

論文の内容の要旨

氏名：久保田 桜

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名： β -aminopropionitrile 投与による鶏胚骨格異常の解析

胚組織の骨格要素は、発生の進行に応じて種々の形態変化を遂げる軟骨や骨であり、その主要な構成成分は細胞外のコラーゲン線維すなわちコラーゲン分子である。コラーゲン性の骨格原基は、将来の生体各部の骨性骨格のテンプレート(雛形)をなすが、その物性や性状にはコラーゲンの分子内および分子間の架橋密度が大きく関わっている。これらの架橋形成を担うのがアミノキシダーゼの一種であるリシルオキシダーゼ(LOX, EC1.4.3.13)であり、一方、この酵素の活性を選択的に阻害するのが β -aminopropionitrile (BAPN)である。BAPN は、スイートピー *Lathyrus odoratus* から抽出、同定された物質であるが、スイートピーの種子を摂取させた家畜では、骨の形態異常、解離性大動脈瘤、皮膚の弛緩など、ラチリズム lathyrism とよばれる諸症状が現れることが知られていた。BAPN は、こうしたラチリズムの原因物質であると判明しており、その投与によって、コラーゲン原線維内で分子間凝集が攪乱され、骨性ラチリズムが生じることが明らかになっている。本研究では、鶏胚を実験動物として用い、卵殻に開窓処置を施して卵内での発生日齢(ED)が3-9日目の鶏胚にBAPNを投与した。その後、発生を一定期間継続させ、ED5-10となった鶏胚を卵から取り出してアルデヒド固定を行い、薄切法を用いずに胚全体としての骨と軟骨の二重染色 whole mount double staining および骨・軟骨以外の組織については透明化処理を施すという手法を用いた。そして、BAPNの投与で骨格要素に生じる異常の特徴、異常形態の再現性、出現経緯についての精査を行った。さらに、注目すべき変形が高い再現性をもって観察された骨性骨格要素をアルカリ法によって胚組織から取り出し、その微細構造的な変化について、電界放射型の走査型電子顕微鏡による観察を行った。

まず、有精鶏卵へのBAPN投与量の妥当性を、鶏胚の生存率と骨格系異常の出現状況から検討した。その結果、卵内で発生中のED4の鶏胚に350 $\mu\text{g}/\text{egg}$ のBAPNを投与した場合、ED10での生存率は約50%であり、骨および軟骨で構成される骨格要素の変形異常は生存胚のすべてで観察されることが明らかになった。そこでこれを本研究の以降の実験で用いる投与量とした。次に、軟骨性骨格要素を青染、骨化した骨格要素を赤染させる二重染色による観察を行ったところ、胚内の複数箇所の骨格要素に変形が認められ、それらには部位特異性があることが判明した。すなわち、外篩骨 ectoethmoid、下顎、椎骨、椎肋骨 vertebral ribs あるいは後肢の骨格要素(脛足根骨 tibiotarsus および足根中足骨 tarsometatarsals)などで骨変形がみられ、前肢(翼)の骨格要素、骨盤、大腿骨などでは変形はみられなかった。これら広範かつ複数個所に生じた変形の中で、以後の解析においては、骨幹中央部が伸筋側に突出する特徴的な屈曲変形が高い再現性をもって現れた後肢の脛足根骨に焦点をあてることにした。

脛足根骨の屈曲変形は、ED4でのBAPN投与後、経日的にED10までその屈曲度が増大した。ED5-8に至るまでのどの日齢での投与によっても屈曲変形は惹起されたが、ED8での投与では、脛足根骨の近遠心にある骨幹端2箇所部位に屈曲が生じた。これは極めて特異な所見であり、ED7以前に投与したBAPNが惹起した屈曲変形とは形態的に明らかな差異がある。本研究の知見からは、ED8は骨幹中央部での屈曲変形が生じる条件が既に終了した時期だと考えられた。実際、ED9でBAPN投与をした鶏胚では、ED8でみられた骨幹端2箇所も含めて、脛足根骨の屈曲変形はもはや出現しなかった。

脛足根骨の屈曲変形部についての走査電顕的な観察では、屈曲変形の凹部(屈筋側)に線維層板骨 fibrolamellar bone の過形成が認められた。これは光顕的には綿毛状構造の集積部として観察された部位であり、電顕的にさらに精査したところ、同部には活発な骨基質形成を行う骨芽細胞の存在を示唆する多数の骨小窩が線維層板骨表面に観察された。線維層板骨は、BAPN非投与の屈曲変形のない脛足根骨にもみられたが、それらは骨幹周囲を均等に覆っていた。BAPN投与によって屈曲変形をきたし

た脛足根骨ではその分布に偏りがあり、とくに屈曲変形の凹部では過形成状態にあるという点が特徴的であった。一方、屈曲変形の凸部(伸筋側)の骨面は平滑で線維層板骨がみられず、骨小窩も乏しかった。また、BAPN 投与胚の脛足根骨の内面(骨髄腔側)には、破骨細胞性の明瞭な吸収窩(ハウシッ^o窩)が多数みられたが、非投与胚での屈曲をみない脛足根骨の内面では、破骨細胞性吸収窩に相当すると思われる吸収面は不明瞭で観察事例数もわずかであった。すなわち、BAPN を投与した鶏胚の脛足根骨の内面(髄腔面)では、非投与の対照群よりも明瞭なハウシッ^o窩が多く分布することを認めたわけであり、これは、屈曲変形が生じた骨では破骨細胞数やその活性が増大する可能性が示唆されたといえる。

以上の結果から、BAPN の投与胚による骨格要素の変形異常とくに脛足根骨でみられる屈曲変形は、高い形態的再現性をもって出現し、発生段階や部位的にも特異性がみられることが明らかになったといえる。また、骨変形の基盤である BAPN による骨格原基の強度減弱には、骨改造におけるバランスの異常も影響している可能性があるとし唆された。