生理食塩液使用による羊膜腔内投与法がマウス胎仔の 成長と口蓋形成に及ぼす影響 ——口蓋ヒダの変異について——

大 林 武 久・保 田 叔 昭*・中 嶋 充 生・牧 正 啓
門久美紀子・右 山 裕 則・田 縁 昭

Influence of method for intra-amniotic administration of physiological saline on fetal growth and palatal formation in mice ——Variations of palatal rugae——

Takehisa OHBAYASHI・Yoshiaki YASUDA*・MITSUO NAKASIMA・Masahiro MAKI
Mikiko KADOHISA・Hironori MIGIYAMA・Akira TAEN

Abstract: The purpose of this study was to examine differences in the effects of the intra-amniotic administration of physiological saline between a hysterotomy group (exo utero) and an extrauterine injection (in utero) group. We also checked for variant rugae in mouse embryos in which cleft palate did not develop.

On day 12 or 13 of gestation, 2 μ l of physiological saline was injected into the amniotic cavities of pregnant mice, either by hysterotomy or by extrauterine injection. The embryos were removed from these mice 18 days later.

The embryo survival rate was low in the hysterotomy group. It was therefore not possible to examine the incidence of cleft palate and variant rugae in this group. The incidence of cleft palate and variant rugae in the extrauterine injection group differed significantly from that in the untreated control group. The results indicate that extra-uterine injection is recommended for intra-amniotic administration of test compounds in toxicological studies. The features of variant rugae differed largely depending on the gestational age at which surgery was performed. This may be useful as an indicator of teratogenicity.

Key words: intra-amniotic administration (羊膜腔内投与), cleft palate (口蓋裂), variant rugae (口蓋ヒダ変異), teratogenicity (催奇形性)

緒 言

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自然科学室
(主任：保田叔昭室長)

Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
School of Medicine, Kumamoto University
(Chief: Prof. Akira Taen)

*Department of Biology and the Physical Sciences,
National Institute for Minamata Disease (Chief:
Prof. Yoshiaki Yasuda)

受付日：平成8年12月19日

実験動物において、発現頻度の高い外表奇形の一つに口蓋裂がある。しかし、従来より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において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。また、Harrisらは、奇形遺伝子 Far をもつマ

図1 羊膜腔内投与法

A 子宮切開投与法 (exo-uterus)

子宮壁を除去し、明視野下に羊膜腔内にマイクロピペットを用いて2 μ lの生理食塩水の投与を行う。

B 子宮外投与法 (in-uterus)

子宮壁外より胎盤ならびに胎仔の損傷がないよう注意を払いつつ羊膜腔内にマイクロピペットを用いて2 μ lの生理食塩水の投与を行う。

ウス胎仔において口蓋ヒダパターンの変異を認めたと報告している²⁾。すなわち、マウス口蓋粘膜にみられる8-9対の口蓋ヒダは、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、催奇形作用又は因子の検出指標となり得るとされ¹⁻⁹⁾、われわれもこの点に注目している。

現在、われわれは、胎仔への生理食塩液を用いた羊膜腔内投与法による口蓋形成機転の解析を計画している。しかし、マウスやラットにおいて、羊膜穿孔による羊水減少が口蓋裂を誘発するとの報告があり¹⁰⁻¹³⁾、子宮切開投与法 (exo-uterus) による胎仔手術においても口蓋裂等の奇形の合併が指摘されている¹⁴⁾。そこで今回われわれは、子宮切開投与法および子宮壁外からの投与法 (in-uterus) における、2通りの羊膜腔内投与法が口蓋形成に及ぼす影響を、ICR系マウスを用いて検討した。このうち口蓋裂を免れた胎仔の口蓋ヒダの変異について調査を行ったので報告する。

材料および方法

日本SLC社より購入した未経産ICR系マウスを用い、購入後1週間の馴化の後に使用した。昼夜逆転を行った飼育室 (lighting; 21:00-翌9:00) にて、7-16週齢の発情期にある雌マウスを午後1時から5時までの4時間雄と同居させ、膣栓の確認できた雌について、当日の午後3時を妊娠0日0時間と規定した。

妊娠12日0時間もしくは13日0時間にネブタール0.05mg/g、ウテメリン1.4mg/mouseを腹腔内投与した後開腹し、子宮角の一方をコントロール群

(C群)、もう一方を実験群とした。実験群では通常4胎仔ほどに子宮切開投与法 (exo-uterus: E群) を、残りに子宮外投与法 (in-uterus: I群) を施した (図1-A, B)。E群ならびにI群には、先を尖らせた直径50-100nmのマイクロピペットで胎盤を貫いて羊膜腔内へ刺入し、生理食塩液2 μ lを投与した。なお、処置を施していないマウスの胎仔は未処置群とした。妊娠18日0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 (1996) の基準を参考にし、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Fisherの直接確率検定を用いた。

結 果

処置が重度になるにしたがって胎仔生存率は減少傾向を示したが、処置日による有意差は認められなかった。胎仔平均体重は処置群すべてが、未処置群に比べ有意に減少していた ($P < 0.01$)。口蓋裂は未処置群に比べ12日目処置I群に有意に出現していた ($P < 0.01$)。口蓋ヒダの変異は、未処置群においても1種類以上のヒダの変異を示すものが59匹中48匹 (81.4%) に認められているが、処置群において増加傾向を示した (表1)。

図2 口蓋ヒダの正常パターン(妊娠18日胎仔)[坂本ら(1989)の正常パターン基準より引用]

A 実体顕微鏡写真(×30)
B 写真Aのシュエマ. 口蓋ヒダを前(吻)側より後(尾)側へ1から9までの番号を付与.

図3 口蓋ヒダの変異パターン[安田ら(1996)の変異パターン基準より引用]

★は未処置群にも多発し、正常範囲の変異と判定されるもの。ただし、rugae 4以後の過剰はまれで、異常と定義される。
★を付けないものは未処置群ではまれで、異常と定義される。

それぞれの変異の発現頻度(表2)については、未処置群に比べ処置群において1口蓋あたりのヒダ変異の多発化ならびに重度化の傾向が認められた。また、12日目処置群よりも13日目処置群において尾側かつ外側でのヒダ変異が増加する傾向が認められた。分断

- 1) Super-numerary : 定数より多い小ヒダまたは口蓋粘膜の突起を rugae 8 または 9 より上方に認めるもの。
- 2) Division : ヒダが2つまたはそれ以上の部分に分離したもの。
- 3) Lateral bifurcation : ヒダの側方端部が枝分かれしたもの。
- 4) Cross : 前(吻)側より後(尾)側に斜走するヒダで小板を伴ったもの。
- 5) Short : 通常サイズの2/3より短いもの。
- 6) Fusion : 2つの近接したヒダが中心側または側方において癒合したもの。
- 7) Mal-direction : 他のヒダの領域にまで斜走する方向異常を認めるもの。

については、正中部分断の発生が12日目処置群の口蓋ヒダ3においてのみ認められ(写真1)、特にI群は、未処置群ならびに13日目処置群に比べ有意に増加していた($P<0.01$)。方向異常については、12日目処置I群の口蓋ヒダ5が、未処置群に比べ有意に増加してい

表 1 処置による影響

Time of treatment during gestation (day/hr)	Treatment	No. of embryos	No. of live fetuses (%)	No. of fetuses with cleft palate (%)	No. of fetuses with normal palate (%)	No. of fetuses with variant rugae (%)	Mean fetal weight (g)	
							weight	S.D.
12/00	C	61	53 (86.9)	0 (0)	53 (100)	50 (94.3)	1.191★	0.161
	I	73	59 (80.8)	8 (13.6)★★	51 (86.4)	48 (94.1)	1.161★	0.156
	E	38	23 (60.5)	0 (0)	23 (100)	23 (100)	1.135★	0.144
13/00	C	76	61 (80.3)	4 (6.6)	57 (93.4)	53 (93.0)	1.169★	0.187
	I	60	45 (75.0)	2 (4.4)	43 (95.6)	42 (97.7)	1.142★	0.129
	E	39	24 (61.5)	2 (8.3)	22 (91.7)	21 (95.5)	1.146★	0.116
Untreated	—	—	59 (—)	0 (0)	59 (100)	48 (81.4)	1.347★	0.117

C: controls, I: in utero method, E: exo utero method.
★ P<0.01, significantly different from untreated group (by Wilcoxon's rank sum test).
★★ P<0.01, significantly different from untreated group and control group on the same day (by Fisher's exact probability test).

た (P<0.05 : 写真 2)。側方分岐については、12 日目処置 C 群 (P<0.05) ならびに 13 日目処置 I 群 (P<0.01) が、未処置群に比べ有意に増加していた (写真 3)。短小については、12 日目処置 I 群が未処置群に比べ有意に増加していた (P<0.01 : 写真 4)。その他、過剰・交叉・癒合は、未処置群をはじめ各処置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

マウス胎仔は、子宮－胎盤系がたもたれていれば子宮外においても正常に近い状態で發育できることが明らかにされ¹⁵⁾、胎仔に対する実験操作が子宮外で行われるようになった^{16, 17)}。しかしながら、今回の実験においては、処置群だけでなくコントロール群においても低体重、口蓋裂の誘発やヒダ変異の多発化ならびに重度化が認められたことより、母体に対する外科的侵襲そのものが胎仔の成長抑制ならびに催奇形因子を有することが示唆された。また、今回は母体への開腹操作のみを行った胎仔をコントロール群として用いたが、生理食塩液の投与を行った群と羊膜腔内への穿孔のみを行った群との胎仔への影響の差も比較検討する必要があるものと考えられた。

安田ら¹⁾・Kimmel ら³⁾は、口蓋ヒダ変異のうち、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⁴⁾・Harris ら²⁾は、口蓋ヒダ 4－7 間でのヒダ過剰の発現は催奇形作用の検出指標であると報告している。本実験においても、口蓋ヒダ 4－6 間で処置群すべてにおいてヒダ過剰を認めたが、各実験群間に有意差は認められず因果

関係は不明であった。

近年、口蓋ヒダ 2 および口蓋ヒダ 3 の正中部分断が催奇形作用の指標となる可能性があることが報告されている^{8, 9)}。本実験においても、12 日目処置群のみに特異的に口蓋ヒダ 3 の正中部分断が生じており、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。坂本ら⁵⁾は、口蓋板の癒合は中央部よりやや前方 (口蓋ヒダ 3－4 付近) で始まり軟口蓋後方の癒合や硬口蓋前方における一次口蓋・二次口蓋の癒合はやや遅れ、口蓋ヒダ 2 ならびに口蓋ヒダ 3 の正中部癒合は口蓋板癒合の最終段階に終了すると報告している。本実験においては、12 日目処置群のみに口蓋ヒダ 3 の正中部分断を認め、この時期の侵襲が正中癒合部の口蓋ヒダ 3 の形成に影響を及ぼしたものと推察した。12 日目処置群において未処置群との有意差を認めた正中部分断・方向異常・短小や 12 日・13 日両処置群において有意差を認めた側方分岐の発現状態により、口蓋ヒダ形成期においては、吻側より尾側に向かって、中央部より外側部に向かって、経時的にヒダ変異の感受性を有する時期があり、その時期特有のヒダ変異の種類があることが推察された。また、有意差を認めたヒダ変異は I 群に集中しており、胎仔に致死的に働く傾向が強い E 群においては口蓋裂または口蓋ヒダ変異の発現が明らかにならなかったものと推察された。

以上より、ある一定時期に母体および胎仔に与える外科的侵襲そのものが、胎仔の成長および口蓋の癒合に抑制を引き起こすのみならず口蓋裂を免れたマウス胎仔においても口蓋ヒダ変異をもたらす要因となることがわかった。また、羊膜腔内投与法においては、子宮切開を行うよりも、子宮外投与を行うほうが薬剤投

表 2 口蓋ヒダ変異発現頻度

			12/00				13/00	
Untreated			-----	-----	-----	-----	-----	-----
			C	I	E	C	I	E
(n=59)			(n=53)	(n=51)	(n=23)	(n=57)	(n=43)	(n=22)
Supernumerary								
Rugae	1 - 2	0	1	0	0	1	1	0
	2 - 3	75	59	69	21	60	58	33
	3 - 4	2	6	3	0	0	2	1
	4 - 5	0	1	1	0	3	2	1
	5 - 6	0	0	1	2	0	1	0
Division								
Rugae	3	0	4	11★	2	0	0	0
	4	1	5	2	6	1	1	0
	5	1	2	5	1	3	4	6
	6	0	1	0	0	0	0	0
	7	0	0	2	0	0	0	0
Maldirection								
Rugae	4	0	2	2	2	0	0	0
	5	0	1	5☆	0	0	0	0
Lateral bifurcation								
Rugae	2	0	1	0	0	0	0	0
	3	1	7☆	4	6	3	10★★	4
	4	0	2	1	0	2	0	0
	5	0	0	0	0	0	1	0
Short								
Rugae	4	0	1	8★★	2	0	2	1
	5	1	4	3	2	4	1	0
	6	0	1	1	1	0	0	0
Cross								
Rugae	4 - 5	0	5	2	2	1	2	2
	5 - 6	0	1	0	0	1	0	0
Medial fusion								
Rugae	5 - 6	0	2	4	4	1	0	0
	6 - 7	0	4	0	3	0	1	0
	7 - 8	0	3	6	0	0	0	2
Lateral fusion								
Rugae	4 - 5	0	1	1	0	0	1	0
	5 - 6	0	0	0	0	0	0	0
	6 - 7	0	0	0	1	0	0	0
	7 - 8	0	0	1	0	0	0	0

★ P<0.01 : significantly different from untreated group and 13th-day treatment group (by Fisher's exact probability test).
★★ P<0.01 : significantly different from untreated group (by Fisher's exact probability test).
☆ P<0.05 : significantly different from untreated group (by Fisher's exact probability test).

写真 1

(12 日目処置 control 群)
口蓋ヒダ 3 の正中部分断を認める。

写真 3

(13 日目処置 in-utero 群)
口蓋ヒダ 3 の右側に側方分枝を、口蓋ヒダ
左側 2-3 間に過剰を認める。

写真 2

(12 日目処置 in-utero 群)
口蓋ヒダ右側 4 と 5 ならびに左側 4 に方向
異常を、口蓋ヒダ両側 2-3 間に過剰を、口
蓋ヒダ左側 5 に分断を認める。

写真 4

(12 日目処置 in-utero 群)
口蓋ヒダ右側 4 に短小を、口蓋ヒダ左側 4
に分断を、口蓋ヒダ左側 7-8 間に側方部
癒合を認める。

結 語

今回、われわれは、羊膜腔内投与法による催奇形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、口蓋ヒダ変異の種類は、外科処置を行った胎齢に大きく影響を受けることが推察された。また、外科的侵襲は、催奇形作用の要因の

与を行う上で、効果判定に有効であると考えられた。さらに、口蓋ヒダ形成期においては、方向性のある、時期依存性のヒダ変異の種類があることが推察された。

この結果は、羊膜腔内投与法を施行する際に考慮すべき問題である。

一つになる可能性があり、羊膜腔内投与法を行う際に十分に考慮すべき問題であると考えられた。

本論文の要旨は、第41回日本口腔外科学会総会（平成8年11月、東京）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) 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.
- 3) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G.: Skeletal deviations in rats: Malformations or variations? *Teratology* 8: 309-316 1973.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.)
- 7) Yasuda, M., Ohya, R., et al.: Variation in the mouse palatal rugae induced by retinoic acid. *Cong Anom* 33: 281 1993. (abst.)
- 8) Yasuda, M., Rong, G., et al.: Variant patterns of mouse palatal rugae. *Cong Anom* 34: 268 1994. (abst.)
- 9) 大林武久, 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。一口蓋ヒダの変異について。日口外誌 41: 520-525 1995.
- 10) Trasler, D.G., Walker, B.E., et al.: Congenital malformations produced by amniotic-sac puncture. *Science* 124: 439-440 1956.
- 11) Walker, B.E.: Effects on the palate development of mechanical interference with the fetal environment. *Science* 130: 981 1959.
- 12) Harris, J.W.S.: Oligohydramnios and cortisone induced cleft palate. *Nature* 203: 533-534 1964.
- 13) Poswillo, D.: Observations of fetal posture and causal mechanisms of congenital deformity of the palate, mandible and limbs. *J Dent Res* 45: 584-596 1966.
- 14) Tamagawa, M., Keino, H., et al.: Induction of the hydrocephalus by the injection of autintricarboxylic acid in mice exo utero. *Cong Anom* 34: 345-352 1994.
- 15) Muneoka, K., Wanek, N., et al.: Mouse embryos develop normally exo utero. *J Exp Zool* 239: 289-293 1986.
- 16) 三宅敏彦: 子宮外手術法と脳神経系細胞ラベル。実験医学 11: 743-749 1993.
- 17) Nakasima, M., Yasuda, Y., et al.: Influence of the manipulation for intra-amniotic administration on fetal growth and palatal formation in mice. *Cong Anom* 35: 383 1995. (abst.)