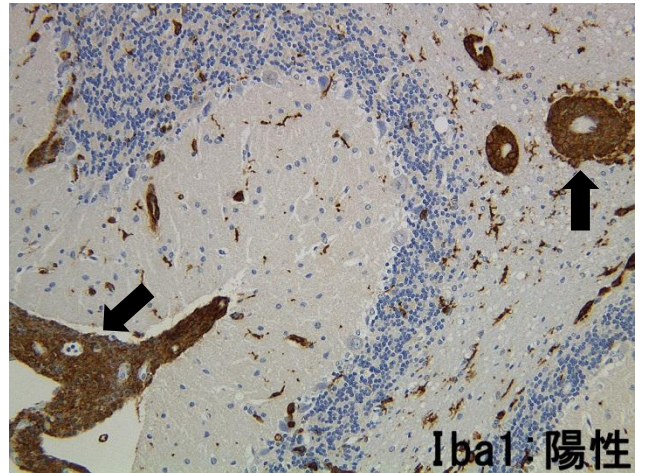
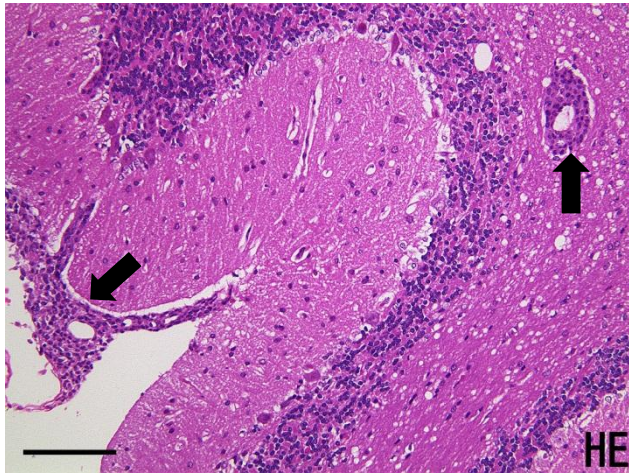
Fig. 3-6 悪性細網症(D型)の免疫染色



悪性細網症のD型は、Iba1、CD68、RM-4とVimentinに陽性であるが、GFAP陰性である。

Bar=100μm

Fig. 3-7 悪性細網症(E型)の免疫染色



悪性細網症のE型(矢印)は、Iba1、RM-4とVimentinに陽性であるが、CD68とGFAP陰性である。

Bar=100μm

総 括

ラットの自然発生性脳腫瘍では、起源が異なるにもかかわらず組織形態が類似していることから悪性星状膠細胞腫と悪性細網症の鑑別が困難である。そこで、本研究では、ラットの自然発生性悪性星状膠細胞腫と悪性細網症の鑑別とこれら腫瘍の起源の検索を目的に、神経上皮性腫瘍と悪性細網症について組織形態学および免疫組織化学的に詳細に検討した。

第1章では、INHANDに従って診断された悪性星状膠細胞腫を含む神経上皮性腫瘍および悪性細網症について、2系統のラット（F344/DuCrjCrljおよびCrj:CD(SD)ラット）における発生状況に加え、リンパ造血器系組織が由来の組織球肉腫の発生率も検索した。その結果、悪性星状膠細胞腫は、F344ラットよりSDラットの方が、また、雌より雄の方が発生率が高く、このような系統差や性差はリンパ造血器系組織に発生する組織球肉腫のそれに類似すること、さらに悪性稀突起膠細胞腫の方が悪性星状膠細胞腫より早期に発生することが明らかとなった。腫瘍の発生状況はその生物学的特性の一部を表しており、化学物質による腫瘍の誘発が疑われる際の判断あるいはその解析に役立つと考えられた。また、ラットの自然発生性神経上皮性腫瘍では悪性星状膠細胞腫の発生率が最も高いことが確認された。星状膠細胞腫の発生率が他の膠細胞腫に比べ高いことは、ヒトやイヌと同様であり、

GFAP 陰性であるにもかかわらず INHAND においてこの腫瘍をラットの星状膠細胞腫としている要因の一つと考えられた。

第 2 章では、星状膠細胞腫を含む神経上皮性腫瘍について、腫瘍細胞を形態学的に分類し、この分類を用いて各腫瘍の病理組織形態学的特徴を再検討した。さらにこれらの腫瘍細胞の由来を明らかにするために、免疫組織学的検索を行った。その結果、ラットでは 1) 悪性星状膠細胞腫の組織形態学的特徴は壊死巣周囲の柵状配列、神経細胞周囲の衛星現象および好酸性顆粒細胞の出現であり、また内皮増生を伴う血管増生が欠如していること、2) 悪性稀突起膠細胞腫および髄芽腫の組織形態学的特徴はヒトやイヌのそれと類似していること、3) 悪性星状膠細胞腫の腫瘍細胞は Iba1、CD68 および RM-4 に陽性で、組織球あるいはミクログリア由来の可能性があること、4) 悪性稀突起膠細胞腫および悪性混合神経膠腫の腫瘍細胞は Olig2、GFAP あるいは Nestin に陽性で、由来は稀突起膠細胞あるいは星状膠細胞であること、および 5) 腫瘍性星状膠細胞はヒトやイヌと同様に GFAP 陽性であることが明らかとなった。すなわち、ラットの神経上皮性腫瘍では、悪性星状膠細胞腫を除き、組織形態学的特徴および GFAP の染色性を含め免疫組織化学的染色動態はヒトやイヌのそれらと概ね類似しており、ラットに特有なものはないと考えられた。一方、悪性星状膠細胞腫については、ラットに特有

な組織形態学的特徴がみられたが、ヒトやイヌと異なり免疫組織化学的に星状膠細胞由来の証拠をとらえることはできなかった。むしろ免疫組織化学的には、従来 GFAP 陰性であることが特徴とされてきたラットの悪性星状膠細胞腫は、真の星状膠細胞腫ではなく組織球あるいはミクログリア由来の腫瘍の可能性が考えられた。さらに、従来ラットでは星状膠細胞腫の診断に有用でないとされていた GFAP は、ヒトや他の動物同様に診断の決め手になると考えられた。

第 3 章では形態学的に診断された悪性星状膠細胞腫と悪性細網症の鑑別のために、これらの腫瘍を細分類し病理組織形態学的特徴を比較、検討した。さらに、これらの腫瘍の由来を明らかにするために、免疫組織化学的検索を行った。その結果、悪性星状膠細胞腫と悪性細網症の間に本質的な組織形態学的相違がなく、これら両腫瘍は、いずれも GFAP と Olig2 陰性、Iba1、CD68 と RM-4 陽性であったことから、ラットの悪性星状膠細胞腫の大部分および悪性細網症は同一起源の腫瘍で、組織球あるいはミクログリア由来と考えられた。

本研究の一連の結果から、ラットにおいても、ヒトや他の動物と同様、一部の腫瘍性星状膠細胞は GFAP 陽性で、ラットにおいてこれまで星状膠細胞腫と診断されていた腫瘍の大部分は、組織球あるいはミクログリア由来の

腫瘍であり、ラットにおいて真の星状膠細胞腫は極めて希であることが明らかとなった。本研究の成果は、発生頻度が低く情報量の少ないラットの自然発生性神経上皮性腫瘍において、その組織発生を考える上で重要な知見を与え、腫瘍の起源をもとに評価する化学物質の癌原性試験においては、成績の確かな評価に寄与するところが大きいと考えられた。

謝 辞

本研究を進める上で多大なご指導を頂きました東京大学大学院農学
生命科学研究科獣医病理学研究室の中山裕之教授、内田和幸准教授および土
井邦雄名誉教授に深く敬意を表し感謝いたします。

また、本研究を遂行するにあたり御援助を賜った株式会社ボゾリサー
チセンター代表取締役社長・山内久実氏、常に適切なお助言を頂いた田村一
利博士ならびに本研究の要である免疫組織化学染色の実施にあたりご協力
頂いた病理部の皆様に深く感謝いたします。

参考文献

1. Baldrick P: Carcinogenicity evaluation: comparison of tumor data from dual control groups in the Sprague-Dawley rat. *Toxicol Pathol* **33**: 283-291, 2005.
2. Brix AE, Hardisty JF, McConnell EE: Combining neoplasms for evaluation of rodent carcinogenesis studies. In: *Cancer Risk Assessment*, (Ching-Hung Hsu and Todd Stedeford eds), pp. 699-715, Hoboken, NJ, John Wiley & Sons, 2010.
3. Bullock FD, Curtis MR: Spontaneous tumors of the rat. *J Cancer Res* **14**:1-115, 1930.
4. Charles River Laboratories, Inc: Spontaneous neoplastic lesions in the CDF[®] (F-344)/CrIBR rat. 1990. Compiled from data available at charles river website:
http://www.criver.com/sitecollectiondocuments/rm_rm_r_snl_cdf_f344_crlbr_r_at.pdf
5. Charles River Laboratories, Inc: Spontaneous neoplastic lesions and selected non-neoplastic lesions in the CrI:CD[®]BR rat. 1992. Compiled from data available at charles river website:
http://www.criver.com/sitecollectiondocuments/rm_rm_r_lesions_selected_non-neo_crlcdbl_rat.pdf
6. Charles River Laboratories, Inc: Compilation of spontaneous neoplastic lesions and survival in CrI:CD[®] (SD)BR rats from control groups. 2001. Compiled from data available at charles river website:
http://www.criver.com/sitecollectiondocuments/rm_rm_r_lesions_survival_crlc-d-sd_br_rats.pdf
7. Charles River Laboratories, Inc: Compilation of spontaneous neoplastic lesions and survival in CrI:CD[®] (SD) rats from control groups. 2004. Compiled from data available at charles river website:

http://www.criver.com/sitecollectiondocuments/rm_rm_r_lesions_survival_crlc_d_sd_rats.pdf

8. Dagle GE, Zwicker GM, Renne RA: Morphology of spontaneous brain tumors in the rat. *Vet Pathol* **16**:318-324, 1979.
9. Damoiseaux JGMC, Dopp EA, Calame W, Chao D, MacPherson GG, Dijkstra CD: Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. *Immunology* **83**:140-147, 1994.
10. Dinse GE, Peddada SD, Harris SF, Elmore SA: Comparison of NTP historical control tumor incidence rates in female Harlan Sprague Dawley and Fischer 344/N rats. *Toxicol Pathol* **38**: 765-775, 2010.
11. Fitzgerald JE, Schardein JL, Kurtz SM: Spontaneous tumors of the nervous system in albino rats. *J Natl Cancer Inst* **52**:265-273, 1974.
12. Frith CH, Chandra M: Spontaneous primary astrocytoma in the spinal cord of a mouse and a rat. *Toxicol Pathol* **18**:427-429, 1990.
13. Garman RH: Malignant reticulosis, rat. In: Monographs on pathology of laboratory animals, Nervous system (Jones TC, Mohr U, and Hunt RD, eds), pp. 117-123, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, 1988.
14. Garner FM, Innes JRM, Nelson DH: Murine neuropathology. In: Pathology of laboratory rats and mice (Cotchin E and Roe FJC eds), pp. 295-348. Blackwell Scientific Publication, Oxford, Edinburgh, 1967.
15. Gopinath C: Spontaneous brain tumours in Sprague-Dawley rats. *Fd Chem Toxic* **24**: 113-120, 1986.
16. Haseman JK, Eustis SL, Arnold J: Tumor incidences in Fischer 344 rats: NTP historical data. In: Pathology of the Fischer Rat, (Boorman GA, Eustis SL, Elwell MR, Montgomery CA Jr. MacKenzie WF eds.) pp. 555-564, Academic Press Inc., San Diego, New York, Boston, London Sydney, Tokyo, Toronto, 1990.

17. Haseman JK, Hailey JR, Morris RW: Spontaneous neoplasm incidences in Fischer 344 rats and B6C3F₁ mice in two-year carcinogenicity studies: A national toxicology program update. *Toxicol Pathol* **26**: 428-441, 1998.
18. Hollander CF, Burek JD, Boorman GA, Snell KC, Laqueur GL: Granular cell tumors of the central nervous system of rats. *Arch Pathol Lab Med* **100**:445-447, 1976.
19. Ide T, Uchida K, Kikuta F, Suzuki K, Nakayama H: Immunohistochemical characterization of canine neuroepithelial tumors. *Vet Pathol* **47**:741-750, 2010.
20. Iwata H, Hirouchi Y, Koike Y, Yamakawa S, Kobayashi K, Yamamoto T, Kobayashi K, Inoue H, Enomoto M: Historical control data of non-neoplastic and neoplastic lesions in F344/DuCrj rats. *J Toxicol Pathol* **4**: 1-24, 1991.
21. Iwata H, Kakamu S, Sugiyama Y, Mukai D, Iida M, Yamakawa S, Yamamoto T, Inoue H: A control data of the mortality, body weight, food consumption, hematological data and neoplastic lesions in long-term examination in Crj:CD(SD)IGS rats -comparison with data in Crj:CD(SD) rats-. CD(SD)IGS Study Group, 243-251, 1999.
22. Iyonaga K, Takeya M, Yamamoto T, Ando M, Takahashi K: A novel monoclonal antibody, RM-4, specifically recognizes rat macrophages and dendritic cells in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Histochem J* **29**:105-116, 1997.
23. Jang T, Savarese T, Low HP, Kim S, Vogel H, Lapointe D, Duong T, Litofsky NS, Weimann JM, Ross AH, Recht L: Osteopontin expression in intratumoral astrocytes marks tumor progression in gliomas induced by prenatal exposure to N-ethyl-N-nitrosourea. *Am J Pathol* **168**:1676-1685, 2006.
24. Kaspareit-Rittinghausen J, Deerberg F: Spontaneous tumours of the spinal cord in laboratory rats. *J Com pathol* **100**:209-215, 1989.

25. Kaufmann W, Bolon B, Bradley A, Butt M, Czasch S, Garman RH, George C, Groeters S, Krinke G, Little P, McKay J, Narama I, Rao D, Shibutani M, Sills R: Proliferative and non-proliferative lesions of the rat and mouse central and peripheral nervous systems. *Toxicol Pathol* **40**:87S-157S, 2012.
26. Koestner A, Bilzer T, Fatzer R, Schulman FY, Summers BA, Van Winkle TJ: Histological classification of tumors of the nervous system of domestic animals. 2nd series, vol. 5, Armed Forces Institute of Pathology American Registry of Pathology, Washington, DC, 1999.
27. Kolenda-Roberts HM, Harris N, Singletary E, Hardisty JF: Immunohistochemical characterization of spontaneous and acrylonitrile-induced brain tumors in the rat. *Toxicol Pathol* **41**:98-108, 2013.
28. Krinke GJ, Kaufmann W, Mahrous AT, Schaetti P: Morphologic characterization of spontaneous nervous system tumors in mice and rats. *Toxicol Pathol* **28**: 178-192, 2000.
29. Krinke G, Naylor DC, Schmid S, Frohlich E, Schnider K: The incidence of naturally-occurring primary brain tumours in the laboratory rat. *J Comp Pathol* **95**:175-192, 1985.
30. Lee YS, Bigner SH, Eng LF, Molnar P, Kuruvilla A, Groothuis DR, Bigner DD: A glial fibrillary acidic protein-expressing and tumorigenic cell line derived from an avian sarcoma virus-induced rat astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol* **45**:704-720, 1986.
31. Leenstra S, Troost D, Westerveld A, Bosch DA, Hulsebos JM: Molecular characterization of areas with low grade tumor or satellitosis in human malignant astrocytomas. *Cancer Res* **52**:1568-1572, 1992.
32. Lopes MBS, VandenBerg SR: Tumors of the central nervous system. In: Diagnostic histopathology of tumors, 2nd edition (Fletcher CDM ed.), pp. 1607-1677, Churchill Livingstone, London, Edinburgh, New York, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto, 2000.

33. Ma YH, Mentlein R, Knerlich F, Kruse ML, Mehdorn HM, Held-Feindt J: Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades. *J Neurooncol* **86**:31-45, 2008.
34. Maekawa A, Onodera H, Tanigawa H, Furuta K, Takahashi M, Kurokawa Y, Kokubo T, Ogiu T, Uchida O, Kobayashi K, Hayashi Y: Spontaneous tumors of the nervous system and associated organs and/or tissues in rats. *Gann* **75**:784-791, 1984.
35. Matsushima K, Yamakawa S, Edamoto H, Yamaguchi Y, Nagatani M, Tamura K: Spontaneous malignant T-cell lymphoma in a young adult Crl:CD(SD) rat. *J Toxicol Pathol* **23**:49-52, 2010.
36. Mawdesley-Thomas LE, Newman AJ: Some observations on spontaneously occurring tumours of the central nervous system of Sprague-Dawley derived rats. *J Pathol* **112**:107-116, 1974.
37. McMartin DN, Sahota PS, Gunson DE, Hsu HH, Spaet RH: Neoplasms and related proliferative lesions in control Sprague-Dawley rats from carcinogenicity studies. Historical data and diagnostic considerations. *Toxicol Pathol* **20**: 212-225, 1992.
38. Mitsumori K, Maronpot RR, Boorman GA: Spontaneous tumors of the meninges in rats. *Vet Pathol* **24**:50-58, 1987.
39. Mokhtari K, Paris S, Aguirre-Cruz L, Privat N, Criniere E, Marie Y, Hauw J-J, Kujas M, Rowitch D, Hoang-Xuan K, Delattre J-Y, Sanson M: Olig2 expression, GFAP, p53 and 1p loss analysis contribute to glioma subclassification. *Neuropathol Appl Neurobiol* **31**:62-69, 2005.
40. Nakamura R, Nishimura T, Ochiai T, Nakada S, Nagatani M, Ogasawara H: Availability of a microglia and macrophage marker, Iba-1, for differential diagnosis of spontaneous malignant reticulosis from astrocytomas in rats. *J Toxicol Pathol* **26**: 55-60, 2013.

41. Newman AJ, Mawdesley-Thomas LE: Spontaneous tumours of the central nervous system of laboratory rats. *J Comp Pathol* **84**:39-50, 1974.
42. NTP (U.S. National Toxicology Program): Historical control data in F344/N rats. 2011. Compiled from data available at NTP website:
http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/Historical_Controls/NTP2000_2011/HistCont2011_Rats_AllRoutes.pdf
43. NTP (U.S. National Toxicology Program): Historical control data in Harlan SD rats. 2011. Compiled from data available at NTP website:
http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/Historical_Controls/NTP2000_2011/HistCont2011_HSD_allroutes.pdf
44. Ogasawara H, Mitsumori K, Onodera H, Imazawa T, Shibutani M, Takahashi M, Ward JM, Maekawa A: Spontaneous histiocytic sarcoma with possible origin from the bone marrow and lymph node in Donryu and F-344 rats. *Toxicol Pathol* **21**:63-70, 1993.
45. Okazaki H, Scheithauer BW: Neoplasms and related lesions. In: Atlas of neuropathology, pp. 59-215, Gower Medical Publishing, New York, London, J.B. Lippincott, Philadelphia, 1988.
46. Pruijboom-Brees IM, Brees DJJE, Shen AC, Ibebunjo C: Malignant astrocytoma with binucleated granular cells in a Sprague-Dawley rat. *Vet Pathol* **41**: 287-290, 2004.
47. Parker K, Pilkington GJ: Morphological, immunocytochemical and flow cytometric in vitro characterisation of a surface-adherent medulloblastoma. *Anticancer Res* **25**:3855-3864, 2005.
48. Perry CJ, Bleakley J, Finch JM: Background pathology data from carcinogenicity studies comparing CrI:CD(SD)IGS and CrI:CD rats – (1) neoplastic lesions. CD(SD)IGS Study group, 255-266, 1999.

49. Quan N, Zhang Z, Demetrikopoulos MK, Kitson RP, Chambers WH, Goldfarb RH, Weiss JM: Evidence for involvement of B lymphocytes in the surveillance of lung metastasis in the rat. *Cancer Res* **59**:1080-1089, 1999.
50. Raju NR, Yaeger MJ, Okazaki DL, Lovell K, Koestner: A Immunohistochemical characterization of rat central and peripheral nerve tumors induced by ethylnitrosourea. *Toxicol Pathol* **18**:18-23, 1990.
51. Rehg JE, Bush D, Ward JM: The utility of immunohistochemistry for the identification of hematopoietic and lymphoid cells in normal tissues and interpretation of proliferative and inflammatory lesions of mice and rats. *Toxicol Pathol* **40**:345-374, 2012.
52. Saad A, Mo J, Miles L, Witte D: Granular cell astrocytoma of the cerebellum. *Am J Clin Pathol* **126**:602-607, 2006.
53. Saxton JA, Sperling GA, Barnes LL, Mc Cay CM: The influence of nutrition upon the incidence of spontaneous tumors of the albino rat. *Acta Un int Cancer* **6**:423-431, 1948.
54. Schiffer D, Manazza A, Tamagno I: Nestin expression in neuroepithelial tumors. *Neurosci Lett* **400**:80-85, 2006.
55. Sepulveda Sanchez JM, Martinez Montero JC, Diez-Lobata R, Hernandez-Lain A, Cabello A, Ramos A, Gonzalez Leon P, Ricoy Campo JR: Classification of oligodendroglial tumors based on histopathology criteria is a significant predictor of survival –clinical, radiological and pathologic long-term follow-up analysis. *Clin Neuropathol* **28**:11-20, 2009.
56. Shi Y, Morgenstern N: Granular cell astrocytoma. *Arch Pathol Lab Med* **132**:1946-1950, 2008.
57. Shibuya S, Miyamoto O, Itano T, Mori S, Norimatsu H: Temporal progressive antigen expression in radial glia after contusive spinal cord injury in adult rats. *Glia* **42**:172-183, 2003.

58. Sills RC, Hailey JR, Neal J, Boorman GA, Haseman JK, Melnick RL: Examination of low-incidence brain tumor responses in F344 rats following chemical exposures in national toxicology program carcinogenicity studies. *Toxicol Pathol* **27**: 589-599, 1999.
59. Solleveld HA, Boorman GA: Brain. In: Pathology of the Fischer rat (Boorman GA, Eustis SL, Elwell MR, Montgomery CA, MacKenzie WF, eds), pp. 155-177, Academic Press Inc., San Diego, New York, Boston, London Sydney, Tokyo, Toronto, 1990.
60. Solleveld HA, Gorgacz EJ, Koestner A: Central nervous system neoplasms in the rat. In: Guides for Toxicologic Pathology. STP/ARP/AFIP, Washington, DC, 1991.
61. Son W, Gopinath C: Early occurrence of spontaneous tumors in CD-1 mice and Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol* **32**:371-374, 2004.
62. Stoica G, Levine J, Wolff J, Murphy K: Canine astrocytic tumors: A comparative review. *Vet Pathol* **48**:266-275, 2011.
63. Sumi N, Stavrou D, Frohberg H, Jochmann G: The incidence of spontaneous tumors of the central nervous system of Wistar rats. *Arch Toxicol* **35**:1-13, 1976.
64. Summers BA, Cummings JF, Lahunta A: Tumors of the central nervous system. In: Veterinary neuropathology, pp. 351-401, Mosby, St. Louis, Baltimore, Berlin, Boston, Carlsbad Chicago, London, Madrid, Naples, New York, Philadelphia, Sydney, Tokyo, Toronto, 1994.
65. Weber K, Garman RH, Germann PG, Hardisty JF, Krinke G, Millar P, Pardo ID: Classification of neural tumors in laboratory rodents, emphasizing the rat. *Toxicol Pathol* **39**:129-151, 2011.
66. Wu D¹, Miyamoto O, Shibuya S, Mori S, Norimatsu H, Janjua NA, Itano T: Co-expression of radial glial marker in macrophages/microglia in rat spinal cord contusion injury model. *Brain Res* **1051**:183-188, 2005.

67. Wu D², Miyamoto O, Shibuya S, Okada M, Igawa H, Janjua NA, Norimatsu H, Itano T: Different expression of macrophages and microglia in rat spinal cord contusion injury model at morphological and regional levels. *Acta Med Okayama* **59**:121-127, 2005.
68. Wyand DS, Zwicker GM, Pavkov K: Spontaneous glioblastoma multiforme in a Charles River CD rat. *Toxicol Pathol* **15**:474-478, 1987.
69. Yamate J, Tajima M, Nunoya T, Kudow S: Spontaneous tumors of the central nervous system of Fischer 344/DuCrj rats. *Jan J Vet Sci* **49**:67-75, 1987.
70. Yokoo H, Nobusawa S, Takebayashi H, Ikenaka K, Isoda K, Kamiya M, Sasaki A, Hirato J, Nakazato Y: Anti-human Olig2 antibody as a useful immunohistochemical marker of normal oligodendrocytes and gliomas. *Am J Pathol* **164**:1717-1725, 2004.
71. Yokoo H, Tanaka Y, Nobusawa S, Nakazato Y, Ohgaki H: Immunohistochemical and ultrastructural characterization of brain tumors in S100 β -v-erbB transgenic rats. *Neuropathol* **28**:591-598, 2008.
72. Yoshimine T, Maruno M, Ushio Y, Hayakawa T, Nakajima Y, Mogami H: Intermediate filaments and anaplastic change of ENU-induced gliomas: immunohistochemical study with vimentin and astroprotein (GFAP). *J Neuro-Oncol* **5**:377-385, 1987.
73. Zook BC, Simmens SJ, Jones RV: Evaluation of ENU-induced glioma in rats: Nomenclature, immunochemistry, and malignancy. *Toxicol Pathol* **28**:193-201, 2000.
74. Zwicker GM, Eyster RC, Sells DM, Gass JH: Spontaneous brain and spinal cord/nerve neoplasms in aged Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol* **20**:576-584, 1992.