

原 著

レチノイン酸の胎生期暴露がラット胎児の発生に及ぼす影響

小 西 啓 悦

四條啜学園大学

キーワード

レチノイン酸、胎生期投与、催奇性、ラット胎児

要 旨

妊娠ラットにレチノイン酸 (RA) を与えると、末期胎児に種々な奇形を生ずることが知られている。今回、時期を変えて妊娠ラットにRAを投与し、その末期胎児に及ぼす影響について調べた。DAラットの妊娠8日、9日、10日および11日にRAを60mg/kgの濃度で単回経口投与し、妊娠20日にその胎児を調べた結果、投与時期に応じて胎児の死亡や奇形の出現などに変化が見られた。妊娠8日と11日の投与ではよく似た奇形の出現率を示し、妊娠9日の投与では全ての胎児が死亡した。しかし妊娠10日の投与では口蓋裂、眼球突出、小顎、小口などの頭蓋顔面部の異常と、二分脊椎、鎖肛、無尾などの腰仙尾部の中軸骨格に由来する異常が多く出現した。顔面頭蓋部の異常は、RAが起源となる神経堤細胞への作用によるものと考えられ、また中軸骨格の奇形については体節への影響によることが示唆された。

はじめに

レチノイン酸 (RA) はビタミンA誘導体の一つ (図1) で、生体中に微量に存在し、全身の上皮組織や網膜の分化および生殖機能に不可欠な物質である。また古くから、細胞の分化や増殖を調節することが明らかにされ、臨床的に種々の皮膚疾患や腫瘍の治療に応用されるようになってきた¹⁻⁴⁾。一方RAの過剰投与によって、種々の先天異常が発生することはマウス⁵⁻¹⁴⁾、ラット^{5・13・14)}、

ハムスター^{12)・15-18)} などにおいて既に報告されている。ヒトでは妊娠初期の婦人が、ニキビの治療のために isotretinoin (13-cis-retinoic acid) を服用した結果、奇形児の出生が報告され、RA製剤のヒトへの適用について問題となった¹⁹⁾。実験動物で多く認められる奇形の型は、RAの種々の器官原基に対する感受性が異なること、すなわちRAを投与する日により種々な奇形が出現し、種差は少ないことが特徴である。マウスでは妊娠8日の母獣にRAを与えたところ、末期胎児の頭部顔面部の奇形が最も頻度が高く出現し、ついで神経管閉鎖不全が多く見られた²⁰⁾。また胎生8日にRAを投与し、投与後8時間以内に胎児では頭部神経上皮に変化が現れ、神経堤細胞に強く影響し、顔面口蓋裂や神経組織の発生異常を来すことが明らかになった²¹⁾。ラットではKochharが妊娠9日から11日までRAを連続投与した結果、その末期胎児に二分脊椎、外脳、人魚肢、短尾、口蓋裂を認めた。またKistler¹³⁾ は、ラットの妊娠0日から19日の間に120mg/kgのRAを単回投与したところ、妊娠8日と9日に投与された母獣では胚吸収率が最も高く、妊娠10日と13日投与母獣からは奇形発生率が高いことを報告している。このようにラットを用いてRAの胎児に及ぼす

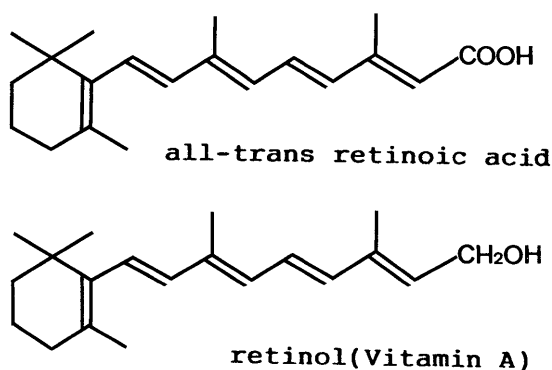


図1 レチノイン酸とビタミンAの構造式

オールトランス型レチノイン酸とレチノール (ビタミンA) の構造式

影響については、種々の外表奇形や骨形成の異常等の報告はあるが、末期胎児の奇形についてその詳細な報告はない。そこで本研究ではRAの末期胎児に及ぼす影響について調べる目的でRAを妊娠8日から11日の各時期に単回投与を行い、末期における胎児の外表奇形の出現の型と頻度を調べた。

方 法

1. 使用動物

ラットの交雑系間の変異をできる限り少なくするため遺伝子の一定した近交系のDAラットを用いた。

体重160 g～180 gのDAラットを静岡実験動物農業協同組合から6週齢で購入した。雄は独居ゲージ、雌は1ゲージ内に4～5匹同居させ、飼料(OA-2、日本クレア、東京)と水は自由に摂取させた。8週齢になった発情雌を選択して雄ゲージ内に1:1で16時間(16:00～8:00)同居させ、翌朝膣スミアを検鏡し、精子を認めたものを妊娠ラットとし妊娠0日と起算した。飼育条件は照明時間7:00～19:00で、温度23.4℃、湿度50±5%とした。

2. 薬物投与

RAはall-trans型のretinoic acid (Sigma社)を用いオリーブ油に懸濁した。投与量は母獣体重kg当たり60mgとし、臨界期単回投与の投与時期による影響をみるために妊娠8日、9日、10日および11日の午前9時に胃ゾンデを用いて強制経口投与した。対照群にはオリーブ油を母体体重kg当たり10mlを同様に強制経口投与した。

3. 剖 検

妊娠20日に母獣をエーテル麻酔下で頸椎脱臼により屠殺し、開腹して子宮を取り出し、着床痕数、生存及び死亡胎児数を調べた。生児については体重を測定し、一腹平均胎児体重を求めた。更に個々の胎児について外表を実体顕微鏡下で観察した。死亡時期の判定については着床痕のみを示すものを早期死亡とし、胚塊を含むものは着床後の死亡とした。

4. 標本の作製

生存胎児の約2/3を無作為に選び、99%エタノールに浸漬し、Inoue法²²⁾によるアリザリンレッドSとアルシアンブルーの骨軟骨二重染色を行った。染色した骨格標本は50%グリセリン溶液下にて実体顕微鏡で観察し

た。

5. 統計処理

奇形を持つ胎児の頻度は生存胎児に対する割合で計算した。死亡胎児数(%)、奇形児を生じた母獣数、奇形児数(%)および外表奇形の頻度についてはすべてカイ二乗検定を行い、平均一腹児数、および平均胎児体重についてはStudentのt検定を用いた。

結 果

妊娠8日、9日、10日、11日のRA単回投与群についての着床数、死亡数、生存胎児数、胎児平均体重、奇形を生じた母獣数、奇形児数を表1にまとめた。RAの投与各群において、平均着床数は対照群と差が認められなかったが、死亡胎児数は各投与群間で大きな差が認められた。妊娠8日では全着床数の78.7%が死亡胚、妊娠9日の投与では100%、妊娠10日では17.3%の死亡胚を認め、いずれも対照群との間に有意な差が認められた。しかし妊娠11日投与では胎児死亡率は対照群との間に差は認められなかった。また生存児の検査で、妊娠8日と10日投与群に平均体重の減少が見られ、また奇形の発生についても各投与群で対照群に比べ有意に高い頻度を示した。

外表奇形

妊娠20日に認められた奇形を投与日別に表2にまとめた。妊娠8日のRA投与群では、末期での生存胎児の6.3%に小口、口蓋裂および曲尾が出現したが、対照群との間に有意差は認められなかった。臍帯ヘルニアと皮下出血がそれぞれ3例と2例認められたが、対照群に比べて有意の差は示さなかった。妊娠10日のRA処理で、生存児に認められた奇形は4投与群中最も高頻度で、顔面頭蓋部の奇形(口蓋裂14.9%、眼球突出79.1%、巨舌17.9%、小顎64.2%、小口65.7%、小耳64.2%)および腰部から尾部の体軸に沿った奇形(二分脊椎79.1%、鎖肛82.1%、曲尾11.9%、短尾10.4%、無尾80.6%)が頻発した(図2 a、2 b、3 a、3 b)。妊娠11日投与群では鎖肛が17.1%に出現し、短尾が15.8%、小口11.8%、眼球突出が9.2%にみられた。いずれの型の異常も対照群に比べて有意の差が認められた。

骨格の異常

顔面頭蓋骨の異常については、妊娠8日RA投与群で、

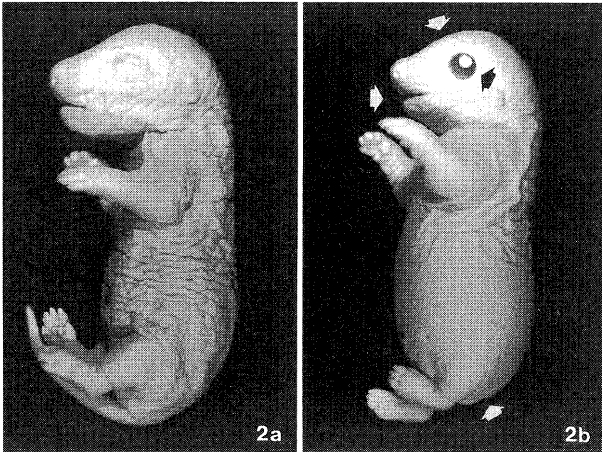


図2 ラット胎児の側面像

- a 妊娠10日にオリーブ油を投与した母獣から得た妊娠20日のラット胎児の側面像 (コントロール) ×1.5
 b 妊娠10日に60mg/kg のレチノイン酸を投与した母獣から得た奇形を持つラット胎児の側面像 小頭、眼球突出、小顎、無尾を示す (矢印) ×1.5

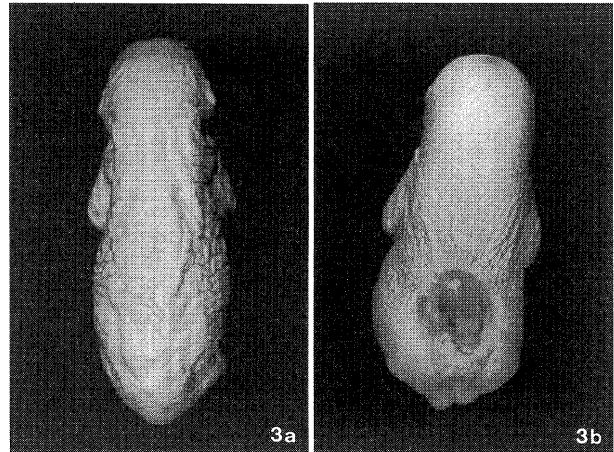


図3 ラット胎児の背面像

- a 妊娠10日にオリーブ油を投与した母獣から得た妊娠20日のラット胎児の背面像 (コントロール) ×1.5
 b 妊娠10日に60mg/kg のレチノイン酸を投与した母獣から得た奇形を持つラット胎児の背面像 尾部の二分脊椎、無尾を示す ×1.5

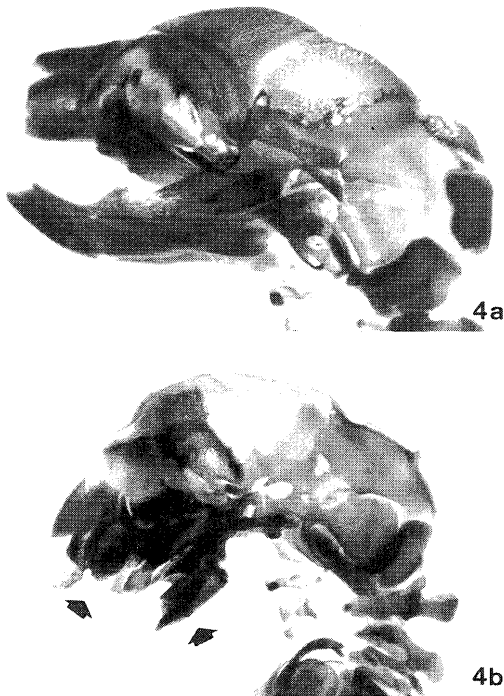


図4 ラット胎児頭蓋の側面像

- a 妊娠10日にオリーブ油を投与した母獣から得たラット胎児頭蓋の側面像 (コントロール) 発達の良い骨化を示す上顎、下顎、頬骨、鼓室輪に注目 ×5.3
 b 妊娠10日に60mg/kg のレチノイン酸を投与した母獣から得たラット胎児頭蓋の側面像 上顎や下顎の奇形を示す (矢印) ×5.3

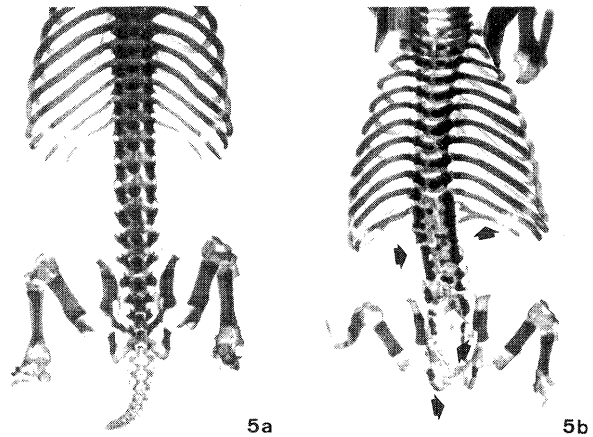


図5 ラット胎児の脊椎骨と尾椎の背面像

- a 妊娠10日にオリーブ油を投与した母獣から得たラット胎児脊椎骨と尾椎を含む背面像 脊柱管は全体に閉鎖している ×3.0
 b 妊娠10日に60mg/kg のレチノイン酸を投与した母獣から得たラット胎児脊椎骨と尾椎を含む背面像 腰仙部における脊椎骨の開裂、尾椎の無形性 (矢印)、癒合肋骨 (右矢印)、癒合椎骨 (左矢印) を示す ×3.0

前頭骨と上後頭骨の減形成あるいは無形成を示したが、他の骨形成では異常を示さなかった。妊娠10日投与では、調べたすべての骨に減形成または無形成が出現し (図4 a, 4 b)、妊娠11日のRA投与でも、妊娠10日投与の場合と同様に、前頭骨と上後頭骨に強い骨形成の抑制が認められたが、上顎骨、下顎骨および鼓室輪は妊娠10日ほど強い抑制 (4 b) は示さなかった。

一方、中軸骨格の奇形については、妊娠10日投与群に多数の奇形が認められたが、特に腰椎以下の椎骨の異常（椎弓の癒合、椎体の分離、変形、脊椎裂、尾椎の無形成など）が目立った（図5 a、5 b）。肋骨の異常は椎骨の場合と同様に、妊娠10日のRA投与群で、左右両側の骨化の抑制が見られた。

考 察

DAラットはアジュバント関節炎に対する感受性が高いことで知られる近交系のラットである²³⁾。このDAラットの妊娠8日、9日、10日および11日にRAの60mg/kgを単回の経口投与として与え、その末期に胎児を調べた結果、妊娠9日の投与で全ての胎児が胎生期死亡を来した（表1）。この妊娠9日の投与で致死率が高いことは他のラットの系統で以前にも報告されており²⁴⁾、RAにより胎盤形成に関与する尿膜の正常な発育が妨げられ、最終的に胎盤の形成が阻害されることにより胎児死亡を来すと考えられた。今回の実験でも全例が初期の死亡胚であり、RAの投与から比較的早期に影響を受けたものであった。妊娠8日投与群の胎児も全着床の78.7%が死亡胚であり、対照群の1.9%と比べて有意に高い値を示した。しかし妊娠9日投与群とは違って、妊

娠末期に死亡した胎児が全死亡例59例中10例（16.9%）存在したことより8日投与群の死亡原因の全てが、胎盤形成不全とは考えられず、胎芽の直接的な作用も関与するものと思われた。妊娠11日投与群では逆に死亡胚は5%と最も少なくなり対照群との間に有意な差は認められなかった。また妊娠10日投与群の死亡児数も17.3%と妊娠8日、9日に比べて低値であった。このことは妊娠8日、9日ではRAの影響を受けた胚芽は死亡の方向へ行ったのに対し、妊娠10日以降での投与の影響は生存する方向へ働いたことを示している。したがって生死の臨界点が妊娠9日と10日の間に存在し、それより早期のRAの作用は胚の生命を維持する組織の破壊により胚が死亡してしまうのに対し、以後の作用では生命維持に関する組織には影響せず、その他の器管形成の原基に影響が現れそれぞれの部位に奇形が現れたものと推測された。

奇形の誘発については、妊娠10日投与群で全ての生児に何らかの奇形が認められ、妊娠8日および妊娠11日の投与では生児の約30%にしか発現しなかった。妊娠10日の投与で出現した奇形の型については主に顔面頭蓋部と腰部から尾部にかけての中軸骨格に奇形が多かったが、妊娠8日の投与の場合、中軸骨格の奇形とし

表 1. レチノイン酸のラット胎児に与える影響（投与時期）

投与日	母獣数	着床数 (平均±SD)	死亡児数(%) [初期/末期]	生 児			
				胎児数	平均胎児体重 g (平均±SD)	奇形児数 母獣(胎児) [生児比%]	
妊娠8日	RA	10	75(7.5±2.24)	59(78.7)** [49/10]	16	2.46±0.44**	5(5)[31.3]**
	C	6	52(8.7±1.37)	1(1.9) [1/0]	51	3.16±0.49	0
妊娠9日	RA	10	89(8.9±0.82)	89(100)** [89/0]	0	—	—
	C	6	47(7.8±0.69)	2(4.3) [2/0]	45	3.24±0.04	0
妊娠10日	RA	10	81(8.1±2.43)	14(17.3)* [13/1]	67	2.37±0.82**	10(67)[100]**
	C	6	48(8.0±1.64)	2(4.2) [2/0]	46	3.11±0.20	0
妊娠11日	RA	10	80(8.0±1.33)	4(5.0) [4/0]	76	2.89±0.69	5(23)[30.3]**
	C	5	43(8.6±1.63)	3(7.0) [3/0]	40	3.18±0.51	0

：カイ自乗検定とt-検定において対照群にくらべて有意な差 (：p<0.05, **：p<0.001)を示す
C：コントロール（オリーブ油）

ては曲尾が一例出ただけで、他の奇形は散発的であった(表2)。妊娠11日の投与になると顔面頭蓋部と尾の奇形そして鎖肛が出現しているが、その程度は妊娠10日投与の場合と比べて少ないものであった。KistlerはFualbinoラットを用い同様の実験を行っており、今回の実験結果と似た結果を報告している¹³⁾。しかし妊娠11日投与の胎児で頭蓋骨の異常は全く出現しないこと、および妊娠8日投与胎児で二分脊椎を含めた中軸骨格の異常が出ていることが今回の結果と異なっていた。これはRAの投与量による差かあるいは系統差によるものと考えられる。

以前に報告したマウスでの実験^{20・21)}により、頭部顔面部の奇形は、発生の初期においてこの部分の神経上皮中にある神経堤細胞へのRAの影響によることがわかった。また尾部の中軸骨格の異常は、神経上皮細胞への直接的作用により起こった神経孔の閉鎖不全が原因であることを報告したが、今回のラットの場合でも同じことが考えられる。

まとめ

DAラットの妊娠8日、9日、10日および11日にRA

を60mg/kgの濃度で単回経口投与し、妊娠20日にその胎児を調べた結果、投与時期に応じて死亡児数や奇形の出現に変化が見られた。妊娠9日の投与では全ての胎児が早期に死亡し、妊娠8日の投与でも約80%の胎児が死亡した。それに対し妊娠10日と11日では死亡率は低く末期で多数の生児が得られたが、奇形の発生は妊娠10日の投与に集中した。奇形は口蓋裂、眼球突出、小顎、小口などの頭蓋顔面部の異常と二分脊椎、鎖肛、無尾などの腰仙尾部の中軸骨格に由来する異常が多く確認できた。顔面頭蓋部の異常は、RAが起源となる神経堤細胞への作用によるものが考えられ、また中軸骨格の奇形については体節への影響によることが示唆された。

謝 辞

稿を終わるにあたり、ご指導、ご校閲賜りました近畿大学医学部第1解剖学教室安田佳子教授に深謝の意を捧げます。

文 献

- 1) Strauss JS, Windhorst DB, Weinstein GD. Oral retinoids : A workshop. J Am Acad Dermatol. 6:573-832, 1982

表2. レチノイン酸によってラット胎児に発生した奇形の型

奇形の型	投 与 日							
	妊娠8日		妊娠9日		妊娠10日		妊娠11日	
	RA	C	RA	C	RA	C	RA	C
口蓋裂	1(6.3) ^a	0	—	0	10(14.9)**	0	0	0
眼球突出	0	0	—	0	53(79.1)***	0	7(9.2)*	0
顔面いぼ	0	0	—	0	11(16.4)**	0	0	0
巨舌	0	0	—	0	12(17.9)**	0	0	0
小顎	0	0	—	0	43(64.2)***	0	1(1.3)	0
小口	1(6.3)	0	—	0	44(65.7)***	0	9(11.8)*	0
小耳	0	0	—	0	43(64.2)***	0	0	0
二分脊椎	0	0	—	0	53(79.1)***	0	0	0
肛門閉鎖	0	0	—	0	55(82.1)***	0	13(17.1)**	0
曲尾	1(6.3)	0	—	0	8(11.9)*	0	1(1.3)	0
曲短尾	0	0	—	0	1(1.5)	0	4(5.3)	0
短尾	0	0	—	0	7(10.4)*	0	12(15.8)**	0
無尾	0	0	—	0	54(80.6)***	0	0	0
内反足	0	0	—	0	22(62.8)***	0	0	0
臍帯ヘルニア	3(18.8)	0	—	0	14(20.9)***	0	0	0
皮下出血	2(12.5)	0	—	0	7(10.4)*	0	2(2.6)	0

: カイ自乗検定において対照群に比べ有意な差 (: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001) を示す

a: 胎児数 (生児比%)

—: 生児は得られなかった

C: コントロール (オリーブ油)

- 2) Peck GL, Retinoids. Therapeutic use in dermatology. *Drugs*. 24:341-351, 1982
- 3) Gourea J, Mathe G, Hercend T, et al. Degree of bronchial metaplasia in heavy smokers and its regression after treatment with a retinoid. *Lancet*. 1:710-712, 1982
- 4) Kessler JF, Mevskens F1 JR, Levine N, et al. Treatment of cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoiders) with 13-cis-retinoic acid. *Lancet*. 1:1345-1347, 1983
- 5) Kochhar DM. Teratogenic activity of retinoic acid. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 70:398-404, 1967
- 6) Kochhar DM, Aydelotte MB. Susceptible stages and abnormal morphogenesis in the developing mouse limb, analysed in oegan culture after transplacental exposure to vitamin A(retinoic acid). *J Emryol Exp Morphol*. 31:721-734, 1974
- 7) Kwasigroch TE, Kochhar DM. Production of congenital limb defects with retinoic acid.:phenomenological evidence of progressive differentiation during limb morphogenesis. *Anat Embryol*. 161:105-113, 1980
- 8) Newall DR, Edwards JRG. The effects of vitamin A on fusion of mouse palates. II. Retinyl palmitate, retinal, and retinoic acid in vitro. *Teratology*. 23:125-130, 1981
- 9) Kochhar DM, Penner JD, Tellone CL. Comparative teratogenic activities of two retinoids:Effects on palate and limb development. *Teratogenesis Carcinog Mutagen*. 4:377-387, 1984
- 10) Johnston MC, Sulik KK, Webster WS, et al. Isotretinoin embryopathy in a mouse model:Cranial neural crest involvement. *Teratology*. 32:26A-27A, 1985
- 11) Jarvis BL, Johnston MC, Webster WS, et al. Isotretinoin-induced ear malformations in mice. *Teratology*. 32:27A, 1985
- 12) Wiley MJ, Tibbles LA, Wong M. A comparative study of the effects of retinoic acid on the morphology of caudal tissues in mouse and hamster embryos during the 24 hours after maternal treatment. *Teratology*. 32:49A, 1985
- 13) Kistler A. Teratogenesis of retinoic acid in rats:susceptible stages and suppression of retinoic acid-induced limb malformation by cycloheximide. *Teratology*. 23:25-31, 1981
- 14) Steele CE, Trasler DG, New DAT. An vivo/in vitro evaluation of the teratogenic action of excess vitamin A. *Teratology*. 28:209-214, 1983
- 15) Shenefelt RB. Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic acid:relation to dose and stage at treatment. *Teratology*. 5:103-118, 1972
- 16) Taylor IM, Wiley MJ, Agur A. Retinoic acid-induced heart malformations in the hamster. *Teratology*. 21:193-197, 1980
- 17) Wiley MJ. The pathogenesis of retinoic acid-induced vertebral abnormalities in goldenhamster fetuses. *Teratology* 28:341-353, 1983
- 18) Wiley MJ, Cauwenbergs P, Taylor IM. Effects of retinoic acid on the development of the facial skeleton in hamsters:early changes involving cranial neural crest cells. *Acta Anat*. 116:180-192, 1983
- 19) Rosa FW. Teratogenicity of isotretinoin. *Lancet*. 2:513, 1983
- 20) Yasuda Y, Okamoto M, Konishi H, et al. Developmental anomalies induced by all-trans-retinoic acid in fetal mice: I. Macroscopic findings. *Teratology*. 34:37-49, 1986
- 21) Yasuda Y, Konishi H, Kihara T, et al. Developmental anomalies by all-trans-retinoic acid in fetal mice: II. Induction of abnormal neuroepithelium. *Teratology*. 35:355-366, 1987
- 22) Inoue M. Differential staining of cartilage and bone in fetal mouse skeleton by alcian blue and alizarin red S. *Cong Anom*. 16:171-173, 1976
- 23) Battisto JR, Smith RN, Beckman K, et al. Susceptibility to adjuvant arthritis in DA and F344 rats. *Arthritis Rheum*. 25:1194-1200, 1982
- 24) Vickers TH. Embryo lethality in rats caused by retinoic acid. *Teratology*. 31:19-33, 1985

The effects of intrauterine exposure to retinoic acid on development of rat fetuses

Hiroyoshi Konishi

Shijonawate Gakuen University

Key words

retinoic acid, developmental anomaly, teratogenicity, rat fetus

Abstract

Retinoic acid (RA) induces various malformations when given to pregnant rats. The present study was undertaken to elucidate the developmental anomalies induced by RA in fetuses of DA strain rats.

RA (all-trans type XX, Sigma) was orally given at a single dose of 60mg/kg of body weight to pregnant DA rats on day 8, 9, 10 or 11 of gestation. On day 20 of gestation, pregnant rats were sacrificed to obtain the fetuses. Examinations of the 20-day-old fetuses revealed that administration of RA on day 8 and day 11 of gestation led to similar occurrence of malformed fetuses and day 9 of gestation gave no live fetuses and on day 10 of gestation led to many kinds of malformations including cranio-facial and axial skeletal anomalies. These findings suggested that the primary effects of RA on the cranial neural crest cells leads to the craniofacial anomalies (cleft palate, exophthalmus, facial skin tag, macroglossia, micrognathia, microstomia, microtia) and on the neuroepithelial cells leads to an axial skeletal anomalies (spina bifida, atresia ani, kinky tail, short-kinky tail, short tail, taillessness).