

## レチノイン酸によるマウス胎仔の眼形成異常

尾関 年則, 白井正一郎, 馬嶋 昭生

名古屋市立大学医学部眼科学教室

## 要 約

神経堤細胞と眼形成異常の関係を解明するため, レチノイン酸をとうもろこし油に溶解して, 妊娠7日のマウス腹腔内に12.5 mg/kg注射した(RA群). 対照は等量の同油のみを投与した(対照群). 実験母獣は各群5匹で, 妊娠18日に胎仔を取り出した. 胎仔死亡率は, RA群46.3%, 対照群2.2%で, RA群22匹, 対照群45匹の生存胎仔について外形観察を行い, 眼部を組織学的に検討した. 外形では, RA群で小眼球95.5%, 口唇・口蓋裂36.4%, 中枢神経系異常31.8%などがみられ, 対照群で小眼球6.7%, 中枢神経系異常, 低位耳介各2.2%が観察

された. 組織学的には, RA群で小眼球47.7%, 無眼球38.6%, 胎生裂閉鎖不全36.4%, 硝子体形成異常34.1%, 無水晶体眼22.7%, 前房隅角形成異常18.2%, 水晶体胞分離不全15.9%がみられ, これらの異常はレチノイン酸の神経堤細胞遊走障害によるもので, 対照群ではそれぞれ3.3%, 1.1%, 3.3%, 8.9%, 1.1%, 2.2%, 2.2%に認められた. (日眼会誌 101:293-298, 1997)

キーワード: レチノイン酸, 神経堤細胞, マウス胎仔, 眼形成異常, 小眼球

## Developmental Eye Abnormalities in Mouse Fetuses Induced by Retinoic Acid

Hironori Ozeki, Shoichiro Shirai and Akio Majima

Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School

## Abstract

To clarify the relationship between neural crest cells and ocular anomalies, pregnant mice were treated intraperitoneally with 12.5 mg/kg retinoic acid suspended in corn oil on day 7 of pregnancy (RA group). Control mice were given an equal volume of corn oil (control group). Each group consisted of 5 mother mice, and the offsprings were removed on day 18 of gestation. The fetal mortality was 46.3% in the RA group and 2.2% in the control group. Twenty-two live fetuses of the RA group and 45 of the control group were grossly observed, and the eyes were examined histologically. In the RA group, gross malformations such as microphthalmos (95.5%), cleft lip and palate (36.4%), and central nervous system anomalies (31.8%) were observed, and in the control group, malformations such as microphthalmos (6.7%), central nervous system anomalies

(2.2%), and low set ears (2.2%) were seen. Histological examination revealed microphthalmos (47.7%), anophthalmos (38.6%), faulty closure of the embryonic fissure (36.4%), developmental abnormalities of the vitreous (34.1%), aphakia (22.7%), goniodysgenesis (18.2%), and faulty separation of the lens vesicle (15.9%) in the RA group. These anomalies arose from abnormal neural crest cell migration induced by retinoic acid. They were detected in only 3.3, 1.1, 3.3, 8.9, 1.1, 2.2 and 2.2%, respectively of the control group. (J Jpn Ophthalmol Soc 101:293-298, 1997)

Key words: Retinoic acid, Neural crest cell, Mouse fetus, Ocular anomaly, Microphthalmos

## I 緒 言

眼球は神経外胚葉, 表面外胚葉および中胚葉由来の各組織が相互に作用しながら発生する<sup>1)</sup>が, 近年, 神経外胚

葉由来の神経堤細胞の眼発生における重要性が明らかにされてきている<sup>2)3)</sup>. 従来から当教室では, X線<sup>4)~6)</sup>, ochratoxin A<sup>7)8)</sup>, エタノール<sup>9)</sup>など種々の催奇形因子を妊娠マウスに作用させて, 胎仔に成立するさまざまな眼形成異

別刷請求先: 467 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1 名古屋市立大学医学部眼科学教室 尾関 年則  
(平成8年8月12日受付, 平成8年11月11日改訂受理)

Reprint requests to: Hironori Ozeki, M.D. Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School.  
1 Kawasumi, Mizuho-cho Mizuho-ku, Nagoya-shi, Aichi-ken 467, Japan

(Received August 12, 1996 and accepted in revised form November 11, 1996)



図1 外形観察における小眼球(RA群).

いずれも胎生18日のC57BL/6N Jclマウスで、左端が正常、中央および右端は小眼球、中央の胎仔の眼球は正常よりわずかに小さく、右端の胎仔の眼部には隆起やぶどう膜色素が全くみられない。

RA群：レチノイン酸投与群

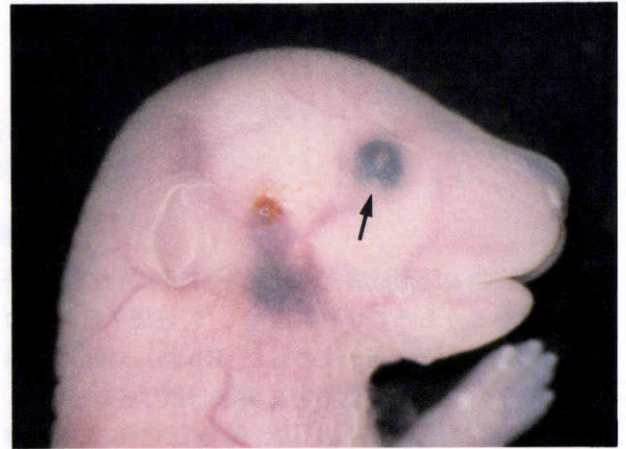


図2 外形観察における定型的虹彩欠損(RA群). 胎生裂に一致した下方の虹彩が欠損している(矢印).



図3 ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色の光学顕微鏡(光顕)写真、高度の小眼球(RA群).

眼杯内板・外板および水晶体成分が頭蓋底にわずかにみられる(矢印). パーは110 μm

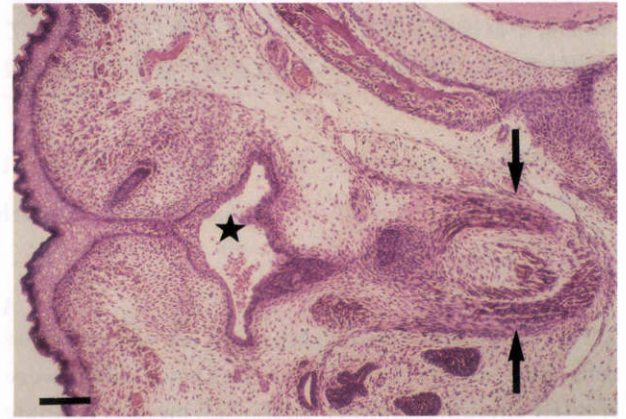
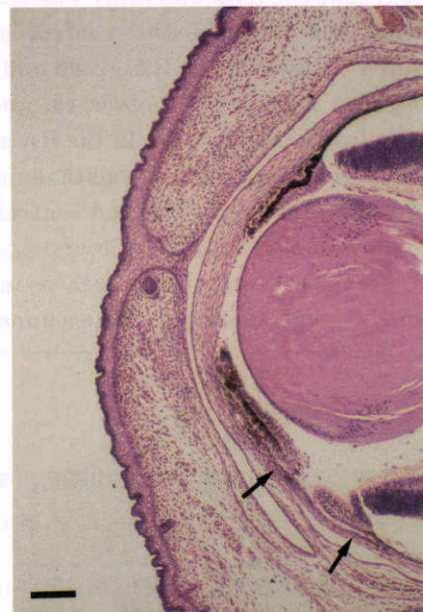


図4 HE染色の光顕写真、無眼球(RA群).

眼瞼、結膜囊(星印)、外眼筋(矢印)は存在するが、神経外胚葉由来の眼球成分は全く観察されない。パーは175 μm

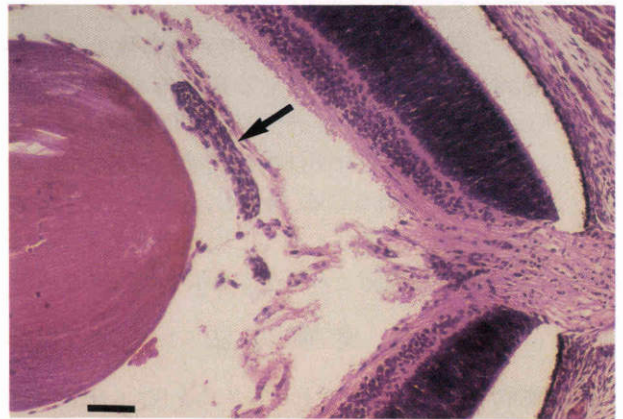
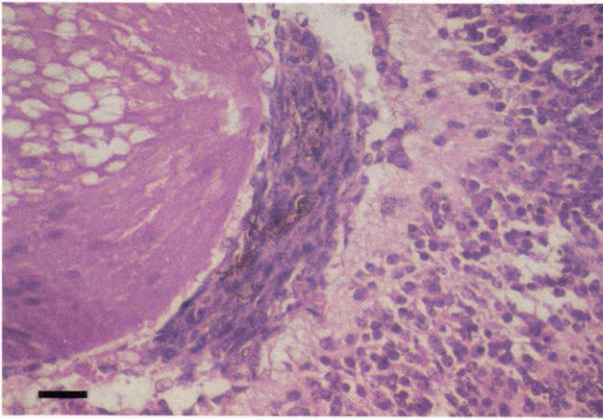


a : 下方の眼杯内板が大きく外反し、硝子体腔で嚢を形成している。同部の外板は欠損している。パーは140 μm



b : 下方虹彩の眼杯内板が外反して(矢印)、その部の外板が欠損している。パーは110 μm

図5 HE染色の光顕写真、胎生裂閉鎖不全, a : 重度(RA群), b : 軽度(RA群).



a: 硝子体腔に間葉組織が充満し, 間葉組織中にメラニン細胞が散在している, バーは 27.5  $\mu\text{m}$

b: 硝子体腔にわずかな間葉細胞塊(矢印)がみられる, バーは 70  $\mu\text{m}$

図6 HE染色の光顕写真, 硝子体形成異常, a: 重度(RA群), b: 軽度(対照群).

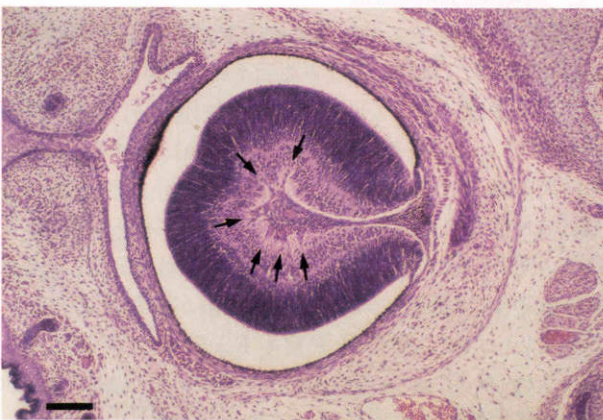


図7 HE染色の光顕写真, 無水晶体眼(RA群). 胎生裂は全長にわたって閉鎖しておらず, 連続切片による観察でも水晶体組織は存在しない. 硝子体腔には間葉組織が充満しており, 硝子体血管の網膜内侵入像(矢印)もみられる. バーは 110  $\mu\text{m}$

図8 HE染色の光顕写真, 前房隅角形成不全(RA群). 下方の隅角部に間葉組織が充満している(矢印), バーは 35  $\mu\text{m}$

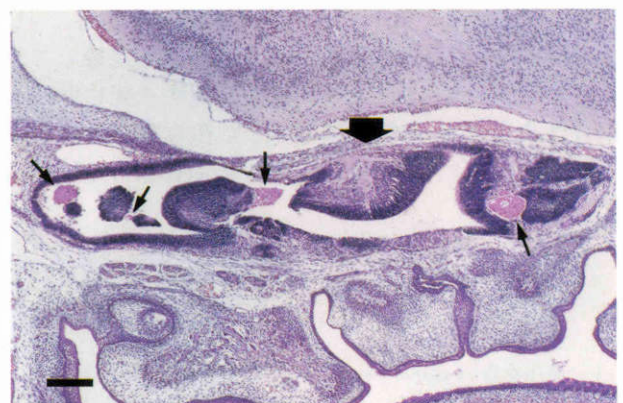


図9 HE染色の光顕写真, 水晶体胞分離不全(RA群). 角膜上皮と水晶体上皮が連続しており(矢印), その部の角膜実質・内皮は欠損している. また, 角膜内皮・実質の分化も不良である. バーは 110  $\mu\text{m}$

図10 HE染色の光顕写真, 合眼症(RA群). 眼杯外板はほとんど存在せず, 内板は著しい襞を形成し, 逆位の網膜構造を呈している部位(太矢印)もある. また, 未分化な水晶体組織(細矢印)が散在している. バーは 175  $\mu\text{m}$

常の成立機序を検討してきた。

レチノイン酸はビタミン A の活性型誘導体で、細胞や組織の正常発生過程を制御する形態形成因子(morphogen)の一つ<sup>10)</sup>である。レチノイン酸には催奇形性があり<sup>11)</sup>、その催奇形作用は頭部神経堤細胞の遊走障害によること<sup>12)</sup>が証明されている。今回は、妊娠マウスにレチノイン酸を投与して、胎仔に成立した眼形成異常の成立機序を、主に神経堤細胞との関連で発生学的に検討した。

## II 実験方法

実験動物は C57 BL/6 NJcl マウスを用い、未経産で発情期の雌と健康な雄を一晚同一飼育箱に入れ、翌朝、腔栓のみられた雌を妊娠 0 日とした。-15°C で保存しておいた全トランス型レチノイン酸(Sigma Chem Co, St Louis)100 mg をとうもろこし油 50 ml に使用時溶解し、妊娠 7 日に 12.5 mg/kg を腹腔内へ注射した(RA 群)。レチノイン酸は光に弱いため、溶解・投与後に残ったレチノイン酸は破棄した。対照は、等量のとうもろこし油のみを投与した(対照群)。各群の実験母獣数は 5 匹で、妊娠 18 日に母獣を屠殺して胎仔を取り出し実体顕微鏡で外形観察を行い、直ちに室温の Bouin 液で 2 日間固定した後、眼部を切り出してさらに 5 日間同液で固定した。上昇エタノール列で脱水、キシレンで透徹してパラフィンに包埋後、厚さ 4.0 μm の前額断の眼部連続切片を作製した。キシレンで脱パラフィン、下降エタノール列で水化した切片をヘマトキシリン液に室温で 5 分間浸漬後、水洗し、続いてエオジン液に室温で 5~10 分間浸漬し、上昇エタノール列で脱水、キシレンで透徹して、合成封入剤で封入した。ヘマトキシリン・エオジン染色を行った各切片は光学顕微鏡で観察した。統計学的検討は t 検定あるいは  $\chi^2$  検定を用いた。

## III 結果

### 1. 外形観察結果

外形観察結果を表 1 に示す。着床総数は RA 群で 41、1 母獣平均 8.2 で、対照群の 46、平均 9.2 と比較して有意差はなかった(t 検定)。着床総数に対する死亡胎仔の割合は、RA 群 46.3%、対照群 2.2%、生存胎仔数に対する異常胎仔の割合は、RA 群 95.5%、対照群 6.7% とい

表 1 外形観察結果

	RA 群	対照群
実験母獣数	5	5
着床総数(1 母獣平均)	41(8.2)	46(9.2)
死亡胎仔数(%*)	19(46.3)	1(2.2)
生存胎仔数(%*)	22(53.7)	45(97.8)
外表奇形胎仔数(%**)	21(95.5)	3(6.7)

\*：着床総数に対する割合、\*\*：生存胎仔数に対する割合  
RA 群：レチノイン酸投与群、対照群：とうもろこし油投与群

ずれの割合も RA 群の方が有意に高かった( $\chi^2$ 検定,  $p < 0.01$ )。両群で観察された主な外表奇形とその胎仔数および生存胎仔数に対する百分率を表 2 に示す。外形観察のみで無眼球と小眼球の鑑別は困難であるため、胎生 18 日の正常眼よりわずかに小さいものから眼部に隆起やぶどう膜色素が全くみられないものまでをすべて小眼球とした。RA 群では小眼球(図 1)の 95.5% をはじめ、口唇・口蓋裂、外脳症などの中枢神経系の異常、低位耳介、顔面形成異常、虹彩欠損(図 2)および小顎症が多発していた。対照群では小眼球、中枢神経系の異常および低位耳介が少数みられたのみで、いずれの外表奇形も RA 群で有意に高率であった( $\chi^2$ 検定,  $p < 0.01$ )。C57 BL/6 NJcl マウスはぶどう膜に色素があるため、外形観察で小眼球や虹彩欠損を比較的容易に判定することができた。

### 2. 組織学的観察結果

両群でみられた主な組織学的眼形成異常とその眼数および生存胎仔の眼数に対する百分率を表 3 に示す。RA 群では小眼球(図 3)をはじめ、無眼球(図 4)、胎生裂閉鎖不全(図 5 a, b)、硝子体形成異常(図 6 a)、無水晶体眼(図 7)、前房隅角形成異常(図 8)および水晶体胞分離不全(図 9)が高率にみられた。対照群では硝子体形成異常(図 6 b)、小眼球、胎生裂閉鎖不全、前房隅角形成異常、水晶体胞分離不全、無眼球および無水晶体眼が少数認められたのみで、いずれの眼形成異常も RA 群で有意に高率であった( $\chi^2$ 検定,  $p < 0.01$ )。また、合眼症(図 10)が RA 群の 2 胎仔に観察された。

## IV 考 按

本研究でマウスに投与したレチノイン酸は、1946 年 Arens ら<sup>13)</sup>により初めて生合成されたビタミン A(レチノール)の活性型誘導体である。1967 年 Kochhar<sup>14)</sup>はレチノイン酸をラットおよびマウスの母獣に経口投与して、胎仔に二分脊椎、無眼球、小眼球、口蓋裂、尾の異常など種々の先天異常が発生することを報告し、レチノイン酸に催奇形性があることを示した。その後、頭部神経堤細胞が全身へ広く遊走していく時期には、同細胞は中胚葉や神経外胚葉由来の他の細胞と比較して、より多くの細胞内レチノイン酸結合蛋白を含有するため、レチノイン

表 2 主な外表奇形

	単位：胎仔数	
	RA 群	対照群
小眼球	21(95.5)	3(6.7)
口唇・口蓋裂	8(36.4)	0
中枢神経系の異常	7(31.8)	1(2.2)
低位耳介	6(27.3)	1(2.2)
顔面形成異常	4(18.2)	0
虹彩欠損	4(18.2)	0
小顎症	4(18.2)	0

括弧内は各群の生存胎仔数に対する百分率

表3 主な組織学的眼形成異常

	単位：眼数	
	RA 群	対照群
小眼球	21(47.7)	3(3.3)
無眼球	17(38.6)	1(1.1)
胎生裂閉鎖不全	16(36.4)	3(3.3)
硝子体形成異常	15(34.1)	8(8.9)
無水晶体眼	10(22.7)	1(1.1)
前房隅角形成異常	8(18.2)	2(2.2)
水晶体胞分離不全	7(15.9)	2(2.2)

括弧内は各群の生存胎仔の眼球に対する百分率

酸の催奇形作用は主に頭部神経堤細胞の遊走障害によること<sup>12)</sup>が証明され、さらに近年、松尾<sup>14)</sup>はマウス胎芽の頭部におけるレチノイン酸受容体のメッセンジャーRNA (mRNA)の局在を検討し、眼杯の神経上皮、表皮外胚葉には同受容体は発現せず、眼杯周囲および眼杯内の水晶体胞を取り囲む神経堤細胞由来の間葉細胞のみに同受容体が発現していることを報告した。以上のことから、レチノイン酸は一次的には頭部神経堤細胞の遊走過程を障害する物質と考えて本研究で使用した。

Cook ら<sup>15)</sup>は妊娠7日のC57BL/6Jマウスにレチノイン酸を経口投与し、胎生14日の胎仔の62%に水晶体胞分離不全が観察されたことから、水晶体胞分離不全は神経堤細胞の遊走異常により成立すると提唱している。本研究の結果からは、水晶体胞分離不全のみでなく、RA群で高率に成立した外表奇形の口唇・口蓋裂、中枢神経系の異常、低位耳介、顔面形成異常および小顎症と眼形成異常の胎生裂閉鎖不全、硝子体形成異常、無水晶体眼および前房隅角形成異常の成立にも神経堤細胞の遊走異常が関与していると考えられる。すなわち、角膜内皮・実質、虹彩実質、隅角線維柱帯などの前眼部を形成する神経堤細胞の遊走過程が障害されると前房隅角形成異常が、さらにこの過程と同調して進行する表面外胚葉からの水晶体胞の分離も損なわれると、無水晶体眼や水晶体胞分離不全が成立し、また、神経堤細胞が胎生裂から眼内へと遊走する過程が障害されると、硝子体形成異常や胎生裂閉鎖不全が成立するものと考えられる。白井<sup>8)</sup>は妊娠マウスにochratoxin Aを投与する実験奇形学的研究から、硝子体形成異常、前房隅角形成異常および水晶体胞分離不全の成立に神経堤細胞の発生異常が関与していることを提唱し、当教室の池田ら<sup>16)</sup>もマウス胎生裂の正常閉鎖過程と閉鎖不全過程を組織学的・組織化学的に検討して、胎生裂閉鎖不全の成立には神経堤細胞由来の間葉細胞が関与していると考察している。本研究の結果は、これらの報告を支持するものであり、神経堤細胞の遊走を障害するレチノイン酸を催奇形因子として用いたため、硝子体形成異常、前房隅角形成異常、水晶体胞分離不全および胎生裂閉鎖不全が、神経堤細胞の発生異常の一つである遊走異常により成立することが解明されたことになる。

臨床的には Lammer ら<sup>17)</sup>が、重症瘡瘍治療薬のシス型レチノイン酸を妊娠初期に内服した妊婦の出生児に、中枢神経系の異常、耳介奇形、心奇形、胸腺欠損、顔面形成異常、小顎症および口蓋裂が多発したことを報告し、その原因としてレチノイン酸による神経堤細胞の障害を挙げて、これら種々の異常を併発する疾患をレチノイン酸胎芽症(retinoic acid embryopathy)と命名した。本研究では、心臓や胸腺の検討はしていないが、外形観察で中枢神経系の異常、耳介奇形、顔面形成異常、小顎症など同胎芽症と同様の異常が高率に観察されており、本研究のマウス胎仔にみられた形成異常は、同胎芽症の実験モデルと考えられる。

投与されたレチノイン酸は、その大部分が肝臓でグルクロン酸抱合を受けてレチノイル-β-グルクロニドとなり、体外へと排出される<sup>18)</sup>。本研究では、催奇形物質としてビタミンAではなく、その誘導体のレチノイン酸を用いたが、これはビタミンAに比較して、レチノイン酸は体内で短時間に代謝される<sup>18)</sup>ため、実験奇形学的研究により適しているとの考えからである。レチノイン酸の側鎖には二重結合(C=C)が四つあるため、その幾何異性体は2<sup>4</sup>=16個存在するが、そのうち全トランス型、9-シス型、13-シス型のレチノイン酸が主に研究されている<sup>19)</sup>。レチノイン酸の生理活性は幾何異性体によって差があり、全トランス型の生理活性を100とすると9-シス型、13-シス型ではそれぞれ10、24で、今回使用した全トランス型の生理活性が最大とされている<sup>19)</sup>。1953年Cohlan<sup>20)</sup>が多量のビタミンAを妊娠ラットに経口投与して、胎生20日および21日の胎仔に外脳症、二分脊椎、眼奇形などが成立することを初めて報告し、本邦でも1958年小谷<sup>21)</sup>が妊娠マウスにビタミンAを経口投与して、胎仔に小眼球をはじめ種々の眼形成異常が成立することを報告している。これらの報告以来、ビタミンAに催奇形性があることは広く知られていたにもかかわらず、近年、欧米では各種ビタミン剤が濫用され、特に妊婦のビタミンA過剰摂取が、出生児の頭部神経堤細胞の発生異常を増加させていると警告され<sup>22)23)</sup>、ビタミンAの催奇形性が再び注目を集めている。今回、母獣マウスに投与したレチノイン酸の12.5 mg/kgは、胎仔のLD<sub>50</sub>(median lethal dose)を目標としたもので、これはOakleyら<sup>23)</sup>が提唱したヒト妊婦の1日のビタミンA摂取上限量8,000 IUの400倍に相当する量であるが、本研究もレチノイン酸、さらにはビタミンAの催奇形性に再度、警鐘をならすものとする。

本論文の要旨は第100回日本眼科学会総会で発表した。

本研究は文部省科学研究費一般研究A 05404059 および奨励研究A 08771508の援助を受けて行った。

#### 文 献

- 1) Coulombre AJ, Coulombre JL: Abnormal organogenesis in the eye. In: Wilson JG, et al (Eds):

- Handbook of Teratology. Vol 2. Plenum, New York, 329—341, 1977.
- 2) **Johnston MC, Norden DM, Hazelton RD, Coulombre JL, Coulombre AJ**: Origins of avian ocular and periocular tissues. *Exp Eye Res* 29: 27—43, 1979.
  - 3) **Cook CS, Ozanics V, Jakobiec FA**: Prenatal development of the eye and its adnexa. In: Tasman W, et al (Eds): *Foundations of Clinical Ophthalmology*. Vol 1. Chap 2. Lippincott, Philadelphia, 1—93, 1991.
  - 4) **橋本 勝**: X線による眼形成異常に関する研究(I)—150R照射によるマウス胎仔および出生後の眼異常の成立について—。 *眼紀* 28: 587—594, 1977.
  - 5) **竹内 廣, 橋本 勝, 白井正一郎**: X線による眼形成異常に関する実験的研究II—200R照射によるマウス胎仔および出生後の眼異常の成立について—。 *日眼会誌* 81: 1180—1189, 1977.
  - 6) **Shirai S**: Eye abnormalities in mouse fetuses caused by simultaneous irradiation of X-rays and ultrasound. 2. Developmental abnormalities of the eye. *Cong Anom* 18: 269—279, 1978.
  - 7) **白井正一郎, 大鹿 智, 湯口修次, 馬嶋昭生**: ochratoxin Aによる眼形成異常に関する研究(I)。 *日眼会誌* 88: 627—634, 1984.
  - 8) **白井正一郎**: 眼先天異常と遺伝子。眼先天異常の成立機序。 *日眼会誌* 95: 1206—1237, 1991.
  - 9) **森 宏明, 佐野雅洋, 白井正一郎, 馬嶋昭生**: 妊娠マウスへのエタノール投与による胎仔の眼形成異常。 *眼紀* 42: 1458—1463, 1991.
  - 10) **Slack JMW**: We have a morphogen. *Nature* 327: 553—554, 1987.
  - 11) **Kochhar DM**: Teratogenic activity of retinoic acid. *Acta Path Microbiol Scand* 70: 398—404, 1967.
  - 12) **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.
  - 13) **Arens JF, van Dorp DA**: Synthesis of some compounds possessing vitamin A activity. *Nature* 157: 190—191, 1946.
  - 14) **松尾俊彦**: 眼と分子生物学。眼の形態形成に關与する遺伝子。 *日眼会誌* 97: 1406—1434, 1993.
  - 15) **Cook CS, Sulik KK**: Keratolenticular dysgenesis (Peters' anomaly) as a result of acute embryonic insult during gastrulation. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 25: 60—66, 1988.
  - 16) **池田晃三, 白井正一郎, 馬嶋昭生, 平林義章, 山田和順**: 正常胎生裂閉鎖および胎生裂閉鎖不全の組織学的・組織化学的研究。 *日眼会誌* 99: 427—434, 1995.
  - 17) **Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, et al**: Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med* 313: 837—841, 1985.
  - 18) **DeLuca HF, Zile M**: Aspects of teratology of vitamin A acid ( $\beta$ -all trans retinoic acid). *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 74: 13—20, 1975.
  - 19) **日本ビタミン学会**: ビタミンハンドブック1。脂溶性ビタミン。11—30, 化学同人, 京都, 1989.
  - 20) **Cohlan SQ**: Excessive intake of vitamin A as a cause of congenital anomalies in the rat. *Science* 117: 535—536, 1953.
  - 21) **小谷貞彦**: ビタミンA過剰投与による眼奇形の形態発生。 *大阪市医会誌* 7: 132—149, 1958.
  - 22) **Rothman KJ, Moore LL, Singer MR, Nguyen UDT, Mannino S, Milunsky A**: Teratogenicity of high vitamin A intake. *N Engl J Med* 333: 1369—1373, 1995.
  - 23) **Oakley GP, Erickson JD**: Vitamin A and birth defects. Continuing caution is needed. *N Engl J Med* 333: 1414—1415, 1995.