

短肢症の実験的成立について*

X線放射, 酸素欠乏, トリパン青注射, ビタミンA過剰
による短肢症の成立状況

亀山義郎** 野上 宏*** 村上氏廣**

妊娠中の thalidomide 剤服用により胎児に重篤な短肢症いわゆる海豹肢症が成立することは近年大きな注目をあびているが, その成因はまだ明かでなく, ただ短肢症の発生と服用の妊娠時期に密接な関係があることが指摘されているに過ぎない(Lenz and Knapp, 1962)⁴⁾. 妊娠中の外的作因にする実験的短肢症の成立についてはこれまでも多くの報告があるが使用動物の種, 系統, 実験方法, 処理の時期などが報告者によって異なり, 作因の相違による肢奇形の成立状況を比較することが困難である. 妊娠ハツカネズミのX線放射による胎仔の短肢症についてはすでに報告したが⁷⁾, さらに酸素欠乏, トリパン青注射, ビタミンA過剰についても短肢症の検索を行ない, 以上4種の作因による肢の短縮奇形の成立臨界期, 成立傾向の相違を検討した.

実験方法

使用実験動物は従来の報告および別編⁷⁾に示す研究に使用したのと同じ実験動物中央研究所由来の ddN 系ハツカネズミで, 1. X線放射は 200r, 300r の各全身1回放射, 放射時期は妊娠第8日~13日間のいずれかの6群, 2. 酸素欠乏は 225mmHg の低圧に5時間, 処理時期は妊娠第8日~12日間のいずれかの5群, 3. トリパン青は 2% 0.1cc 静注, 注射時期は妊娠第8日~12日間のいずれかの5群, 4. ビタミンA過剰は水性ビタミンA 15,000 I.U. を腹腔内注射, 注射時期は妊娠第9~13日間のいずれかの5群とした. 使用母鼠数はX線, 酸素欠乏, トリパン青は各処理日別にそれぞれ20匹, ビタミン

A過剰はそれぞれ10匹宛とした.

各処理群ともすべて妊娠第19日に母鼠を開腹し胎仔を取り出し, 外形および alizarin red S 染色(Dawson法)による骨格標本で異常を観察した.

実験結果

1. X線放射による短肢症: X線放射では200r, 300rともに妊娠第11日, 12日放射群に短肢症が成立し, 200rで成立するのは肢の短縮のみであるが, 300rではさらに太さも減少し小肢症の形を示すものが多い(図7-1). 第11日放射では上下肢の短縮が多く, 200rでは短肢症胎仔18%のうち後肢のみの短縮は9%, 前後肢ともに短縮が6%で後肢短縮がやや多いが, 300rでは49%の短肢のうち43%は前・後肢ともに侵され短縮も強度になる. 第12日放射では200r 4%, 300r 25%で, それぞれ短肢の成立は減少し後肢のみが侵される(表1, 図1).

指趾奇形はほとんどが欠指症で少数に合指症, 多指症が見られる. 欠指症は200r, 300rともに第12日放射群に集積し, 200rでは81%の指趾異常のうち, 前肢の指異常49%, 前・後肢の指趾異常31%で前肢に多く, 300rでは99%のうち94%は前後肢ともに指趾異常を示した. なお300rでは第13日放射でも少数の欠指症が認められた(表2, 図1).

すなわちX線放射による短肢症の成立臨界期は前肢, 後肢ともに胎令第11日で, 欠指症の成立臨界期は胎令第12日にあり, 四肢と指趾の奇形の成立臨界期があきらかに分離し, 両者の合併は少い. また線量の増加は奇形の

*Study on micromelias in mice fetuses caused by X-radiation, hypoxia, trypan blue injection or hypervitaminosis-A upon mother animals during pregnancy.

**Yoshiro Kameyama, Hiroshi Nogami and Ujihiro Murakami.

Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University, Nagoya.

***Department of Orthopedic Surgery, Nagoya University School of Medicine, Nagoya.

**名古屋大学環境医学研究所 病理・胎生部門

***名古屋大学医学部整形外科学教室

名古屋大学環境医学研究所 病理・胎生部門

妊娠日の推定は陰栓法により, 交配の翌朝, 陰栓のみられた時を妊娠第1日とした.

表1 実験的短肢症の成立状況 (%)

作 因	処 理 日 妊 娠 日	前肢のみの短縮	後肢のみの短縮	前・後肢ともに短縮	計
X線放射 200r	10		1		1
	11	3	9	6	18
	12		4		4
X線放射 300r	11	6		43	49
	12		24	1	25
	13				
酸素欠乏	10		12		12
	11	1	1		2
トリパン青注射 ビタミンA過剰	9		6		6
	10	21			21
	11	36		60	96
	12	6	6	78	90
	13			58	58

成立頻度，強度が増強せしめるのみで，臨界期の延長はほとんど認められなかった。

骨格標本の観察では，短肢症は長管骨の欠損，形成不全，彎曲およびその組合せを示し，さらに前肢では長管骨の癒合が見られる。X線放射では前肢においては上腕骨，撓骨，尺骨のいずれにも骨欠損はなく，形成不全に癒合をとまなるものが目立ち，とくに300r放射による前肢短縮のほとんどに骨癒合が見られた(図7-7)

一方，後肢では200r，300rともに骨欠損は著明であったが骨癒合は見られなかった。

前肢骨の異常は200r，300rともに第11日放射のみに見られ，各長管骨は同様に侵され特定の骨のみ強く侵される傾向は認められなかった。後肢骨の異常は第11日放射では大腿骨，脛骨，腓骨ともに侵され，200rでは大腿骨の欠損が下腿骨に比し多く，300rでは大腿骨と腓骨の欠

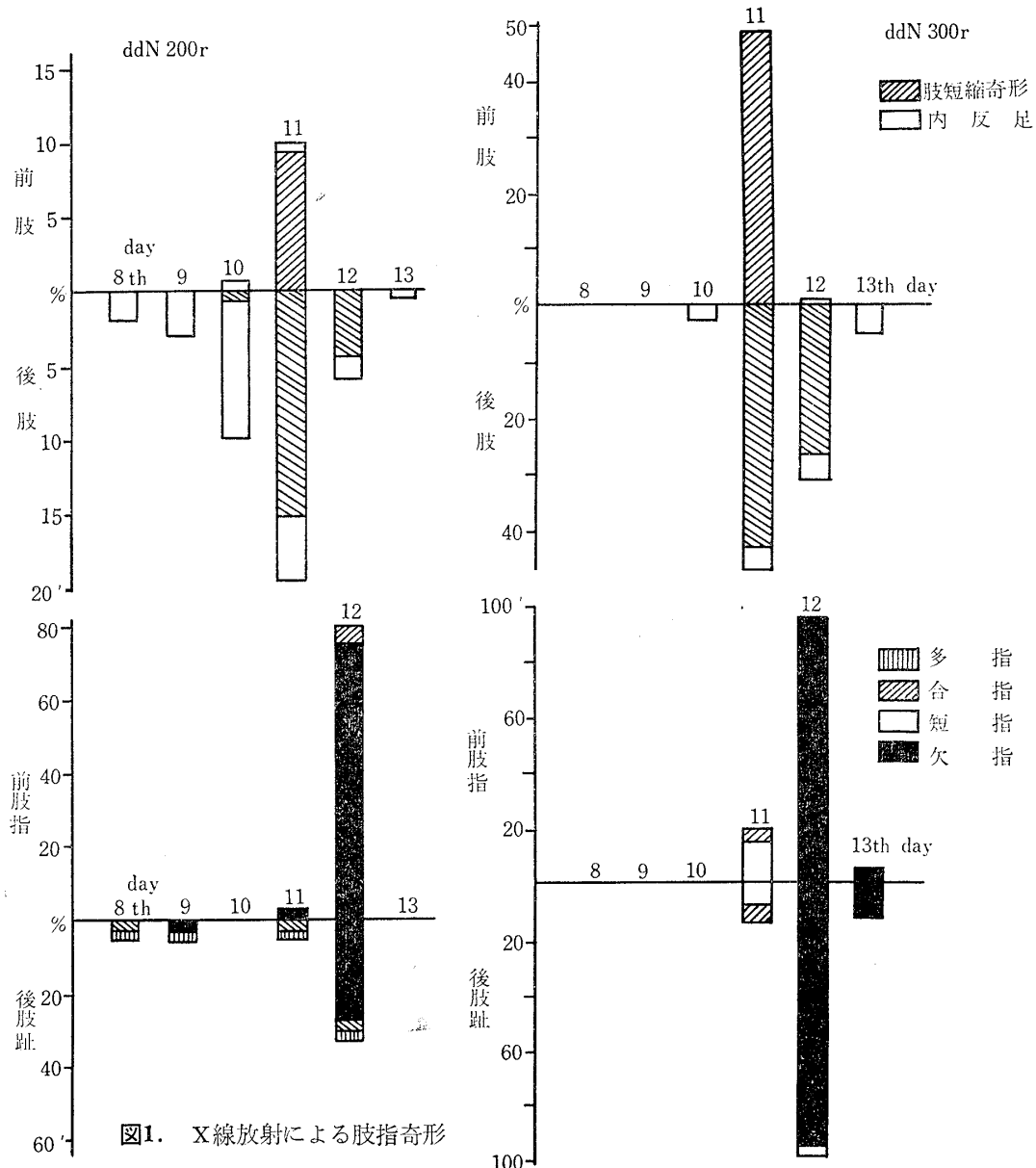


図1. X線放射による肢指奇形

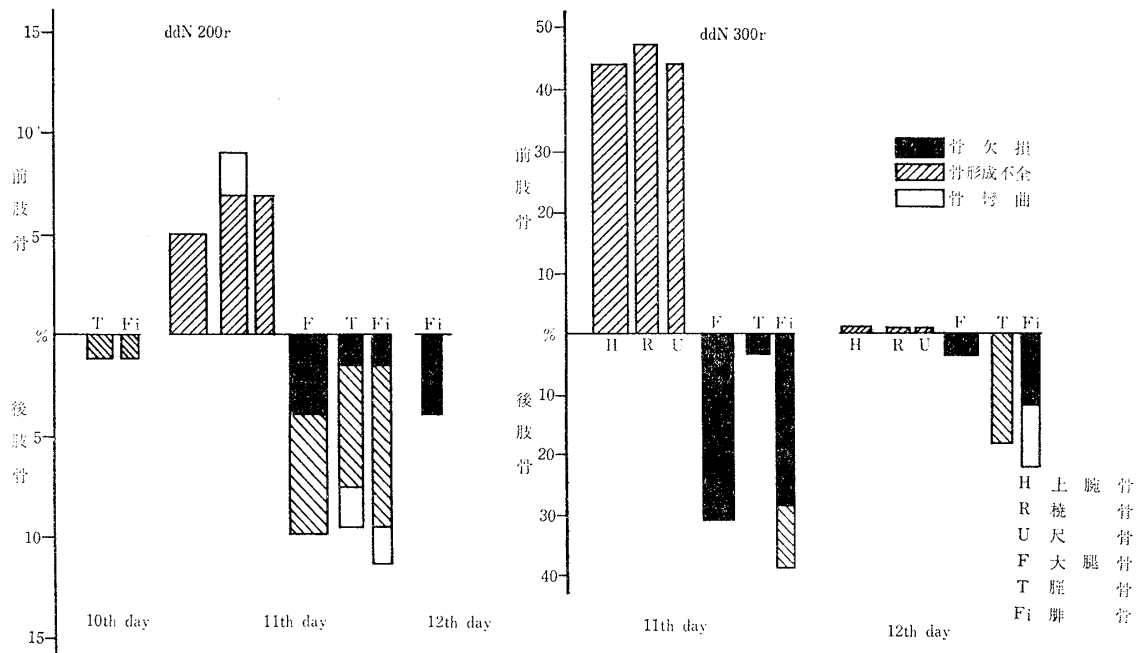


図2. X線放射による肢骨異常

損が増加するが脛骨の異常は少ない。第12日放射では200r, 300rともに腓骨の欠損が目立ち。200rの場合大腿骨, 脛骨に異常がないため外形で判別できる短肢を示さない(図2)。

2. 酸素欠乏による短肢症: 酸素欠乏では短肢症は妊娠第10日処理によって, 後肢にのみ成立し, 欠趾症を合併するものが多い。指趾奇形も同様第10日処理のみに成立し, 肢指ともに奇形の成立臨界期は胎令第10日であった(表1, 2, 図3)(図7-2)。骨標本では前肢骨に異常はなく, 後肢では大腿骨の形成不全と脛骨の欠損が目立ちX線の場合とは逆に腓骨の異常は軽度であった。(図4, 7-8)。

3. トリパン青注射による短肢症: トリパン青では短

肢症の成立は少く(2%)正確な傾向は明らかでないが, X線放射と同様第11日注射のみに成立した。短肢は前・後肢ともに見られ, 骨異常は前肢の短肢に合併したもので, ほかの時期の注射群には見られず, 成立臨界期はやはり妊娠第11日のものごとくである(図2, 3)。

4. ビタミンA過剰による短肢症: ビタミンA15,000 I. U. 注射では強度の四肢奇形がおこり, いわゆる海豹肢症が多く欠指の合併も多い(図7-4, 5, 6)。第9, 10日処理では短肢の程度軽く頻度も低いが, 第11日処理では短肢症は96%で, 前肢のみの短縮36%, 前・後肢の短縮60%で前肢にやや多い。第12日処理では短肢90%で, 前肢のみおよび後肢のみの短縮はそれぞれ6%と少く, 前・後肢ともに短縮せるものは78%となる。第13日

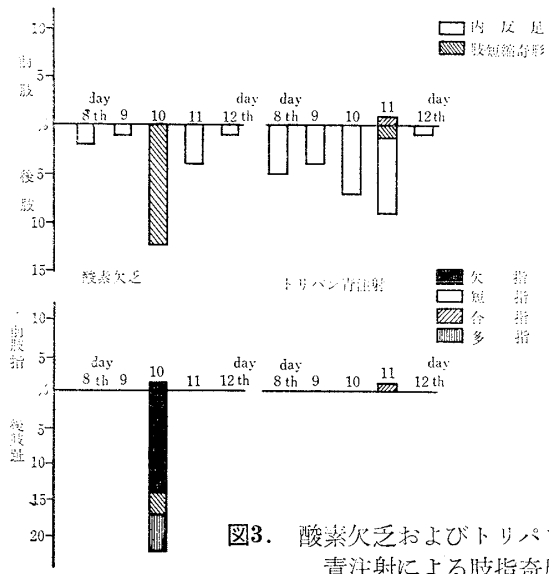


図3. 酸素欠乏およびトリパン青注射による肢指奇形

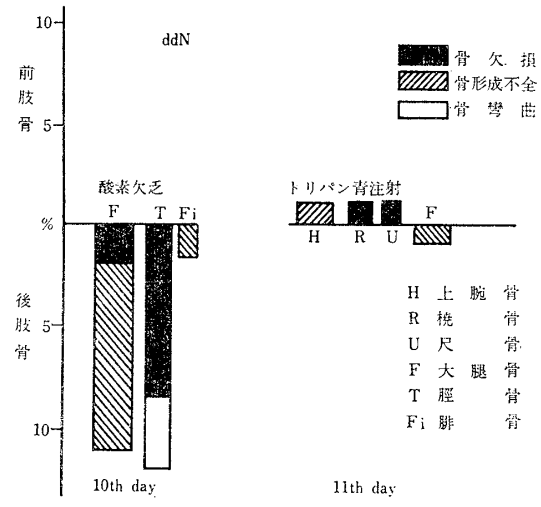


図4. 酸素欠乏およびトリパン青注射による肢骨異常

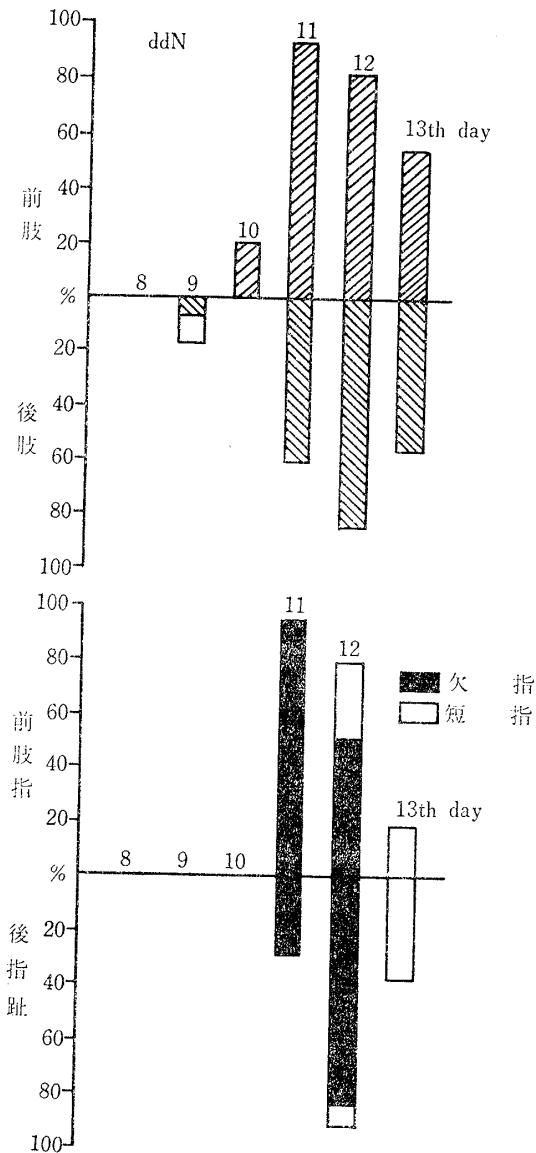


図5. ビタミンA過剰による肢指奇形

表2 実験的指異常の成立状況 (%)

作 因	処 理 日	前肢の指のみ異常	後肢の趾のみ異常	前・後肢の指趾とも異常	計
X線放射 200r	8		2		2
	9		1.5		1.5
	11	1.5	1	1	3.5
	12	49	1	31	81
X線放射 300r	11	14	6	3	39
	12	4	1	94	91
	13		4	6	10
酸素欠乏	10	1	18		19
トリパン青注射	11	1			1
ビタミンA過剰	11	44		44	88
	12	2	15	82	99
	13	2	14	19	35

処理でも前・後肢短縮は58%と高率であるが、短縮の程度は軽く、第11, 12日処理で成立したような海豹肢症は見られなくなる(表1, 図5).

指趾奇形は第11日処理ではすべて欠指で2ないし3本を欠く重篤なものが多く、88%の欠指趾中前肢のみに見られるもの44%, 前・後肢ともに見られるもの44%で前肢に多い。第12日処理では重篤な欠指はやや減少し短指趾が見られるようになり、99%の指趾異常のうち前肢のみ2%, 後肢のみ1.5%, 前・後肢82%と後肢にやや多くなる。第13日処理では欠指趾はなく短指趾のみとなる(表2, 図5).

四肢長管骨の異常は軽度の彎曲より完全な欠損に至る各段階の異常が見られ、骨短縮はいずれも肥厚・彎曲をとらない、強度の場合は前肢の撓骨、後肢の脛骨が尺骨側、腓骨側を底面とする円錐形の骨塊となる傾向が強い(図7-10, 11, 12)。ビタミンA過剰ではX線放射に著明であった長管骨の骨性癒合は見られなかった。処理群別に骨異常を見ると第11日処理では前肢に形成不全がつよく、上腕骨、尺骨に欠損があるが撓骨は円錐塊状として残る場合が多い。後肢では骨異常は少いが大腿、脛骨、腓骨のいずれにも骨欠損は見られる。第12日処理では前肢の骨欠損は稀で、後肢の骨欠損が著明になる。第13日処理では前・後肢ともに骨異常は軽く、上腕骨と大腿骨の形成不全は軽度で、前腕・下腿では骨彎曲と肥厚が目立ち骨短縮は軽微であった。

考 察

外因による実験的短肢症の成立感受期が広い意味での胎原基発生の時期に当たることは発生学的に当然であるが、作因により成立臨界期に異同あるいは幅があることは本実験結果が示すとおりである。すなわちddNハツカネズミについて実験的短肢症の成立臨界期は酸素欠乏では胎生第10日、X線、トリパン青では第11日、ビタミンA過剰では第11~12日にある。ハツカネズミ胚について前肢芽はほぼ20体節期、後肢芽は25体節期頃に出現し、ddNでは胎生第10~11日の間に当たる。このことから酸素欠乏では肢芽形成の前段階に作用した短肢を成立せしめ、X線、トリパン青注射では発生した肢芽を直接侵襲し、ビタミンA過剰ではX線同様形成された肢芽を直接侵襲するのみでなく、次の段階の肢骨原基をも障害して短肢を成立せしめるものであろう。X線放射による催奇形効果が主として胚組織へ直接作用する破壊的傷害によることは中枢神経系奇形、口蓋裂、指欠損症において認められ、短肢症も同様の機転によるとみなすことができる。ビタミンA過剰の場合もKalterら(1959²⁾は胚内のビタミンA濃度の上昇による直接胚侵襲によるとし、

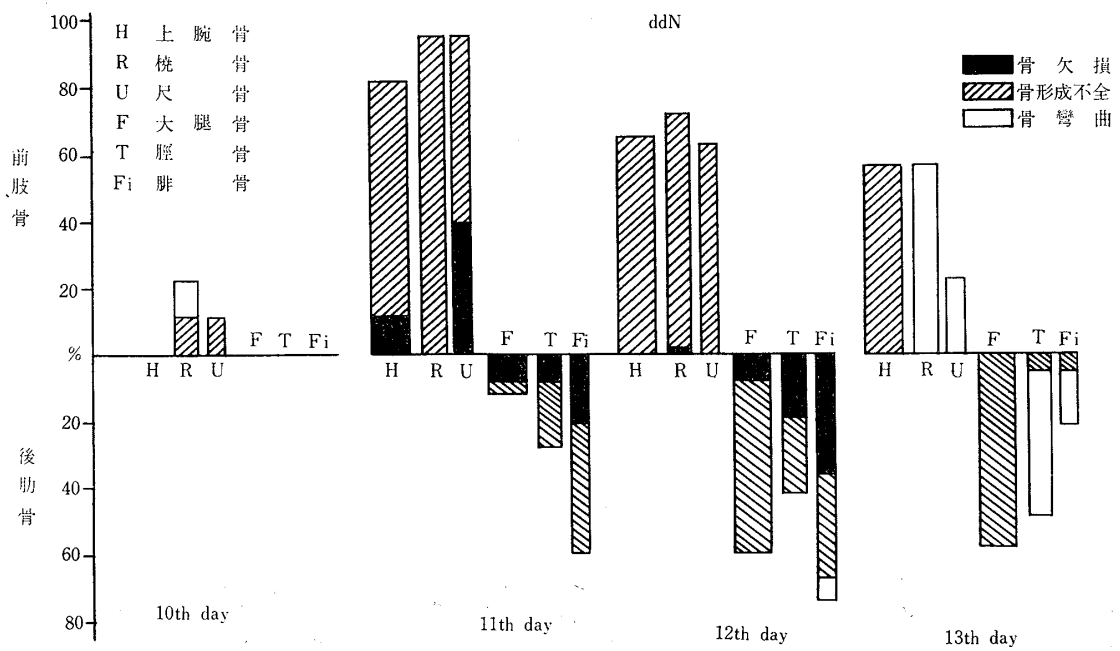


図6. ビタミンA過剰による肢骨異常

ビタミンA欠乏の催奇形作因が未分化組織へでなく器官形成の過程に現われる (Wilson, et al. 1953¹²) 事実から推して, A過剰による短肢症も直接傷害によるものであろう。

実験的短肢症に見られる骨形成障害も作因による特徴的傾向は明らかで, X線放射では線量の増加によっても前肢に骨欠損はおこらず長管骨の癒合が著明で, さらに欠指の合併が稀である点が他の作因による短肢といちじるしく異なる。酸素欠乏では前肢に骨異常なく, 後肢に脛骨の欠損が多い点はX線, ビタミンA過剰といちじるしく異なる。ビタミンA過剰では前・後肢ともに強い骨形成障害をおこし骨短縮に際し骨肥厚と彎曲が著明で, 骨原基の長軸方向の伸長が選択的に強く障害をうける点がX線, 酸素欠乏に見られぬ特徴のある傾向であろう。

本実験による短肢症をヒトの thalidomide 短肢症と比較すると, ハツカネズミの胎生第11~12日はヒトの第4週~6週に相当し, Lenzらが西独での thalidomide 奇形の大半が妊娠第28日~42日の服用によると報告しており臨界期についてはよく一致する。しかし thalidomide 奇形では上肢の骨欠損が多く, radial ray defectの形をとるものが多いといわれているが, 本実験のX線では前肢に骨欠損はなく, ビタミンA過剰では撓骨欠損は稀で尺骨欠損が多い点は異なる。

総 括

ddN 系妊娠ハツカネズミにX線, 酸素欠乏, トリパン青, ビタミンA過剰の各処理を加え胎仔の短肢奇形の成立状況を比較観察した。得られた短肢症の成立臨界

期は酸素欠乏では胎生第10日, X線, トリパン青は第11日, ビタミンA過剰は第11日~12日であった。作因別による短肢症成立の特徴的傾向は, X線では短肢と欠指の合併が稀で線量を増加しても臨界期の延長はおこらず, 前肢では骨欠損がなく骨癒合が著明の点, 酸素欠乏では短縮は後肢のみにおこり, 脛骨欠損の多い点, ビタミンA過剰では短肢症ができ易く, いわゆる海豹肢症の形をとり強い骨形成障害をおこす点が目立った。

本研究の一部は昭和36, 37年度文部省科学研究費(総合研究)の援助にする。

本論文の要旨は, 昭和38年7月第3回日本先天異常学会に発表した。

文 献

- 1) Giroud, A. et Martinet, M. Tératogénèse par hautes doses de vitamin A en fonction des stades du développement. Arch. D' Anat. Microscop. 45 : 77~98, 1956.
- 2) Kalter, H. and Warkany, J. Experimental production of congenital malformations in mammals by metabolic procedures. Physiological Review. 39 : 69-115, 1959.
- 3) 亀山義郎, 村上氏廣, 馬嶋昭生 胎生早期の神経組織のX線障害, 環研年報VII(1960), 154-158, 1961.
- 4) Lenz, W. und Knapp, K. Die Thalidomid-Embryopathie. Dtsch. med. Wschr. 87 : 1232-1241, 1962.
- 5) Millen, J. W. and Woollam, D. H. M. Congenital malformations of the skeletal system. Proceedings of the European Society for the Study of Drug Toxicity. 1. Excerpta Medica

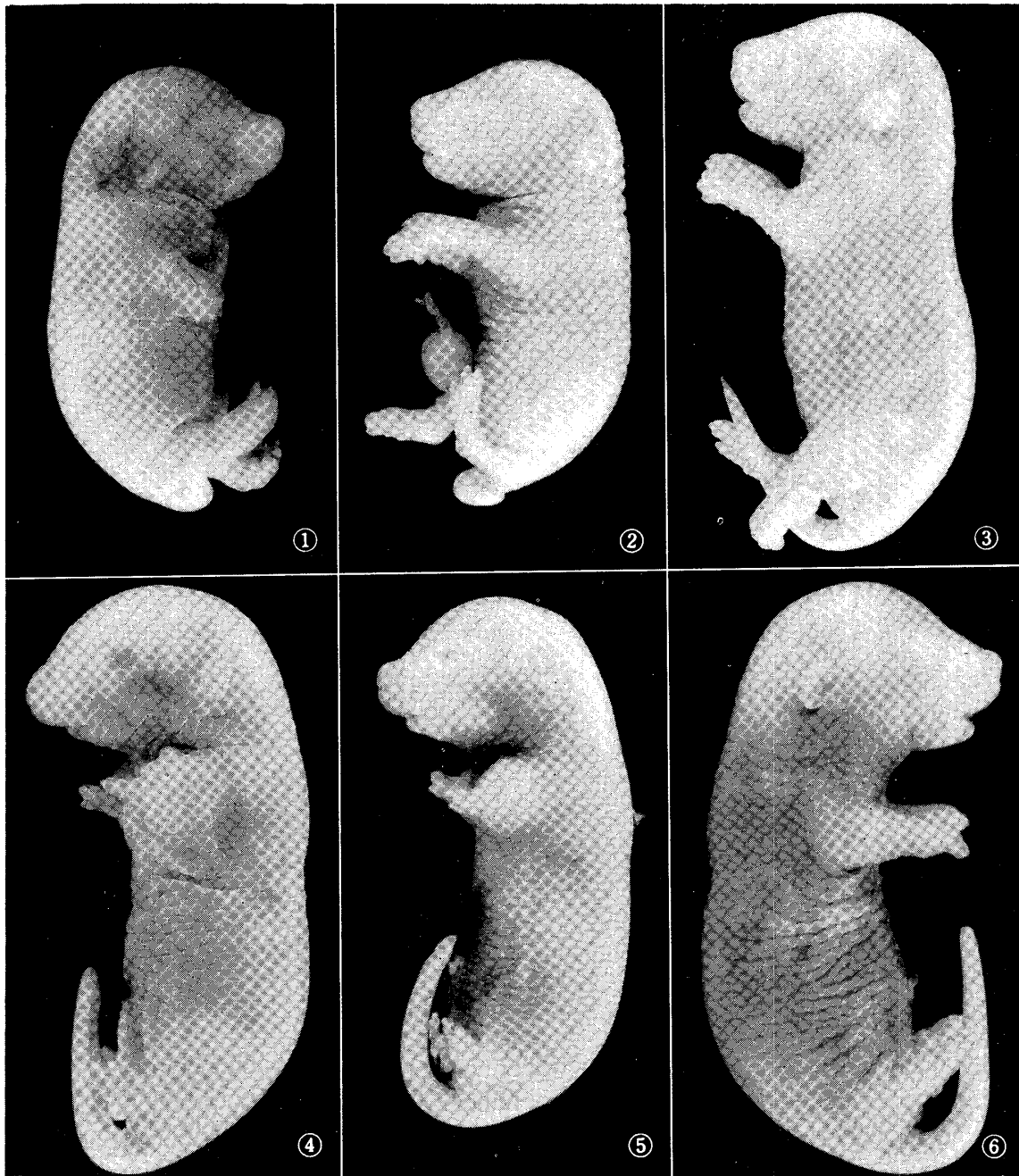


図 7

1. X線放射による短肢症：妊娠第11日に 300r 放射，前・後肢の短縮，後肢内反，小頭，猪首状，口吻短小，小耳，下顎形成不全，短尾を合併する。
2. 酸素欠乏による短肢症：妊娠第10日処理，後肢短細，合趾症合併。
3. トリパン青注射による短肢症：妊娠第11日注射，後肢の短縮，左後肢は内反馬足状。
4. ビタミンA過剰による短肢症：妊娠第11日処理，前・後肢は海豹肢状，強度の欠指症をともなう．頭部は小頭状，口吻短，下顎形成不全を合併する。
5. ビタミンA過剰による短肢症：妊娠第12日処理，外形は4と同じ。
6. ビタミンA過剰による短肢症：妊娠第12日処理，前肢の短縮は軽度，後肢は海豹肢状。

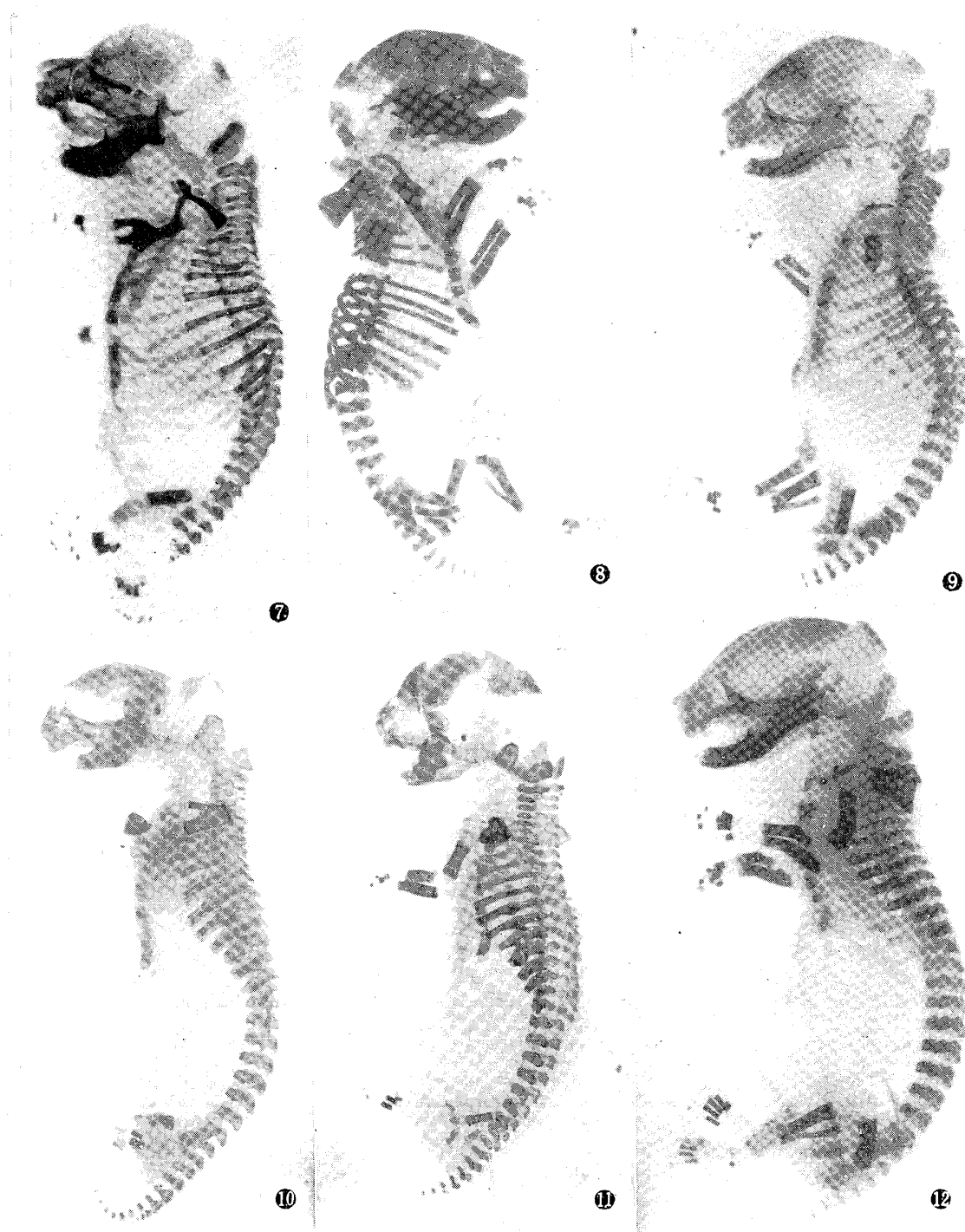


図 7

- | | |
|--|--|
| <p>7. X線放射による肢骨異常：妊娠第11日に300r放射。前肢の上腕骨，撓骨，尺骨は変形短縮して癒合，後肢の大腿骨，腓骨は欠損，脛骨短縮。</p> <p>8. 酸素欠乏による肢骨異常：妊娠第10日処理，前肢骨正常，右後肢の脛骨短縮，腓骨彎曲。</p> <p>9. トリパン青による肢骨異常：妊娠第11日注射，左前肢の上腕骨短縮著明，撓骨，尺骨欠損。</p> <p>10. ビタミンA過剰による短肢症：前肢の上腕骨欠損，撓骨は円錐塊状，尺骨欠損，強度の欠指をともな</p> | <p>ら，肩胛骨形成異常，後肢の大腿骨欠損，脛骨は円錐塊状，腓骨欠損，欠指をともなう。頭蓋骨形成異常著明。</p> <p>11. ビタミンA過剰による短肢症：妊娠第12日処理，前肢の上腕，撓骨，尺骨は短縮肥厚，肩胛骨形成不全，後肢の大腿骨，腓骨は欠損，脛骨は痕跡状。</p> <p>12. ビタミンA過剰による短肢症：妊娠第13日処理，前肢・後肢の長管骨の短縮はなく骨彎曲・肥厚著明，外形で短肢症を示さない。</p> |
|--|--|

- International Series No. 64, 1963, Amsterdam, New York, London, Milan, Tokyo.
- 6) Murphy, M. L. Teratogenic effects of tumor-inhibiting chemicals in the foetal rat. Ciba Foundation Symposium on Congenital Malformations. J. & A. Churchill, London, 1961.
 - 7) Murakami, U., Kameyama, Y. and Nogami, H. Malformations of the extremity in the mouse foetus caused by X-radiation of the mother during pregnancy. *J. Embryol. exp. Morph.* 11: 549-569, 1963.
 - 8) 村上氏廣, 亀山義郎 X線放射による口蓋裂とその成立機序(予報), 環研年報(1963), 175-181, 1964.
 - 9) Otis, E. M. and Brent, R. : Equivalent ages in moues and human embryos. *Anat. Rec.* 120: 33-64, 1954.
 - 10) Russell, L. B. and Russell, W, L, An analysis of the changing radiation response of the developing mouse embryos. *J. Cell. and Comp. Physiol.* 43, Suppl. 1: 103-149, 1954.
 - 11) Warkany, J. and Nelson, R. C. Appearance of skeletal abnormalities in the offspring of rats reared on a deficient diet. *Science*, 92: 383-384, 1940.
 - 12) Wilson, J. G., Roth, C. B. and Warkany, J. An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration on vitamin A at various times during gestation. *Am. J. Anat.* 92: 189-217, 1953.

(昭和38年11月30日受付)