塩化メチル水銀によるマウス胎仔顎顔面奇形に関する研究 ——口蓋ヒダの変異について——

大 林 武 久・牧 正 啓・中 嶋 充 生・平 田 秀 一
田 縁 昭・桑 名 貴*・保 田 叔 昭**

Studies on maxillofacial defects in fetal mice induced by methyl mercury chloride ——Variations of palatal rugae——

Takehisa OHBAYASI・Masahiro MAKI・Mitsuo NAKASIMA・Shuichi HIRATA
Akira TAEN・Takashi KUWANA*・Yoshiaki YASUDA**

Abstract: Eighteen-day-old mouse embryos sequentially treated with methyl mercury chloride (MMC) and tiopronin (TP, used to prevent cleft palate induced by MMC) on day 10 of gestation were examined for the presence of variant rugae. Nontreated mouse embryos served as controls.

Variant rugae were classified into seven types (supernumerary, division, maldirection, bifurcation, shortness, cross and fusion). They were observed in MMC-treated embryos, and supernumerary was most frequent type. Division and shortness were ranked next. Variant rugae were also observed in nontreated embryos in low frequencies, although there were some differences between the control and MMC+TP treated embryos in the distribution of supernumerary rugae. The division in the MMC+TP group was characteristically found at the middle of the 2nd or 3rd rugae. Division of the middle of the 2nd or 3rd rugae may suggest teratogenicity.

Key words: methyl mercury chloride (塩化メチル水銀), tiopronin (チオプロニン), cleft palate (口蓋裂), variant rugae (口蓋ヒダ変異), teratogenicity (催奇形性)

緒 言

口蓋裂は、発現頻度の高い外表奇形の一つであり、従来より多くの研究が行われている。しかし、口蓋形成に関する動物実験において、口蓋裂を誘発する実験は多数なされているものの、口蓋裂を免れた胎仔に対

する評価はあまり見受けられないようである。

近年、安田らは、マウスを用いた実験で口蓋裂を発現しない程度の催奇形作用下においても潜在的奇形が誘発される場合があることを報告し¹⁾、その指標として口蓋ヒダパターンの変異があげられると述べている。すなわち、マウス口蓋粘膜にみられる8-9対の口蓋ヒ

熊本大学医学部歯科口腔外科学講座
(主任：田縁 昭教授)

*国立水俣病研究センター病理室
(主任：桑名 貴室長)

**熊本大学医学部解剖学第一講座
(主任：児玉公道教授)

Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
School of Medicine, Kumamoto University

(Chief: Prof. Akira Taen)

*Department of Pathology, National Institute for
Minamata Disease (Chief: Prof. Takasi Kuwana)

**Department of Anatomy, School of Medicine,
Kumamoto University (Chief: Prof. Kodo
Kodama)

受付日：平成6年12月19日

図1. 薬剤の投与方法

A

B

図2 口蓋ヒダの正常パターン(妊娠18日胎仔)

A: 実体顕微鏡写真(×30)

B: 写真Aのシェーマ。口蓋ヒダを前(吻)側より後(尾)側へ1から9までの番号を付す。

材料および方法

日本SLC社より購入した未經産ICR系マウスを用い、購入後1週間の馴化の後に使用した。7-16週齢の発情期にある雌マウスを午前0時から8時まで雄と同居させ、膣栓の確認できたものを母獣として使用、当日の午前4時を妊娠0日0時間と規定した。

使用薬剤はMMCおよびTPであり、母獣を5群に分けた。第1群を対照群、第2群をTP投与群、第3群・第4群・第5群をMMC+TP投与群とした。

妊娠10日8時間目に、第2群には生理食塩水のみを、第3群・第4群にはMMC25mg/kgを、第5群にはMMC20mg/kgを胃ゾンデにて経口投与した。次いで、その直後および24時間毎に3回、計4回にわたり第2群・第3群・第5群にはTP160mg/kgを、第4群にはTP320mg/kgを腹腔内投与した。対照群は未処置とした(図1)。

妊娠18日8時間に母獣を屠殺、開腹にて胎仔を摘出し、死胚ならびに吸収胚数を調べた後、ブアン液にて固定した。その後体重を測定し、口蓋裂を免れた胎仔について実体顕微鏡下にて口蓋ヒダの観察を行った。正常マウスの口蓋ヒダ(図2)と比較した口蓋ヒダ変異の分類法については、安田ら(1994)の基準を用い、過剰・分断・方向異常・分岐・短小・交差・癒合の7項目に分類した(図3)。統計学的有意差の検定には、wilcoxonの順位と検定ならびに χ^2 検定を用いた。

ダは、正常においても変異を認めることがあるものの、ある種の変異は、催奇形作用の検出指標となり得るとしており¹⁻⁷⁾、われわれもこの点に注目している。

今回われわれは胎仔の2次口蓋形成を著しく阻害し、口蓋裂を誘発する塩化メチル水銀⁸⁻¹⁰⁾(MMC)および、水銀排泄促進作用を有するチオプロニン¹¹⁻¹⁷⁾(TP)を妊娠マウスに投与し、口蓋裂発現の防御を試みた。得られた胎仔のうち、口蓋裂を免れた胎仔の口蓋ヒダ変異発現について検討を行ったので報告する。

(安田ら (1994) の変異パターン基準より引用)

図 3 口蓋ヒダの変異パターン

表 1 口蓋ヒダ変異発現状態

	母獣数	着床数	吸収・死亡 胎仔数(%)	生存 胎仔数	完全口蓋裂 胎仔数(%)	正常口蓋 胎仔数(%)	口蓋ヒダ変異 胎仔数(%)	胎仔平均体重(g) M.±S.E.
第 1 群 : Control	5	60	0	60	0 (0)	60 (100)	37 (64.9)	1.61±0.036
第 2 群 : 160mg/kg TP	4	56	1 (1.8)	55	0 (0)	55 (100)	46 (85.2)	1.54±0.020
第 3 群 : 25mg/kg MMC+160 mg/kgTP	6	75	2 (2.7)	73	54 (74.0)	19 (26.0)	19 (100)	1.29±0.039***
第 4 群 : 25mg/kg MMC+320 mg/kgTP	4	49	3 (6.1)	46	14 (30.4)	32 (69.6)	32 (100)	1.38±0.021***
第 5 群 : 20mg/kg MMC+160 mg/kgTP	6	75	9 (12.0)	66	31 (47.0)	35 (53.0)	35 (100)	1.32±0.025***

★ : Control 群との有意差 (P<0.001)
☆☆ : TP 作用群との有意差 (P<0.001)

結 果

各投与群における正常口蓋の発現数は、各薬剤の投与量を増減させることにより濃度依存性に変化した(表 1)。また、胎仔平均体重は、MMC+TP 投与群が対照群ならびに TP 単独投与群に比べ有意に減少していた (p<0.001)。

口蓋ヒダ変異の発現数は、対照群においても 1 種類以上のヒダ変異を示すものが、60 匹中 37 匹 (64.9%) に認められたが、MMC+TP 投与群ではすべてのマウス胎仔にヒダ変異が誘発された。

口蓋ヒダ変異の発現頻度(表 2)については、対照群においても過剰が口蓋ヒダ 2-3 間で多発している(写真 1)。しかし、MMC+TP 投与群においては、それに加えて口蓋ヒダ 3-4 間や 4-5 間あるいは 1-2 間での過剰の発現が認められ(写真 2)、発現部位の分布に有意差が認められた。分断は、TP 単独投与群、MMC+TP 投与群共に口蓋ヒダ 3 と口蓋ヒダ 4 で多発していた。しかし、対照群でも低頻度ながら同様の傾向があり、分布の違いは認められなかった。ところが、TP 単独投与群と MMC+TP 投与群との間には、分断の発現部位の分布に有意差が認められた

表 2 口蓋ヒダ変異発現頻度

		第 1 群	第 2 群	第 3 群	第 4 群	第 5 群
		Control (n=60)	160mg/kgTP (n=55)	25mg/kgMMC +160mg/kgTP (n=19)	25mg/kgMMC +320mg/kgTP (n=32)	20mg/kgMMC +160mg/kgTP (n=35)
Supernumerary				★	★★	★★ ☆
Rugae	1-2	0	0	3	1	6
	2-3	48	55	29	38	45
	3-4	0	5	2	13	12
	4-5	0	1	0	2	2
	5-6	1	0	0	1	1
Division				☆	☆	☆
Rugae	2	0	1	2 (1)	5 (3)	6 (4)
	3	4	4	14 (6)	18 (7)	32 (21)
	4	7	13	16	21	24
	5	0	5	0	0	2
	6	0	0	1	0	1
	7	1	0	0	0	1
Maldirection						
Rugae	3	0	0	0	1	0
	4	0	1	0	1	0
	5	1	0	1	1	0
	6	0	1	0	0	0
	7	0	0	1	0	0
Lateral Bifurcation						
Rugae	2	0	0	0	2	0
	3	4	2	2	1	7
Short						
Rugae	4	1	1	0	2	1
	5	2	3	3	2	0
	6	0	0	1	0	1
	7	0	0	1	0	0
Cross						
Rugae	4-5	1	0	0	0	2
Medial fusion						
Rugae	7-8	0	0	0	0	1

★ : Control 群との有意差 P<0.05
★★ : Control 群との有意差 P<0.01
☆ : TP 作用群との有意差 P<0.05
() : 中央部分断傾向を認めたヒダ数

写真1 第1群(対照群)

口蓋ヒダ2-3間に右側端1箇所, 左側端2箇所の過剰を認める。

写真3

第5群 (20mg/kgMMC+160mg/kgTP 投与群)
口蓋ヒダ2ならびに口蓋ヒダ3の正中部の分断傾向が認められる。

写真2

第5群 (20mg/kgMMC+160mg/kgTP 投与群)
口蓋ヒダ1-2間の右側端1箇所, 3-4間の左側端1箇所に過剰が出現している。

($p < 0.05$). また, 口蓋ヒダ2および口蓋ヒダ3の中央部における分断傾向を MMC 投与を行った第3群 (43.8%), 第4群 (43.5%), 第5群 (65.8%) において認めた(写真3)。

その他, 方向異常・分岐・短小・交叉・癒合は, 対

照群をはじめ各投与群に散発しているものの, 有意差は認められなかった。

考 察

妊娠10日目の ICR マウスに MMC25mg/kg を単回投与すると, その胎仔の100%に完全口蓋裂が誘発されることは, 冬田ら⁹⁾により報告されている。そこで, 本来高率に完全口蓋裂を誘発する MMC 濃度において, TP を併用することにより口蓋形成期間中に作用する MMC の影響を軽減させて口蓋裂の発現を防御し, 正常に癒合した口蓋を有するマウス胎仔の発現率の増加を試みた。このようにして得られた正常口蓋に対して口蓋ヒダの観察を行った。その結果, MMC+TP 投与で得られた正常口蓋は, 対照群の正常口蓋に比べて口蓋ヒダ変異の出現パターンに有意差を認めており, MMC ならびに TP の双方がヒダ変異の発現に関与していることが推察された。

安田ら¹⁾・Kimmel ら²⁾は, 口蓋ヒダ変異のうち, 口蓋ヒダ過剰の発現率の増加は, 奇形発生の警告サインであると報告している。さらに, 安田ら³⁾・Harris ら⁴⁾は口蓋ヒダ4-7間でのヒダ過剰の発現が催奇形作用の検出指標であると報告している。本報告においても対照群と MMC+TP 投与群との間でヒダ過剰の発現分布に有意差を認めた。中でも口蓋ヒダ4-5間においてヒダ過剰の発現率が増加していた。しかし, ヒダ過剰の数は, 胎仔間でバラツキが認められ, 薬剤用量依存の有無は不明であった。

分断に関して、対照群においても口蓋ヒダ3ならびに口蓋ヒダ4での分断が散見されているが、MMC+TPの併用においてはTPの増量によって分断の発生率は低下しており、TP投与によるMMCの催奇形作用の抑制効果が推察された。また、TP単独投与群とMMC+TP投与群との間に分断の発現分布における有意差が認められており、TPとMMCの双方が分断の発現分布に、影響を与えている可能性が推察された。この意味付けについては、今後の課題であると考えられる。また、同じ実験系において中嶋ら¹⁷⁾は、MMC+TP投与群253匹中3匹(1.16%)に部分口蓋裂を認めており、そのいずれもが口蓋ヒダ2ならびに口蓋ヒダ3の正中部の分断を認めたと報告している。本報告においても、MMCを作用させた投与群の分断発現部位は、口蓋ヒダ2ならびに口蓋ヒダ3の正中部に集中しており、この部位における分断の発現は催奇形作用の指標となる可能性を示唆するものと考えられた。

結 語

今回、われわれは塩化メチル水銀による催奇性作用の調査の一つとして、マウス口蓋ヒダの変異について検討を行った。その結果、過剰と分断の発現部位について、対照群と比べ有意な変化を認めた。特に、口蓋ヒダ2ならびに口蓋ヒダ3の正中部における分断の発現は、催奇形作用の指標となる可能性を示唆するものと考えられた。

本論文の要旨は、第34回日本先天異常学会総会(平成6年7月、高知)において発表した。

引 用 文 献

- 1) Yasuda, M. and Maeda, H.: Significance of the lumbar rib as an indicator in teratogenicity test. *Cong. Anom.*, 13: 25-29 1973.
- 2) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G.: Skeletal deviations in rats: Malformations or variations? *Teratology*, 8: 309-316 1973.
- 3) Yasuda, M., Ohya, R., et al.: Variation in palatal rugae in near term fetuses from untreated Jcl: ICR mice. *Cong. Anom.*, 34: 71-75 1994.
- 4) Harris, M.J., Juriloff, D.M., et al.: Disruption of pattern formation in palatal rugae in fetal mice heterozygous for First arch (Far). *J. Craniofac. Genet. Dev.*

- Biol.*, 10: 363-371 1990.
- 5) Yasuda, M., Ohya, R., et al.: Variation in the palatal rugae in the mouse as an indicator for detection of teratogenicity. *J. Toxicol. Sci.*, 17: 348 1992. (abst.)
- 6) Yasuda, M., Ohya, R., et al.: Variation in the mouse palatal rugae induced by retinoic acid. *Cong. Anom.*, 33: 281 1993. (abst.)
- 7) Sakamoto, M.K., Nakamura, K., et al.: Studies of variant palatal rugae in normal and corticosteroid-treated mouse embryos. *Anat. Rec.*, 230: 121-130 1991.
- 8) 河辺広男, 西野 平, 他: 妊娠マウスへのメチル水銀経口投与の胎仔への影響. *三重医学* 16: 444-448 1973.
- 9) 冬田昌利, 藤本十四秋, 他: 妊娠哺乳動物(マウスとラット)に投与された塩化メチル水銀の胎仔におよぼす影響. *熊本医学会雑誌* 50(2): 182-192 1976.
- 10) 冬田昌利, 清藤英一, 他: 妊娠哺乳動物(マウスとラット)に投与された塩化メチル水銀の胎仔におよぼす影響. 1. 胎仔器官形成期に連続投与, 2. 胎仔器官形成期に1回投与. 文部省特定研究「難病」; 有機水銀中毒症研究班, 研究協議会(1977, 2)
- 11) 高橋 等, 平山紀美子, 他: Tioproninの体内水銀排泄促進効果の検討. *基礎と臨床* 9(6): 245-249 1975.
- 12) 藤本十四秋, 冬田昌利, 他: 塩化メチル水銀によるマウス口蓋裂に対するTioproninの防御効果. 第16回日本先天異常学会総会抄録集, 41. 名古屋(1976, 9).
- 13) 椿忠雄, 広田紘一, 他: メチル水銀投与妊娠マウスにおける2-Mercaptopropionyl glycineの影響. 文部省特定研究「難病」; 有機水銀中毒症研究班, 研究協議会(1976, 2).
- 14) 椿忠雄, 白川健一: 有機水銀中毒症の治療—特に α -Mercaptopropionyl glycineについて. *新薬と臨床* 15: 1471-1475 1966.
- 15) 小川栄一, 鈴木史郎, 他: 塩化メチル水銀の体内分布と排泄に関する実験的研究(1). *災害医学* 15: 222-228 1972.
- 16) 小川栄一, 鈴木史郎, 他: 塩化メチル水銀の体内分布と排泄に関する実験的研究(2). *災害医学* 15: 371-376 1972.
- 17) 中嶋充生, 牧正啓, 他: 塩化メチル水銀によるマウス胎仔顎顔面奇形に関する研究. 一軟口蓋裂発症系確立の試み—(抄). *日口外誌* 39: 1522-1523 1993.