

## 実験動物の出生前医学における役割

田中 修<sup>1)</sup>, 橋本 龍樹<sup>1)</sup>, 帯刀 禮子<sup>2)</sup>

島根医科大学第一解剖学教室<sup>1)</sup> 島根医科大学生物学教室<sup>2)</sup>

### 1. はじめに

ひとつの個体が、たったひとつの細胞である受精卵より始まるという生命誕生の謎について、人類は未だ解明していない部分が多く残されている現在、その謎について解明しようと多くの実験動物を用いて行われている。発生途上にある初期胚から胎仔に人為的操作を加え、それによって引き起こされた変化や結果を解析するという発生工学も、この謎の解明へのアプローチの一つと考えられる。また、近年妊娠動物に与えられた環境因子が、どのような影響を出生前や出生後にその子孫に及ぼすかという成因の究明も重要な課題である。

ここでは我々の教室で行っている催奇形実験について紹介し、今後の発生工学の展望について考えてみたい。

### 2. 環境要因としての催奇形実験

催奇形因子としてまず医薬品がある。1960年代に起こったサリドマイド禍はあまりにも有名である。鎮静睡眠薬サリドマイドを妊娠中に内服した母親より生まれた児にあざらし四肢奇形が生じたことにより、催奇形実験の重要性が叫ばれるよう

になった。現在では医薬品のみならず、本来ヒトが摂取しないと思われる重金属・有機化合物等の化学物質、また放射線や高熱などの物理的要因、風疹ウイルス・サイトメガロウイルス・トキソプラズマ・梅毒スピロヘーター等の感染要因、糖尿病のような病態が催奇形因子としての環境要因と考えられる。

最近では催奇形因子のみ作用させるのではなく、同時に催奇形性を修飾するような物質を投与する試みも行われている<sup>1)</sup>。アルキル化剤であるクロラムブシルや X 線照射を妊娠マウスに施すと、その胎仔に口蓋裂や乏指等が発生することが知られているが、同時に免疫賦活剤である PSK などを投与すると、胎仔の奇形発生の頻度が減少するという抗催奇形作用があることを認めている<sup>2)</sup> (表 1, 2)。

一方、5-アザシチジンを妊娠マウスに投与すると、外脳症・顔面裂等が胎仔に発生するが、同時にサイトカインである IL-1 を作用させると、有意に奇形発生の頻度が増加し催奇形性の増強することも認められた<sup>3)</sup>(表 3)。

2 種類以上の催奇形因子を作用させた場合の相互作用には、次のような分類ができる<sup>4)</sup>。

Table 1 Effect of PSK on the chlorambucil or X-ray treated mice

Group	Treatment		No. of litter	No. of implant	Live fetuses (%)	Mean CRL (mm)	Mean B.W. (g)	Sex ratio (♂/♀)	No. of malformed fetuses
	Teratogen	PSK (mg/kg)							
A	X ray (51.6mC/kg)	0	13	176	65.9	23.0	1.12	1.90	94 (81.0%)
B	X-ray (51.6mC/kg)	200 (IP)	10	148	79.7	24.0	1.16	1.46	51 (43.2%)**
C	X-ray (51.6mC/kg)	1000 (PO) × 10	10	173	72.3	23.7	1.13	0.84	80 (64.0%)**
D	CA (4mg/kg)	0	10	147	89.8	21.7	1.10	1.17	85 (64.4%)
E	CA (4mg/kg)	200 (IP)	10	134	96.3	21.8	1.03	1.06	74 (57.4%)
F	CA (4mg/kg)	200 (IP) × 3	10	132	94.7	21.7	1.14	1.52	71 (56.8%)
G	Untreated	0	6	91	91.2	24.8	1.47	0.86	3 (3.6%)

Kai-square test \*\* : P < 0.01

Table 2 Effect of PSK on the malformed fetuses induced by X-ray

Group	Irradiation dose(mC/kg)	PSK (mg/kg)	N	Microphthalmia	Tail		cleft palate	Oligodactyly	Syndactyly
					short	kinky			
A	51.6	0	116	75 (64.7%)	29 (25.0%)	18 (15.5%)	17 (14.7%)	5 (4.3%)	1 (0.8%)
B	51.6	200(IP)	118	14** (11.9%)	14** (11.9%)	13 (11.0%)	13 (11.0%)	1 (0.8%)	1 (0.8%)
C	51.6	1000(PO) ×10	125	14** (11.2%)	14** (11.2%)	13 (10.4%)	12 (9.6%)	7 (5.6%)	1 (0.8%)

Kai-square test \*\* : P<0.01

Table 3 Effect of interleukin 1 on the malformed fetuses induced by 5-azacytidine or chlorambucil

Group	No. of live fetus (%)	No. of malformed fetus (%)	Exencephaly (%)	Facial cleft (%)	Eye abnormality (%)
a) 5 AZ	83(69.2)	67( 80.7)	67(80.7)	25(30.1)	34(41.0)
b) 5 AZ+IL-1	41(34.2)	41(100.0)	39(95.1)	23(56.1)	38(92.7)
c) CA	52(54.2)	8( 15.4)	3( 5.8)	0	1( 1.9)
d) CA+IL-1	30(66.7)	6( 20.0)	1( 3.3)	0	0
e) IL-1	96(95.0)	0	0	0	0
f) Saline	113(93.4)	1( 0.01)**	0	0	0
g) Cottonseed oil	39(86.6)	1( 2.6)	0	0	0

\*P<0.01, Chi-square test

\*\*Tubercle at the head region

i) 干渉：二つの因子を作用させた場合、いずれか一方を単独に与えたときより奇形出現の頻度が低い場合。ii) 相互作用：二つの因子を作用させたとき各々の作用の和に等しい場合。iii) 相乗効果：奇形の出現頻度が各々単独作用させたときの和より越える場合。iv) 催奇形作用がほとんどない2つの因子を同時に作用させると催奇形作用が出現する場合。

### 3. 生後発育の観察による実験奇形学

出生時にはまだ未熟なため、あたかも奇形のように観察される臓器が、その後の発育していく過程において正常に変化していく様子を観察する方法である。例としてナキウサギ(*Ochotona rufescens*)の新生仔期の心臓について観察すると、約10%に膜性心室中隔欠損症が認められるが、生後3週齢では2%にみとめられた。新生仔期に高頻度に認められた膜性中隔欠損の大部分は、生後発育の初期段階に自然閉鎖することが示唆された<sup>5)</sup>。これは、実験動物による奇形の修復過程をやる上で貴重な資料となり得る。一方、出生前に摂取し

た環境因子が生後の発育、特に行動などにどのような影響を及ぼすかという問題については、いわゆる行動奇形学がある。一例として、クロラムブジルの4 mg/kgを妊娠11日目にICRマウスに与えると、その仔に小頭症が生じる。この仔の生後発育を観察すると、open field testによるとhigh emotionalあるいはhyperactiveを示した。またシャトル回避箱を用いた能動的回避学習においては、成獣時に能動的回避事態に対する学習を低下させるのではないかと指摘した<sup>6)</sup>。

### 4. 胚移植による催奇形実験(発生工学的研究)

同一の催奇形因子を作用させた催奇形実験を行った場合、発生した奇形の形や出現頻度が動物種によって大きく異なる。インスリン依存型糖尿病モデル動物であるNOD(non-obese-diabetic)マウスをもちいて、奇形発現に関わる実験動物の遺伝的素因と環境要因の相互作用を解析した。

NODマウスは、糖尿病が発病した母体からの13日齢胎仔では神経管閉鎖不全など約40%と高頻度の奇形が出現することを確認している。一方、糖

Table 4 Embryo transfer to the uterine horns

Embryo	Recipient	No. of recipients	No. of embryos	Implant (%)	Viable (%)	Exen- cephalo	Spina bifida	Kinky vertebral column	Other anomalies	Total (%)
NOD-DM	ICR	13	175	123 (70.3)	58 (33.1)	3	0	5	0	8 (13.7)
ICR	NOD-DM	19	321	167 (52.0)	45 (14.0)	5	5	6	2	18 (40.0)
ICR	ICR	10	130	103 (79.2)	73 (56.2)	0	0	0	0	0

尿病が発症していない母体からも約8%の出現があった。NOD マウスは ICR マウスより発見，系統化されたことから，対照群の ICR マウスでの奇形は0%であった。このことは NOD マウスがすでに自然奇形発現の素因があり，これに妊娠中の母体環境が作用して高率な奇形発現を示すものと考えられた。この奇形発現の原因が環境要因か遺伝的素因かのいずれかを解明するために，胚仔子宮内移植法を行った。まず受精卵提供マウスの雌に排卵誘発剤 (PMS, HCG) を使って排卵させたのち雄と交尾させ，受精卵を採取する。それを桑実期から胚胞期まで培養した。一方仮親マウスとなる雌に排卵誘発剤を使った後，精管結紮した雄と交尾させ偽妊娠状態をつくり，そこに培養していた受精卵を子宮内に移植した。すなわち発症 NOD マウス (NOD-DM) の受精卵を ICR マウスの子宮に移植し，ICR マウス (NOD-DM) の受精卵を ICR マウスの子宮に移植し，ICR マウスの受精卵を ICR マウスの子宮に移植した対照群と比較検討した<sup>7)</sup> (表4)。

ICR マウスの子宮内で発生した NOD-DM の胚から，自然発生奇形として特徴的に出現した同様の神経管閉鎖不全がみとめた。一方，DM-NOD の子宮に移植された ICR マウス胚に奇形が生じたが，その頻度は NOD マウスの自然発生率より低く，神経管閉鎖不全のほか腮弓異常が出現した。

一方，NOD-DM マウスの染色体分析の結果，着床前期胚の染色体異常は有意に増加しないが<sup>7) 8)</sup>，着床後期である12日齢胎仔の染色体分析より奇形胎仔では分裂中期像の減少及び20%の染色体異常がみとめられた<sup>10)</sup>。

以上の結果より，NOD-DM の子宮内環境は催奇形作用を胚に及ぼすが，必ずしも神経管閉鎖不全を特異的に高率に起こす環境とは言えない。した

がって，NOD-DM の奇形仔自然発生率の高さは，胚の遺伝的素因と糖尿病の代謝異常によって二次的に起こった，と考えられる卵巣及び子宮の器質的変化など<sup>11)</sup>の子宮環境との相加的効果によるもので，特に後者の影響が大きいと考えられた。なお，この器質的変化が吸収胚の増加，着床率の低下を来すのではないかと考えている。

#### 5. 人工キメラ動物による催奇形実験

人工キメラ動物とは人為的操作により遺伝子型の異なる2種以上の細胞群から構成される動物個体のことであるが，作成方法として卵割期にある2個以上の胚を培養液中で集合させる集合法と，培養液中の胚盤胞の腔内に他の細胞を注入する注入法がある。

人工的に誘起排卵させた C57 BL/6 N 雌マウスと DBN/2 N雄マウスと交尾させた後，受精卵を採取し，マイクロマニピュレーションにより雄性前核を抜取り培養し，雌性前核を2倍体にする。BALB/cA マウスまたは BALB/cA 雌マウスと ICR 雄マウスから得られた8細胞期の胚をプロナーゼによってばらばらにし，雌性由来の染色体よりなる細胞と共に，フィットアグルチニン P によって集合させた後，仮親の子宮に移植し，妊娠20日目に帝王切開にて胎仔を取り出した。この操作によって得られたキメラマウスと BALB/cA マウスと交配させることにより単親性の遺伝子座が100%ホモ型の完全遺伝的ホモ型マウスができた<sup>12)</sup> (表5)。

マウス胚盤の内部細胞塊に由来する胚幹細胞 (ES 細胞) は，外中内胚葉のいずれの胚葉由来の細胞にも分化することができる多分化能を持った幹細胞である。この ES 細胞を未分化のまま培養し，培養中に DNA を導入する。その細胞を正

Table 5 Chimera formation between uiparental and normal embryo

Uniparental	Strain Normal	Aggregated Embryos	Single morula	Mice born	Chimeras (M:F)**
C 57 BL/6 N × DBA/2 N	BALB/cA	91	70	42	2(2 0)
C 57 BL/6 N × DBA/2 N	BALB/cA × ICR	51	38	16	2(1 1)

\* Includes control pups delivered

\*\* M : male F female.

常マウスの胚盤胞に注入しキメラマウスをつくる。キメラマウスの生殖細胞に ES 細胞由来の細胞が分化していれば ES 細胞の性質が子孫に伝達されていき、導入された遺伝子ももっていることになる。それを確かめるためには、導入した遺伝子をプローブとして in situ hybridization 法によってその遺伝子を持つ細胞を特定することができる。

次に、遺伝的疾患モデル動物と正常動物とのキメラ個体を作り出すことにより、その疾患の原因について解析が可能となる。この様にキメラ動物では一つの個体の中に遺伝子型の異なる細胞が共存しているため、発生分化の過程における細胞間の相互作用や細胞の系譜を解析することができることから、正常発生の理解に役立つとされる。

## 6. トランスジェニックマウス

遺伝子工学によって調整された遺伝子を実験動物、主にマウスの受精卵に導入し、外来遺伝子導入マウス（トランスジェニックマウス）を作成する。

方法としてマウスの受精卵の融合する前の雄性前核に既知の合成 DNA 溶液を注入し、その胚を偽妊娠の雌の卵管または子宮に移植し、妊娠19日目に帝王切開にて出産させる。導入された遺伝子の有無は、生後4週頃に仔マウスの尾を切断し、DNA を抽出して導入遺伝子の DNA のサザンブロット法によって検出する。

また、致死的な遺伝子機能が胎生期に発現しトランスジェニックマウスが得られない場合が時々あるが、導入する遺伝子を工夫することにより可能となる。勝木ら<sup>13)</sup>は導入遺伝子の構造を、遺伝子発現調節領域と発現させたい遺伝子領域とを別々に分けて、トランスジェニックマウスを作成した。

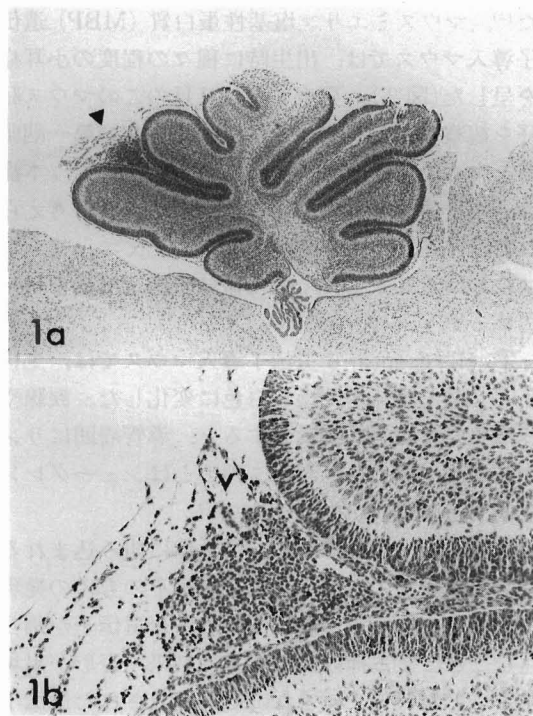


図1 IL-2 遺伝子導入マウスの生後6日の小脳矢状断面写真。小脳皮質表面の脳膜腔内、特に血管周囲領域に、リンパ球を主体とした細胞浸潤が観察される。vは血管を示す。1 bは1 aの矢頭部分の拡大像である。(1 a, ×23; 1 b, ×115)

発現させたい遺伝子が致死性の遺伝子であっても出現せず正常なまま子孫を残すことができる。しかし相互の交配により F<sub>1</sub> をつくると、胎仔期に致死遺伝子を発現させることができる。このことを導入遺伝子のデジタル化と命名している。

我々はトランスジェニックにおける発生異常のマウス形態形成の解析を行っている。

ヒトインターロイキン2 (IL-2) 遺伝子導入マウスでは出生時、外表異常もなく対照動物との間にも外見上行動上の差を特に認めなかったが、生後3-4週にかけて特徴的な運動失調が出現した。本例は肉眼的に小脳が顕著に萎縮しており、組織学的には脳膜側に強く、血管周囲にリンパ球浸潤などの強い炎症性変化により小脳皮質の構築が広範に破壊され、髄質も菲薄化していた(図1 a, 1 b)。これは生後発生の初期に小脳周囲の限局された部位にヒト IL-2 遺伝子が発現し、その二次的効果として炎症性変化が起こったものと疑われ

た<sup>14)</sup>。マウスミエリン塩基性蛋白質 (MBP) 遺伝子導入マウスでは、出生時に種々の程度の小耳症を呈した(図2)。発生9—11日目のこのマウス胚仔を観察すると、第一と第二咽頭弓及び第一咽頭溝を中心に耳介結節の癒合状態を検索した<sup>15)</sup>。本症は MBP 遺伝子導入による挿入突然変異と考えられた。現在、この小耳症トランスジェニックマウスにおける外来 DNA 挿入領域の構造解析を行っている<sup>16)</sup>。

T cell-receptor  $\delta$  遺伝子導入マウスでは、生後1—2週で眼球が乾燥し白色に変化した。涙腺や唾液腺を組織学的検索をすると、導管周囲にリンパ球浸潤が認められた。このことはシェーグレン症候群との関連が推測された<sup>17)</sup>。

導入遺伝子の DNA が、染色体に組み込まれる位置が不規則であり、導入遺伝子そのものの発現によるものと、正常遺伝子中に外来遺伝子が割り込むことによる挿入突然変異の結果、奇形が出現することがある。いずれにせよ導入された遺伝子の塩基配列が既知であり、この手がかりを使って先天異常の解明の重要な手段になると共に、ヒト疾患モデル動物の開発にも役立つと思われる。

## 7. in vitro における催奇形実験

環境因子の催奇形性の有無についての動物実験には in vivo における哺乳動物による試験が必須である。しかし、その作用機序や発生過程を研究

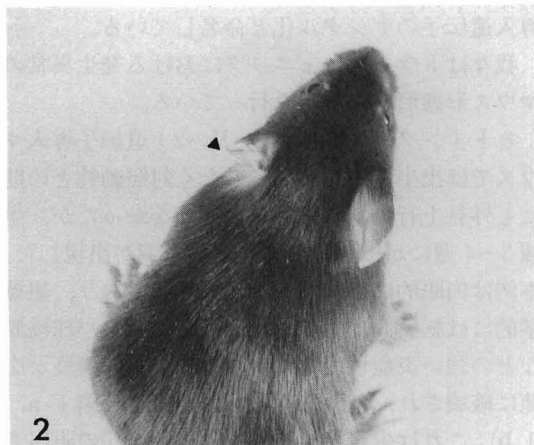


図2 マウスミエリン塩基性蛋白質遺伝子導入マウスの背側写真。矢頭は小耳症を示す。

するには in vitro 実験が適しており、現在ではさかんに行われるようになった。実験系としては、i)細菌やその他の単細胞生物、ii)細胞培養、iii)組織培養、iv)器管培養、v)全胚芽培養などがある。

特に全胚培養に関しては、D.A.T.New によって開発された回転培養法により、日齢9.5日~11日のラットやマウス胎仔を最高72時間培養することが効率よく行われるようになった。

谷村<sup>18)</sup>はその利点と不利な点を次のように述べている。利点として、a)母体、栄養、ホルモンなどの因子を除外できる。胎盤通過性の動物種差が避けられる。b)化学物質の濃度をより容易に決定でき、化学物質への作用時間を系統的に変更できる。c)in vivo 研究より簡単な実験条件が設定できる。例えば口蓋の培養において舌の影響を除外することもできる。d)生化学的研究、例えば放射性同位元素での標識が容易である。e)in vivo 研究より低い標準偏差が得られる。f)発生の時期を正確に決定できる。g)多くの両側性器官(肢芽や中腎など)では、1個体で対照ととられて実験群と比較できる。h)顕微鏡手術的技法が応用できる。i)経時的に胎芽発生を観察することができる。不利な点としては、a)in vivo における複雑な相互作用が見られない。b)化学物質の代謝物の効果が認識し難い。c)偽陽性や偽陰性の所見が起こる。d)細胞培養では表現型の特性が失われ易い。

トランスジェニックマウスやキメラマウスなどは、in vivo と in vitro の相互乗入れの典型的な実験であり、これからの催奇形実験として不可欠な分野と思われる。

## 8. おわりに

以上述べてきた催奇形実験において得られた結果が、ヒトに外挿できるかどうかという問題は医学において非常に重要である。動物実験はあくまでも仮定どまりであり、基本的な制約がある。しかし、人類は古代より「ヒトとは何か？」を問い続け、今まで宗教や哲学がそれに答えてきた。ヒトを実験に使うことは決して許されないことから、現在の自然科学の進歩により動物実験を通して、その謎に近づこうとしており、発生工学的アプロ

一チはその方法の一つと考えられる。

また人工授精やホルモン等生理活性物質の産生等これまでに得られた発生工学の技術が医学に應用され、胎児の出生前治療という試みも始まっている。今後ヒトの遺伝子情報の解析や、生命の誕生のメカニズムも解明されてくるものと思われるが、そのためには科学的に真実性のある動物実験のデータの蓄積が必要であると考えられる。

### 参考文献

1. 田中 修：細胞障害因子に対する免疫賦活剤の抗催奇形作用。(ミニシポジウム)発生異常と癌化との接点をめぐって。第49回日本癌学会総会記事, p. 28, 1990.
2. 直良博之, 篠原春夫, 佐藤文夫, 田中 修：X線及びアルキル化剤に対する免疫賦活剤(PSK)の抗催奇形効果。Cong. Anom., 29 : 244, 1989.
3. 田中 修, 八田稔久, 安東誠一, 帯刀禮子, 吉岡孝文：化学物質による中枢神経奇形に及ぼす Biological Response Modifiersの影響。厚生省精神・神経疾患研究委託事業, 平成2年度研究報告書, 1991(印刷中)。
4. 田中 修：実験奇形学—分子レベルの先天異常。小児内科, 21 : 41—49, 1989.
5. Shinohara, H. and H. Nishimura : Spontaneous closure of isolated ventricular septal defect in the Pika (*Ochotona rufescens rufescens*) Exp. Anim., 35 : 169—173, 1986.
6. 田中 修：脳形態形成の阻害—とくに化学物質による催奇形実験をめぐって。脳と発達, 20 : 105—114, 1988.
7. Otani, H., O. Tanaka, R. Tatewaki, H. Naora and T. Yoneyama : Genetic predisposition versus diabetic environment as causes of congenital malformations in NOD mouse embryos. Diabetes, 1991 (in press).
8. Tatewaki, R., H. Otani, O. Tanaka and J. Kitada : Chromosome analysis of preimplantation stage embryos of Non-Obese Diabetic (NOD) mice. Cong. Anom., 29 : 7—13, 1989.
9. 橋本龍樹, 帯刀禮子, 大谷 浩, 田中 修：糖尿病(NOD)マウス奇形仔の細胞遺伝学的研究。I. 着床前期胚について, 第41回染色体学会, 東広島, 1990.
10. Tatewaki, R., H. Otani, O. Tanaka, R. Hasimoto and S. Ando : Chromosome analysis of postimplantation stage for studying possible cause of developmental abnormalities in diabetic NOD mice. Biol. Neonate, 1991 (in press).
11. Tatewaki, R., H. Otani, O. Tanaka and J. Kitada : A morphological study on the reproductive organs as a possible cause of developmental abnormalities in diabetic NOD mice. Histol. Histopath., 4 : 343—358, 1989.
12. Otani, H., M. Yokoyama, S. N. Kimura, O. Tanaka and M. Katuki : Pluripotency of homozygous-diploid mouse in chimeras. Develop. Growth and Differ., 29 : 373—380, 1987.
13. 勝木元也：マウス遺伝子の操作。蛋白質 核酸 酵素, 35 : 2468—2475, 共立出版, 1990.
14. 田中 修, 大谷 浩, 篠原春夫, 佐藤文夫, 勝木元也：ヒト IL-2 遺伝子導入トランジェニックマウス的小脳障害, 厚生省精神・神経疾患研究委託事業, p 109—116, 1988.
15. 田中 修, 大谷 浩, 吉岡奈津美, 藤本勝邦, 木村 譲, 勝木元也：マウスミエリン塩基性タンパク質遺伝子導入マウスにおける耳奇形の発生学的検索。Cong. Anom., 28 : 237, 1988.
16. 直良博之, 大谷 浩, 田中 修, 小泉 勤, 早川純一郎, 横山峯介, 木村 譲だ勝木元也：小耳症トランスジェニックマウスの解析。日本分子生物学会総会, 京都市, 1990.
17. 田村治子, 大國昌美, 直良博之, 吉岡孝文, 田中 修：遺伝子導入マウスにおける発生異常の形態的解析。第45回日本解剖学会中四国地方会, 広島市, 1990.
18. 谷村 孝：ヒトの奇形と実験奇形学。小林ら編：新小児医学大系7 A. 出生前小児科学 I, p 109—149, 中山書店, 1979.