

齧歯類の発生のひずみをしらべる

永井 廣

岡山大学歯学部口腔解剖学第1講座

1. なぜ発生のひずみをしらべるのに齧歯類を使うのか

ここでいう発生のひずみをしらべることとは環境要因、主として化学物質によってひきおこされる奇形の発現機序の解析を指している。

妊娠動物に化学物質を適用して発生のひずみ（奇形を含む）をひきおこす事例は数えきれず多い。実験動物に何をを使うかは、ヒトの事例と対比して考えるときその成果を左右する。たとえば霊長類（サル類）を使って発生のひずみをしらべるとは系統発生的な近似から考えて妥当であろう。霊長類がヒトと同様な絨毛尿膜胎盤であり、当然形態的・発生時間的な類似も加味される。しかも薬物の代謝など生化学的要素もヒトに類似し、ヒトと同等量で胎仔の感受性に類似があることも有利である。しかし、生殖能力の低さに伴う供給難、飼育経費の大きさなどを考え併せると常時発生のひずみの研究に供することには難がありすぎる。

ヒトに似た胎盤を有する意味でイヌは普遍的な実験動物であるが純系の開発にはほど遠く、薬理的な知識の蓄積は多いが、生殖に関する知識に乏しい。モルモットは胎盤の形態の上から有効な実験動物であるが、生殖能力が低く、妊娠期間の長いのが欠点である。

ウサギは生殖に関する知識が多く、人工受精の材料として有利である。ラットは受胎能力が高く、自然に発生する外形のひずみはほとんど1%以下で、しかも遺伝子が安定し、取扱いも容易であるが環境要因に対しては感受性は低いようである。マウスは環境要因に対しては極めて感受性が高く、自然に成立する外形のひずみは系統によっては高率で不安定である。しかしその遺伝的な安定性、育種学的に安定した質量の供給面、経済面、取扱いなど考え併せて、ラット・マウスがもっとも妥当な実験動物といえる。

2. どんな系統を選んだらよいのか

実験動物としてラット・マウスを用いるのどの系統を選んだらよいかはやはり発生のひずみを正しく評価する上に大切である。妊娠した実験動物の感受性の系統差はその種差に比べて解析しにくい。

ここでは系統の表示法がよく整理されているマウスについてclosed colonyと近交系（inbred strain）を使用する例をとって論じてみよう。closed colonyは他からの移入がなく、一定の集団内のみで交配維持されている群とされ、近交系は文字通り兄妹交配または親子交配を20代以上継続している群とされる。

我々が繁用しているclosed colonyはICR-JCL, dd/Sであり、他にCF#1の例をあげる。近交系はA/Jaxを例にとる。ICR-JCLは多産を目標に開発されているので、着床数の平均を除けば外形異常の発現率はdd/Sと大差がない。dd/SとA/Jaxは京大医学部純系動物飼育室で繁殖をおこなってきたもので勝矢が集計したもの（私信）が含まれる。CF#1は武田薬工安全性研究所の資料（亀山ら、1980）を用いた。

これによるとdd/Sは死仔（dead fetus）、外形異常（external malformation）の発現率（それぞれ8.1%、1.1%）も低く、CF#1は死仔率（25.3%）が高く、外形異常の発現率（1.6%）が低く、A/Jaxは死仔率（25.5%）外形異常の発現率（14.1%）ともに高い。またdd/Sにおいては内反足（club foot）のような軽症の四肢異常が多く、指趾の異常は前肢第5指外側に肉芽突起がみられるが多指（polydactylia）とは異なる。CF#1は短尾（kinky tail）、内反手（club hand）、内反足よりも、多指、乏指（oligodactylia）、短指（brachydactylia）など指趾の先端に少数ながら重篤な

異常がみられる。A/Jaxは眼瞼開存 (open eyelid), 口蓋裂 (cleft palate), 口蓋裂と兎唇 (harelip) の合併症が非常に高率に発現した。

dd/S と CF#1 はともに closed colony ではあるが起源が異なり, CF#1 は一定の集団の中で交配を続けていくうちに指趾の異常の遺伝子型が発現したものであろうし, A/Jax は近親交配を続けていくうちにそれぞれの個体の遺伝子型がホモになり, 異常の発現が高率になったものと思われる。母体は生仔でも生存能力の低いものについては哺育しないし, 口蓋裂と兎唇を併発した生仔も喰殺してしまう。異常の大半は毛, 尾, 眼, 指趾のような直接生存に影響のない部位に限られることは, dd/S や CF#1 の例でも明らかである。まず一連の長期にわたる実験では近交系は避け, closed colony でも起源を同じくする同一集団を用いるべきであろう。事実 CF#1 の調査個体数が dd/S に比べて少なく, A/Jax の調査個体数が極端に少ないのは, 同一実験室内での使用が放棄された結果を物語っている (Table 1)。

3. 発生のひずみを起こさせる作用量

もっとも効果的に発生のひずみを起こさせるための因子のひとつは化学物質の作用量である。単純に考えて作用量を段階的に増し, 形態分化時期 (器官形成の感受期にあたる) に作用させるものとする。次のどれかの表現で示されよう。(1)母体が死亡する作用量, (2)胎仔が死亡する作用量, (3)胎仔が死亡し, 異常が発現する作用量, (4)異常が発現する作用量, (5)異常が発現しない作用量である。

母体が死亡する作用量は当然胎仔の死亡に先行するから, 使用時に急性毒性 (LD₅₀) に近い値を大量作用量として設定できる。しかし急性毒性は (1)~(5)までの作用量を決めるのに不適当であるという考えもある (Schardein, 1976)。そこで逆に使用時に薬効量 (ED₅₀) に近い値を少量作用量として設定する考えもある。しかし LD₅₀ も ED₅₀ も明示出来ない作用物質もあろうから臨床投与量

Table 1. Summary of Terminal Stage Sacrificed on Pregnancy

Strain	dd/S	CF#1*	A/Jax
No. of Dams	763	293	54
No. of Implantations (Mean)	6,188 (8.1)	—** (11.9)	408 (7.6)
No. of Live Fetuses (Mean)	5,688 (7.5)	2,593 (8.8)	304 (5.6)
No. of Dead Fetuses (%)	500 (8.1)	—** (25.3)	104 (25.5)
No. of Gross Malformations (%)	65 (1.1)	42 (1.6)	43 (14.1)
Type and Number of Malformations	EC(1), AT(2), CP(6) AF-AE(16), HI(1) CF(40), MS(1), ND(1)	HC(1), MP-AP(1) OE(1), MT(2), MG(4) CP(4), OC(3), KT(6) CH(1), CF(6), PD(16) OD(2), BD(1), CD(1) SH(1)	OE(15), CP(7), CF(3) PD(2), CP+HI(18)

EC : Exencephalia

HC : Hydrocephalia

MP-AP: Micro or anophthalmos

MT : Microtia

MG : Micrognathia

OC : Omphalocele

OE : Open eyelid

(): Number

CP : Cleft palate

HI : Harelip

MS : Myeloschisis

AF-AE : Abnormal finger or toe

CH : Club hand

CF : Club foot

AT : Abnormal tail

KT : Kinky tail

PD : Polydactylia

OD : Oligodactylia

BD : Brachydactylia

CD : Clinodactylia

SH : Subcutaneous hemorrhage

ND : No description

* Takeda

** No indication

(TD₅₀)の10倍程度の値を少量作用量と設定することもある。大量作用量か少量作用量が設定されればあとは前者ならばその分数、後者ならばその倍数を設定してゆくわけである。

ある作用量で胎仔の半数が死亡(FLD₅₀)する域(あるいは閾値)に達する。さらにその作用量を下げると、死仔(dead fetus)生仔(live fetus)が混在する域に達する。死仔には着床痕(implantation), 吸収(resorption), 胎盤遺残(placental remnant), 浸軟胎仔(macerated fetus)が混在する域があり, 生仔には体重の統計処理で正常個体と体重減少個体が混在する域がある。

胎仔の死亡と異常の発現が相関をもたないと考えると, ある作用量で全胎仔が重篤な複合奇形(serious complication)を発現する域に達する。さらに作用量を下げるに従って, より軽度な異常を発現する域がつづく。

ある作用量で異常の発現は有意でなくなる。胎仔の死亡の域が先行する場合と異常の発現の域が先行する場合とがある。一方の域が現れないまま母体の死亡に至る場合もある。胎仔の死亡と異常の発現は平行的なものでなく相関がないと指摘する場合もある。言い換えれば, 胎仔の死亡の域も異常を発現する域も非常に狭い幅であるということになる。

もっとも効果的に発生のひずみを起こさせることは実はこの狭い幅を見出すことである。

4. 発生のひずみを起こさせる作用時期

もっとも効果的に発生のひずみを起こさせる次の因子は化学物質の作用時期である。その作用時期はどの実験動物でも形態分化の時期であり, 器官形成の感受期である。器官形成の感受期がいつであるかは正常発生の知識の正しい把握の上に立たなければならない。齧歯類では発生の速度の形態学的な指標が次のようにすすんでゆく。原始線条(結節)の出現, 心臓原基の出現, 眼杯の形成, 耳胞の形成, 前神経口の閉鎖, 前肢芽(前肢芽の指放線)の形成, 後神経口の閉鎖, 後肢芽(後肢芽の趾放線)の形成, 心室中隔の完成, 口蓋板の癒合などの順である。

上記器官形成時期はラットで妊娠7~17日,

マウスで妊娠6~15日とされる。ただし, 妊娠日の算定は交尾時から24時間以内を妊娠1日目とした場合である。妊娠1日目方式をとるか妊娠0日目方式とするかは研究者の考えに基づいている。また妊娠1/2日目方式をとる場合もある。算定法をよく吟味しないと前述の指標はすべてずれてしまう。交尾した動物は必ずしも妊娠したわけではないので腔栓(精液の凝固)を厳密に検査しなければならない。

妊娠検査はラットとマウスで少し違うし, 腔脂膏の細胞を検鏡することがもっとも確かなのであるが, 多数の雌を検査するには労力がかかりすぎる。

われわれは一応妊娠の0日目方式をとっている。したがって器官形式の感受期はラットで妊娠6~16日, マウスで妊娠5~14日とよみかえられる。感受期以前は主として胎芽の着床時期であるから, 化学物質を作用させても早期死亡や流産のみがおきる。しかし, これも異常の発現とも考えられる。

また, 化学物質の量を増して作用させるとそれぞれの感受期が延長することもある。さらに個体差もあるが, おおよそラット, マウスの感受期はこれにおさまる。作用させた化学物質の侵襲は器官形成がもっとも盛んに行なわれているときに最大の効果を現わすとされるから, 例えば心原基の出現はラットで9日, マウスで8日であり, 心室中隔の完成はラットで15日, マウスで13日とされているからこの時期に作用させれば異常は成立することになる。心臓の分化が完成すれば化学物質を作用させても異常は成立しない。ただし, 大動脈弓の走行異常などは早い時期の心ループの異常に左右されて遅い時期に成立するようになる。口蓋裂の成立はラットで9~10日, 12~13日に高い率で成立することがある。いずれの時期の成立かは正確に24時間ごとの化学物質の作用を行なわないと判断できない。作用させた化学物質が吸収, 代謝, 排泄といった生理的な速度が早ければ, 容易に異常の成立時期を推定できるが, 緩慢な速度あるいは不完全な生理作用が行なわれると感受期をずれても異常が成立することになる。また体内に蓄積されていると考えられる化学物質があった場合, これを完全に除去したのちに改めて化学物質を作用させるのでなければ結果の正確は期しが

たい。事実奇形とか異常といった大きな発生のひずみでなくとも歯胚の形成などは通常の影響を大きくは受けているのである。

5. 発生のひずみを起こさせる作用頻度

化学物質の作用は器官形成感受期内で多くは連続でおこなわれる。これは臨床時に連続投与がおこなわれることが多いこと、また1日単位（以下単独）で作用せしめた場合の試験規模の膨大化を避けてのことである。作用を連続しておこなうとき、その初回と第2回以降の効果が差があり、例えば肝機能の機能低下に伴う効果の漸増、逆に化学物質の酵素による効果の漸減などの問題がある。さらに作用を連続しておこなったとき、母体の衰弱をひきおこし、発生のひずみをおこすよりは母体の耐性すら失うことになる。これを避けるために出来るだけ少量の作用量を設定すると、その連続での作用量の総和に等しい単独の作用量では効果が現れないことがある。われわれは時にこれを異常が全く起こらず、無害であるという誤った考えへと導いてしまう。臨床的に発生のひずみを起こさせる化学物質の作用は単一とは限らない。連続して1つの化学物質を作用させる重積効果を考慮するなら、複数の化学物質を作用させる相互効果も考慮しなければならない。相互効果が正（増加）であるか負（減少）であるかは、作用量、作用時期、作用頻度などの設定の度合で決まる。

相互効果を次のように分ける考え方がある

(Runner et al, 1960)。

- (1) 干渉 (interference) (2) 無効果 (no effect)
(3) 相加効果 (additive effect) (4) 相剋効果 (potentiation) である。

干渉は複数の化学物質がそれぞれ引き起こす異常の量よりも、その和が低い場合である。無効果は異常の和に変動がない。相互効果は複数の化学物質がそれぞれ引き起こす異常の量とその和が同じということである。相剋効果とは複数の化学物質がそれぞれ引き起こす異常の量よりもその和がはるかに多いということである。

6. 発生のひずみを「動物試験法」でしらべる

発生のひずみをしらべるとなると次のすすめか

たが考えられる。

(1) 予備としてLD₅₀, T/LD₁₀₀（すべての胎仔が死亡するかすべて奇形を起こす量）、FLD₅₀, ED₅₀, TD₅₀などをしらべる。

(2) 交配予定の雄および雌のそれぞれに一定期間、発生のひずみを起こさせる化学物質を作用させる。雌の半数は出産の直前に開腹して胎仔をしらべる。他の半数は出産させて胎仔の生後発育をしらべる。

(3) 胎仔の形態分化期（器官形成の感受期にあたる。以下同じ）に化学物質を作用させる。出産の直前に開腹して胎仔をしらべる。一定数を出産せしめて胎仔の生後発育をしらべる。

(4) 形態分化期の終りから出産の直前まで化学物質を作用させる。半数は出産の直前に開腹して胎仔をしらべる。他の半数は出産させて新生仔が離乳するまで母体に化学物質を作用させ、その生後発育をしらべる。

(5) 離乳から成熟まで化学物質を作用させて、器官別の発生のひずみをしらべる。

(1)を予備試験、(2)を繁殖試験、(3)を催奇形試験、(4)を周産期および授乳期試験などと呼称すると、1965年に厚生省から提示された「医薬品の胎仔に及ぼす影響に関する動物試験法」（以下「動物試験法」）の区分けとほぼ一致する。

(1)の予備試験は実際の効率を考慮しても少数例でよいから試験を行ない、正確に把握しておくことが望ましい。

(2)の繁殖試験は「動物試験法」によると、化学物質の作用は雄は交配前60日以上、雌は交配前14日以上を交配後器官形成の感受期直前までとされる。また雌はすべて出産直前に開腹、黄体数（総着床数）、胎仔の死亡率、妊娠状況を把握し、生仔については性別、成熟度（体重）をしらべ、外表・内部器官を観察、必要に応じて骨標本、組織標本を製作して検索する。とくに生後発育を観察する必要はないとされている。1つの実験群の動物数はラット、マウスとも雌雄各約20匹。原則として臨床適用経路、作用量は最大耐量を含む3段階以上とされている。

(3)の催奇形試験は「動物試験法」によると、化学物質の作用はラットで妊娠7～17日、マウスで

同6～15日、ウサギで同6～18日とされる。各実験群 $\frac{2}{3}$ (非齧歯類では全数)を出産直前に開腹、(2)にならって観察、他の $\frac{1}{3}$ を出産させて新生仔の成長、発達、生殖機能などを観察する。必要に応じ更に長期間の観察や、母動物の次産仔に関する検索を行なうとされている。動物数はラット・マウスで約30匹、ウサギで約10匹、ただし適用経路、作用量と段階は(2)と同じとしている。動物数は試験法の改定のために増されてきた。しかし統計処理として1群10～15匹程度で十分であると考ええる。

(4)の周産期および授乳期試験は「動物試験法」によると次のように定められている。化学物質の作用はラットで妊娠17日～生後21日、マウスで妊娠15日～生後21日、ウサギで妊娠18日～生後30日とされている。全数を出産させ、生仔が離乳するまで母体に化学物質を作用させて新生仔の成長、発達、生殖機能などを観察する。必要に応じ、更に長期間の観察や、母動物の次産仔に関する検索を行なうことは(3)と同じである。

(5)の離乳期から成熟までに化学物質を作用させるのは「動物試験法」にはない。われわれはこの時期には歯牙萌出に伴う硬組織構造のひずみ、切歯の成長に伴う象牙芽細胞・エナメル芽細胞などの細胞増殖のひずみをしらべることになっている。

7. 「動物試験法」による実際のすすめかた

発生のひずみのしらべかたは研究者の十分な発生的な基礎知識とあらかじめ化学物質の作用機序解析することによってその冗漫さが避けられる。「動物試験法」ではWHOなどにおいて常に国際的に受け入れられる試験の基準と方法が討議されていてそのたびに基準の厳正化、方法の増加がある。

以下「動物試験法」に基づいて化学物質を作用させた実際について説明する。

例は抗腫瘍剤として開発されたことのあるアルキル化合物 Vercyte[1.4.bis(3-bromo-propionyl) piperazine]の6の(3)の催奇形試験についてである。「動物試験法」に従って実験動物はラット、マウスの2種、1つの実験群は約30匹、作用経路はVercyteを0.5%CMC(carboxymethyl cellulose)に懸濁し、1日1回強制連続経口作用を行

なった。ただし、連続作用はラットは妊娠7～14日、マウスは妊娠6～13日の各8日間とし、二半期4日間づつに分けて連続作用する2群(以下前半期および後半期)と8日間全期通して投与する1群(以下全期)を設けた。

作用量は最大作用量を6の(1)の予備試験の結果、体重1kg当たり、ラットで40mg、マウスで80mgと定め、以下ラットで20mg、10mg、5mg、2mgとし、マウスで40mg、20mg、10mgとした。すなわち連続作用群はラットで5段階、マウスで4段階となり、それぞれこれに0.5%CMCのみ作用の対照群を加えた。ただし、母体の最大耐量が二半期のうち前半期と後半期とで異なり、また全期では最大耐量は低下するから段階数は実施時に減少する。出産直前に開復する $\frac{2}{3}$ の約20匹について作用時期中の母体の生死、体重、健康状態、摂取量、摂水量などをチェックし、場合によっては途中剖検を行なった。

ラットは妊娠20日、マウスは同18日にエーテル麻酔又は頸椎脱臼で屠殺、帝王切開(caesarean section)して子宮を手早く取り出し、生理食塩水内に固定した。子宮の収縮はとくに激しいため胎仔が溢血したり、損傷することがあるので、これも手早く子宮間膜の反対側(antimesometric side)に沿って子宮壁を開け、胎仔は羊膜をつけたまま取り出した。別に体温程度に暖めた生理食塩水中で羊膜を破った。

抗腫瘍剤の場合、死仔、生仔とも状態もいろいろで、浮腫、血腫、着床痕、吸収仔、遺残胎盤などは見のがされ易い状態にある。生仔については体重、体長を測定、皮膚の状態、性別をみたのち、実体顕微鏡下で頭部、胸部、肢部の順に観察していった。とくに記録にとっておく場合は冷光の下で手早く写真撮影をした。胎仔は固定液などで処理すると、血腫、浮腫、皮下の血管などが明確でなくなる。また抗腫瘍剤ではしばしば妊娠途次に開腹することもあり、そのとき体節、脳胞、心臓、指放線などが不明瞭になるので出来るだけ生時、生理食塩水中で撮影することが望ましい。観察が終了したのち、とくに綿密な組織観察を必要とするための固定液での処理のほかは2分してブァン液(Bouin's fluid)と95%アルコールに入れた。

ブアン液に入れたものは内臓の検索に、95%アルコールに入れたものは骨の検索にかなった標本を作成した。

Vercyteのような新しい開発された抗腫瘍剤の催奇形試験を行なうときは、その実験群の設定にはいくつかの派生的な実験群を予測しなければならない。連続して4日間もしくは8日間作用させることはヒトと対比すれば極めて長期間といえる。母体の耐性を考えれば1日のみ(以下単独)作用せしめる方が、作用機序の解析に容易であることはいうまでもない。単独作用を行なった場合の実験群の段階は、当然連続作用における実験群の段階の3~4倍となる。また抗腫瘍剤は化学構造の違いがあっても早い速度で胎仔への侵襲を行ない、かなり似通った作用機序で又は典型的な異常を起こす。

したがって、実験群の段階もいわゆる最大作用量から分数で設定してゆくことは発生のひずみを見つけ出すのに危険が伴う。当然、更に段階の細分化を考えねばならない。この場合、ラットで30mg、マウスで60mgの実験群を設定した方がよい。

抗腫瘍剤が薬剤として従来のものよりどれほど優れているかは催奇形試験の重要な解析点である。われわれは極めてよくその発生のひずみがしらべられている同系抗腫瘍剤のMyleran[1, 4-Dimethane sulfonyloxybutane]をポジティブ対照群(positive control)として選んだ。このことはVercyteの場合と同数の実験群の設定を意味するので、ここでまた実験群の段階数は倍になる。

8. どんな発生のひずみがみられるか

実体顕微鏡下で頭部・胸部・腹部・肢部の順に観察してゆくときのような発生のひずみが見られる。

頭部(head)は観察項目が多いので頭蓋、顔面、眼、耳、口蓋、口吻などに区分する。頭蓋では外脳症(exencephalia)がもっとも普通に成立し、識別が容易である。外脳症は成立感受期が早く、脳室面が反転して露出し、ヒトの無脳症(anencephalia)に相当するものとされる。水頭症(hydrocephalia)は髄液の異常によるもので成立感受期は遅い。ほかに頭頂部に水泡(bubble)がみら

れる例もあるが組織切片での識別が必要である。実験動物の系統によっては無脳症、脳ヘルニア(encephalocele)、耳頭症(octocephalia)がごく少数成立する。眼は頭蓋に次いでひずみの型が多い。眼瞼開存(open eyelid)は出生時、正常で開いていない眼瞼が開いているもので普通に成立する。無眼球症(anophthalmos)、小眼球症(microphthalmos)は組織切片によって確認すべきである。小眼球症は網膜組織の痕跡の存在をもって判断している。眼球突出症(exophthalmos)は頬骨が異常をおこし眼窩が狭くなって成立するものとされる。実験動物の系統によっては結膜のうっ血がみられるときがある。

耳は耳介の大きさ、形態、位置の異常がみられる。系統によっては小耳症(microtia)がみられる。

顔面は兔唇(harelip)、口蓋は口蓋裂(cleft palate)が普通に成立する。兔唇は口唇裂とも呼ばれ、口唇の閉鎖不全、口蓋裂は口蓋の閉鎖不全である。両者の合併症は重篤である。系統によっては口蓋裂の成立頻度は高く、その差が著しい。成立する時期も二相性(器官形成期の初期と後期に高頻度に成立する)の場合もある。

口吻の形状はしばしば無嗅脳症(arrhinencephalia)と関係している。鼻先は角ばらず円味を帯びて一見短くみえる。舌は過形成(hyperplasia)の巨舌症(macroglossia)が成立する。

顎の減形成(hypoplasia)は骨の観察結果との関連で判断しなければならないが、小顎症(micrognathia)と下顎長のみの短縮とに分けるべきである。系統によっては下顎欠損症(agnathia)が少数成立するが、しばしば外脳症、脊髄裂を伴う。

胸部(chest)は外表からうかがえ知れぬ異常が多い。またに右心症(dextrocardia)心臓逸所(ectopia cordis)があるが、生存中に胸腔を透視できる場合である。腹部(abdomen)は腹壁、背、下腹に区別する。腹壁にはヘルニア(hernia)が成立する。これは軽症で臍ヘルニア(omphalocele)となり重症で内臓ヘルニア(visceral hernia)となる。背は脊椎裂(myelomeningocele)又は二分脊椎(spina bifida)がみられる。これは形状が開放性か潜在性かによって成立の頻

度が異なり、また部位も背の上部か腰仙部に偏ることもある。外脳症およびその類症、脊髄裂およびその類症は神経管の閉鎖障害に起因している。

下腹は生殖結節 (**genital tubercle**) の減形成か欠如 (**absence**) である。雌性器官は時に雄性化する。外性器は肛門生殖間距離 (**anogenital distance**) を計測して、その性別を見分けることにしてあるが、是非内性器を剖検すべきである。鎖肛 (**anal atresia**) はしばしば成立する。浮腫は全身の浮水腫 (**anasarca**)、浮腫 (**edema**)、血腫 (**hematoma**) などと外形的に識別される。

肢部 (**extremity**) は前肢、後肢に分けられ、それぞれ左右指放線、左右趾放線といった発生の速度の指標となる部位を観察する。四肢の異常 (**abnormal extremities**) は前肢より後肢に異常 (**hind limb abnormal**) が多い。型は短肢症 (**micromelia**) が普通であるが、正確には長管骨を観察して、単なる変形か癒合による短縮かあるいは骨の異常は全くないものなのか判断した方がよい。内反手 (**pes varus**) は少なく、内反足 (**club foot**) はもっとも普通に成立するが見掛上の場合がある。さらに胎仔の子宮内での状態から観察をしないと内反足、内反手などの判断を誤ることがある。

指趾の異常 (**abnormal finger or toe**) では、短縮は短指 (趾) 症 (**brachydactylia**) が主で、欠損の欠指 (趾) 症 (**ectrodactylia**)、過剰の多指 (趾) 症 (**polydactylia**) のような重篤な異常は自然に発症しないか、近交系の場合少数例成立する。通常は変形、扁平、肉芽状突起などである。

尾異常 (**abnormal tail**) は短縮、屈曲、彎曲などであるが子宮内での位置で圧迫されての彎曲もある。指趾、尾ともにしばしば水泡、血腫 (**hematoma**) を合併していることがある。

軀幹全体として短軀 (**short body**)、二重体 (**conjoined twins**) がみられることがある。発生のひずみはこうした二重体のような重複体 奇形 (**double monster**) と単体奇形 (**simple monster**) とに分け、後者を更に細別する表現がある。裂 (**fissure**) それに伴う逸所 (**ectopia**)、融合 (**fusion**)、癒着 (**adhesion**)、逆立 (**inversion**)、無形成 (**aplasia**)、欠損 (**absence**)、減形成 (**hypoplasia**)、過形成 (**hyperplasia**)

これに派生して異形成 (**dysplasia**)、さらに管腔で閉鎖 (**atresia**)、狭窄 (**stenosis**)、残存 (**persistence**)、開存 (**patent**)、拡大 (**dilation**) など。数に関しては過剰 (**super-**) 多 (**poly-**) 少 (**oligo-**)、副 (**accessory-**) などと表現する。

未熟仔 (**immature fetus**) はその指標となる体長・体重の評価で研究者の見解の相違がある。一般に齧歯類では体重は産仔数 (**litter size**) に逆比例し、子宮内の位置と相関がある。

胎盤の癒合 (**placenta fusion**) も子宮内の位置と関連している。

9. 骨発生のひずみをしらべる

骨の検索には95%アルコールに固定した胎仔より作製する標本を用いる。7日以上固定したのち、皮膚・脂肪および筋組織を出来るだけ除去する。頭部・肩甲骨間の脂肪は染色の障害となるので念入りに除去する。指趾の部分の皮膚は残しておいてもよい。ついで1%KOH水溶液を加えて1~2日、室温(年中操作の場合、恒温器を利用する)で浸漬すると骨が透視出来るようになり、ごく薄い(1万分の1程度)アリザリン・レッドS染色液に1日入れ、さらに1%KOHと30%グリセリンの混合液(Mall液)に入れ過剰染色を分別する。アリザリン・レッドS染色は1~2回使用した液が好まれる。以下50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%のグリセリンのシリーズをあげてゆく。それぞれ1日でよい。100%グリセリンに入れて実体顕鏡下で観察する。

骨の観察は頭蓋骨 (**cranial bone**)、顔面骨 (**facial bone**)、頭椎 (**vertebrae cervicalis**)、胸椎 (**vertebra thoracicae**)、腰椎 (**vertebrae lumbalis**)、仙椎 (**vertebrae sacralis**)、尾椎 (**vertebrae coccyx**)、肩甲骨 (**scapula**)、鎖骨 (**clavicula**)、胸骨 (**sternbrae**)、肋骨 (**rib**)、四肢骨 (**extremity bone**)、指趾骨 (**digital bone**) などの順におこなう。骨はその程度に応じて異常 (**malformation**)、化骨遅延 (**delayed ossification**) および変異 (**variation**) に分ける。

ラットとマウスでは若干骨化の遅延、様態の相違があるが、ここではラットの骨発生のひずみに

ついて述べる。異常は欠損、痕跡、短縮、癒合、分離、分岐、開裂、過剰、変形などにその程度が細別される。化骨遅延はしばしばアリザリン・レッドで染色されるのは化骨部のみであるから欠損と判断してしまうことが多いので軟骨染色を併用することが望しい。軟骨染色は通常 van Wijhe 法の Noback 変法と呼ばれるものを多用する。ラットよりも化骨の状態が不安定なマウスにおいて有効である。また、染色色との併用は Williams 法の変法を多用するが、骨染色と軟骨染色とは異なった条件で行なうので美しい標本が得がたく、熟練を要する。軟骨染色は小骨すなわち足根骨、指趾骨、尾骨、耳小骨などに有効であるが過染しないよう気をつける。

頭蓋骨の異常は頭頂骨、頬骨に bone dysplasia が見出されることがあるが、実験群でもまれである。むしろ後頭骨 (supra-occipital bone) ではしばしば化骨遅延 (incomplete ossification) が起こる。顔面骨では上顎骨 (maxilla)、下顎骨 (mandibula) とくに切歯骨 (incisor) に注目したい。下顎骨はしばしば短縮する。厳密に下顎体高と下顎体長を計測し、表面積の計測 (成長量として) すると相関がある。下顎骨に近く舌骨にしばしば化骨遅延が起こる。

各椎骨 (vertebral bone) は椎骨数、椎体、椎弓などに分けて観察する。椎骨数は頸椎数 7、胸椎数 13、腰椎数 5、仙椎数 4 が標準で尾椎は平均化骨数 ($M \pm S.E.$) で示される。これらは変異である。椎体はそれ自体の欠損、痕跡、変形などのほか、椎体相互の癒合 (fusion)、椎体と椎弓の癒合、環椎と外後頭骨との癒合などがある。これらは異常である。さらに椎弓の分岐、第 7 頸椎に付着する頸肋骨 (cervical vertebrae)、第 13 肋骨の短縮、第 14 肋骨 (14th rib) の存在 (実際は腰椎の胸椎化、腰肋骨) などがある。これは変異とされる。仙椎 (vertebral sacralis)、尾椎 (vertebral coccyx) の欠損はまれに起こる。

肩胛骨、鎖骨の異常は少ないが、胸骨・肋骨は多い。胸骨は骨核の分節 (para-sternebrae)、第 5 胸骨核の非相稱 (asymmetrical sternebrae V) などの変異がある。

肋骨は欠損 (absence)、痕跡 (vestigial)、癒合

(fusion)、分岐 (bifurcate)、過剰 (excess) などがもっとも発現の多い型である。

四肢骨は前肢骨 (forelimb) の左右、後肢骨 (hindlimb) の左右でそれぞれの異常の発現頻度が異なり、それぞれ短縮、菲薄化、変曲などの異常を起こす。足根骨の踵骨 (calcaneus)、指趾の基節骨 (phalanx proximalis) はしばしば成熟度の指標とされている。

10. 内臓発生のみずみをしらべる

内臓の検索には Wilson の薄切法か、Monie の解剖法が推奨されている。

われわれは Wilson の薄切法を繁用する。ブアン固定液に 7 日以上浸漬固定し、鋭利な剃刀で切断してゆく。頭部 (head) はまず舌を切断し口蓋を観察する。Fig.1 はそれぞれの切断面を示したものである。

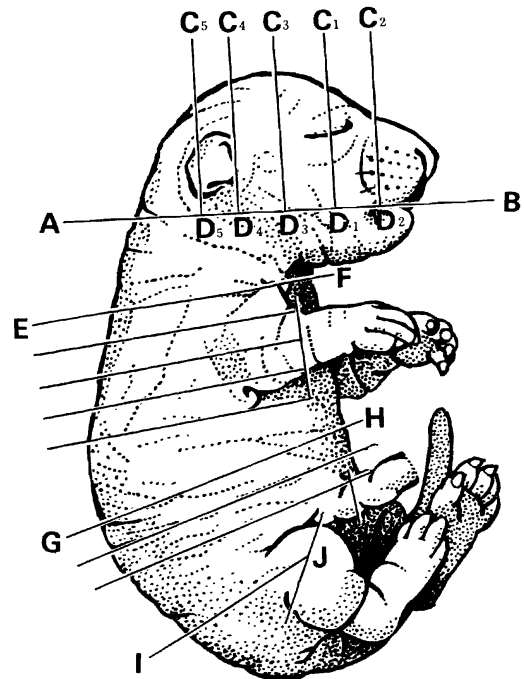


Fig.1 Cut plane by Wilson's method.

(1) 口蓋に平行な (A-B) をベースにして、左右眼球を通る線で垂直に切断して眼球の観察をする。(C₁-D₁)

(2) (1)の前方1 cmほどの位置で垂直に切断して鼻腔を観察する。(C₂-D₂)

(3) (2)にならって頭頂より垂直に切断して、眼球、水晶体、嗅球などを観察する。(C₃-D₃)

(4) (3)にならって左右の耳を通る線で垂直に切断して、大脳、間脳などを観察する。(C₄-D₄)

(5) (4)の後方1 cmほどの位置で垂直に切断して、側脳室、第3脳室を観察する。(C₅-D₅)

胸部 (chest) は四肢を切断して前肢部分を挟んで5切断面を設定する。(E-F) 5番目の切断面は横隔膜の直前となるよう留意する。場合によっては切断面を追加する。ここでは心臓、血管系、肺、胸腺、脊髄などを観察する。

腹部 (abdomen) は臍帯の残欠を切断して、3切断面を設定する。(G-H) ここでは肝臓・大動脈を観察する。とくに臍ヘルニア、横隔膜ヘルニアに留意する。下腹部は尾を切断して1切断面を設定する。(I-J)

副腎・腎は直接剃刀で損傷しないよう留意し、位置の状況を確認したのち、器官の中央部で切断

する。精巣の場合も同様である。

この方法は各内臓器のあらましの観察を行なうにすぎず、たとえば矮小腎が無腎症であるかの見当がついたら組織標本を作製して、正確な判断をしなければならない。

むすび

個体レベルでの発生のひずみをしらべることはもっとも基本的な研究態度である。われわれはこうした個体レベルを理解してから、ときには中枢神経系、循環器系といった器官別の研究に、ときにはマイクロラジオグラフィ、電子顕微鏡による器官形成の機序解折などの研究へとすすんでいった。いづれ、またの機会を得てこれら研究の経過を紹介してみたい。なおここに記載した内容の一部は第1回岡山実験動物研究会で記念講演をおこなった。

本稿をまとめるにあたり、京都大学名誉教授西村秀雄先生、岡山大学教授猪貴義先生、島根医科大学教授田中修先生より有益な御助言をいただいた。ここに、厚く御礼を申しあげる。