

ラットにおける妊娠後期の胎児骨格標本作製法の検討

Study of preparation procedure for fetal skeletal specimens at late gestational stage in rats

坂 芳樹・小林 茜・森山 優里奈・田内 洸安・堀本 政夫

Yoshiki BAN, Akane KOBAYASHI, Yurina MORIYAMA, Hiroyasu TAUCHI
and Masao HORIMOTO

医薬品の開発候補品や農薬など新規化学物質による骨の発生毒性評価は、分娩直前(妊娠20日または21日)のラットから摘出した胎児の骨・軟骨二重染色標本作製し、骨格異常発現の有無と骨化進行度を評価することが一般的である。これらの標本作製方法は標準化されているが、それ以前の胎齢の骨格標本の作製法については標準化されていない。本研究では、妊娠後期(妊娠17日、18日または19日)のラットから摘出した胎児の骨・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条件を中心に、他の手順は標準化された方法に準じて検討した。各妊娠日の胎児標本を0.5%、0.75%または1%水酸化カリウム水溶液に1日間または2日間浸漬する試験条件を設定し、完成した標本の柔軟性と染色性をスコア化した。その結果、妊娠17日の胎児標本では0.5%水酸化カリウム水溶液に2日間、または0.75%水酸化カリウム水溶液に1日間浸漬した条件で標本の柔軟性と染色性に高スコアが認められた。妊娠18日および19日の胎児標本では、0.5%水酸化カリウム水溶液に2日間、0.75%または1%水酸化カリウム水溶液に1日間浸漬した条件で標本の柔軟性と染色性に高スコアが認められた。以上の結果より、妊娠17日から19日の骨・軟骨二重染色標本作製は、標準化されている分娩直前の手順の中で、各妊娠日で共通して至適と考えられた0.5%水酸化カリウム水溶液に2日間浸漬する条件に置き換えることで標準化することが望ましいと考えられた。

1. 緒言

種々の医薬品の開発候補品や農薬など、新規化学物質における骨の発生毒性評価は、妊娠ラットを介して胎児に化学物質を暴露させ、分娩直前(妊娠20日または21日)に摘出した胎児の骨格標本作製し、骨格異常の有無と骨化進行度を評価することが一般的である¹⁾。化学物質による骨の発生への影響が検出された場合、分娩直前に認められた骨の形態や骨化進行度の異常のみならず、妊娠後期における骨の形態や骨化進行度を詳細に観察す

ることが発生毒性の作用機序の解明に役立つと考えられる。さらに、胎生期の骨の発生や骨化の基礎研究、骨の異常と変異の分類評価^{2) 3)}における基礎データになる可能性がある。分娩直前に摘出した胎児の骨・軟骨二重染色標本(アリザリンレッドSによる硬骨の染色とアルシアンブルーによる軟骨の染色)の作製方法は標準化されている^{4) 5) 6) 7)}が、それ以前の胎生期の作製方法については標準化されていない。本研究では妊娠17日、18日または19日の母動物から摘出した胎児の骨・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中心に検討した。

分娩直前の胎児の骨・軟骨二重染色標本作製手順^{4) 5) 6) 7)}は、①摘出した胎児の内臓の除去と表皮の剥離、②95%エタノール水溶液による固定(7日間浸漬)、③アリザ

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

(2019年9月30日受付, 2019年12月23日受理)

表1. 水酸化カリウム水溶液の試験条件

濃度	妊娠 17 日胎児標本		妊娠 18 日胎児標本		妊娠 19 日胎児標本	
	浸漬期間		浸漬期間		浸漬期間	
	1 日間	2 日間	1 日間	2 日間	1 日間	2 日間
0.5%	① (10)	② (9)	-	① (10)	-	① (10)
0.75%	③ (9)	-	② (10)	-	② (8)	-
1%	-	-	③ (10)	-	③ (10)	-

①②③は試験条件を示す
()内の数字は評価標本数を示す

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95%エタノール水溶液(酢酸含む)に3日間浸漬)、④1%水酸化カリウム水溶液(2日間浸漬)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部分からの脱色と透徹(5日間浸漬)、⑥80%グリセリン水溶液による保存に分けられる。

ラット、マウス、ハムスターまたはウサギの分娩直前の骨・軟骨二重染色標本作製において、①胎児の内臓の除去と表皮の剥離、②エタノール水溶液による固定、③アリザリンレッドSとアルシアンブルー溶液による硬骨と軟骨の染色、⑤グリセリン水溶液による周囲組織の共染部分からの脱色と透徹と⑥グリセリン水溶液による保存は大きさや軟部組織の脆弱性が異なる分娩直前の各動物種の標本においても同じ濃度の各種溶液が用いられているが、水酸化カリウム水溶液はその濃度と浸漬時間は標本の大きさや脆弱性により至適な条件が異なる¹⁾。ラットの妊娠後期の胎児標本は分娩直前の標本に比べて軟部組織がより脆弱であるため、軟部組織の融解過程における至適な水酸化カリウム水溶液の濃度と浸漬期間を設定する必要がある。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標本が破損する可能性がある。また、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標本の柔軟性が悪くなる、またはアリザリンレッドSとアルシアンブルーによる硬骨と軟骨の染色性が悪くなる等、標本の細部にわたる骨格が観察できない可能性がある。

本研究では妊娠17日、18日および19日の骨・軟骨二重染色標本作製について、至適な水酸化カリウム水溶液の濃度と浸漬時間を種々の条件を設定して検討した。その他の標本作製手順(①、②、③、⑤、⑥)は、脆弱な軟部組織を持つ標本でも分娩直前の胎児標本作製方法に準じて影響がないと判断し、その作製方法に準じて行った。

2. 材料と方法

2.1 動物

日本エスエルシー株式会社より9週齢で購入したSprague-Dawley系雌ラット9匹を1週間の馴化期間を設けた後に10週齢で試験に供した。ラットは温度(22±2°C)、湿度(55±10%)および照明時間(12時間:7:00点灯、19:00消灯)が制御されている飼育室に収容し、実験動物用飼料(Laboratory Animal Diet, PMI Nutrition International)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を得て、本学動物実験規定に従い実施した。

2.2 試験系

雌ラット(10週齢)を同系統の成熟雄ラットと夕方に同居(雄1:雌1)させ、翌朝、膣垢を採取し、精子を確認した。精子が認められた日を妊娠0日とした。妊娠17日、18日または19日の雌動物各3匹に三種混合麻酔薬(ドミトール、ミタゾラムおよびベトルフェールの混合)⁸⁾を腹腔内に投与し、麻酔下で腹大動脈から全血を採血し、安楽死させた。母動物の胸腔臓器の異常の有無を肉眼的に観察した後、子宮を子宮内容物ごと摘出した。子宮壁を切開し、胎児または吸収胚を摘出し、吸収胚数、生存胎児数を記録した。生存胎児にペントバルビタールの過麻酔量(0.2~0.3mL/胎児)を腹腔内に投与し、安楽死させ、骨・軟骨二重染色標本の作製に供した。

2.3 骨格標本の作製

妊娠17日、18日および19日胎児標本の水酸化カリウム水溶液の条件を表1に示した。妊娠17日胎児標本では、0.5%または0.75%水酸化カリウム水溶液に1日間または2日間浸漬した。妊娠18日および妊娠19日胎児標本では、0.5%、0.75%または1%水酸化カリウム水溶液に1日間または2日間浸漬した。

各妊娠日に摘出した胎児は無作為に各々3つの試験条

件に8～10匹割り当て、骨格標本作製した。著者の経験より、水酸化カリウムによる軟部組織融解は液温に影響されることから、骨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観察を行い、その完成度をそれぞれスコア化した。各標本に対し3人の観察者が評価を行った。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一致させた。標本の柔軟性と染色性評価は試験条件のバイアスをなくすため、各標本にBlind番号を割り付け盲検下で観察を実施した。

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：観察は可能であったが、柔軟すぎるまたは柔軟性が悪い場合

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：染色性が悪いまたは染色ムラがあり、観察

に支障をきたした場合

スコア1：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

3観察者のスコアの平均値をその標本の評価スコアとした。各妊娠日の試験条件の柔軟性または染色性評価を平均値 ± 標準偏差 (SD) で表し、Tukey-Kramer検定を用いて試験条件間で比較を行った。有意水準は1%とした。

3. 結果

3. 1 妊娠17日胎児標本 (表2)

3. 1. 1 柔軟性

評価スコアが0の標本はなかった。0.5%水酸化カリウム水溶液に1日間または2日間、または0.75%水酸化カリウム水溶液に1日間浸漬した試験条件間で評価スコアの平均値 (各々2.0, 1.9および2.0) に統計学的有意差はなかった。

0.5%水酸化カリウム水溶液に2日間浸漬した9例中1標本で評価スコアが1.3 (胎児体重: 0.70 g、妊娠17日の胎児体重平均値: 0.68 g) を示した。柔軟性に低下はあったが、観察可能な標本であった。

表2. 妊娠17日胎児標本の評価スコア

試験条件 ^a	標本数	柔軟性	染色性
① 0.5%, 1日間	10	2.0 ± 0.0 ^b	1.4 ± 0.4**
② 0.5%, 2日間	9	1.9 ± 0.2	1.8 ± 0.4
③ 0.75%, 1日間	9	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0

^a水酸化カリウム水溶液の濃度と浸漬期間、^b平均値 ± 標準偏差、**p<0.01 (試験条件③との差)

表3. 妊娠18日胎児標本の評価スコア

試験条件 ^a	標本数	柔軟性	染色性
① 0.5%, 2日間	10	2.0 ± 0.0 ^b	2.0 ± 0.0
② 0.75%, 1日間	10	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0
③ 1%, 1日間	10	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0

^a水酸化カリウム水溶液の濃度と浸漬期間、^b平均値 ± 標準偏差

表4. 妊娠19日胎児標本の評価スコア

試験条件 ^a	標本数	柔軟性	染色性
① 0.5%, 2日間	10	1.8 ± 0.4 ^b	2.0 ± 0.0
② 0.75%, 1日間	8	1.9 ± 0.4	2.0 ± 0.0
③ 1%, 1日間	10	1.9 ± 0.3	2.0 ± 0.0

^a水酸化カリウム水溶液の濃度と浸漬期間、平均値 ± 標準偏差

3. 1. 2 染色性

評価スコアが0の標本はなかった。0.5%水酸化カリウム水溶液に2日間または0.75%水酸化カリウム水溶液に1日間浸漬した試験条件での染色性は良好であった(スコアの平均値は各々1.8と2.0)。

0.5%水酸化カリウム水溶液に1日間浸漬した条件では、10例中8標本で染色性の低下が認められ(評価スコア: 1.0~1.7、胎児体重平均値: 0.67 g)、この試験条件のスコアの平均値(1.4)は、0.75%水酸化カリウム水溶液に1日間浸漬した条件の平均値(2.0)と比べて有意な(p < 0.01) 低値を示した。

3. 2 妊娠18日胎児標本(表3)

3. 2. 1 柔軟性

0.5%水酸化カリウム水溶液に2日間、0.75%または1%水酸化カリウム水溶液に1日間浸漬した試験条件において、すべての評価スコアの平均値が2.0であり、試験条件間で統計学的有意差はなかった。

3. 2. 2 染色性

0.5%水酸化カリウム水溶液に2日間、0.75%または1%水酸化カリウム水溶液に1日間浸漬した試験条件において、すべての評価スコアの平均値が2.0であり、試験条件間で統計学的有意差はなかった。

3. 3 妊娠19日胎児標本(表4)

3. 3. 1 柔軟性

評価スコアが0の標本はなかった。0.5%水酸化カリウム水溶液に2日間、0.75%または1%水酸化カリウム水溶液に1日間浸漬した試験条件間で評価スコアの平均値(各々1.8, 1.9および1.9)に統計学的有意差はなかった。

0.5%水酸化カリウム水溶液に1日間浸漬した2標本(胎児体重: 1.83 gおよび2.09 g)および0.75%または1%水溶液に1日間浸漬した各1標本(胎児体重: 各々2.32 gおよび1.63 g)は評価スコア1.0を示したが、観察が許容できる柔軟性であった。妊娠19日の胎児体重平均値は2.13 gであった。

3. 3. 2 染色性

0.5%水酸化カリウム水溶液に2日間、0.75%または1%水酸化カリウム水溶液に1日間浸漬した試験条件において、すべての評価スコアの平均値が2.0であり、試験条件間で統計学的有意差はなかった。

4. 考察と結論

妊娠17日、18日または19日の母動物から摘出した胎児の骨・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中心に検討した。

妊娠17日胎児標本において、柔軟性は各試験条件間で統計学的有意差は認められなかった(表2)。0.5%水酸化カリウム水溶液に2日間浸漬した9例中1標本で評価スコアが1.3を示した。柔軟性に低下はあったが、観察可能な標本であった。同濃度の水酸化カリウム水溶液に1日間浸漬した全標本のスコアが2.0であったことより、偶然性の可能性が考えられた。また、この胎児標本の大きさ(胎児体重: 0.70 g)は妊娠17日の他の試験条件を含めた胎児体重の平均値(0.68 g)と比較して差異はなく、胎児の大きさに起因したものではなかった。妊娠17日胎児標本の染色性(表2)では、0.5%水酸化カリウム水溶液に1日間浸漬した条件において10例中8標本で部分的に染色性が悪いまたは染色ムラがある結果を得た(評価スコア: 1.0~1.7)。0.5%水酸化カリウム水溶液に2日間浸漬した条件または0.75%水酸化カリウム水溶液に1日間浸漬した条件での平均評価スコアは各々1.8と2.0であった。0.5%水酸化カリウム水溶液に1日間浸漬した条件の評価スコアの平均値(1.4)は0.75%水酸化カリウム水溶液に1日間浸漬した条件と比較して統計学的に有意な低値を示した(表2)。これら8標本の胎児の大きさ(胎児体重の平均値: 0.67g)は他の試験条件を含めた胎児体重の平均値(0.68 g)と比較して差異はなかったことから、胎児の大きさが起因したことは否定でき、水酸化カリウム水溶液の濃度と浸漬期間条件のいずれかまたは両者が原因と考えられた。以上、妊娠17日胎児標本では0.5%水酸化カリウム水溶液に1日間浸漬した条

件は至適条件ではないが、他の条件では適切な標本作製できると考えられた。

妊娠18日胎児標本では、柔軟性と染色性共にいずれの試験条件においても全標本の評価スコアが2.0(表3)であり、いずれの条件でも適切な標本作製できると考えられた。

妊娠19日胎児標本において、柔軟性は各試験条件間で統計学的有意差は認められなかった(表4)。0.5%水酸化カリウム水溶液に1日間浸漬した2標本および0.75%または1%水溶液に1日間浸漬した各1標本は評価スコア1.0を示したが、観察が許容できる柔軟性であった。これらの標本の胎児体重は1.63 gから2.32 gの範囲であり、他の試験条件を含めた胎児体重の平均値(2.13 g)を考慮すると胎児の大きさに起因するものではないと考えられた。標本の染色性に関してはいずれの試験条件においても全標本で評価スコアが2.0であった(表4)。以上、妊娠19日胎児標本はいずれの条件でも適切な標本作製できると考えられた。

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エタノールによる固定、染色およびグリセリンによる周囲組織の共染部分からの脱色、透徹および保存は分娩直前の胎児標本と同じ条件で行ったが、これらの過程が影響したと考えられる結果は得られなかった。

実験動物の胎児骨格所見の国際的標準化は長年にわたり議論されている。骨の異常(生存、発育あるいは機能に悪影響を及ぼす永久的な構造変化)と変異(通常範囲を超えた変化で生存や健康に悪影響を及ぼさない構造変化)の分類については、観察対象部位が多いため標準化には至らず、明確に分類される所見はあるものの、明確に分類されていない所見についての分類は各研究施設の判断に任せられているのが現状である^{2) 3)}。異常と変異を分類する際、発生過程における軟骨化様式や骨化様式などを経時的に観察することが重要である。そのためにも分娩直前の胎児標本のみならず、胎生期における骨の発生や骨化の過程の基礎データを収集し、異常と変異の分類を検討する必要がある。その際、本研究で検討した胎生期の標本作製法が役立つと考えられる。

結論として、妊娠17日、18日または19日の骨・軟骨二重染色標本作製時の軟部組織融解過程の条件としては、妊娠17日胎児標本では、0.5%水酸化カリウム水溶液に2日間または0.75%水酸化カリウム水溶液に1日間浸漬する条件、妊娠18日および19日の胎児標本では、0.5%水酸化カリウム水溶液に2日間、または0.75%または1%水酸化カリウム水溶液に1日間浸漬する条件が至適な条件であった。標準化されている分娩直前の標本作製手順の中で水酸化カリウム水溶液の上記の条件に置き換えることで適切に骨格観察できる標本が作製できることが確認できた。各妊娠日で共通して至適と考えられた0.5%

水酸化カリウム水溶液に2日間浸漬する条件をこの期間に作成する骨標本作製法の標準とすることが望ましいと考えられた。

参考文献

- 1) 有行史男：骨格，発生毒性，地人書館，東京，203-220，1992.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Inouye M: Differential staining of cartilage and bone in fetal mouse skeleton by alcian blue and alizarin red S. *Cong. Anom.*, 16, 171-173, 1976.
- 5) Whitaker J, Dix KM: Double staining technique for rat foetus skeletons in teratological studies. *Lab. Anim.*, 13, 309, 1977.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Kawai S, Takagi Y, Kaneko S, Kurosawa T: Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Exp. Anim.*, 60, 481-7, 2011.

Study of preparation procedure for fetal skeletal specimens at late gestational stage in rats

Yoshiki BAN, Akane KOBAYASHI, Yurina MORIYAMA, Hiroyasu TAUCHI
and Masao HORIMOTO

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

In the development of process for medicines or pesticides, assessment of bone development is generally required by skeletal observation of abnormalities or ossification using fetal bone and cartilage-staining specimens obtained from term pregnancy (gestational days ((GD) 20 or 21) in rats. The preparation procedure for fetal skeletal specimen at term pregnancy is standardized but the procedure at late gestational stage has not been standardized. In this study, we studied the procedure for the fetal bone and cartilage-staining specimens on GD 17, 18 or 19 which have more vulnerable soft tissues than those at term pregnancy. We studied to focus on the concentration of potassium hydroxide (KOH) solutions and the immersing period which is a process of melting the fetal soft tissues. The skeletal specimens on GD 17, 18 or 19 were melt the soft tissues by KOH solution at the concentrations of 0.5%, 0.75% or 1%, or for 1 or 2 days of immersing periods after bone-staining by Alizarin red S and cartilage-staining by Alcian blue. All skeletal specimens prepared were observed from points of softness and stainability, and scored. In the specimens from GD 17, higher scores were observed in 0.5% KOH solution for 2 days or 0.75% KOH solution for 1 day. In the specimens from GD 18 and 19, higher scores were observed in 0.5% KOH solution for 2 days, or 0.75% or 1% KOH solution for 1 day. Based on the results, the condition of 0.5% KOH for 2 days is recommended for the standardized preparation procedure of the fetal bone and cartilage specimens on GD 17 to 19.