

## マウスにおける離乳前産児の骨格標本作製法の検討

### Study of preparation procedure for skeletal specimens of preweaning pups in mice

坂 芳樹・木内 謙太郎

Yoshiki BAN, and Kentaro KIUCHI

医薬品や農薬などの開発において、新規化学物質による骨の発生毒性評価は妊娠末期の実験動物から摘出した胎児の骨格標本作製し、骨格異常の発現の有無を評価することが一般的である。マウス、ラットまたはウサギなど発生毒性評価に汎用されている動物では、これらの胎児の標本作製方法は標準化されているが、それ以降の出生後産児の骨格標本の作製方法については標準化されていない。本検討では離乳前の生後3日、7日および14日のマウス産児の骨格標本の作製方法について、軟部組織を融解する水酸化カリウム水溶液の濃度と浸漬期間の条件を中心に至適条件の検討を行った。生後3日および7日の産児標本では1%、1.5%または2%の水酸化カリウム水溶液に2日間浸漬する条件の各々3群を設定し、生後14日の産児標本では2%の水酸化カリウム水溶液に2日または3日間浸漬する条件、2.5%または3%の水酸化カリウム水溶液に2日間浸漬する条件の4群を設定した。完成した標本は柔軟性と染色性の観点からスコア化し評価した。その結果、柔軟性と染色性に高スコアが認められたのは生後3日標本、生後7日標本および生後14日標本では、各々1.5%水酸化カリウム水溶液に2日間浸漬した条件、2%水酸化カリウム水溶液に2日間浸漬した条件および3%水酸化カリウム水溶液に2日間浸漬した条件であった。以上の結果より、生後3日標本では1.5%水酸化カリウム水溶液に2日間浸漬する条件、生後7日標本では2%水酸化カリウム水溶液に2日間浸漬する条件、生後14日標本では3%水酸化カリウム水溶液に2日間浸漬する条件が至適であると考えられた。

#### 1. 緒言

種々の医薬品や農薬の開発において、新規化学物質の発生毒性評価は妊娠動物に化学物質を曝露させ、妊娠末期に摘出した胎児の外表、内臓および骨格異常の有無を観察する。骨格観察は骨格標本作製し、骨格の形態学的変化の有無を評価することが一般的であり、医薬品や農薬開発の試験法ガイドラインに明記されている<sup>1)2)</sup>。この形態学的変化は異常と変異に分類され、異常は生存、発育あるいは機能に悪影響を及ぼしうる永久的構造変化、変異は構造に関して通常範囲を逸脱した微細な変化であり、生存、発育あ

るいは機能に悪影響を及ぼさないものと定義されている。しかし、妊娠末期で認められた形態学的変化を異常と変異のどちらに分類するかは各研究者や各研究施設に委ねられ、その分類の標準化が課題である<sup>3)4)5)6)</sup>。妊娠末期に認められた形態学的変化として、存在すべき骨の欠損や隣り合う骨の癒合などは永久的な構造変化と断定できるが、変異として定義されている通常範囲を逸脱した微細な変化は、生後の産児成長の過程でどのように変化するか、修復するか、または、その後の産児の生存、発育あるいは機能に悪影響を及ぼすかを検討することは必要となり、そのためには出生後の産児の適切な骨格標本作製する必要がある。

本検討では、生後3日、7日または14日の離乳前産児の骨・軟骨二重染色方法について、軟部組織の融解する水酸化カリウム水溶液の至適濃度と浸漬期間を中心に検討した。

本検討に用いたマウス産児の骨・軟骨二重染色標本の作

連絡先：坂 芳樹 yban@cis.ac.jp

千葉科学大学 危機管理学部 動物危機管理学科

Department of Animal Risk Management, Faculty of Risk and  
Crisis Management, Chiba Institute of Science

(2023年9月21日受付, 2024年1月23日受理)

表 1. 水酸化カリウム水溶液の試験条件

試験群	生後 3 日産児標本	生後 7 日産児標本	生後 14 日産児標本	
濃度	浸漬期間 2 日間	浸漬期間 2 日間	浸漬期間 2 日間	浸漬期間 3 日間
1%	① (10)	① (10)	-	-
1.5%	② (10)	② (10)	-	-
2%	③ (10)	③ (10)	① (10)	② (10)
2.5%	-	-	③ (10)	-
3%	-	-	④ (10)	-

①②③は試験条件、( ) 内の数字は評価標本数を示す

製手順は、標準化されているラットの妊娠末期胎児の標本作製手順<sup>7)8)</sup>に従い、①産児の内臓の摘出と皮膚の剥離、②95%エタノール水溶液による固定（7日間浸漬）、③アリザリンレッドSとアルシアンブルーによる硬骨と軟骨の染色（0.1%アリザリンレッドSおよび0.1%アルシアンブルーの70%エタノール水溶液（3%酢酸を含む）に7日間浸漬）、④水酸化カリウム水溶液による軟部組織の融解、⑤50%グリセリン水溶液による周囲組織の共染色部分からの脱色と透徹（5日間浸漬）、⑥80%グリセリン水溶液へ保存する作製過程とした。軟部組織の融解に用いる水酸化カリウム水溶液の濃度と浸漬期間は標本サイズにより条件が異なり、水酸化カリウム水溶液の濃度が高いまたは浸漬期間が長いと軟部組織の融解が進み標本が破損する可能性がある。一方、水酸化カリウム水溶液の濃度が低いまたは浸漬期間が短いと軟部組織の融解が不十分となり標本の柔軟性や骨の染色性が悪くなり、適切な評価ができなくなる可能性がある。本検討で標本作製手順を参考とした妊娠末期のラット胎児体重は一般的に約5～6gであり、本検討に用いた生後3日、7日および14日のマウス産児の体重は一般的に各々約2.5～3.5g、約5.5～6.5gおよび約10～11gである。特に生後14日産児は標本サイズが大きいため水酸化カリウム水溶液の濃度を高くまたは浸漬期間を長く設定し検討した。その他の標本作製手順（①、②、③、⑤、⑥）はラットの妊娠末期胎児の骨格標本作製<sup>7)8)</sup>に準じても影響がないことを事前に実施した予備検討で判断し、標準化された作製方法に準じて行った。

## 2. 材料と方法

### 2.1 動物

日本 SLC 株式会社より 8 週齢で購入した ICR 系雌 12 匹を 1 週間の馴化期間を設けた後に 9 週齢で試験を供した。マウスは温度（22±3℃）、湿度（55±10%）および照明時間（12 時間：午前 8 時点灯、午後 8 時消灯）が制御されている動物室に収容し、実験動物用飼料（ラボ MR スタンダー

ド：日本農工業株式会社）と飲料水（水道水）を自由摂取させた。

本試験は、千葉科学大学動物実験委員会の承認（承認番号 22-04）を得て、本学動物実験規定に従い実施した。

### 2.2 試験系

雌マウスは 9 週齢時に同系統の成熟雄マウスと夕方に同居させた（雌 1：雄 1）。翌朝、膣栓の有無で交尾の確認を行い、膣栓が認められた日を妊娠 0 日とした。その後母動物は自然分娩させ（産児は出生日を生後 0 日と起算）、生後 3、7 および 14 日標本群の 3 群に群分けをした（4 匹/群）。生後 3 日、7 日または 14 日の産児にチオペンタールナトリウム（ニプロ ES ファーマ株式会社）の過麻酔量（0.3～0.5 ml/産児）を腹腔内に投与し、安楽死させた。各生後 3、7 および 14 日産児標本は各試験条件に 10 標本ずつ無作為に割り付けた。

### 2.3 骨格標本の作製

水酸化カリウム水溶液の濃度と浸漬期間を表 1 に示した。生後 3 日および 7 日産児標本は、1%、1.5%または 2%の水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬する 3 試験群を設けた。生後 14 日産児標本は 2%水酸化カリウム水溶液濃度に 2 日間または 3 日間浸漬する群、2.5%または 3%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬する計 4 試験群を設けた。水酸化カリウム水溶液による軟部組織融解は液温に影響されることから、骨格標本作製時の室温は常時 25℃に設定した。

### 2.4 骨格標本の観察

各試験条件で作製した骨・軟骨二重染色標本は柔軟性と染色性の観点から評価を行い、スコア化した。これらのスコア基準は事前に実施した予備検討結果を用いて決定した。各標本に対して 4 人の観察者によって評価した。観察者は事前に他の標本を用いて柔軟性と染色性の基準を統一した。

#### 2.4.1 柔軟性の基準

下記の基準で評価を行った。

スコア 0：標本に破損があった場合、または柔軟性が悪く、観察に支障をきたした場合

スコア 1：柔軟すぎるまたは柔軟性が悪いが、観察に支障をきたさなかった場合

スコア 2：標本の細部にわたり適度な柔軟性を有した場合

#### 2.4.2 染色性の基準

下記の基準で評価を行った。

スコア 0：標本の 90%以上の骨に染色性が悪いまたは染色ムラがあるため、観察に支障をきたした場合

スコア 1：標本の 10%以下の骨に染色性が悪いまたは染色ムラがあるが、観察に支障をきたさなかった場合

スコア 2：標本のすべての骨が適切に染色されていた場合

### 2.5 統計

4 人の観察者によるスコアの平均値をその標本の評価スコアとした。各生後群の試験条件の柔軟性と染色性の評価を平均値±標準偏差で表し、一元配置共分散分析を用いて各試験条件間で比較を行った。有意水準は 5%および 1%とした。

## 3. 結果

### 3.1 生後 3 日産児標本（表 2）

#### 3.1.1 柔軟性

1%水酸化カリウム水溶液に 2 日間、1.5%水酸化カリウム水溶液に 2 日間および 2%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬した試験条件における平均スコアは各々 1.7、1.7

および 1.8 であった。各試験条件間での平均値に統計学的有意差はなかった。2%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬した試験条件において、9/10 例に評価スコア 2 が認められたが、残り 1 例のスコアは 0 であり、この標本は標本全体の破損により観察が不可能であった。

#### 3.1.2 染色性

1%水酸化カリウム水溶液に 2 日間、1.5%水酸化カリウム水溶液に 2 日間および 2%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬した試験条件における平均スコアは各々 1.6、1.8 および 1.6 であった。各試験条件間での平均値に統計学的有意な差はなかった。評価スコアが 2 を示した標本は 1%水酸化カリウム水溶液に 2 日間の浸漬した試験条件では 4/10 例、1.5%水酸化カリウム水溶液に 2 日間の浸漬した試験条件では 6/10 例および 2%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬した条件では 2/10 例であった。

### 3.2 生後 7 日産児標本（表 3）

#### 3.2.1 柔軟性

1%水酸化カリウム水溶液に 2 日間、1.5%水酸化カリウム水溶液に 2 日間および 2%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬した試験条件における平均スコアは各々 1.4、1.4 および 1.8 であった。2%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬した試験条件の平均スコア（1.8）は 1%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬した平均スコア（1.4）に対して有意な（ $p<0.05$ ）高値を示した。

#### 3.2.2 染色性

1%水酸化カリウム水溶液に 2 日間、1.5%水酸化カリウム水溶液に 2 日間および 2%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬した試験条件における平均スコアは各々 1.3、1.6

表 2. 生後 3 日産児標本の評価スコア

試験条件 <sup>a</sup>	標本数	柔軟性	染色性
① 1%, 2 日間	10	1.7±0.2	1.6±0.3
② 1.5%, 2 日間	10	1.7±0.5	1.8±0.2
③ 2%, 2 日間	10	1.8±0.6	1.6±0.3

<sup>a</sup> 水酸化カリウム水溶液の濃度と浸漬期間

表 3. 生後 7 日産児標本の評価スコア

試験条件 <sup>a</sup>	標本数	柔軟性	染色性
① 1%, 2 日間	10	1.4±0.1	1.3±0.1
② 1.5%, 2 日間	10	1.4±0.6	1.6±0.4*
③ 2%, 2 日間	10	1.8±0.4*	1.9±0.2**

<sup>a</sup> 水酸化カリウム水溶液の濃度と浸漬期間、\* $p<0.05$ 、\*\* $p<0.01$ （試験条件①との差）

表 4. 生後 14 日産児標本の評価スコア

試験条件 <sup>a</sup>	標本数	柔軟性	染色性
① 2%, 2 日間	10	1.2±0.5	1.5±0.3
② 2%, 3 日間	10	1.6±0.4	1.3±0.2
③ 2.5%, 2 日間	10	1.4±0.2	1.5±0.7
④ 3%, 2 日間	10	1.7±0.3 <sup>b</sup>	1.7±0.4 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>水酸化カリウム水溶液の濃度と浸漬期間、<sup>b</sup>p<0.05、<sup>c</sup>試験条件①との差、<sup>d</sup>試験条件②との差

および 1.9 であった。1.5%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬した試験条件の平均スコア (1.6) および 2%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬した平均スコア (1.9) は 1%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬した平均スコア (1.3) に対して有意な高値を示した (各々p<0.05 および p<0.01)。

### 3.3 生後 14 日産児標本 (表 4)

#### 3.3.1 柔軟性

2%水酸化カリウム水溶液に 2 日間または 3 日間、2.5%水酸化カリウム水溶液に 2 日間または 3%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬した試験条件における平均スコアは各々 1.2、1.6、1.4 および 1.7 であった。3%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬した試験条件での平均スコア (1.7) は 2%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬した平均スコア (1.2) に対して有意な (p<0.05) 高値を示した。評価スコア 2 を示した標本は 3%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬した試験条件で 5/10 例認められた。

#### 3.3.2 染色性

2%水酸化カリウム水溶液に 2 日間または 3 日間、2.5%水酸化カリウム水溶液に 2 日間または 3%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬した試験条件における平均スコアは各々 1.5、1.3、1.5 および 1.7 であった。3%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬した試験条件での平均スコア (1.7) は 2%水酸化カリウム水溶液に 3 日間浸漬した平均スコア (1.3) に対して有意な (p<0.05) 高値を示した。評価スコア 2 を示した標本は 3%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬した試験条件で 4/10 例認められた。

## 4. 考察と結論

生後 3 日、7 日または 14 日の産児の骨・軟骨二重染色標本の作製方法について、軟部組織を融解する水酸化カリウム水溶液の濃度と浸漬期間の至適条件を柔軟性と染色性の観点から検討した。

生後 3 日産児の標本 (表 2) において、柔軟性は 1%、1.5% または 2%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬した試験条件間で統計学的な有意差はなかった。しかし、2%水酸化カ

リウム水溶液に 2 日間浸漬した条件において、1/10 例ではあるが軟部組織の過度な融解が原因と考えられる標本の破損が認められた。この事例より、この条件は標本破損のリスクがあると考えられた。他の 2 試験条件での柔軟性は破損標本もなく、同等な条件と考えられた。染色性に関しては、1%、1.5%または 2%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬した試験条件の平均スコアは各々 1.6、1.8 または 1.6 を示し、試験群間に統計学的有意差は認められなかった。個々の標本の完成度として、1.5%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬した試験条件で 6/10 例に評価スコア 2 が認められたことから、この条件が染色性としては至適と考えられた。以上の結果より、生後 3 日産児標本では、1.5%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬した条件が至適と考えられた。

生後 7 日産児の標本 (表 3) において、2%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬した試験条件での柔軟性と染色性の平均スコアは共に他の 2 試験条件群より軽度ではあるが統計学的に有意な高値を示した。以上の結果より、2%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬した条件が至適と考えられた。

生後 14 日産児の標本 (表 4) において、3%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬した試験条件での柔軟性と染色性の平均スコアは共に他の 3 試験条件群より軽度または統計学的に有意な高値を示した。この試験条件では、柔軟性と染色性の評価スコア 2 と示した標本が各々 5/10 および 4/10 例に認められた。以上の結果より、3%水酸化カリウム水溶液に 2 日間浸漬した条件が至適と考えられた。

水酸化カリウム水溶液による軟部組織融解以外の作製過程である 95%エタノール水溶液による標本の固定、アリザリンレッド S とアルシアンブルーによる硬骨と軟骨の染色、50%グリセリン水溶液による周囲組織の共染色部分からの脱色と透徹、および 80%グリセリン水溶液による保存は、標準化されているラットの妊娠末期胎児の骨格標本作製手順<sup>7)8)9)</sup>と同じ条件で検討を行ったが、これらの過程が標本作製に影響を及ぼしたと考えられる結果は得られなかった。

種々の医薬品や農薬の胎生期曝露による実験動物を用いた妊娠末期の発生毒性評価において、骨格の形態学的変化は異常と変異に分類されるが、通常範囲を逸脱した微細な変化で産児の生存、発育や機能に影響を及ぼさない変異に分類する基準の標準化が課題である<sup>3)4)5)6)</sup>。妊娠末期に認

められた微細な骨格の形態学的変化がその後の産児成長に伴う骨形成過程にどのように影響するかを経時的に精査することが重要であり、それらのデータを収集することが異常と変異の分類の標準化につながる。その際、産児の骨格観察に本検討で実施した産児の骨格標本作製法が役立つと考えられる。

結論として、生後3日標本では1.5%水酸化カリウム水溶液に2日間浸漬した条件、生後7日標本では2%水酸化カリウム水溶液に2日間浸漬した条件、生後14日標本では3%水酸化カリウム水溶液に2日間浸漬した条件が至適であると考えられた。

## 参考文献

- 1) ICH, Steering Committee: Harmonized Tripartite Guideline on Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products, 1993.
- 2) OECD: OECD Guideline for Testing of Chemicals, 414, Prenatal Developmental Toxicity Study, 2001.
- 3) 谷村孝：先天異常 congenital anomalies と先天奇形 congenital malformations, 毒性試験講座 11 発生毒性, 地人書館, 東京, 5, 1992.
- 4) 有行史男：骨格, 毒性試験講座 11 発生毒性, 地人書館, 東京, 203-220, 1992.
- 5) 佐藤旭, 勝亦芳裕, 千原和弘：ワークショップ「生殖発生毒性試験の国際標準化」：骨格の構造変化に関する異常と変異の分類, 第 56 回日本先天異常学会学術集会, 2016.
- 6) 藤原道夫, 山崎華子, 千原和弘他：ワークショップ「生殖発生毒性試験の国際標準化」：実験動物の胎児骨格検査所見評価の標準化, 第 57 回日本先天異常学会学術集会, 2017.
- 7) Whitaker J, Dix KM: Double staining technique for rat foetus skeletons in teratological studies. Lab. Anim., 13, 309, 1977.
- 8) Boardman JP, Mitala JJ, Carrano RA, Iulicci JD: Cartilage-staining technique for the examination of unskinned fetal rat specimens previously processed with alizarin red S. Teratology, 30 (3), 383, 1984.
- 9) Kawamura S, Hirohashi A, Kato T, Yasuda M: Bone-staining technique for fetal rat specimens without skinning and removing adipose tissue. Cong. Anom., 30, 93, 1990.