

Cts マウスにおよぼす Ochratoxin A の影響 (II)

—水晶体嚢形成異常の成立機序について—(図6, 表4)

二村 健一・白井正一郎・馬嶋 昭生 (名古屋市立大学医学部眼科学教室)

Effects of Ochratoxin A on Cts mice (II)

Causes of lens capsule deformities

Kenichi Futamura, Shoichiro Shirai and Akio Majima

Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School

要 約

前報では、妊娠7日の Cts マウスに ochratoxin A を投与して胎生16日の胎仔の観察を行い、水晶体嚢形成異常が特徴的に観察されたことを報告した。今回は胎生13, 14, 15日の胎仔の観察を行い、水晶体嚢形成異常の成因について検討を行った。連続切片で水晶体嚢の不連続性が認められた異常胎仔も、さらに水晶体線維細胞が硝子体中に遊走している異常胎仔も、ともに胎生15, 16日のみに観察された。また、水晶体嚢形成異常に伴った他の組織学的異常を検討すると、前者には特徴的な合併異常はなかったが、後者には視神経形成異常と硝子体形成異常が多く合併しており、水晶体嚢形成異常の原因として硝子体形成異常の関与が考えられた。(日眼 92: 462—467, 1988)

キーワード: Cts マウス, ochratoxin A, 水晶体嚢形成異常, 硝子体形成異常, 組織相互作用

Abstract

In previous studies, ochratoxin A, a potent teratogen for malformations in various organs including the eyeball of Jcl: ICR mice, was applied to Cts mice homozygote of which might develop congenital cataract with microphthalmia as an autosomal dominant trait. Characteristic deformities of the lens capsule were observed in addition to the same anomalies as those of Jcl: ICR mice treated with ochratoxin A. In the present study, pregnant homozygous Cts mice received an intraperitoneal injection of ochratoxin A (2mg/kg) on day 7.0 of pregnancy. The fetuses were removed by laparotomy on day 13, 14, 15 or 16 of gestation. Histopathological studies of the eye balls revealed deformities of the lens capsule at only days 15 and 16 of gestation. Deformities of the lens capsule were classified into two groups, based on the existence of intravitreal seeding of lens fiber cells. Those with intravitreal seeding were characteristically associated with malformations of the vitreous body, whereas there were no characteristic anomalies associated with lens capsule deformities without intravitreal seeding. It is suggested that lens capsule deformities were caused by abnormalities of the hyperplastic vitreous body. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 462—467, 1988)

Key words: Cts mouse, ochratoxin A, malformation of lens capsule, malformation of vitreous body, tissue interactions

別刷請求先: 467 名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄1 名古屋市立大学医学部眼科学教室 二村 健一
(昭和62年9月29日受付)

Reprint requests to: Kenichi Futamura, M.D. Dept. of Ophthalmol., Nagoya City Univ. Medical School
1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467, Japan

(Accepted September 29, 1987)

I 緒 言

Cts マウスは Jcl: ICR マウスの雌に自然発症した白内障マウスで、同種接合体（ホモ）で白内障と小眼球を発現することが知られており¹⁾²⁾、われわれの教室で異種接合体（ヘテロ）でも白内障とともに軽度の小眼球が発生することを証明した³⁾。

Ochratoxin A は mycotoxin の一種で、強い催奇形性を有している^{4)~7)}。眼については、Jcl: ICR マウスで催奇形実験を行い、組織学的に観察して、ochratoxin A が眼形成異常の成立過程を研究する上で有用な催奇形因子であり、ヒトにみられる種々の眼形成異常の実験モデルを成立させうることをこれまで報告してきた^{8)~10)}。

先回、著者らはホモの *Cts* マウスの妊娠母獸に ochratoxin A を投与して胎生16日に胎仔の観察を行い、Jcl: ICR マウスでの ochratoxin A 投与による異常とはほぼ同様の異常に加え、水晶体嚢形成異常が特徴的に認められたことを報告した¹¹⁾。今回は、この水晶体嚢形成異常の成因を検討するため、胎生13、14、15日にも胎仔の観察を行った。

II 実験方法

実験動物としてホモの *Cts* マウス(*Cts/Cts*)を用い、発情期の雌 1 匹を成熟した雄 1 匹と同一飼育箱に 1 晩入れ、翌朝腔栓を認めたものを妊娠 0 日（午前 8 時）とした。母獸の月齢と体重はマッチングさせてある。

Propylene glycol と蒸留水の等量混合液で溶解した ochratoxin A を用い、妊娠 7.0 日（7 日目の午前 8 時）に 2mg/kg を腹腔内に 1 回注射した。母獸を妊娠 13、14、15 日に屠殺し、直ちに開腹して胎仔を取り出し、双眼実体顕微鏡下で眼部および全身を外形的に観察した。生存胎仔は Bouin 液で固定し、パラプラストに包埋して厚さ 5μ の眼部連続切片標本を作製、ヘマトキシ

リン・エオジン重染色を行ない、光学顕微鏡で観察した。統計学的検討は t 検定、 χ^2 検定、必要に応じてその Yates 修正、あるいは Fisher の直接確率計算法で行った。

III 結 果

外表観察結果を表 1 に示す。各群間で平均着床数に有意差はなかった。死亡胎仔数は 13 日観察群において、16 日観察無処理対照群（以下、対照群と略す）に比して有意に多かったが ($\chi^2=6.416$, $p<0.02$)、他群間では有意差を認めなかった。異常胎仔数は 15 日観察群で対照群に比して有意に増加していた ($\chi^2=7.920$, Yates 修正, $p<0.01$)。13 日観察群では、取り出した胎仔がこわれやすいため、充分な外表観察を行っておらず、異常胎仔数は算出しなかった。

主な外表奇形を持つ胎仔数を表 2 に示す。口蓋裂、唇裂、腹壁ヘルニアなどは、今回の観察時期がちょうど口蓋、口唇、腹壁などの閉鎖の進行時期に一致するため、正常と異常との判別が困難なため異常には含まなかった。*Cts* マウスは遺伝的に小眼球を発生するので、ここでは、平均的なホモの *Cts* マウスよりも眼部の隆起が明らかに小さいものを小眼球とした。従って、全く眼球の存在が不明で無眼球と考えられるものも含まれている。

主な組織学的異常のみられた胎仔数および眼数を表 3 に示す。平均的なホモの *Cts* マウスの眼球よりも明らかに小さいものを小眼球とし、神経外胚葉由来の構成組織が連続切片で全く認められないものを無眼球とした。今回は水晶体嚢形成異常を 2 群に分け、連続切片で水晶体嚢の不連続性が確認されたものを水晶体嚢形成異常（+）（図 2）、さらに水晶体線維細胞が硝子体腔に遊走しているものを水晶体嚢形成異常（++）とした（図 3、4、5、6）。ただし、明らかに標本作製上の人工産物と考えられる水晶体嚢の破損は除外し

表 1 外表観察結果

観察日	Ochratoxin A 投与群				無処理対照群
	13日	14日	15日	16日	16日
実験母獸数	4	4	4	11	10
着床総数	26	33	29	92	80
死亡胎仔数 (%)	13 (50.0)	12 (36.4)	11 (37.9)	33 (35.9)	19 (23.8)
生存胎仔数 (%)	13 (50.0)	21 (63.6)	18 (62.1)	59 (64.1)	61 (76.2)
異常胎仔数 (%)*	—	5 (23.8)	7 (38.9)	9 (15.3)	5 (8.2)

* は生存胎仔数に対する割合 (%)

表2 主な外表奇形を持つ胎仔数

	Ochratoxin A 投与群			無処理対照群
	14日	15日	16日	16日
外脳症	0	0	1	0
耳頭症	1	1	1	0
小眼球	5	7	9	5

た。水晶体嚢形成異常は胎生13, 14日には認められず, 15, 16日のみに観察された。水晶体嚢形成異常(++)については, 16日観察群で対照群(図1)に比して有意に多く発生したが($p=0.0034$, Fisherの直接確率), 15日観察群では対照群と有意差はなく, また, 15日観察群と16日観察群との間にも有意差はなかった。一方,

表3 主な組織学的異常のみられた胎仔数

観 察 日	ochratoxin A 投与群				無処理対照群
	13日	14日	15日	16日	16日
無 眼 球	0 (0)	0 (0)	2 (3)	0 (0)	0 (0)
小 眼 球	1 (2)	6 (8)	5 (6)	9 (16)	5 (7)
胎生裂閉鎖不全	2 (3)	14 (18)	10 (13)	15 (21)	1 (1)
水晶体胞分離不全	0 (0)	6 (8)	8 (11)	15 (16)	5 (6)
無水晶体眼	1 (1)	5 (5)	5 (6)	5 (6)	1 (1)
水晶体嚢形成異常(+)	0 (0)	0 (0)	4 (4)	1 (1)	1 (1)
水晶体嚢形成異常(++)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	9 (10)	1 (1)
硝子体形成異常	0 (0)	6 (11)	4 (4)	10 (15)	0 (0)
視神経形成異常	1 (2)	4 (5)	4 (6)	5 (6)	1 (2)

() は眼数

水晶体嚢形成異常(+): 連続切片で水晶体嚢の不連続性が確認されたもの

水晶体嚢形成異常(++): 水晶体線維細胞が硝子体中に遊走しているもの

表4 水晶体嚢形成異常にもなった組織学的異常

眼 数	水晶体嚢形成異常(-) 304	水晶体嚢形成異常(+) 6	水晶体嚢形成異常(++) 12
水晶体胞分離不全	29	1	5
胎生裂閉鎖不全	41	2	10
硝子体形成異常	21	0	9
視神経形成異常	9	0	10

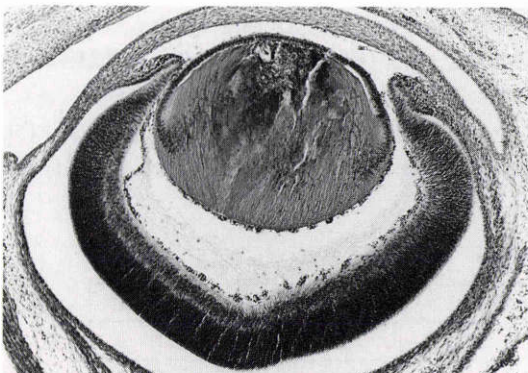


図1 胎生16日 無処理対照群(×50, ヘマトキシリン-エオジン染色, 以下H-E染色と略す). *Cts/Cts*としての水晶体の変化, すなわち, 前極部の水晶体線維細胞の膨化および核濃縮がみられるが, 水晶体嚢に異常は認めない。

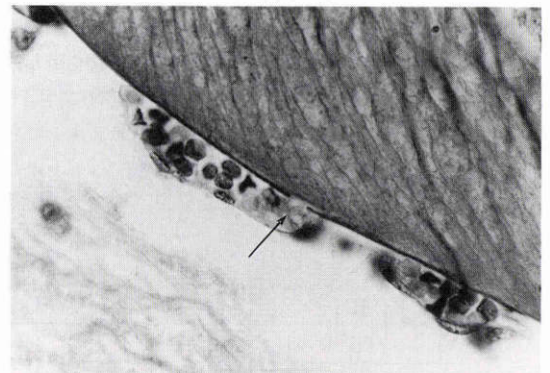


図2 胎生15日 Ochratoxin A 投与群(×500, H-E染色). 連続切片で水晶体嚢の不連続性が確認された例(水晶体嚢形成異常(+)). 矢印の部位に水晶体嚢形成異常がみられる。水晶体血管膜が後嚢に付着しているが, 硝子体形成異常は認めない。

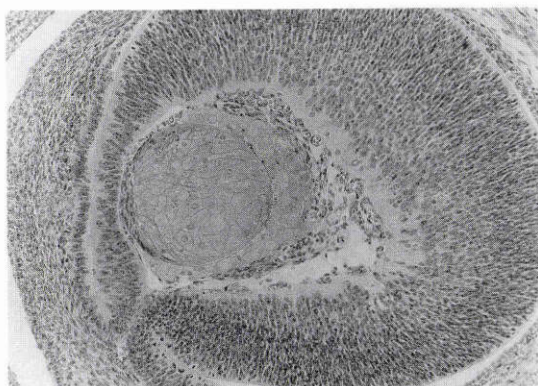


図3 胎生16日 Ochratoxin A 投与群($\times 100$, H-E 染色). 水晶体線維細胞が硝子体腔に遊走している例(水晶体嚢形成異常(+)). 硝子体腔に多数の水晶体線維細胞が遊走し, 硝子体形成異常もみられる. 水晶体嚢の不連続な部位は明らかではない.

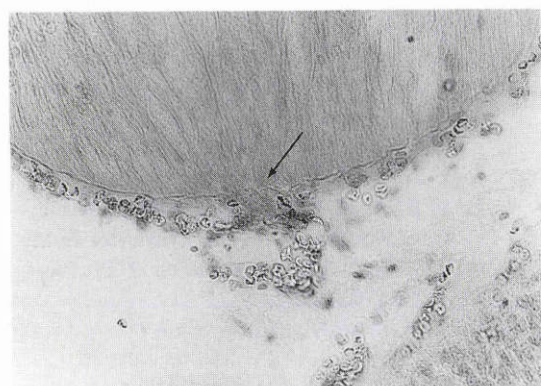


図4 胎生16日 Ochratoxin A 投与群($\times 200$, H-E 染色). 水晶体嚢形成異常(++)例. 水晶体嚢の不連続性が後極部にみられ(矢印), 少数の水晶体線維細胞が脱出している.

水晶体嚢形成異常全体についてみると, 対照群に比して15, 16日観察群共に有意に多く出現し ($p < 0.0023$, $p = 0.0064$, Fisher の直接確率), 15, 16日観察群間には有意差はなかった.

水晶体嚢形成異常にもなった組織学的異常を表4に示す. 水晶体胞分離不全は水晶体嚢形成異常(-)群, (+)群, (++)群にそれぞれ29例(9.5%), 1例(16.7%), 5例(41.7%)合併し, 胎生裂閉鎖不全は41例(13.5%), 2例(33.3%), 10例(83.3%)合併しており, 各群間の合併率に有意差はなかった. 一方, 硝子体形成異常, 視神経形成異常は水晶体嚢形成異常

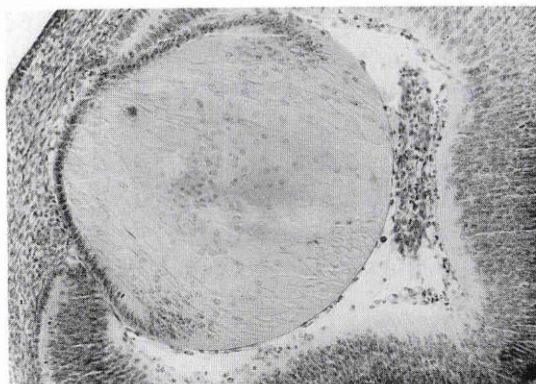


図5 胎生16日 Ochratoxin A 投与群($\times 100$, H-E 染色). 水晶体嚢形成異常(++)例. 硝子体形成異常を合併している.

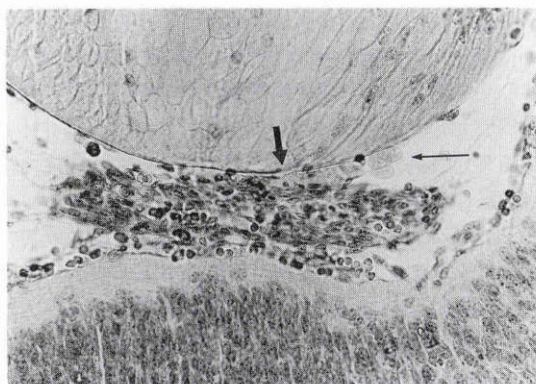


図6 図5の強拡大($\times 500$, H-E 染色). 水晶体嚢の不連続性が認められ(大矢印), 少数の水晶体線維細胞が硝子体腔に遊走している(小矢印), 過剰に増殖した間葉組織が後嚢の破損部位に接して存在する.

(+)群にはみられず, 水晶体嚢形成異常(++)群にそれぞれ9例(75.0%), 10例(83.3%)みられ, 水晶体嚢形成異常(-)群に比して, 有意に多かった ($p = 0.0036$, $p < 0.0001$, Fisher の直接確率).

IV 考 按

Ochratoxin A の投与を受けたホモの Cts マウスの胎仔にみられた水晶体嚢形成異常の成因については前報¹¹⁾で考察し, 1) 発生初期からの後嚢の一部の無形成, 2) 後嚢の本質的な脆弱性, 3) 間葉組織との癒着, 牽引による破損の3つの可能性をあげた. 前報¹¹⁾では胎生16日のみの観察を行ったので1)は検討できなかったが, 2), 3)について著者らの考えを述べた.

水晶体線維細胞の硝子体腔への遊走は水晶体嚢の不連続性が前提であり、水晶体嚢形成異常(+)は(++)の前段階と考えられる。表3に示すように、胎生13, 14日には水晶体嚢形成異常が認められなかったことから、胎生15日に水晶体嚢が破れ、それに引き続いて水晶体線維細胞の遊走が起こるものと推定された。すなわち、1)の、発生初期からの後嚢の一部の無形成は、今回の実験では否定的であった。前報¹¹⁾で考察したように、2), 3)の可能性が高い。そこで、水晶体嚢形成異常に合併した他の組織学的異常について検討する。表4に示すように、水晶体嚢形成異常(+)は他の組織学的異常に関連なく単独で発生しているが、水晶体嚢形成異常(++)には硝子体形成異常が有意に多く合併していた。従って、水晶体嚢形成異常(+)から(++)への発展には、硝子体形成異常が関与していることが推定される。逆に、水晶体線維細胞が硝子体中に遊走することにより反応性に硝子体間葉細胞が増生して、硝子体形成異常が発生した可能性も考えられるが¹²⁾、水晶体嚢形成異常出現以前の胎生13, 14日にも硝子体形成異常がみられることから、硝子体形成異常は水晶体嚢形成異常の原因であって、結果ではないと思われる。図5, 6に示すように、水晶体嚢形成異常例では、後嚢に過剰に増殖した間葉組織が接している所見が観察された。この過剰な間葉組織は、1) 圧迫による後嚢の機械的障害、2) 間葉組織自体の収縮、あるいは眼球の発育による間葉組織の相対的収縮による後嚢の牽引、3) 間葉組織による硝子体動脈、水晶体血管膜の圧迫に基づく水晶体の栄養障害、4) 眼杯内板に由来し水晶体に作用する elongation factor の作用阻害¹³⁾¹⁴⁾などの機序により、水晶体嚢形成異常の発症、進行に関与するものと考えられる。一方、視神経形成異常は ochratoxin A の直接作用、あるいは他の異常との組織相互作用(tissue interactions)によって生じたものと思われるが⁹⁾、視神経から水晶体までの距離が長いので、水晶体嚢形成異常に直接関与したとは考えにくい。

以上のことから、Cts マウスにみられた水晶体嚢形成異常は Cts gene による後嚢の本質的な脆弱性に加えて、ochratoxin A による硝子体形成異常が合併することにより、水晶体後嚢の不連続性が高度となったものと推定される。このように、遺伝因子に環境因子の作用が加わり、より強い形成異常を発生しうるのは非常に興味深いところである。先天異常の原因は遺伝因子によるもの10~30%、環境因子によるもの10%、

特定の要因不明のもの60~70%とされているが¹⁵⁾、原因不明のものも大部分は遺伝因子になんらかの環境因子が作用することによって生じると考えられており、今回の実験結果は、遺伝因子単独ではあまり発生しないより高度な形成異常を環境因子の作用によって発現させたことに重要な意味を持つものと考えられる。

本論文の要旨は第91回日本眼科学会総会で発表した。

文 献

- 1) 大鳥 寛, 吉田豊彦, 狗田忠義: マウスの小眼球症をともなう遺伝的白内障について. 実験動物 17: 91—96, 1968.
- 2) 岩田修造: 水晶体—その生化学的機構—, 東京, メディカル葵出版, 374—382, 1986.
- 3) Kobayashi H: Genetical and morphological studies on congenital cataract and microphthalmia (Cts) in mice. Cong Anom 20: 391—398, 1980.
- 4) Hayes AW, Hood RD, Lee HL: Teratogenic effects of ochratoxin A in mice. Teratology 9: 93—98, 1974.
- 5) Arora RG, Frolen H: Interference of mycotoxins with prenatal development of the mouse: I. Ochratoxin A induced teratogenic effects in relation to the dose and stage of gestation. Acta Vet Scand 22: 535—552, 1981.
- 6) Hood RD: Effects of mycotoxins on development, in Persaud TVN, (ed): Advances in the Study of Birth Defects. Lancaster, MTP Press, 191—210, 1979.
- 7) 林 和男, 亀山義郎: Ochratoxin A のマウスにおける催奇形性. 環研年報 32: 228—229, 1981.
- 8) 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 88: 627—634, 1984.
- 9) 大鹿 智, 白井正一郎, 湯口修次, 馬嶋昭生: Ochratoxin A による眼形成異常に関する研究(II): 視神経無形成について. 眼紀 35: 937—945, 1984.
- 10) 白井正一郎, 大鹿 智, 馬嶋昭生: Ochratoxin A による眼形成異常に関する研究(III): 前眼部形成異常について. 日眼 89: 753—760, 1985.
- 11) 二村健一, 白井正一郎, 馬嶋昭生: Cts マウスにおよぼす ochratoxin A の影響(I). 眼紀 38: 1060—1065, 1987.
- 12) 湯口修次, 馬嶋昭生, 白井正一郎, 湯口幹典: 優性小眼球マウス(Eye Lens Obsolescence, Elo)における水晶体・硝子体形成異常. 日眼 89: 1104—1110, 1985.
- 13) McAvoy JW: Cell division, cell elongation and distribution of α -, β -, γ -crystallins in the rat

- lens. J Embryol Exp Morphol 44: 149-165, 1978.
- 14) 白井正一郎: Ochratoxin A によるマウス胎仔の水晶体形成異常について, あたらしい眼科 2: 1731-1736, 1985.
- 15) 渡辺巖一: 先天異常の成因別にみた頻度, 村上氏廣, 鈴木雅洲, 馬場一雄 編: 出生前の医学, 第2版, 東京, 医学書院, 7-12, 1976.
(第91回日眼総会原著)
-