

遺伝性多発奇形ウズラ（HMM）初期胚の形態異常と神経堤細胞

一般教育等 金子 智子

1. はじめに

遺伝性多発奇形ウズラ（HMM）は単一の常染色体劣性致死遺伝子（hmm）によって支配され、全身の各所に形態異常を発現して孵卵の初期に大部分が死亡する突然変異体である。HMMに発現する外部形態の異常は孵卵4日目から識別が確実となり、四肢先端部の二枚貝様の形態と脊柱2カ所の湾曲が主な特徴である。

一方、発生初期に出現する神経堤細胞は、増殖を繰り返し体の各所に移動して様々な組織や器官に分化する多分化能を持つきわめて特殊な細胞群である。HMMの形態異常が体の各所に発現することから、hmmは神経堤細胞の増殖あるいは移動、移動先での周りの組織との関わりなどに何らかの影響を与えることが予想される。近年、鳥類における移動中の神経堤細胞を特異的に認識する抗体が見出され、この抗体を用いて移動中の神経堤細胞を染色することが可能になった。この染色法を用いたこれまでの研究によって、HMMと正常型の間で神経堤細胞の移動に違いが認められたが、標本作製の未熟さの故に確信を持つには至らなかった。そこで、再度この染色法を実施して、hmmと神経堤細胞との関係を検討した。

2. 材料及び方法

材料のhmmホモ型の胚を得るために、hmmヘテロ型同士の交配をして採取した卵を孵卵（ 37.7 ± 0.2 °C）した。孵卵の1.5日、2日、2.5日、3日、3.5日、4日、5日目にそれぞれの卵から胚を取り出して実体顕微鏡で観察し、HMM特有の形態異常を認めた生存胚（hmmホモ型）をブアン液で固定した。ただし、孵卵1.5日および2.5日目の胚は外部形態によって遺伝子型を判別できないため取りだした胚のすべてを固定した。固定した胚の半分は抗マウスCD57抗体（移動中の神経堤細胞を特異的に認識する）を用いて全胚の免疫化学染色を行った。残りの半分は通常の方法でパラフィン連続切片（ $6 \sim 8 \mu\text{m}$ ）とし、その半分はヘマトキシリン・エオシン染色を実施し、残りの半分には抗マウスCD57抗体を用いて免疫組織化学染色を実施した。同様にして正常型胚

の標本を作成しコントロールとした。全胚は実体顕微鏡で、組織標本は光学顕微鏡でそれぞれ観察をし、正常型胚とHMM胚との間で比較検討した。

3. 結果

3-1 外部形態

HMM2日胚の第1、第2、第3鰓弓の形態に異常が観察されたが、その異常の程度は個体差が大きかった。HMM2.5日胚の脊柱の2カ所に、ようやく判別できる程度の湾曲が観察された。この脊柱湾曲は発生が進むに従って一層顕著になった。4日胚では正常型の四肢が棒状であるのに対し、HMMの四肢尖端部は二枚貝の貝殻様を示し、HMM5日胚のそれはさらに大きい扇状を呈した。また、HMM5日胚には明らかな眼球肥大が認められた。

3-2 組織

外部形態により遺伝子型が判別できるHMM2.5日胚において、眼杯内層の異常な褶曲が観察された。発生が進み、眼杯内層から分化した神経網膜には多層化、褶曲、波状形態などが認められた。また、正常型胚の眼胞は後極部がやや窪んでいるのに対し、HMM胚のそれは肥大し突出していた。

3-3 抗マウスCD57抗体による免疫染色

全胚

発生の各段階において正常型胚、HMM胚ともに眼胞の周辺部、耳胞の周辺部、鰓弓、心臓、頭部正中線部、体節部などに染色性が認められた。2.5日胚においてHMMの眼胞の水晶体の周辺部に強い染色性が観察されたのに対し、正常型ではその部分にほとんど染色性が認められなかった。また、3日胚においてHMM胚の眼胞の下部に染色性があるのに対し正常胚にはほとんど染色性は認められなかった。3.5日胚、4日胚、5日胚の眼胞周辺部の染色性はHMMと正常型の間で違いは観察されなかった。また、体節部分の染色性を比較すると、HMM胚の方が正常型胚より神経堤細胞が脊髄付近に長く留まっている像が観察された。また、5日胚では正常型、HMMともにほとんどの部分でその染色性を失っていた。

組織

正常型胚、HMM胚ともに頭部および体幹部の様々な部分に染色性が観察されたが、正常型胚とHMM胚の染色性に明らかな違いは見出されなかった。

4. 論議とまとめ

全胚免疫染色を実施した 2.5 日胚と 3 日胚において、正常型とHMMを比較すると、眼胞周辺部の染色性に明らかな違いが観察されたこととHMM胚の眼胞が後極部で肥大していることから、神経堤細胞が眼の分化や成長に何らかの影響を与えることが示唆された。さらに、正常胚とHMM胚の間で体節部分の染色性の相違が観察されたことからHMM胚特有の四肢の形態異常と神経堤細胞の移動との関わりも示唆された。しかし、現時点において、全胚での染色性の異なる位置に対応する組織上の位置に顕著な染色性の違いが見出されないことから、神経堤細胞と眼の分化あるいは四肢の形態異常との関わりについて確証を得たとは言えない状況である。これは単に組織標本作製の未熟さに起因するのか、あるいは他に原因があるのか、さらに検討を続けなければならない課題である。また、HMMの神経堤細胞の移動について検討するためには、神経堤細胞が出現する発生段階からの追跡が必要であるが、今のところ、孵卵 2.5 日以前にはHMMの遺伝子型の判別は不可能であり大変困難な問題である。従って、今後は出来るだけ多くの標本作製して、この発生段階における神経堤細胞の移動についての検討を試みたいと考えている。