チオフェン中毒ラットにおける Fos 蛋白発現

森 文秋, 高屋豪瑩

弘前大学医学部附属脳神経疾患研究施設神経病理部門

C-FOS EXPRESSION IN THIOPHENE EXPOSED RATS

Fumiaki Mori and Goyo Koya

Department of Neuropathology, Institute for Neuroscience, Hirosaki University School of Medicine

Abstract: Repeated injection of thiophene induced clinical signs to grooming, trunkal ataxia, or tonic convulsion and the signs are similar to those of cerebellar degeneration by methyl mercury poisoning. The rats disclosed by PAS reaction in inferior colliculus, and disorder in auditory brainstem response. In thiophene poisoned rats have arranged an immunohistochemical (Fos immunoreactivity) and histopathological methods to evaluate the correlation between those signs and lesions.

1) Fos-like immunoreactivity (FLI) in the central nervous system was distributed the characteristic associated with trunkal ataxia and/or tonic convulsion.

2) FLI positive cells disclosed nerve cells by rim of the necrotic regions (penumbra) in the cerebellum.

3) Neuronal degeneration was scattered in the resemblance area in contralateral hemisphere of the same rat that had displayed continuous and excessive FLI positive cells.

4) Marchi stain and FLI displayed how it is dependent on the degeneration of the cerebellar nucleus, the red nucleus, and the dorsal lateral funiculus, to be related into rubrospinal tracts.

These results showed that FLI is a useful tool for check to the early phase of the lesion and transsynaptic lesion associated with clinical signs induced by a neurotoxic agent. (J Toxicol Pathol 7: 489~499, 1994)

Key words: c-Fos, Rat, Seizure, Neuronal death, Thiophene

はじめに

ヒトとは相違した動物の犠牲によって、病的症状出現の同時期の病理像変化を把握することがこれまでに行われてきた。なかでも変性疾患では、生前の臨床症状を把握することが大切である。つまり、その疾患の病巣局在分類がこれまで想定してきた変性疾患の病因と関連させて特定できた疾患動物モデルでも繁用しうるモデルはいまだ数少ない。神経疾患としての中毒動物モデルであるジメチル水銀中毒症を中心に、特に、2, 3 のモデル動物の症状をこれまで検討してきた。

一般動物の正常行動を把握することは困難なことが多い。ましてや病的状態に陥ったときの症状を把握することは難しい。なかでも、生前の注意深い観察によって、急性ないし慢性的な症状、例えば、痙攣発作、急性痛や慢性痛などを把握できているならば、これにこしたことはない。一方、病巣を特定する際、その形成過程のなかで、一般臓器所見をないがしろにしてはならない。なかでも、神経症状と関係づけて病理神経組織像を把握することは多くの困難を伴う。そこで動物自身が示す特有の神経症状に対応した神経細胞の興奮状態を表す電気生理学的手法、放射性同位元素 (2DG) の使用、CT, MRI, PET などの手技を用いたマクロ的病巣の位置決定などは、生前のその形態像を診断する手段としてとりあげられる。しかし、CT, MRI, PET などの利用に要する経費は高価なの

Accepted for publication: June 2, 1994

Mailing address: Fumiaki Mori, Department of Neuropathology, Institute for Neuroscience, Hirosaki University School of Medicine, 5 Zaifu-cho, Hirosaki-shi, Aomori-ken, 036, Japan.

で、一般用の域をでていない。

今回採用した Fos 蛋白は、多数の即初期遺伝子の中の1つである c-fos の遺伝子産物で、別の即初期遺伝子 c-jun の産物の Jun 蛋白と、転写因子 AP-1 のヘテロダイマーを構成して、遺伝子の転写の制御を行っている¹⁻⁴。実際には、さまざまな物理化学的刺激に対応して興奮した神経細胞中に発現している。この手技は、生存中の病巣との関連において見出せる CT からみた病理像とは異なるが、実験動物では細胞レベルで病理像の出現部位の決定ができる。

チオフェン中毒ラットでは、ジメチル水銀中毒の小脳変性に類似する小脳虫部吻側に限局した病変がみられるものの、その症状や病巣は、ジメチル水銀とはかなり異なることをこれまで示してきた。チオフェン中毒では、小脳顆粒層血管内に、オスミウム好性物質がみられること^{5,6}、聴性脳幹反応でいう下丘の障害を示す IV 波の振幅低下と潜時延長を来し、下丘の腹内側部分に、PAS 陽性物質がより強くみられ、壊死神経細胞が出現すること^{7,8}などを報告してきた。

今回は、このチオフェン中毒ラットに対して、病的状況下にある神経症状を示した動物の神経組織上での変化を把握し、特有の神経症状と合致する病理変化をより明らかに関連づける手段の1つとして、Fos 蛋白免疫反応性を採用し、その有用性を確認したので報告する。

材料と方法

当施設で継代維持してきた自然発症高血圧ラット (SHR) 雌 8 頭, SD ラット (SD) 雌 1 頭, HTX ラット (HTX) 雄 2 頭の計 11 頭について検討した。HTX 雄, 150 日齢にはチオフェン 0.3 ml を 1 日/回 8~12 回, 後肢筋肉内に連日投与した。SHR, 雌 150 日齢および SD, 雌, 51 日齢には、チオフェン 0.15 ml を 1 日 1 回, 2 から 12 回, 後肢筋肉内に連日投与した (Table 1)。これとは別に、SHR, 150 日齢, 雌, 2 頭を非投与対照例とした。

症状、体重変化を記録し、投与終了から次の投与までの 24 時間以内に、躯幹振動ないし強直性痙攣などを呈したラットについて、その時点で投与を中止し、一定時間後に、灌流ポンプ (Model No.

7520-25, Cole-Parmer Instrument Co. USA) を用い、経心的に 4% パラホルムアルデヒド 0.1 M 燐酸緩衝液, 4% PFA) を 50-75 ml/分の量 (灌流圧 110-120 mmHg) で灌流固定を行った。1 時間後に、脳および脊髄 (前根, 後根, 後根神経節を付着させたまま) を取り出し、同一固定液に 1 晩浸漬固定した。

1) 脊髄の切り出し

手術用顕微鏡下で、後面および前面の硬膜を切り開く。神経節のレベルは、

(1) 一番上の C2 後根神経節から、順に C8, Th13, L6, S4 と数えること。

(2) 手術用顕微鏡下で、神経節の大きさが、L3<L4>L5 であること。

(3) 脊髄を取り出す際に、第 6 腰椎と仙骨の関節の可動性を確認すること。

以上のことから決定し、後根神経の脊髄移行部の下部を横断し、さらに上方へ向かって約 2 mm で横断し、上面に墨をつけて、下面から薄切標本を採取した。

2) 大脳前額断

一定レベルの前額断面を得るために作製した脳鋳型 (マトリックス) 内に、脳底面を上向きにおき、橋の前端から、前方へ向かって約 2 mm 間隔で、ミクロトーム用の替え刃で、前額断した (Fig. 1)。橋の前端より後方のレベルについては、小脳を取り外した後、下丘の後端、延髄の上中下と約 2 mm 間隔で、前額断した。小脳については、正中矢状断したのち、左右の虫部と半球を約 2 mm の厚さで矢状断した。右半分を Fos 蛋白免疫反応に使用した。脊髄については、C6, Th6, L4 のレベルで厚さ約 2 mm で切り出し、右前索に指標として切れ目をいれた。

切り出した脳、脊髄を、マイクロスライサー (DTK-3000, 堂坂 EM, 京都) で、50 μ m の厚さの薄切を連続して行った。24 穴マルチプレート (住友ベークライト, 東京) 内に連続切片を順番に置いていき、4 枚おきの切片について、以下の通り、免疫組織化学的に Fos 蛋白様免疫反応性としての分布を調べた。隣接切片について、KB 染色を行い、神経核等の部位の確認の参考とした。

左側の大脳皮質、脳幹については視交差のレベルから約 2 mm の間隔で、前額断し、小脳について

Table 1. Experimental Condition, Weight Loss, Symptoms and c-Fos-like Immunoreactivities of Thiophene Poisoned Rats

No.	Strain	Sex	Age	Dose	Inj. ^a	DPI ^b	HPI ^c	Weight ^d (%)	Symptom TA ^e TC ^f	Fos expression (II-IV) ^g (V-VI) ^h	ANC ⁱ	RN ^j	IC ^k	Gra ^l	CN ^m	RST ⁿ
1	SHR	F	150	0.15	8	0	2	-29.4	+ ^o	+	±	+	#	+	#	+
2	SHR	F	150	0.15	7	0	6	-16.4	+	±	±	+	+	±	±	±
3	HTX	M	150	0.3	8	0	6	-20.9	+	+	±	+	#	#	#	+
4	SHR	F	148	0.15	6	3		-25.7	+	±	-	[+] ^p	±	±	[+]	±
5	SHR	F	148	0.15	8	5		-11.7	+	-	-	[+]	-	-	[+]	±
6	SHR	F	150	0.15	7	10		-24.9	+	-	-	[+]	-	-	[±]	±
7	SD	F	51	0.15	10	1		-11.8	+	#	#	#	+	#	#	+
8	SHR	F	153	0.15	2	0	1	-5.8	-	±	±	+	+	±	±	±
9	SHR	F	150	0.15	7	0	4	-11.7	-	±	±	±	+	-	±	±
10	HTX	M	150	0.3	12	0	6	-31.2	-	±	±	±	+	±	±	±
11	SHR	F	150	0.15	7	7		-22.5	-	-	-	[+]	[±]	-	[±]	±

^a, No. of injections; ^b, Days after last injection; ^c, Hours after last injection; ^dWeight loss (%); ^e, Trunkal ataxia; ^f, Tonic convulsion; ^g, Lamina II-IV of temporal cortex; ^h, Lamina V-VI of temporal cortex; ⁱ, Amygdaloid nuclear complex; ^j, Red nucleus; ^k, Inferior colliculus; ^l, Granule cell layer of cerebellum; ^m, Cerebellar nuclei; ⁿ, Rubrospinal tract; ^o, Numerous (#), many (±), several (+), some (±), few (-) Fos-like immunoreactivity positive cells; ^p, Cytoplasmic Fos immunoreactivity positive.

Fig. 1. A matrix for cutting a rat brain coronally to 2 mm thick slices.

は、小脳虫部と半球を矢状断方向に、脊髄については、C5, Th5, L2 のレベルで前額断方向に、そして、一般臓器についても 2 mm の厚さで切り出し、アルコール脱水、パラフィン包埋後、4 μ m の厚さで薄切した後、中枢神経系については、HE, KB, PAS, Bodian の各染色を、一般臓器については HE, PAS の各染色を施し、鏡検した。

免疫組織化学の手順

- (1) 50 μ m の厚さの前額断切片を、浮遊状態で、24 穴マルチプレート (住友ベークライト、東京) 内で、PBS+0.3% Triton (PBST)、5 分間洗浄。
- (2) PBST+3% H_2O_2 、5 分間、2 回、内因性 Peroxiase 除去。
- (3) PBST 洗浄 (10 分間、3 回)。
- (4) 0.2% 正常ウサギ血清 (NRS)+PBST、1 時

間、室温。

(5) ヒツジ抗 c-fos 蛋白抗体 (OA-11-823, Cambridge Bioresearch, UK; 1/4000, 0.2% NRS+PBST) に 3 日間浸漬, 4°C。

(6) PBST 洗浄 (10 分間、3 回)。

(7) ビオチン化ウサギ抗ヒツジ IgG 抗体 (Vectastain, Vector Laboratories, USA; 5 μ l/ml in PBS), 1 時間, 室温。

(8) PBS 洗浄 (10 分間、3 回)。

(9) ABC 溶液 (Vectastain, 10 μ l/ml in PBS) 1 時間, 室温。

(10) PBS 洗浄 (10 分間、3 回)。

(11) DAB (0.5 mg/ml in Tris-buffer, 0.05 M) 15 分間, 室温。

(12) (11) の溶液に 0.02% H_2O_2 を加えた溶液に浸漬, 5 分間, 室温。

(13) Tris 洗浄, 10 分間, 室温。

(14) スライドガラスに載せて、風乾, xylol 透徹後、カバーガラスをかけ、鏡検。

Marchi 染色

躯幹振動例のうち一部の例の脳の右側について、Fos 蛋白免疫染色を行わず、Marchi 染色を行った。脊髄については、C7, Th7, L3 に対して Marchi 染色⁹を行った。

結 果

1) 症状: 全ての動物で、初回投与後から、既報の自発運動低下および立毛がみられた (Fig. 2)。

投与終了からの症状により、次の群に分けた。

(1) 躯幹振動発作例 (6 例): 最終投与後、1 日以内に躯幹振動がはじまり、1-2 日間にわたり、継続したが、発症後、3 日経過すると、躯幹振動は消失した。

(2) 強直性痙攣発作例 (1 例): 最終投与後、グルーミング (丸まって両前肢で、鼻先を交互に撫でる動作)、躯幹振動 (ケージを移動させたり、移動中急に止めたりすると、躯幹を左右に動揺させる。またラット自身が移動しているときに、躯幹を左右に揺らす、静止したままだと振動しない) がはじまり、しばらく続いた。最終投与から 1 日後に全身性の強直性痙攣がおり、意識不明で、呼吸停止し、全身が棒のように硬直した状態が約 15

Fig. 2. The onset of various neurological signs. Trunkal ataxia continued for several days. Tonic convulsion occurred transiently.

秒間続いた。(その後、意識回復し、躯幹振動はみられたが強直性痙攣発作の再発はなかった。強直性痙攣発作から3時間後に灌流固定した)。

(3) 非発作例 (4例): 最終投与後、グルーミングはみられたが、躯幹振動や強直性痙攣はみられなかった。

(4) 非投与対照例 (2例): 特定の症状はみられなかった。

2) 体重減少 (Table 1): 非投与対照例を除き、すべての動物で、初回投与後から減少がみられ、最終投与終了時点では投与前体重の10%以上の減少を認めた。

3) Fos 蛋白免疫反応性:

(1) 発作出現時

躯幹振動発作例: Fig. 3 に示すように、梨状葉皮質、大脳皮質の一部、線条体の一部、視床の一部、視床下部、脳室周囲、中心灰白質、内側膝状体、脚周囲核、赤核 (Fig. 4)、被蓋核、背側外側毛帯核、下丘 (Fig. 5)、青斑核、前庭神経核、三叉神経脊髄路核、孤束核、外側網様体、小脳顆粒細胞層 (Fig. 6A)、小脳核 (Fig. 6B)、脊髓前角、脊髓側背側部に、Fos 蛋白発現細胞が観察された。

強直性痙攣発作例: 躯幹振動発作例の Fos 蛋白出現部位に加え、斜線で示したほぼ全断面の大脳皮質の II-IV 層、側頭皮質 (TE) の II-VI 層 (Fig. 7)、線条体、扁桃核複合体で、より多数の Fos 蛋白発現細胞が観察された。

Fos 蛋白と GFAP の 2 重染色を実施したところ、GFAP 陽性の突起をもつグリア細胞の核にあたる部分では Fos 蛋白はみられなかったが、突起をもたない神経細胞の核には Fos 蛋白がみられた。

非発作例: 上記の 2 者に比べ、Fos 蛋白発現細胞の分布範囲も狭く、数や濃度も低かった。

(2) 発作消失後

躯幹振動発作例: 投与終了後 (3 日以上)、症状の消失した時期には、発作時の Fos 蛋白のみられた部位の多くに、Fos 蛋白発現細胞を見いだすことは難しかった。しかし、赤核、小脳核、および脊髓前角の神経細胞の細胞体にわずかに陽性を示すものがあった。

強直性痙攣例の症状消失後の Fos 蛋白発現については、検索できなかった。

Fig. 3. Schematic distribution of Fos-like immunoreactivity (FLI) positive cells in the CNS of the rats with trunk ataxia (dotted area) or tonic convulsion (dotted and shaded area). Cpu, caudate putamen; Pir, piriform cortex; TE, temporal cortex; ANC, amygdaloid nuclear complex; RN, red nucleus; MG, medial geniculate nucleus; PP, peripeduncular nucleus; CG, central gray; IC, inferior colliculus; CnF, cuneiform nucleus; DLL, dorsal nucleus of lateral lemniscus; Gra, granular cell layer of cerebellum; CN, cerebellar nucleus; LC, locus coeruleus; Ve, vestibular nucleus; Sp5, spinal trigeminal nucleus; Sol, nucleus of solitary tract; LRT, lateral reticular nucleus; RST, rubrospinal tract; VH, ventral horn of spinal cord.

非投与対照例では、Fos 蛋白発現細胞はほとんどみられなかった。

4) 病理組織学的変化

(1) 発作出現時

強直性痙攣発作例および躯幹振動発作例では、ほぼ同様の病理所見がみられた。小脳顆粒細胞変

Fig. 4. Induction of Fos-like immunoreactivity (FLI) in the red nucleus (arrow) of the rat at 3 hours after tonic convulsion. Case #7. Peroxidase-DAB. Bar=250 μ m.

Fig. 5. Induction of FLI in the ventromedial region of central nucleus of inferior colliculus (arrows) of the rat with continued trunk ataxia. Case #3. Peroxidase-DAB. Bar=250 μ m.

Fig. 6. Induction of FLI in the cerebellum of case #7 (tonic convulsion). A, numerous FLI positive cells in the granule cell layer with distinct demarcation. Peroxidase-DAB. Bar=250 μ m. B, many FLI positive cells appeared in the cerebellar nucleus. Peroxidase-DAB. Bar=250 μ m.

性および浮腫を主とする虫部皮質の変性壊死病変が小葉およびIX, X小葉でより優位にみられた, 小脳半球半球皮質でも顆粒細胞変性壊死ならびに浮腫は, 吻側小葉でより優位であった。小脳半球の深部小脳核では, 神経細胞, グリア細胞の腫大

Fig. 7. Induction of FLI in the temporal cortex of case #7 (tonic convulsion). A, prominent numerous FLI positive cells appeared from lamina II to lamina VI. Peroxidase-DAB. Bar=250 μ m. B, Higher magnification of A. Peroxidase-DAB. Bar=100 μ m.

淡明化とともに多数の空隙形成がみられた。下丘では小血管周囲の浮腫並びに核融解および細胞質の濃縮や好酸性均質化からなる孤在性の神経細胞変性ないし壊死がみられた。とくに、下丘中心核の腹外側方の内側部分に、変性神経細胞を高頻度にみとめた。大脳皮質でも、孤在性の神経細胞壊死がしばしば観察された。

以上の部位を含む Fos 蛋白発現細胞が多数みられた部位に相当する位置には、核は比較的保たれ、細胞体が淡明あるいは好塩基性に濃縮した神経細胞が大部分を占めていた。小脳では、Fos 蛋白発現細胞のみられた部位は、これらの変性壊死部分と一見正常にみられる部分の境界領域に存在した。

非発作例では、上記の病変は、軽度で僅少であった。

(2) 発作消失後

軀幹振動発作例：投与終了後（3日以上）、症状の消失した時期には、小脳の顆粒細胞の変性および脱落がみられたが、下丘や大脳皮質の神経細胞壊死を見いだすことはできなかった。これらの部位では、GFAP の発現亢進がみられた。

非投与対照例では、顕著な変化は観察できなかった。

Marchi 染色

発作消失後 7 日以上経過した軀幹振動発作例で、赤核、小脳核、脊髓側索赤核脊髓路 (Fig. 8) に、変性顆粒の集積がみられた。非投与対照例では、これらの変性顆粒はみられなかった。

考 察

チオフェン中毒急性期ラットにみられた Fos 蛋白発現細胞の多くは、Fos 蛋白と GFAP の二重染色を行ったところ、神経細胞にみられた。躯幹振動例および強直性痙攣例の双方の小脳にみられ

た壊死部分、一見正常にみえた部分、そしてその間のやや染色性の低下した部分とにわけられ、梗塞性（低酸素性）病変であった。この病変部分の対向面の Fos 蛋白は、一見正常にみえる境界部分に多く発現細胞が観察された。このパターンは、局所脳虚血の penumbra でみられるパターンと類似

Fig. 8. Marchi preparation of the spinal cord of the rat at 10 days after continued trunkal ataxia. Marchi degenerated granules accumulate in the dorsal part of the lateral funiculi, considered to be rubrospinal tract of rats, bilaterally (arrows). Case #6. A, the 7th segment of cervical cord; B, the 7th segment of thoracic cord; C, the 3rd segment of lumbar cord. Marchi. Bar = 250 μ m.

していた¹⁰。強直性痙攣例では、躯幹振動例と違う部分として、大脳では、側頭皮質のII層からIV層、これ以外の大脳皮質では、IIからVI層で、扁桃体、線条体、にかけて、Fos蛋白発現細胞がみられたが、反対側の大脳のHE染色標本では、壊死神経細胞（核濃縮し、細胞体が好酸性均質）はほとんどみられなかった。以上の所見は、チオフェン中毒急性期ラットにみられたFos蛋白発現細胞の多くが、壊死した神経細胞ではなく、壊死する可能性のある神経細胞であることを示していた。

Fos蛋白が持続的で過剰な発現を示した部位には神経細胞壊死が共存していた。このことは、Fos蛋白の発現の程度から、Fos蛋白発現細胞のその後の予後が予測される¹¹。強直性痙攣例と躯幹振動例で共通して、赤核、小脳核、赤核脊髄路にFos蛋白陽性細胞がみられた。症状出現時に灌流した例では、赤核および小脳核には、壊死神経細胞や神経網の空隙形成がみられた。Fos蛋白陽性細胞は、症状の発現消失後3日以上経過するとほとんど消失した。躯幹振動発作は、強直性痙攣発作に比べると、長期間にわたって、反復持続してみられた。1-2日間躯幹振動を示した後、消失7日以上経過した例の胸髄では、側索の背側部分に変性軸索を染色するといわれているMarchi染色では変性顆粒が集積してみられた。ラットのこの部分は、Fink-Heimer染色などにより、赤核脊髄路とされている¹²。興奮状態にある神経細胞が神経毒性物質に対して易損性が高いことは、これまでも報告されてきた^{13,14}。今回の実験系では、チオフェンないしその代謝産物が、持続的に生体内に存在し毒性を発揮することが想定される^{5,6}。チオフェン中毒においては、Fos蛋白発現細胞が壊死と如何ように関係するかはその後に変化する環境に左右される。特に、壊死周囲に反応するグリアの反応との形態からみた相関や他の細胞小器官の変異との関係を、これまでに見いだした血管内変化とを関係づけて考えると壊死していく可能性が考えられる。

Fos蛋白発現細胞の分布は、強直性痙攣や躯幹振動などの特定症状および聴覚異常などの機能異常に対して、特徴的なパターンを示す。躯幹振動から強直性痙攣を示した例のFos蛋白陽性細胞

の分布は、大脳皮質のII-IV層、特に、側頭皮質のII層からVI層、扁桃体、線条体、梨状葉皮質にかけて、Fos蛋白発現細胞がみられた。大脳皮質および基底核にみられたFos蛋白発現細胞の分布は、海馬を除いて、Metrazole痙攣などのFos蛋白の発現パターン¹⁵に類似することから、これらの発現部位は、強直性痙攣発作に関連したものと考えられた。発現した細胞数や濃度に差がみられるが、強直性痙攣例と躯幹振動例に共通して、大脳皮質II-IV層、梨状葉皮質、赤核、下丘、小脳皮質、小脳核、青斑核、前庭神経核、孤束核、赤核脊髄路にFos蛋白発現細胞がみられ、これらの発現部位は、躯幹振動に関連したものと考えられた。チオフェン中毒急性期には、聴性脳幹反応（ABR）でIV波の振幅低下と潜時延長がみられる。ラットでは、IV波は外側毛帯から下丘にかけての電位変化に起因していると考えられている^{16,17}。一方、高周波数領域に相当する下丘の腹内側部分には、急性期に、PAS陽性物質の出現、壊死神経細胞が出現する^{7,8}。今回の下丘腹内側部分にみられたFos蛋白発現細胞もABR異常と関連した所見と考えられる。

Fos蛋白の発現は、経シナプス性伝達による神経細胞の興奮によっても活性化される^{1,2}。興奮状態にある神経細胞が神経毒性物質に対して易損性が高いことは、これまでも報告されてきている^{13,14}。チオフェン中毒によって生じた小脳核-赤核-赤核脊髄路障害には、神経細胞の過剰興奮によって系統変性が発生したことが考えられる（Fig. 9）。

強直性痙攣発作は、投与開始50日齢のSDラットに今回は観察している。150日齢では、躯幹振動を観察することはできたが、強直性痙攣をみることはできなかった。ヒトの歯状核・赤核・淡蒼球・ルイ体萎縮症では一般に若年発症例ではてんかん発作を主症状とし、成人以降の発症例では、小脳失調や舞踏病様不随意運動を主症状とする¹⁸。また、水俣病では、初期にてんかんといわれた痙攣の出現する胎児性患者や年少患者では病巣に選択性が少なく、大脳皮質や脳幹部が広範に侵されていた特定に対し、成人では、病巣の選択性が高く、大脳の特定部位の運動野、感覚野、視覚野の皮質で侵され脳幹部にも僅少の変化しかみられな

Fig. 9. Schematic representation of the correlation between the FLI positive area (dotted area) and the degenerated area (shaded area, proved by HE and Marchi preparation) in the thiophene poisoned rats. Solid arrows indicate the transsynaptic effect or degeneration (Gra-CN-RN-RST). Dotted arrows stand for the speculated effect (Cbr-RN). Cbr, cerebral cortex; Pir, piriform cortex; RN, red nucleus; IC, inferior colliculus; Gra, granule cell layer of cerebellum; CN, cerebellar nucleus; LC, locus coeruleus; RST, rubrospinal tract.

い^{19,20}。以上の現象と今回得られた結果から、中枢神経系の未発達な時には神経組織（経路）の障害が拡散してみられるが、成熟することによって特定部位に傷害が限局する可能性を示している。すなわち、特定の神経毒性物質による障害において傷害部位や程度の日齢による違いは、被験動物の神経系の発達程度によって生じている可能性がある。

プロトオンコジーン c-fos およびそれに関連する即初期遺伝子は、知覚性刺激、てんかん発作、ストレス、成長因子に反応して発現する¹⁻⁴。Fos 蛋白の免疫細胞化学的標識は、そのような刺激で障害を受けた細胞を mapping する方法に使われている。多くの場合、c-fos 発現の特異性について、不明瞭であるが、c-fos 発現は、刺激に対し細胞の適応反応に内在する遺伝子翻訳の異常の最初のステップを示すものと考えられている。本研究で示したように、実験的チオフェン投与によっても、痙攣ないし軀幹振動という症状に密接に関連して、大脳、中脳、小脳、脳幹、脊髄の特定部位に Fos 蛋白の誘導を起こしていた。このように、種々の有害刺激による神経毒性が、症状と関連して、特定神経細胞に発揮されているときの初期病変を検索するのに、Fos 蛋白免疫反応が有効な手段であることを示唆している。

References

1. Sheng, M and Greenberg, ME: The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4: 477-485, 1990.
2. Morgan, JI and Curran, T: Stimulus-transcription coupling in the nervous system: Involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci* 14: 421-451, 1991.
3. Herschman, HR: Primary response genes induced by growth factors tumor promoters. *Annu Rev Biochem* 60: 281-319, 1991.
4. Hoffman, GE, Smith, RS, and Verbalis, JG: c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 14: 173-213, 1993.
5. 森 文秋, 高屋豪瑩, 吉田泰二, 玉山公基, 西岡孝浩: チオフェンによって惹起されたラット小脳血管障害. *J Toxicol Pathol* 5: 21-28, 1992.
6. 森 文秋, 高屋豪瑩, 吉田泰二, 玉山公基: 高齡 SHR にチオフェン投与を行なった後小脳顆粒細胞層内血管に出現したオスミウム好性物質. *J Toxicol Pathol* 5: 167-177, 1992.
7. 森 文秋, 高屋豪瑩, 吉田泰二, 玉山公基: チオフェン中毒急性期ラットの聴性脳幹反応 (ABR) 異常と下丘 PAS 変化. *J Toxicol Pathol* 5: 179-187, 1992.
8. 森 文秋, 高屋豪瑩, 吉田泰二, 中村清純: 実験的チオフェン中毒ラットにおける下丘高周波数領域の変性病変. *J Toxicol Pathol* 6: 213-222, 1993.
9. Swank, RL and Davenport, HA: Chlorate-osmic-formalin method for staining degenerating myelin. *Stain Technol* 10: 87-90, 1935.
10. Kiessling, M and Gass, P: Stimulus-transcription coupling in focal cerebral ischemia. *Brain Pathol* 4: 77-83, 1994.
11. Smeyne, RE, Vendrell, M, Hayward, M, Baker, SJ, Miao, GG, Schilling, K, Robertson, LM, Curran, T,

- and Morgan, JI: Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. *Nature* **363**: 166-169, 1993.
12. Brown, LT: Rubrospinal projection in the rat. *J Comp Neurol* **154**: 169-188, 1974.
 13. Donoso, JA and Samson, F: Mechanisms of neurotoxicity of anticancer drugs I; 251-270, Marcel Dekker, New York, 1985.
 14. Ray, DE, Brown, AW, Cavanagh, JB, Nolan, CC, Richards, HK, and Wylie, SP: Functional/Metabolic modulation of the brain stem lesions caused by 1, 3-dinitrobenzene in the rat. *Neuro Toxicol* **13**: 379-388, 1992.
 15. Morgan, JI, Cohen, DR, Hempstead, JL, and Curran, T: Mapping pattern of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science* **237**: 192-197, 1987.
 16. Jewett, DL and Romano, MN: Neonatal development of auditory system potentials averaged from the scalp of rat and cat. *Brain Res* **36**: 101-115, 1972.
 17. 橋本 勲: 聴覚脳幹電位の発生機序. *神経進歩* **32**: 80-100, 1988.
 18. 湯浅龍彦: 齒状核・赤核・淡蒼球・ルイ体萎縮症. *日臨* **51**: 3016-3023, 1993.
 19. 松本英世: ヒト水俣病の神経病理学的研究. *熊本医学会誌* **35**: 1133-1169, 1961.
 20. Matsumoto, H, Koya, G and Takeuchi, T: Fetal Minamata disease, A neuropathological study of two cases of intrauterine intoxication by a methyl mercury compound. *J Neuropathol Exp Neurol* **24**: 563-574, 1965.