



Title	マウス母体に投与したepidermal growth factorの胎仔口蓋形成に対する影響 : cortisone acetateを併用した場合
Author(s)	加納, 康行
Citation	大阪大学, 1986, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/35182
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

● 博士論文題名

マウス母体に投与した epidermal growth
factor の胎仔口蓋形成に対する影響
- cortisone acetate を併用した場合 -

原稿総紙数 60 枚

図表写真紙数 26 枚

大阪大学大学院歯学研究科

歯学臨床系口腔外科学第二専攻

加 納 康 行

● 結 言

1950年 Baxter¹⁾は、ある種のマウスに口蓋融合時期にコルチゾンを投与すると、口蓋裂が高率に発生することを発見した。そしてそれ以来コルチゾンなどの薬物が、口蓋融合過程をどのように阻害するのか追求することを通して、口蓋形成に関する研究が進められ²⁾⁻⁴⁾数多くの報告がなされてきた。しかし現在でもなお、口蓋形成に関して不明な点が多く残されている。

一方 epidermal growth factor (EGF) は、マウス新生仔に投与すると眼瞼開裂や、切歯の萌出を早める成長因子として、1962年に Cohen⁵⁾によってマウス顎下腺から発見された。この EGF は分子量約 6000 のペプチドで、上皮の肥厚を促進したり間葉細胞の増殖を促進するなど、上皮はもちろん非上皮系の細胞をも含めて、多彩な細胞に作用することが報告されている。⁶⁾⁻⁸⁾また、口蓋形成における EGF の働きについて述べた文献も散見される。⁹⁾⁻¹⁵⁾

ところで、⁹⁾ Bedrick らは A/J マウスに cortisone acetate (CA) を $100 \mu\text{g/g}$ body weight、EGF を $40 \mu\text{g/g}$ body weight 投与し口蓋裂の発生率の変化を報告している。CA 単独投与に比べて EGF と CA を併用して投与した場合、唇裂をともなった口蓋裂の発生率は変化しないが、口蓋裂単独の発生率は 61% から 95% に上昇しており、彼らは EGF は CA によって誘発される口蓋裂の発生を、助長するとしている。こうした研究結果に対して本研究では、EGF が口蓋間葉細胞の増殖を促進するとの報告¹²⁾もあり、また Bedrick らが実験に用いた EGF が極めて多量である点を考え、より少ない量の EGF をマウスに投与し、その口蓋裂発生頻度に対する影響を調べ、また口蓋形成におよぼす作用について検討した。

● 実験材料ならびに実験方法

1. 実験動物および妊娠確認方法

A/J マウス（塩野義製薬油日ラボラトリー、滋賀）および C57BL/6NJcl マウス（日本クレア、東京）を使用し、空調の完備した室内で、午前 6 時から午後 7 時まで照明を点灯して飼育した。

雄は 5 週令から 15 週令のものを使用した。雌は 7 週令から 10 週令で、体重は約 25g であり、妊娠経験のないものを使用した。発情期の雌を選び出し、夕方に雄のケージに入れ、翌朝陰栓を確認して妊娠 0 日とした。マウスの場合照明点灯時間を一定にしておく¹⁶⁾と、点灯約 2 時間前に排卵がおこるので、上記のような場合には午前 4 時頃に受精したことになる。

2. 口蓋裂発生率の調査方法

口蓋形成に重要な時期を十分含むように、妊娠 11 日から 14 日の 4 日間、午前 11 時頃に

1. CA（和光純薬，大阪）100 μ g/g body

weight 2. EGF 0.8 μ g/g body weight (マウス一匹につき総量 20 μ g 投与したこととなるので以下 EGF 20 と略す) 3. CA 100 μ g/g body weight と EGF 0.4 μ g/g body weight の併用 (CA+EGF10) 4. CA 100 μ g/g body weight と EGF 0.8 μ g/g body weight の併用 (CA+EGF20) 5. コントロールとして生理的食塩水 0.2ml を腹腔内に注射した。妊娠 18.5 日に胎仔を摘出し、雄雌を鑑別し体重を測定したのち、レントゲン撮影 (M-150 型、ソフテックス、大阪) を行なって、骨格系の先天異常の有無を調べた。そして胎仔を解剖し、唇裂口蓋裂を始めとする先天異常の有無を調べた。また各薬剤投与グループで、妊娠 11 日から 15 日までの胎仔をそれぞれ約十匹ずつ、頭部前額面の組織切片とし、ヘマトキシリン・エオジン染色を行なった。そして可及的にその中央部で、口蓋突起の状態を観察した。

3. 胎仔口蓋間葉細胞の分離・培養法

妊娠 14 日の無処置 A/J マウスから胎仔を取り出し、無菌的に口蓋突起を摘出した。
Tyler¹⁷⁾らの方法に従って、トリブシン (Flow Laboratories, U.K.) とバンクレアチン (Grade III, Sigma, U.S.A.) を 3:1 に混合した 2.5% の濃度の液中で 4°C 40 分インキュベートし、上皮を剝離し除去した。そして残った間葉細胞をコラゲナーゼ (CLS II, Cooper Biomedical, U.S.A.) を 0.1% 含むハンクス液 (日水製薬、東京) 中で 20 分間攪拌し、200 × g で 5 分間遠沈し細胞沈査を得た。10% 牛胎仔血清 (Whittaker Co., U.S.A.)、ペニシリン (100 I.U./ml) - ストレプトマイシン (100 μg/ml), (Flow lab., Australia)、4mM L-グルタミン (和光純薬)、および重曹 (和光純薬) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM, 日水製薬) を使用して、得られた細胞沈査から 2.5×10^4 個 / ml の細胞浮遊液を作製した。この細胞浮遊液をプラスチックプレート (24 flat bottom wells, Flow Lab.、

● U.S.A.) に 1ml ずつ分注し、5%炭酸ガス培養器 (SHEL-LAB, model 250S, U.S.A.) 中で 37°C にて培養し、5日経過した時点でマウス胎仔口蓋間葉細胞 (MEPM 細胞) として実験に使用した。

● また、ヒト胎仔口蓋間葉細胞 (HEPM 細胞) は、米国 National Institutes of Health において、妊娠 10週で流産したヒト胎児の口蓋間葉細胞より分離されたものを、大阪大学歯学部口腔外科学第二講座にて継代培養しているものを使用した。細胞は MEPM細胞と同様に 10% 牛胎仔血清を含む DMEM 中で培養し、細胞がプラスチックシャーレ上で confluent になれば、0.15% トリプシンと 0.1% エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA, 半井化学薬品、京都) の混合液で細胞を処理し継代培養を行なった。実験に使用する際は、MEPM細胞と同じようにプラスチックプレートに細胞浮遊液を分注して準備した。

4. EGF の染色法

2. の実験で作製した、妊娠13日から15日の胎仔口蓋のパラフィン切片を使用して
Gresikらの方法¹⁸⁾を基本にして次のように行なった。脱パラフィンした後、30倍に希釈した正常ヤギアルブミン (Cappel laboratories, U.S.A) で5分間前処置し、1%のヤギ血清を添加した Ca^{2+} , Mg^{2+} を含まないリン酸緩衝生理食塩水 (PBS(-), Flow Lab., U.K.) で500倍に希釈した抗マウスEGF家兎血清 (Collaborative research, U.S.A.) と作用させ4℃で24時間インキュベートした。そしてPBS(-)で10分間ずつ3回洗浄し、10%のヤギ血清を含むPBS(-)で50倍に希釈したヤギ抗家兎IgG (Cappel lab.) と室温で30分間処理した。さらにPBS(-)で3回10分間ずつ洗浄し、1%のヤギ血清を含むPBS(-)で60倍に希釈した家兎peroxidase-anti peroxidase complex (PAP, Cappel lab.) と室温で30分反応させた。そして 0.003% 過酸化水素と 50mg/100ml のジアミノベンジジン塩酸塩

(DAB、同仁化学、熊本)を含む0.05M トリス塩酸緩衝液と室温で約10分反応させ、EGF存在部位を茶色に染色した。水洗したのちヘマトキシリンにて核の染色をおこない、光学顕微鏡下で観察した。

なお、一枚のスライドグラスに6~10のパラフィン切片を貼布し、半数のスライドグラスはコントロールとして抗EGF家兎血清のかわりに正常家兎血清を使用した。またEGFを産生している生後10週の雌C57BL/6Nマウスの顎下腺の染色を行なってポジティブコントロールとした。

5. EGF濃度測定法

妊娠11,12日に2.の口蓋裂発生率調査の場合と同様に、CA 100 μ g/g body weight と EGF 0.8 μ g/g body weight の併用(CA+EGF20), CA, EGF20, および生理的食塩水を投与したA/Jマウス、また同様に生理的食塩水を投与したC57BL/6Nマウスから妊娠13.5日に胎仔を摘出した。こうして得られた3~5匹

- の胎仔に、0.1%牛胎仔アルブミン (Sigma) を含む0.1Mリン酸緩衝液に10 μ g/mlのトリプシンインヒビター (Type 1-S, Sigma) および1 μ g/mlのアジ化ナトリウム (和光純薬) を添加したもの0.5mlを加え、テフロンホモジナイザーにてホモジナイズし、16000 $\times$ gで30分4 $^{\circ}$ Cで遠沈し、得られた上清を使用し
- て以下のようにNex¹⁰⁾らの方法をもとにしてラジオイムノアッセイを行なった。

- 胎仔上清100 μ lあるいは0.1%牛胎仔アルブミンを含む0.1Mリン酸緩衝液に溶解したレセプターグレードの標準EGF溶液 (Collaborative research) 100 μ lと、同じく0.1%牛胎仔アルブミンを含む0.1Mリン酸
- 緩衝液で溶解した¹²⁵IでラベルしたEGF (約100000 cpm、アマシャム・ジャパン、東京) 100 μ l、および20000倍に希釈した家兎抗EGF血清 (Collaborative research) 100 μ lを加え、4 $^{\circ}$ Cで3日間インキュベートした。さらに0.1%牛胎仔アルブミンを含む

● 0.1Mリン酸緩衝液で60倍に希釈した正常家兎血清100 μ l、および10倍に希釈したヤギ抗家兎IgG 100 μ lを加え、4°Cで24時間インキュベートした。そして2000×gで30分間遠沈し上清を捨て、沈殿物をガンマカウンター(LKB 1282COMPUGAMMA)で測定した。

6. EGFの胎盤通過性の検討

● A/Jマウスで妊娠11~14日に毎日一日一回午後4時頃約10000 cpmの¹²⁵IでラベルしたEGFを投与し、妊娠15.5日に羊膜を破らないように胎仔を取り出した。そしてPBS(-)でよく洗浄した後、羊膜から胎仔を取り出し胎盤を除去した。さらにPBS(-)でよく洗浄した後、ガンマカウンターで放射活性を測定した。

● 7. 胎仔上清採取法

2. の口蓋裂発生率調査の場合と同様に、妊娠11,12日のA/JマウスにCA+EGF20, CA, EGF20、あるいは生理的食塩水を投与し、妊娠13.5日に胎仔を摘出した。またC57BL/6NマウスでもA/Jマウスと同様に生理的食塩水を

投与し、胎仔を摘出した。そして胎仔の重量の5倍量の、 $5.3\text{mg}/100\text{ml}$ のフェニルメチルスルフォニルフルロライド (Sigma)を含むPBS (-)を加え、ポリトロン (KINEMATICA, Switzerland)を使用して 4°C で30秒間ホモジナイズした。 $200\times g$ 4°C で10分間遠沈し、得られた上清をさらに $100000\times g$ 4°C で30分間遠沈し、その上清を凍結乾燥して使用した。¹⁹⁾なお得られた胎仔上清は、Lowryの方法により牛血清アルブミンを標準としてタンパク量を測定し、使用する際にはタンパク量が等しくなるように添加した。

8. DNA合成の測定

^3H -チミジンの取り込みを指標としてDNA合成を測定した。3.のようにして準備したMEPM細胞, HEPH細胞の培養液を牛胎仔血清を含まないものに交換し、24時間培養後、7.のようにして準備した胎仔上清を含んだDMEMと交換した。胎仔上清はタンパク量が $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ あるいは $500\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように

し、20時間培養後 ^3H -チミジン $1\ \mu\text{Ci/well}$ を加え、さらに4時間インキュベートした。そして培養液を吸引除去後ほぼ 0°C の PBS(-) で一度洗浄し、さらに5%トリクロロ酢酸で3回、メタノールで1回 4°C で洗浄した。その後 1N NaOH を 1ml 加え細胞を溶解し、そのうちの 0.4ml を 10N HCl で中和後バイアルに移し、 10ml のシンチレーター液を加え、液体シンチレーションスペクトロメーター (LKB 1215RCKBETA) により放射活性を測定した。

9. 胎仔口蓋突起の器官培養法

2倍の濃度に調整した DMEM と、0.6% 寒天 (Special agar noble, Difco laboratories, U.S.A.) を等量加えたものを 35mm プラスチックシャーレ (Corning, U.S.A.) 中で硬化させ、その上にメンブランフィルター (TM-2, 東洋科学産業、大阪) を置いた。メンブランフィルター上に無処置 A/J マウスおよび C57BL/6N マウスの妊娠13日の胎仔口蓋突起を片側ずつ、一対の口蓋突起が違った実験グループになる

● ように配慮して、鼻腔側がフィルターに接するよう
に置いた。そして7.のよう調整した各種胎仔上清を、
生理的食塩水を用いてタンパク量が $1\mu\text{g/ml}$ あるいは $10\mu\text{g/ml}$ となる
ように希釈して、 $20\mu\text{l}$ ずつ加えて48時間培養した。
そして可及的に口蓋突起の中央部で前額面があらわれ
るようにして、フィルターとともに口蓋突起をバラフィン
切片とし、ヘマトキシリン・エオジン染色を行なって、
口蓋正中縁端上皮の消失の有無を光学顕微鏡下で観
察した。

結 果

1. EGF, CA投与の口蓋裂発生率への影響

実験方法2. に従って A/J マウス、C57BL/6Nマウスで EGF, CA投与の口蓋裂発生率への影響を調査し、以下のような結果を得た。A/J マウス（表1）、C57BL/6Nマウス（表2）ともに、着床後吸収されたものの割合は、薬剤の投与によって有意な変化は認められなかった。生存胎仔数から唇裂口蓋裂の発生率を見ると、A/J マウスでは、唇裂を伴った口蓋裂の発生率はどの薬剤投与グループでも同じであった。一方、CAを投与した3グループ（CA, CA+EGF10, CA+EGF20）では口蓋裂単独の発生率は非投与グループに比べて遙かに高くなった。C57BL/6NマウスでもCA投与により口蓋裂単独を有するマウスが見られたが、A/J マウスに比べればその変化は僅かであった。なお、A/J マウスで唇裂のみを有するもの、またC57BL/6Nマウスで唇裂を有するものは見られなかった。

A/J マウスのこの結果から、CAにEGFを併せて投与することによって、口蓋裂単独の発生率がどのように変化するのかを検討した

(図1)。CAに併せて投与するEGFの量を $10\mu\text{g}$, $20\mu\text{g}$ と増量していくと、それになくなって正常な口蓋の割合は増加し、口蓋裂単独の割合は減少した。この結果についてカイ二乗検定を行なうと(表3)、CA投与グループとCA+EGF20投与グループの間で口蓋裂単独の発生率に、1%の危険率で有意差のあることが確かめられた。

A/J マウスで口蓋突起の状態を、組織切片を用いて観察すると(表4)、妊娠13日の時点ではどのような薬剤を投与した胎仔でも口蓋突起は舌にそって垂直方向に存在しており、違いは観察されなかった。コントロール、EGF投与の胎仔では妊娠14日になると、口蓋突起の水平方向への成長の変化(水平転位)が多数の胎仔で観察された(図2A)。そして妊娠15日になると、口蓋突起が融合したもの

が多く認められた（図2B）。それに比較して、CA, CA+EGF20を投与した胎仔では、妊娠14日になっても口蓋突起が舌にそって垂直方向に存在しているものが多くみられた。妊娠15日の時点でのCA投与胎仔とCA+EGF20投与胎仔の違いは、CA+EGF20投与胎仔では、水平転位や口蓋正中縁端上皮の菲薄化（図2C）が89%の胎仔で見られたのに対して、CA投与胎仔では、口蓋突起が舌にそって垂直方向に存在していたり（31%、図2D）、口蓋正中縁端上皮の菲薄化が見られないもの（46%）が多いように思われた点である。なおC57BL/6Nマウスでは、A/Jマウスにくらべて比較的早期に口蓋突起の融合が観察され、妊娠14日で融合が観察されたものも多かった。

唇裂口蓋裂の他にも多指症や短指症、副肋骨などが数例見られたが、CAやEGFの投与と明らかに関連性が見られるものはなかった。ただ、眼瞼開裂は数%ずつではあるがA/Jマウスの各グループにみられ（図3）、その発

生率はEGFを投与したグループではやや少ないように思われた。一方C57BL/6Nマウスでは、眼瞼開裂は観察されなかった。

雌雄別にA/Jマウスの口蓋裂単独、唇裂をともなった口蓋裂、眼瞼開裂の発生率をみると(表5)、口蓋裂単独の発生率は雌雄で有意差は認められなかったが、唇裂をともなった口蓋裂や眼瞼開裂では各薬剤投与グループを合計してみると、雌よりも雄に多くみられるという結果が得られた。またA/Jマウスについて胎仔の体重を測定すると(図4)、CAを投与した3つのグループで有意な体重の減少がみられたが、EGFを投与したことによる体重の増減は認められなかった。

2. 胎仔口蓋突起のEGF染色

実験方法4.に従って胎仔口蓋突起のEGFを染色した。その結果、口蓋突起の融合の前後に関係なく、無処置の妊娠13日のC57BL/6Nマウスの胎仔口蓋突起後縁部分(図5C)、CA+EGF20を妊娠11日から13日の母体に投与し

た A/J マウスの妊娠 14 日の胎仔口蓋突起 (図 5D)、また無処置の妊娠 15 日の A/J マウスの胎仔口蓋突起融合部 (図 5F) など、妊娠 13 日から 15 日の使用した 6 種類 9 胎仔のすべての組織切片で上皮を中心に茶色の発色があり、EGF の存在が考えられた。なお抗 EGF 血清のかわりに正常家兎血清を使用したネガティブコントロールでは、明らかな DAB による発色は見られず (図 5E, G)、また EGF を産生している生後約 10 週の雌の C57BL/6N マウスの顎下腺を使用したポジティブコントロールでは茶色の発色が見られた (図 5A)。

3. EGF, CA 投与の胎仔 EGF 濃度への影響

実験方法 5. のように標準 EGF 溶液を使用した結果から標準曲線を求め (図 6)、それを利用して各種処置胎仔の EGF 濃度を測定した (表 6)。その結果 EGF ($0.8 \mu\text{g/g body weight}$) をマウス母体に投与しても、胎仔中の EGF 濃度は変化しないことが示された。また、羊水中の EGF 濃度も EGF 投与胎仔 4 例、

EGF 非投与胎仔 5 例であわせて測定したが、すべて 0.3 pmol/ml の測定限界以下であった。

4. EGF の胎盤通過性の測定

実験方法 6. のようにして測定した結果 (表 7)、 ^{125}I を投与した胎仔では 55.2 cpm であり、妊娠 11-14 日に生理的食塩水を投与したコントロールでは 48.6 cpm であって、有意差はみられなかった。

5. 胎仔口蓋間葉細胞の DNA 合成に対する胎仔上清の影響

実験方法 8. のように MEPM 細胞、HEPM 細胞を用いて DNA 合成を測定した。その結果、MEPM 細胞では (図 7)、タンパク量が $10 \mu\text{g/ml}$ となるように胎仔上清を加えた場合、A/J の CA+EGF20 処理胎仔上清を加えたもの、A/J の CA 処理胎仔上清を加えたもの、A/J の無処置胎仔上清を加えたものの順に DNA 合成は多かった。タンパク量が $200 \mu\text{g/ml}$ となると各胎仔上清間の DNA 合成の差は少なくなっ

た。HEPM細胞では（図8）、胎仔上清をタンパク量が $10\mu\text{g/ml}$ となるように加えると、A/JのCA+EGF20処理胎仔上清を加えたほうが、そのほかのA/JのCA処理胎仔や無処置胎仔の上清を加えたもの、また胎仔上清を加えなかったものよりもDNA合成は促進された。

6. 器官培養における口蓋正中縁端上皮消失に対する胎仔上清の影響

実験方法9.のように胎仔口蓋突起の器官培養を行ない、各種胎仔上清の正中縁端上皮消失に対する影響を観察した（表8）。A/Jマウス胎仔口蓋突起を使用した場合は、タンパク量 $1\mu\text{g/ml}$ で胎仔上清を加えると、A/JのCA処理胎仔上清を加えた場合には、50%の口蓋突起でのみ口蓋正中縁端上皮の消失が見られた（図9A）のに対して、A/JのCA+EGF20処理胎仔上清を加えた場合には、100%の口蓋突起で口蓋正中縁端上皮の消失が見られた。同じく、タンパク量が $10\mu\text{g/ml}$ となるように加えた場合では、A/JのCA処理胎仔上清を

加えた場合には、38%の口蓋突起でのみ口蓋正中縁端上皮の消失が見られたのに対して、A/JのCA+EGF20処理胎仔上清を加えた場合には、60%の口蓋突起で口蓋正中縁端上皮の消失が見られた。このようにCA処理胎仔上清とCA+EGF20処理胎仔上清で差が見られたのに対し、C57BL/6Nマウス胎仔口蓋突起を使用した場合には、タンパク量 $1 \mu\text{g/ml}$ で上清を加えると、A/JのCA処理胎仔上清を加えた場合には83%、A/JのCA+EGF20処理胎仔上清を加えた場合には79%の口蓋突起で口蓋正中縁端上皮の消失が見られ、消失率に差はみられなかった。またA/Jマウス胎仔口蓋突起にA/Jマウス無処置胎仔上清を加えた場合や、C57BL/6Nマウス胎仔口蓋突起にC57BL/6Nマウス無処置胎仔上清を加えた場合には、いずれもほぼ全例で上皮の消失がみられた。

● 考 察

in vivo で口蓋裂のみの発生率、唇裂をと
もなった口蓋裂の発生率を調べると、CA, EGF
の投与によって両者は大きく違った反応をし
た。A/Jマウスでは、口蓋裂のみの発生率は
CA, EGFの投与によって変化したのに対して、
唇裂をともなった口蓋裂では、CA投与によっ
ても発生率はコントロールとほぼ同じで変化
しなかった。また、C57BL/6NマウスでもCA投
与によって口蓋裂だけが観察され、コントロー
ルと同様に唇裂をともなった口蓋裂はみられ
なかった。したがってCA, EGF投与は口蓋裂の
みの発生率に大きく影響するが、唇裂をとも
なった口蓋裂の発生率にはほとんど影響しな
いと考えられた。そこでCA, EGFの影響をより
明確に評価できるように唇裂をともなった口
蓋裂を除き、口蓋裂のみの発生率について
A/Jマウスで検討した。その結果コントロー
ル、CA処置またEGF処置でもBedrickらとほ
ぼ同様の結果であり、コントロールとEGF処

● 置との間で口蓋裂のみの発生率に有意差はみられなかった。しかし Bedrick らの EGF 40 $\mu\text{g/g body weight}$ を CA にあわせて投与した結果と逆に、EGF 0.8 $\mu\text{g/g body weight}$ を CA にあわせて投与すると口蓋裂発生率が減少した。そして EGF の量を 0.4 $\mu\text{g/g body weight}$ にした場合と 0.8 $\mu\text{g/g body weight}$ にした場合を比較すると、後者のほうがより口蓋裂発生率は減少する傾向がみられた。このように EGF は、単独ではほとんど口蓋裂発生率に影響ないが、CA によって誘発される口蓋裂の発生には 0.8 $\mu\text{g/g body weight}$ で抑制的に働き、口蓋裂発生に関与することが示された。

● こうした薬剤投与による口蓋裂発生率の変化を形態的な面から考えてみた。A/J マウスでは EGF のみを投与した時は、無処置の時とほぼ同様に水平転位・正中縁端上皮の菲薄化が観察された。これは EGF 単独投与グループがコントロールと同様な口蓋裂発生率を示し

たこととよく一致している。一方 A/J マウスに CA を投与した時、口蓋突起の水平転位は遅れ、妊娠 15 日でも 69% しか水平転位をしておらず、正中縁端上皮の菲薄化は 54% であった。それに対して CA+EGF を投与したグループでは妊娠 15 日で融合の起きているものはないが、水平転位・正中縁端上皮の菲薄化はほぼコントロールと同様に起こっていた。

両側の口蓋突起の接触なしに、つまり接触とは関係なしに正中縁端上皮の消失が起こること²⁰⁾⁻²²⁾から、口蓋突起が水平転位した際に時期をあわせて正中縁端上皮の消失が起こることは口蓋形成に重要であると思われる。また、in vivo では CA を投与しても正中縁端上皮²³⁾の菲薄化は起こるという報告から、CA 投与グループを中心に妊娠 15 日で正中縁端上皮の消失が見られなかった口蓋突起は、菲薄化が起こらなかったのではなく、菲薄化の時期が遅延していると考えられるべきであろう。これらのことは、水平転位・正中縁端上皮の消失の

時期が CA 投与によって共に遅れるということで、口蓋突起の融合に対して合目的性があるように思われるが、両者の遅延の程度が都合よく一致するとは限らないこと、またあまり遅くなると頭蓋全体の成長との関係から口蓋突起が接触できなくなる等の理由から、やはり CA 投与によって口蓋裂発生率は上昇したように考えられる。また、CA 単独投与によって水平転位・正中縁端上皮の消失といった一連の現象のつながりが不完全になったものが、EGF をあわせて投与することによって多少とも改善され、口蓋裂が減少したと思われる。

A/J マウスと C57BL/6N マウスの違いについて考察すると、これまでの報告では、C57BL/6N マウスにくらべて A/J マウスでは口蓋突起の水平転位が遅く、そうしたことからグルココルチコイド投与によって口蓋突起の成長・水平転位が遅れた時、C57BL/6N マウスではまだ融合の可能性があるが、A/J マウスで

● は左右の口蓋突起が接触できなくなる可能性が非常に高くなり、そのためにA/Jマウスでは口蓋裂が頻発しやすいと考えられている。^{24) 25)}

今回の結果でも、コントロールのC57BL/6Nマウスでは妊娠14日で融合している口蓋突起がみられるなど、コントロールのA/Jマウスにくらべて水平転位、融合は早くみられ、この仮説を肯定する結果が得られた。

次に、雌雄別の唇裂口蓋裂、眼瞼開裂の発生率についてみてみると、唇裂をともなった口蓋裂、眼瞼開裂では雌雄別発生率に違いがみられ、口蓋裂単独では雌雄差がないという結果であった。Nexøらの報告等¹⁰⁾と同じように、今回の実験結果からEGFあるいはEGF様物質が口蓋突起を含め胎仔中に存在することが確認された。そしてこのEGFの産生・レセプター²⁶⁾の調整にアンドロゲン、エストロゲン²⁷⁾が関与しており、雌雄でEGF濃度が違うこと、またBrownら²⁸⁾によると子宮内で、ある胎仔の両側が雄であるか雌であるかによって、その胎仔

の EGF 濃度に高低があることが報告されている。こうしたことから考えると、EGF あるいは EGF と同様にアンドロゲン等によって調節されるなんらかの物質が、雌雄によって違った量含まれており、その物質の口蓋突起に対する作用によって雌雄差がおこるとも考えられる。口蓋裂単独の発生率には雌雄差はなかったが、これは CA 投与が性差以上に強力に口蓋裂を発生させ、そうした胎仔が口蓋裂単独のグループには多く含まれているためとも考えられる。

ところで、マウスでは通常新生仔の目が感染や傷をうけ、構造・機能に異常を生じることがを防ぐため、眼瞼は閉鎖して誕生してくる。

この眼瞼の閉鎖は妊娠 17 日頃までに完成し、誕生後約 14 日までふたたび開かないとされている。²⁹⁾ Watney らは、眼瞼開裂が頻発する Lidgap-Miller (lg^{MI}) マウスを使用し、その胎仔の眼瞼開裂がグルココルチコイドの投与^{29) 30)}によって減少することを報告している。これ

に対して今回の結果では、胎仔数が少ないのでさらに胎仔数を増さないと断定できないが、CA投与では特に眼瞼開裂の発生率には変化ないように思われた。一方EGF投与では眼瞼開裂がやや減少したように思われた。Lidgap-Millerマウスの結果と違い、CA投与で眼瞼開裂は減少しなかったが、他にもコルチゾン投与にほとんど反応しないマウスがあることも報告されており、³¹⁾A/Jの眼瞼開裂についてはさらに研究を進めていく必要があると思われる。ただ、上皮の消失がない点が異なるにしても、口蓋と同様に融合がおこる眼瞼でEGF, CAが関与していると考えられることは、興味あるところである。

さて、これまで免疫組織化学の技法を用いて、組織中のEGFを染色した報告は数多くあるが、その多くは顎下腺を染色したものである。³²⁾口蓋突起のEGFの局在を調べたものはなく、EGFレセプターの局在をオートラジオグラフを用いて示したものが³³⁾⁻³⁵⁾あるにすぎない。¹⁰⁾

今回著者は酵素抗体法（PAP法）を用いて口蓋突起でのEGFの存在の有無を調べた。その結果上皮を中心に妊娠13日から15日の染色に用いたすべての口蓋突起でEGFの存在が認められ、EGFが直接口蓋形成に関与している可能性が高いと考えられた。また、CA、EGFなど投与薬剤の違いによる染色性の違いは観察されなかった。今回の染色法は定量的な話をするには十分ではないが、各薬剤投与グループでEGFの分布・量に顕著な違いがなかったことは言えるであろう。また今回の結果から、上皮に特に多くのEGFが存在していると考えられ、このことは前述のEGFレセプターの局在を調べた報告で、上皮部分にEGFレセプターが多くみられたという事実と、一致している。

このようにEGFの局在を調べた結果、胎仔口蓋にEGFが存在することが示された。そこでこのEGFが、CAやEGFを母体に投与することによって胎仔中で増減するか調べることと

した。今回の実験では口蓋突起のみの濃度を測定することは、必要とされる多量のサンプルを集めることが困難であったので、胎仔全体を用いて EGF 濃度を測定した。すでに正常マウス胎仔中の EGF 濃度は Nexø¹⁰⁾らによって報告されている。今回の結果は彼らのラジオイムノアッセイの結果 ($0.12 \text{ pmol/g wet weight}$) より数倍高い値、ラジオレセプターアッセイとほぼ等しい値 ($0.62 \text{ pmol/g wet weight}$) であった。測定の結果母体に EGF を投与しても胎仔中の EGF 濃度に変化はなく、したがって母体に EGF を投与しても胎仔中の EGF 濃度は上昇しないと考えられた。なお、以上の結果は EGF 投与後約 24 時間たってから胎仔を摘出し上清を得ているので、かなり母体血中 EGF 濃度は減少していると考えられる。そこで EGF を母体に静脈注射後 1 時間で胎仔を取り出し、 0.05 M の酢酸中で胎仔をホモジナイズし遠沈した上清でも EGF 濃度を測定したが、結果は EGF 投与後 24 時間経過した胎仔を使用

したものと同一傾向を示し、EGFの投与による胎仔中のEGF濃度の上昇は見られなかった。

コルチゾンは代謝されずそのまま胎盤を通過し、胎仔に達することが報告されている。³⁶⁾

EGFもこれまで述べたように母体に投与しても胎仔中で濃度が増加せず、胎盤を通過しない可能性が高いと思われた。そこでその点を

より明確にするために約10000cpmの¹²⁵IでラベルしたEGFを妊娠11日から14日の4日間母体に投与した。その結果胎仔での放射活性の有意な上昇は測定されず、EGFの胎盤通過は非常に困難であると考えられた。Bedrickら

の報告⁹⁾の他に、Calvert³⁷⁾らはマウス母体にEGFを投与し胎仔の酵素活性の変化を報告し

ているが、EGFの胎盤通過が非常に困難であることから、本研究の結果を含めBedrick, Calvertの結果もEGFが直接胎仔に作用して起こったものではなく、EGF投与によってなんらかの物質が増減し、そのために起こった現象であるとも考えられた。

EGF が口蓋突起を含めて胎仔中に存在する
という今回の結果やこれまでの報告から、
EGF は直接胎仔の口蓋形成に関与していると
考えられている。しかし今回の母体に EGF を
投与した場合では、これまでの考察からその
EGF は直接胎仔の口蓋突起に働くのではなく、
EGF を母体に投与することによって胎仔中で
なんらかの物質の増減があり、それによって
口蓋裂の発生が減少していると考え、この点
についてさらに調べることにした。CA 投与に
よって発生する口蓋裂が EGF をあわせて投与
することによって減少することから、CA と
CA + EGF をそれぞれ投与した時の胎仔口蓋突
起から得た上清で両者の差を比較するとより
良いと思われたが、EGF 濃度測定の場合と同
様に、口蓋突起のみから十分な量の上清を集
めることは困難であったので、胎仔全体から
上清を得て in vitro で実験を進めた。

胎仔口蓋突起の融合では、口蓋突起の増殖
・形態の変化、上皮と間葉組織の関係、細胞

41) の接着、*programmed cell death* 42)43) などの点で融合が完成する過程で重要と考えられ種々の報告がなされている。今回はこれらの中から特に重要と思われる口蓋間葉細胞の増殖・口蓋正中縁端上皮の消失について、CA, CA+EGF20を投与した胎仔上清を中心として各種胎仔上清の影響について検討した。

³H-チミジンの取り込みを指標としてDNA合成能を測定し、口蓋間葉細胞の増殖に与える影響について検討した結果、MEPM細胞ではタンパク量を10 μ g/ml含むように加えた場合CA+EGF20, CA, 無処置胎仔上清の順に³H-チミジンの取り込みは多かった。*in vitro*で口蓋間葉細胞にグルココルチコイドのみを投与すると、増殖が抑制されることが知られている¹²⁾⁴⁴⁾が、今回A/JのCA投与胎仔上清を添加したほうが、A/Jの無処置胎仔上清を加えたものより取り込みが多かったが、その理由として次のように考えた。胎仔は最後にCAを投与してから24時間後に摘出されており、そのために

● 胎仔上清中のCA濃度は、CA投与直後に比べてかなり低下していると思われる。また、胎仔中にはEGFが存在しており、EGF存在下でCAがある程度低濃度で存在すると、これまでに報告があるように、⁽²⁾⁴⁵⁾ CAが存在しない場合より口蓋間葉細胞の増殖を促進する。このためにCA投与胎仔上清を添加したほうが無処置胎仔上清を添加したものよりも取り込みが多かったのであろう。さらにそのCA投与胎仔上清にくらべてCA+EGF20投与胎仔上清を加えた方がDNA合成を促進することから、EGFを投与したことによって産生されたなんらかの物質を介して、MEPM細胞の増殖が促進されたことが示唆された。また、HEPM細胞を用いた実験でもMEPM細胞と同様な傾向を示す結果が得られた。よって、MEPM細胞・HEPM細胞を用いた実験結果から、母体にCAを投与する際EGFをあわせて投与すると、EGFの働きによって口蓋突起の成長が促進されることが予想された。実際 in vivo の組織像観察の結果をみると、

● CA+EGF20投与グループの方がCA投与グループより水平転位がよく起こっており、このことは上記のような作用に関係あるかもしれない。

● in vivo 組織像観察の結果、A/Jマウスでは妊娠15日ごろ、C57BL/6Nマウスではそれより早く（A/Jより約12時間早いという報告⁴⁶⁾がある）、口蓋突起正中縁端上皮の菲薄化・融合が起こった。そこで口蓋正中縁端上皮の消失については、A/Jマウス・C57BL/6Nマウスともに菲薄化・融合が起こっていない妊娠13.5日の無処置マウスの口蓋突起を摘出し、器官培養を行なって検討した。A/Jマウスの口蓋突起を使用した場合では、A/JのCA投与胎仔上清を加えた場合、口蓋突起正中縁端上皮の消失が半数でしか認められなかった。これに対してA/Jの無処置胎仔上清、A/JのCA+EGF20投与胎仔上清、A/JのEGF20投与胎仔上清を加えた場合では85%以上で上皮の消失が認められた。このことから母体に投与さ

れた EGF はなんらかの物質を介して、CA 投与によって阻害される正中縁端上皮の消失を正常に行なわせる働きがあることが示唆された。このことも in vivo の CA 投与グループと CA+EGF20 投与グループの、菲薄化の達成率の結果に類似しており、母体に EGF を CA にあわせて投与すると、この作用からも口蓋裂発生を抑制している可能性がある。また、A/J マウスにくらべて口蓋裂が発生しにくい C57BL/6N マウスの口蓋突起を使用した場合には、同じ A/J の CA 投与胎仔上清を使用しても、83% で上皮の消失が見られ、A/J の無処置胎仔上清を使用した場合と有意な差は認められなかった。口蓋突起の器官培養を行なってコルチゾールを投与し、A/J では正中縁端上皮の消失が阻止されたが C57BL/6N マウスでは阻止されなかったという報告²²⁾と同様に、これは A/J マウスと C57BL/6N マウスのグルココルチコイドに対する感受性の違いを表わしており、この違いは、C57BL マウスでは口蓋突起中の

● ゲルココルチコイドレセプターがA/Jマウスより少ないために起こるのではないかと考えられている。⁴⁷⁾⁻⁴⁹⁾

以上の考察から、母体にEGFを投与することによってなんらかの物質を介し、口蓋突起の融合が促進されることが強く示唆されたが、この物質はどのような物であろうか。

● 母体と胎仔を隔てているものは胎盤であり、その胎盤にはEGFレセプターが多く存在することが知られている。⁵⁰⁾⁻⁵⁶⁾そして、EGFは正常胎盤細胞や絨毛膜癌腫細胞を培養した結果から、胎盤性ラクトゲン、絨毛性性腺刺激ホルモンまたプロゲステロンの分泌を促進することが知られている。^{51) 57-59)}EGFは妊娠中このような機序を通して、胎仔の成長に関与していると考えられている。今回の口蓋裂が減少したという結果もEGFのこうした作用によると推察される。また胎盤を培養する上で、高濃度のEGFを投与すると、かえって胎盤に有害であるとする報告や、⁵⁹⁾チロキシンは先天異常発生を抑

- 制するように関与しており、そして EGF がチロキシンの合成抑制・濃度低下に関与しているという報告⁽⁶²⁾⁽⁶³⁾をあわせて考えると、著者の結果と Bedrick の結果の違いを少しは推測できると思われる。つまり、EGF が低濃度 ($0.8 \mu\text{g/g body weight}$) の場合には、EGF の各種作用の中で胎仔の成長を促進するような働きが主となっていると考えられ、逆に Bedrick のように高濃度 ($40 \mu\text{g/g body weight}$) になると EGF 自身の細胞為害性、また EGF の投与による各種物質の増減による先天異常の誘発が起こったとも考えられた。

総括

- マウス母体に CA, EGF を投与し口蓋裂発生率の変化を調べ、またその口蓋形成におよぼす作用について検討し次のような結論を得た。

1. CA にあわせて EGF ($0.8 \mu\text{g/g body weight}$) を腹腔内に注射すると、口蓋裂のみ

を有する胎仔の発生率は減少した。一方、唇裂と口蓋裂を有する胎仔の発生率は変化しなかった。

2. CA, EGF20を投与した際のA/Jマウスの胎仔口蓋突起を観察すると、EGF20投与グループではコントロールと同じような変化を示した。それに対して、CA投与グループでは口蓋突起の水平転位が遅れたが、CA+EGF20投与グループは正常と同様の変化を示した。またコントロールのC57BL/6NマウスではコントロールのA/Jマウスよりはやく口蓋突起の融合がおこった。

3. 妊娠13日から15日の胎仔口蓋突起にはEGFが存在することが明かとなったが、母体にEGFを投与しても胎仔中のEGF濃度は変化せず、EGFの胎盤通過は非常に困難であると考えられた。

4. CAを投与したA/Jマウスの胎仔上清よりCA+EGF20を投与したA/Jマウスの胎仔上清のほうがタンパク量 $10\mu\text{g/ml}$ でMEPM細胞・HEPM

細胞のDNA合成を促進した。このことから母体に投与したEGFが口蓋突起の増殖という点から口蓋裂の発生を抑制した可能性が示された。

5. 胎仔口蓋突起を用いた器官培養でも、タンパク量 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の CA 投与胎仔上清を加えた場合には約半数でしか正中縁端上皮の消失がみられなかったのに対し、タンパク量

$1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の CA+EGF 20 投与胎仔上清を加えた場合には全例で上皮の消失がみられ、in vivo と似た結果が得られた。よって、こうした上皮消失の面からも母体に投与したEGFが口蓋裂の発生を抑制した可能性が考えられた。

以上のようにマウス母体にEGF ($0.8 \mu\text{g}/\text{g}$ body weight) を投与すると、そのEGFは直接胎仔に作用するのではなく、なんらかの物質を介して胎仔内で作用を及ぼすと思われた。そして、そのためにCAによって誘発される口蓋裂がEGF ($0.8 \mu\text{g}/\text{g}$ body weight) をあわせて投与することによって減少したと考えら

Effects of Intra-peritoneal Administration of Epidermal Growth Factor to Maternal Mice on the Palatal Morphogenesis of Fetuses.

---Concomitant Administration with Cortisone Acetate---

Yasuyuki Kano

The Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery
Osaka University Faculty of Dentistry
1-8 Yamadaoka, Suita, Osaka, 565, Japan

Key words: Cleft palate • epidermal growth factor.
glucocorticoids

Pregnant A/J mice each were given an I.P. injection of 0.8 $\mu\text{g/g}$ of epidermal growth factor (EGF) and/or 100 $\mu\text{g/g}$ of cortisone acetate (CA) during days 11 to 14 of gestation and fetuses were removed at 18 days of gestation. EGF, when injected into pregnant mice, decreased the incidence of cleft palate (CP) in CA treated mouse fetuses. EGF alone, however, had no apparent effect on the incidence of CP. Delay of both palatal shelf elevation and palatal medial-edge epithelium (MEE) thinning was observed in CA treated A/J mice. And when EGF was injected with CA, delay of these palatal changes were improved.

Immunohistochemical localization of EGF in palatal

shelves was studied. EGF was detected in palatal shelves especially in the epithelium both before and after palatal fusion. It, therefore, seems that EGF plays an important role in palatal growth and differentiation. However, radioimmunoassay indicated that the immunoreactive EGF concentration in mouse fetuses did not increase even if EGF was injected in maternal mice. From these results above mentioned, it is presumed that EGF injected in maternal mice changed the level of substance "X", which decreased the incidence of CP of fetuses.

To examine and clarify the influence of substance "X" on palatal growth and differentiation, fetus extracts were prepared as follows. Pregnant A/J mice each were given an injection of CA alone or CA with EGF, and fetuses were removed and homogenized. After centrifugation, the supernatant fluid of each of fetuses was lyophilized. By using both human and murine embryonic palatal mesenchymal cells, it was observed that CA with EGF injected fetus extract enhanced cell growth more than CA injected fetus extract. And palatal organ culture studies demonstrated that the breakdown of palatal MEE occurred on most of A/J palatal shelves treated with CA with EGF injected fetus extract. In contrast, on more than half of A/J shelves treated with

CA injected fetus extract, the breakdown of palatal MEE was inhibited.

The results of these studies suggest that EGF localizes in the fetus palate and may be important for the growth and differentiation of the palate. However maternal EGF cannot affect fetuses directly. It is, therefore, speculated that EGF decreases the CP incidence of CA treated A/J mice fetuses through the intermediary of substance "X", and that the role of "X" is related to palatal growth and the breakdown of palatal MEE.

参考文献

- 1) Baxter, H., and Fraser, F.C. (1950): Production of congenital defects in the offspring of female mice treated with cortisone. McGill Med. J., 19, 245-249.
from Fraser, F.C. and Fainstat, T.D. (1951): Production of congenital defects in the offspring of pregnant mice treated with cortisone. Pediatrics, 8, 527-533.
- 2) Greene, R.M., and Kochhar, D.M. (1975): Some aspects of Corticosteroid-induced cleft palate: A review. Teratology, 11, 47-56.
- 3) Salomon, D.S., and Pratt, R.M. (1979): Involvement of glucocorticoids in the development of the secondary palate. Differentiation, 13, 141-154.
- 4) Pratt, R.M. (1983): Mechanisms of chemically-induced cleft palate. Trends Pharmacol. Sci., 4, 160-162.
- 5) Cohen, S. (1962): Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. J. Biol. Chem., 237, 1555-1562.
- 6) Carpenter, G. (1979): Epidermal growth factor, Ann. Rev. Biochem., 48, 193-216.

7)Gospodarowicz,D. (1981): Epidermal and nerve growth factors in mammalian development. Ann. Rev. Physiol., 43, 251-263.

8)Walker,P. (1982): The mouse submaxillary gland: a model for the study of hormonally dependent growth factors. J. Endocrinol. Invest., 5, 183-196.

9)Bedrick,A.D. and Ladda,R.L. (1978): Epidermal growth factor potentiates cortisone-induced cleft palate in the mouse. Teratology, 17, 13-18.

10)Nexø,E., Hollenberg,M.D., Figueroa,A. and Pratt,R.M. (1980): Detection of epidermal growth factor-urogastrone and its receptor during fetal mouse development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 2782-2785.

11)Tyler,M.S. and Pratt,R.M. (1980): Effect of epidermal growth factor on secondary palatal epithelium in vitro: tissue isolation and recombination studies. J.Embryol.Exp.Morph., 58, 93-106.

12)Yoneda,T. and Pratt,R.M. (1981): Interaction between glucocorticoids and epidermal growth factor in vitro in the growth of palatal mesenchymal cells from the human embryo. Differentiation, 19, 194-198.

13)Grove,R.I. and Pratt,R.M. (1984): Influence of epidermal growth factor and cyclic AMP on growth and differentiation of palatal epithelial cells in culture.

Dev. Biol., 106, 427-437.

14) Hassell, J.R. and Pratt, R.M. (1977): Elevated levels of cAMP alters the effect of epidermal growth factor in vitro on programmed cell death in the secondary palatal epithelium. Exp. Cell Res., 106, 55-62.

15) Grove, R.I. and Pratt, R.M. (1983): Growth and differentiation of embryonic mouse palatal epithelial cells in primary culture. Exp. Cell Res., 148, 195-205.

16) Hoppe, P.C. (1975): Fertilizing ability of mouse sperm from different epididymal regions and after washing and centrifugation. J. Exp. Zool., 192, 219-222.

17) Tyler, M. and Koch, W.E. (1977): In vitro development of palatal tissues from embryonic mice. II. Tissue isolation and recombination studies. J. Embryol. Exp. Morph., 38, 19-36.

18) Gresik, E. and Barka, T. (1977): Immunocytochemical localization of epidermal growth factor in mouse submandibular gland. J. Histochem. Cytochem., 25, 1027-1035.

19) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.

20) Smiley, G.R. and Koch, W.E. (1972): An in vitro study of single palatal processes. Anat. Rec., 173, 405-416.

21) Tyler, M.S. and Koch, W.E. (1974): Epithelial-

mesenchymal interactions in the secondary palate of the mouse. J.Dent.Res., 53, A64.

22)Goldman,A.S., Herold,R. and Piddington,R. (1981): Inhibition of programmed cell death in the fetal palate by cortisol. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 166, 418-424.

23) 栗栖浩二郎, 清水浩, 和田薫(1977): トリアムシノロンによって誘発した口蓋裂における口蓋突起内側縁上皮の超微形態, 歯基礎誌, 19, 288-299, 昭和52.

24)Walker,B.E. and Fraser,F.C. (1957): The embryology of cortisone-induced cleft palate. J. Embryol. Exp. Morphol., 5, 201-210.

25)Walker,B.E. and Patterson,A. (1978): Palate development after fetal tongue removal in cortisone-treated mice. Teratology, 17, 51-56.

26)Byyny,R.L., Orth,D.N., Cohen,S. and Doyne,E.S. (1974): Epidermal growth factor: Effects of androgens and adrenergic agents. Endocrinology, 95, 776-782.

27)Mukku,V.R. and Stancel,G.M. (1985): Regulation of epidermal growth factor receptor by estrogen. J.Biol.Chem., 260, 9820-9824.

28)Brown,M.J., Schultz,G.S. and Hilton,F.K. (1984): Intrauterine proximity to male fetuses predetermines level of epidermal growth factor in submandibular glands of adult female mice. Endocrinology, 115, 2318-2323.

29)Watney,M.J. and Miller,J.R. (1964): Prevention of a

genetically determined congenital eye anomaly in the mouse by the administration of cortisone during pregnancy. *Nature*, 202, 1029-1031.

30) 中津武, 伊原敏夫, Miller, J.R. (1984): 遺伝性眼瞼閉鎖不全マウス ($1g^{M1}$) の形質発現におよぼす糖質コルチコイドの影響, 先天異常, 24, 202, 昭和59.

31) Boyd, J., Harris, M.J. and Juriloff, D.M. (1984) *Mouse newsletter*, 70, 66-68.

32) 渡辺慶一, 中根一穂編 (1985): 改訂版酵素抗体法, 学際企画, 東京, 昭和60.

33) Gresik, E.W. and Azmitia, E.C. (1980): Age related changes in NGF, EGF and protease in the glanular convoluted tubules of the mouse submandibular gland. A morphological and immunocytochemical study. *J. Gerontol.*, 35, 520-524.

34) Shikata, H., Utsumi, N., Hiramatsu, M., Minami, N., Nemoto, N. and Shikata, T. (1984): Immunohistochemical localization of nerve growth factor and epidermal growth factor in guinea pig prostate gland. *Histochemistry*, 80, 411-413.

35) Gresik, E.W. and Barka, T. (1978): Immunocytochemical localization of epidermal growth factor during the postnatal development of the submandibular gland of the mouse. *Am. J. Anat.*, 151, 1-10.

36) Zimmerman, E.F. and Bowen, D. (1972): Distribution and

metabolism of triamcinolone acetonide in inbred mice with different cleft palate sensitivities. *Teratology*, 5, 335-344.

37) Calvert, R., Beaulieu, J.-F. and Menard, D. (1982): Epidermal growth factor (EGF) accelerates the maturation of fetal mouse intestinal mucosa in utero. *Experientia*, 38, 1096-1097.

38) Adamson, E.D. and Meek, J. (1984): The ontology of epidermal growth factor receptors during mouse development. *Dev. Biol.*, 103, 62-70.

39) Wee, E.L., Phillips, N.J., Babiarczyk, B.S. and Zimmerman, E.F. (1980): Palatal morphogenesis V. Effects of cholinergic agonists and antagonists on rotation in embryo culture. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 58, 177-193.

40) Kuhn, E.M., Babiarczyk, B.S., Lessard, J.L. and Zimmerman, E.F. (1980): Palatal morphogenesis. I. Immunological and ultrastructural analyses of mouse palate. *Teratology*, 21, 209-223.

41) Greene, R.M. and Pratt, R.M. (1977): Inhibition by diazo-oxo-norleucine (DON) of rat palatal glycoprotein synthesis and epithelial cell adhesion in vitro. *Exp. Cell Res.*, 105, 27-37.

42) Pratt, R.M. and Greene, R.M. (1976): Inhibition of palatal epithelial cell death by altered protein synthesis. *Dev. Biol.*, 54, 135-145.

43)Greene,R.M. and Pratt,R.M. (1978): Inhibition of epithelial cell death in the secondary palate in vitro by alteration of lysosome function. J. Histochem. Cytochem., 26, 1109-1114.

44)Chepenik,K.P., George,M. and Greene,R.M. (1985): Effects of dexamethasone on phospholipase activities in palate mesenchyme cells in vitro. Teratology, 32, 119-123.

45)Baker,J.B., Barsh,G.S., Carney,D.H. and Cunningham,D.D. (1978): Dexamethasone modulates binding and action of epidermal growth factor in serum-free cell culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1882-1886.

46)Wilson,J.G. and Warkany,J. (1965): Teratology: principles and techniques. Univ. of Chicago Press, Chicago, 38-55: from Vekemans,M.J.J. and Biddle,F.G. (1984): Genetics of palatal development. Curr. Top. Dev. Biol., 19, 165-192.

47)Salomon,D.S. and Pratt,R.M. (1976): Glucocorticoid receptors in murine embryonic facial mesenchyme cells. Nature, 264, 174-177.

48)Butley,M.S., Erickson,R.P. and Pratt,W.B. (1978): Hepatic glucocorticoid receptors and the H-2 locus. Nature, 275, 136-138.

49)Goldman,A.S., Katsumata,M., Yaffe,S. and Shapiro,B.H. (1976): Correlation of palatal cortisol receptor levels

with susceptibility to cleft palate teratogenesis. *Teratology*, 13, 22A-23A.

50) Hirata, Y., Sueoka, S., Uchihashi, M., Yoshimoto, Y., Fujita, T., Matsukura, S. and Motoyama, T. (1982): Specific binding sites for epidermal growth factor and its effect on human chorionic gonadotrophin secretion by cultured tumour cell lines: comparison between trophoblastic and non-trophoblastic cells. *Acta Endocrinol.*, 101, 281-286.

51) Lai, W.H. and Guyda, H.J. (1984): Characterization and regulation of epidermal growth factor receptors in human placental cell cultures. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 58, 344-352.

52) O'Keefe, E., Hollenberg, M.D. and Cuatrecasas, P. (1974): Epidermal growth factor. Characteristics of specific binding in membranes from liver, placenta and other target tissues. *Arch. Biochem. Biophys.*, 164, 518-526.

53) Hock, R.A. and Hollenberg, M.D. (1980): Characterization of the receptor for epidermal growth factor-urogastrone in human placenta membranes. *J. Biol. Chem.*, 255, 10731-10736.

54) Carson, S.A., Chase, R., Ulep, E., Scommegna, A. and Benveniste, R. (1983): Ontogenesis and characteristics of epidermal growth factor receptors in human placenta. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 147, 932-939.

- 55) Rao, Ch.V., Ramani, N., Chegini, N., Stadig, B.K., Carman, F.R., Jr., Woost, P.G., Schultz, G.S. and Cook, C.L. (1985): Topography of human placental receptors for epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.*, 260, 1705-1710.
- 56) Chiegini, N. and Rao, Ch.V. (1985): Epidermal growth factor binding to human amnion, chorion, decidua and placenta from mid- and term pregnancy: Quantitative light microscopic autoradiographic studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 61, 529-535.
- 57) Benveniste, R., Speeg, K.V., Jr., Carpenter, G., Cohen, S., Lindner, J. and Rabinowitz, D. (1978): Epidermal growth factor stimulates secretion of human chorionic gonadotropin by cultured human choriocarcinoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 46, 169-172.
- 58) Bahn, R.B., Speeg, K.V., Jr., Ascoli, M. and Rabin, D. (1980): Epidermal growth factor stimulates production of progesterone in cultured human choriocarcinoma cells. *Endocrinology*, 107, 2121-2123.
- 59) Huot, R.I., Foldart, J.-M., Nardone, R.M. and Stromberg, K. (1981): Differential modulation of human chorionic gonadotropin secretion by epidermal growth factor in normal and malignant placental cultures. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 53, 1059-1063.
- 60) Langman, J. and Faassen, F.V. (1955): Congenital defects in the rat embryo. After partial thyroidectomy

of the mother animal: A preliminary report on the eye defects. Am.J.Ophthalmol., 40, 65-76.

61) Woollam, D.H.A. and Millen, J.W. (1960): Influence of thyroxine on the incidence of harelip in the "Strong A" line of mice. Brit.Med.J., 23, 1253-1254.

62) Westermarck, K., Karlsson, F.A. and Westermarck, B. (1983): Epidermal growth factor modulates thyroid growth and function in culture. Endocrinology, 112, 1680-1686.

63) Moore, G.P.M., Panaretto, B.A. and Wallace, A.L.C. (1984): Treatment of ewes at different stages of pregnancy with epidermal growth factor: effects on wool growth and plasma concentrations of growth hormone, prolactin, placental lactogen and thyroxine and on foetal development. Acta Endocrinol., 105, 558-566.

脚注

大阪大学歯学部口腔外科学第二講座（主任：作田正義教授）
本論文の要旨は、第39回日本口腔科学会総会（昭和60年5月、仙台）および第30回日本口腔外科学会総会（昭和60年9月、東京）において一部発表した。

図表の説明

表1 A/J マウスでのCA,EGF投与の唇裂口蓋裂発生率への影響

A/J マウスに下記の薬剤を妊娠11日から14日まで腹腔内に注射し、妊娠18日に胎仔を摘出して観察した。

コントロール：生理的食塩水0.2 ml

CA : cortisone acetate 100 μ g/g body weight

EGF10 : epidermal growth factor 0.4 μ g/g body weight

EGF20 : epidermal growth factor 0.8 μ g/g body weight

生存胎仔数の割合はコントロールに比較して他の4グループで有意差は認められなかった。また唇裂と口蓋裂を有する胎仔の割合は、コントロールにくらべてすべての薬剤投与グループで有意差は認められなかった(カイ二乗検定、表3参照)。

表2 C57BL/6NマウスでのCA投与の唇裂口蓋裂発生率への影響

C57BL/6Nマウスに生理的食塩水0.2ml(コントロール)あるいはCA(100 μ g/g body weight)を妊娠11日から14日に腹腔内に注射し妊娠18日に胎仔を取り出して観察した。CAを投与しても、生存胎仔の割合に有意差はみられなかった(カイ二乗検定)。しかし口蓋裂のみを有する胎仔数は有意に増加した($p<0.01$ Fisher正確確率検定)。

表3 A/J マウスでのCA,EGF投与による口蓋裂発生率の変化についてのカイ二乗検定結果

各種薬剤を妊娠11日から14日まで腹腔内に注射し、妊娠18日に胎仔を摘出して観察した結果について、カイ二乗検定を行なった。CA(100 μ g/g body weight)とコントロール(生理的食塩水)、CAとEGF20(0.8 μ g/g body weight)、CA+EGF20とコントロール、CA+EGF20とEGF20 およびCAとCA+EGF20間で、口蓋裂のみを有する胎仔数に有意差を認めた。

表4 CA,EGF投与による妊娠15日目のA/J マウスでの口蓋突起の水平転位・上皮菲薄化への影響

母体に妊娠11日から14日に各種薬剤を投与し、妊娠15日に胎仔を摘出した。そして組織切片を作製し口蓋突起の状態を観察した。表はその結果を

水平転位あるいは正中縁端上皮の菲薄化の

明らかに起こっている胎仔数

観察胎仔数

(%)

で表わしたものである。

CA (100 μ g/g body weight)を投与した場合、妊娠15日の胎仔で口蓋突起の水平転位・上皮の菲薄化の観察されたものはそれぞれ 69%, 54% であったが、EGF20(0.8 μ g/g body weight)をCAに併用するとコントロール(生理的食塩水)とほぼ同様に水平転位・上皮の菲薄化が観察された。

表5 EGF, CA投与によるA/J マウス胎仔(雌雄別)の先天異常発生率への影響
母体に妊娠11日から14日に各種薬剤を投与し、妊娠18日に胎仔を摘出して観察した。表はその結果を

各先天異常の発生した胎仔数/観察胎仔数 (%)

で雌雄別に表わしたものである。

CA (100 μ g/g body weight)、EGF20(0.8 μ g/g body weight)、生理的食塩水(コントロール)等を投与したグループおよび無処置のグループすべてを合計して胎仔の雌雄別先天異常発生率を調べた。その結果唇裂を伴った口蓋裂の発生率、眼瞼開裂の発生率に有意な雌雄差が認められた。しかし口蓋裂のみを有する胎仔の発生率に有意差は認められなかった。

表6 EGF, CA投与のマウス胎仔EGF濃度への影響

妊娠11日、12日にマウス母体に各種薬剤を腹腔内に注射し、妊娠13日に胎仔を摘出した。3～5匹の胎仔をホモジナイズ後遠沈し、得られた胎仔上清を用いて本文中に記述した方法でラジオイムノアッセイを行ないEGF濃度を測定した。A/Jマウスのコントロール(生理的食塩水)では5回、CA(100 μ g/g body weight)投与グループでは4回、EGF20(0.8 μ g/g body weight)投与グループでは3回、CA+EGF20投与グループでは1回、またC57BL/6Nマウスのコントロールでは1回このようにEGF濃度を測定した。コントロールに比較してCA、EGF20を投与してもEGF濃度の有意な変化は測定されなかった(t検定)。

表7 A/J マウス母体に投与したEGFの胎盤通過性の測定結果

125 I-EGF 約10000cpmを妊娠11日から14日に2匹のA/Jマウス母体に4回腹腔内に注射した。そして妊娠15日にその胎仔を2匹と3匹それぞれ取り出し十分洗浄した後、胎仔1匹ずつ放射活性を測定した。その結果と、同様に生理的食塩水を投与した2匹のA/Jマウスから得た5匹のコントロールの胎仔の結果には、有意差は認められなかった(t検定)。

表8 胎仔上清の器官培養における口蓋正中縁端上皮消失への効果

妊娠13日の胎仔口蓋突起を片側ずつメンブランフィルター上で48時間培養した。表はその結果を

明らかに上皮の消失の見られた口蓋突起数/観察口蓋突起数(%)

で表わしたものである。

A/J マウス胎仔口蓋突起にA/J マウスのCA (100 $\mu\text{g/g}$ body weight) 投与胎仔上清をタンパク量が1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加した場合、50% のみ上皮の消失が認められたのに対して、A/J マウスの CA+EGF20 (0.8 $\mu\text{g/g}$ body weight) 投与胎仔上清を添加した場合には、すべての口蓋突起で上皮が消失し有意差が認められた(*, $p<0.02$, Fisher正確確率検定)。しかしC57BL/6Nマウス胎仔口蓋突起にA/J マウスのCA 投与胎仔上清をタンパク量が1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加しても83%の口蓋突起で上皮の消失がみられ、A/J マウスの CA+EGF20投与胎仔上清やA/J マウスの無処置胎仔上清を添加した場合と有意差は認められなかった(Fisher正確確率検定)。

図1 A/JマウスのEGF, CA投与による口蓋裂発生率の変化

表1より各薬剤投与グループでの、正常口蓋を有する胎仔(□)、口蓋裂のみを有する胎仔(■)の割合を表わした。CA (100 $\mu\text{g/g}$ body weight) にEGF20 (0.8 $\mu\text{g/g}$ body weight) を併用することによって、正常口蓋を有する胎仔の割合は増加し、口蓋裂のみを有する胎仔の割合は減少した。CA投与グループとCA+EGF20投与グループに有意差を認めた($p<0.01$ 、カイ二乗検定、表3参照)。

図2 A 妊娠14日無処置A/Jマウス胎仔口蓋

口蓋突起の水平転位がみられる(倍率40倍)。

B 妊娠15日無処置A/Jマウス胎仔口蓋

口蓋突起が融合しつつある(倍率40倍)。

C 妊娠15日EGF+CA投与A/Jマウス胎仔口蓋

口蓋突起正中縁端上皮の菲薄化がみられる(倍率100倍)。

D 妊娠15日CA投与A/Jマウス胎仔口蓋

水平転位が観察されなかった口蓋突起(倍率40倍)。

図3 A/JマウスでのCA, EGF投与による眼瞼開裂発生率の変化

A/Jマウスに各種薬剤を妊娠11日から14日まで腹腔内に注射し、妊娠18日に胎仔を摘出して唇裂口蓋裂の有無を調査すると同時に、すべての胎仔で眼瞼開裂の有無を観察した。その結果コントロール(生理的食塩水)、CA (100 $\mu\text{g/g}$ body weight) 投与グループで

それぞれ生存胎仔数の5.2, 6.6%に眼瞼開裂がみられたのに対して、EGF 20 (0.8 μ g/g body weight) 投与グループでは、1.5%とやや少ないように思われた。しかし有意差は認められなかった。

図4 CA, EGF投与によるA/J マウス胎仔の体重の変化

in vivoでの唇裂口蓋裂の発生率の調査時(妊娠18日)に、すべてのマウスで胎仔の体重測定を行ない、その平均値 $\pm$ S.D.を図に表わした。A/Jマウスではコントロール(生理的食塩水)に比較して、CAを投与した3グループ(*)で有意な($p < 0.05$, t 検定)胎仔の体重減少が認められた。しかしEGF 20 (0.8 μ g/g body weight)のみの投与では、コントロールと有意差は認められなかった。

図5 本文中に記述した方法で組織中のEGFをPAP法を用いて染色した。

A メスC57BL/6Nマウス顎下腺中のEGFの染色

EGFを産生している顎下腺をポジティブコントロールとして染色した。3匹の顎下腺で実施し、同様の結果が得られた(倍率200倍)。

B Aのコントロール

Aと同一の3顎下腺で抗EGF家兎血清のかわりに正常家兎血清を使用すると茶色の発色は認められなかった。(ネガティブコントロール、倍率200倍)。

C 無処置のC57BL/6Nマウスの妊娠13日目の胎仔口蓋突起後縁部のEGFの染色

上皮を中心に茶色の発色があり、EGFの局在が認められた(1胎仔で実施、倍率400倍)。右上挿入写真は、上皮の拡大像を示す(倍率1000倍)。

D CA+EGF20を妊娠11日から13日に投与したA/Jマウスの妊娠14日目の胎仔口蓋突起中のEGFの染色

上皮を中心にわずかではあるが、EGFの局在が認められた。2胎仔で実施し、同様の結果が得られた(倍率400倍)。

E Dのネガティブコントロール

Dとほぼ同一部位を使用したか、茶色の発色は認められなかった(倍率400倍)。

F 無処置のA/Jマウス妊娠15日目の胎仔口蓋突起融合部のEGFの染色

左右の口蓋突起が写真では上下からのび、中央で融合している。融合部の上皮、これから吸収されるであろう上皮残遺物で茶色の発色がみられ、EGFの局在が認められた。2胎仔で実施し、同様の結果が得られた(倍率400倍)。

G Fのネガティブコントロール

Fとほぼ同一部位を使用したか、茶色の発色は認められなかった

(倍率400 倍)。

図6 ラジオイムノアッセイ標準曲線

図7 CA, EGF投与胎仔上清のMEPM細胞でのDNA合成に対する効果

2.5 × 10⁴ 個/ディッシュのMEPM細胞を17mmディッシュに接種し5日間培養後、培養液を牛胎仔血清を含まないものに交換し、24時間培養後培養液を胎仔上清を含んだものに交換した。20時間インキュベートしたのち1 μCi/ディッシュの³H-チミジンを加え、さらに4時間インキュベートした。そして本文中に記載した方法に従って、³H-チミジンの取り込みを測定した。各胎仔上清各濃度について3ディッシュずつ1回測定し、その平均値±S. D. を図に表わした。

胎仔上清をタンパク量10 μg/mlで添加した時、3グループ間で³H-チミジンの取り込みに有意差が認められた (*p<0.05, ★p<0.01 t検定)。

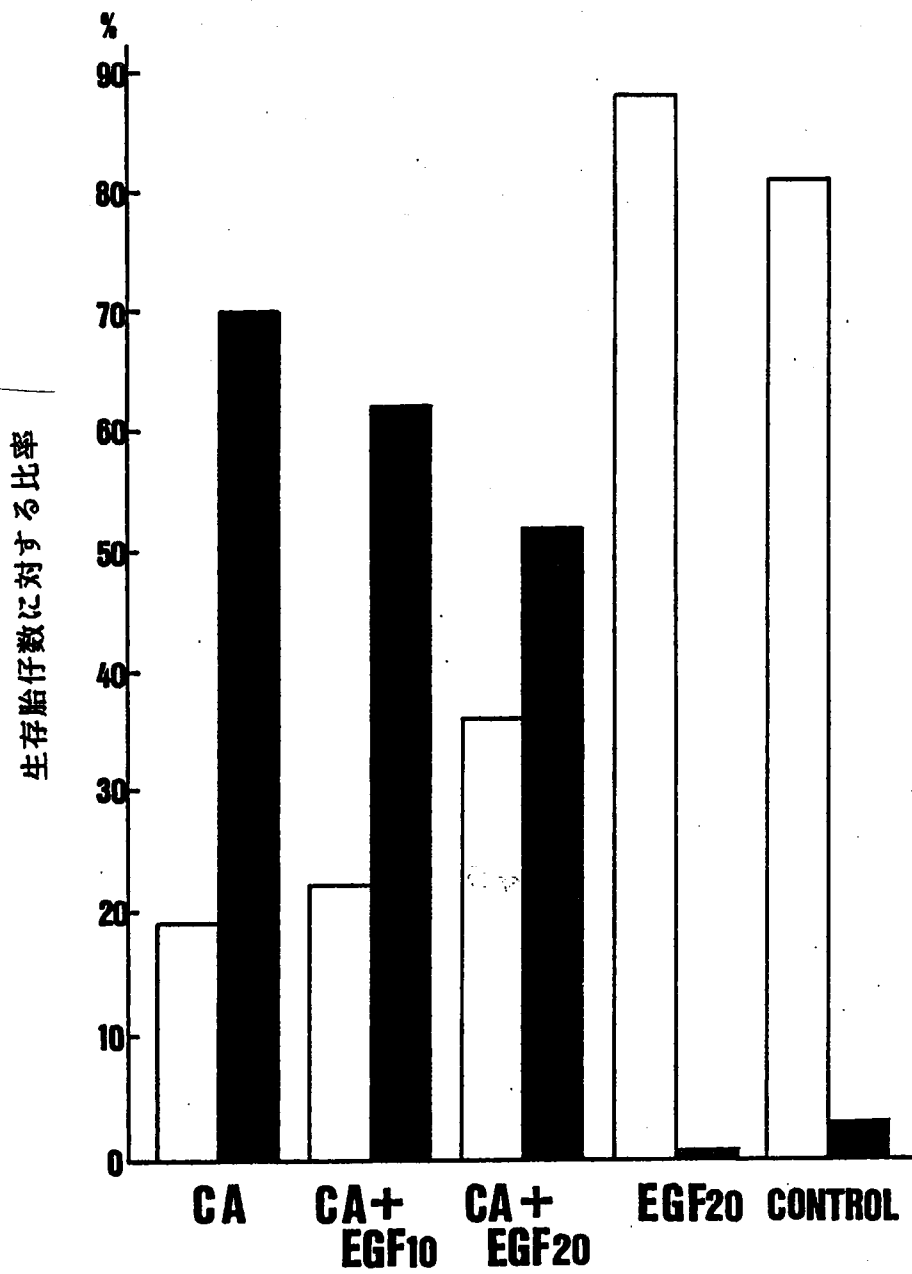
図8 CA, EGF投与胎仔上清のHEPM細胞でのDNA合成に対する効果

MEPM細胞と同様に2 × 10⁴ 個/ディッシュのHEPM細胞を17mmディッシュに接種し3日間培養後、牛胎仔血清を含まない培養液中で24時間培養し、培養液を胎仔上清を含んだものに交換した。20時間インキュベートしたのち1 μCi/ディッシュの³H-チミジンを加え、さらに4時間インキュベートし³H-チミジンの取り込みを測定した。各胎仔上清について3ディッシュずつ(無添加は4ディッシュ)1回測定し、その平均値±S. D. を図に表わした。

胎仔上清無添加の場合に比較して、A/JマウスのCA (100 μg/g body weight) + EGF20 (0.8 μg/g body weight) 投与胎仔上清を添加したもので、有意な³H-チミジンの取り込みの増加が認められた (*p<0.05、t検定)。

図9 A 器官培養で口蓋突起の正中縁端上皮の消失の認められた一例(倍率200倍)。

B 器官培養で口蓋突起の正中縁端上皮の消失の認められなかった一例(倍率200倍)。



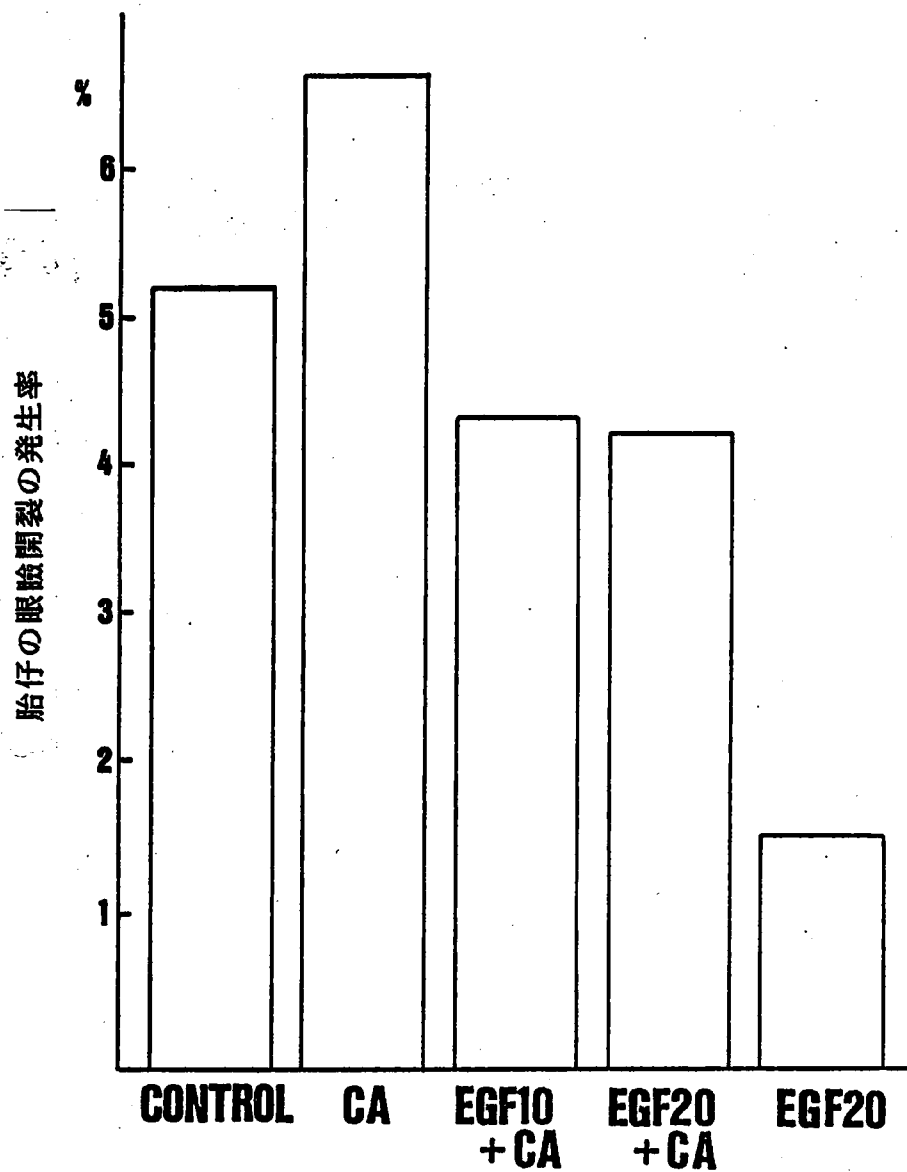


図 3

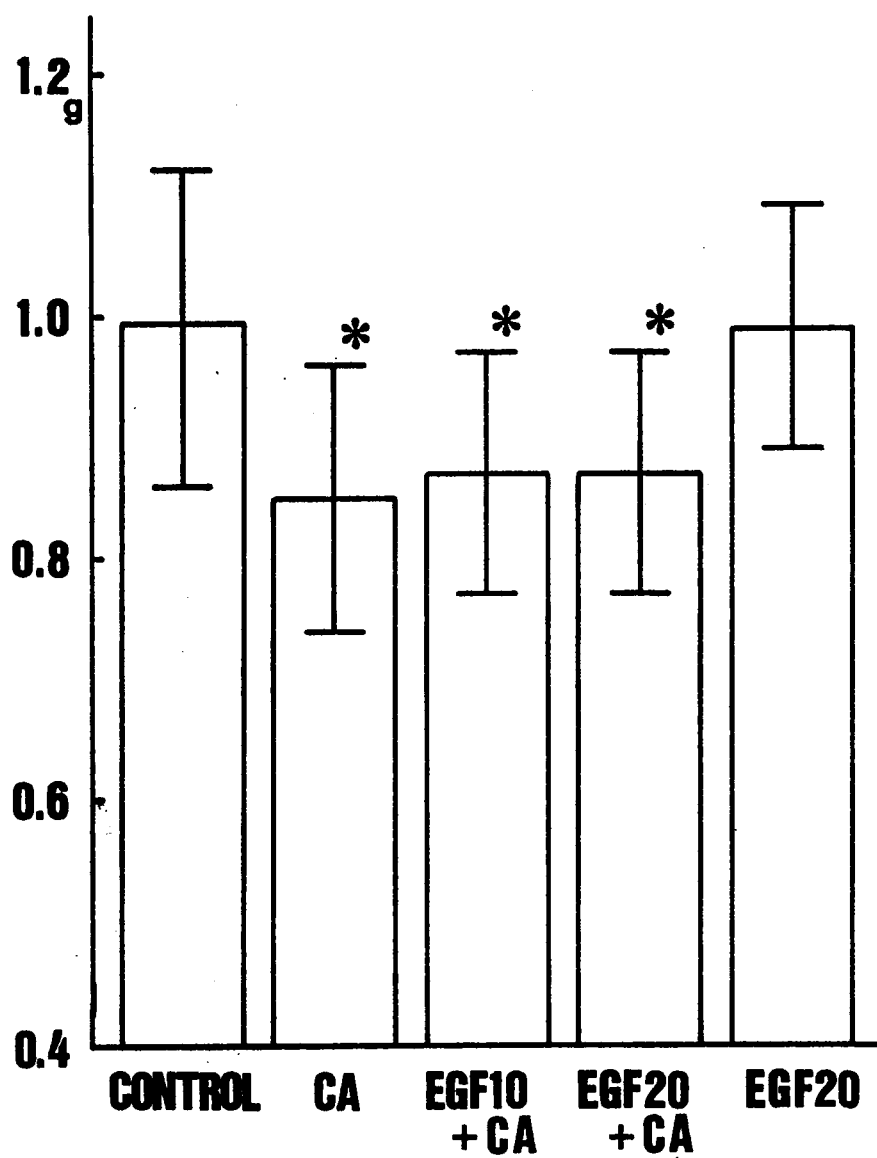


图 4

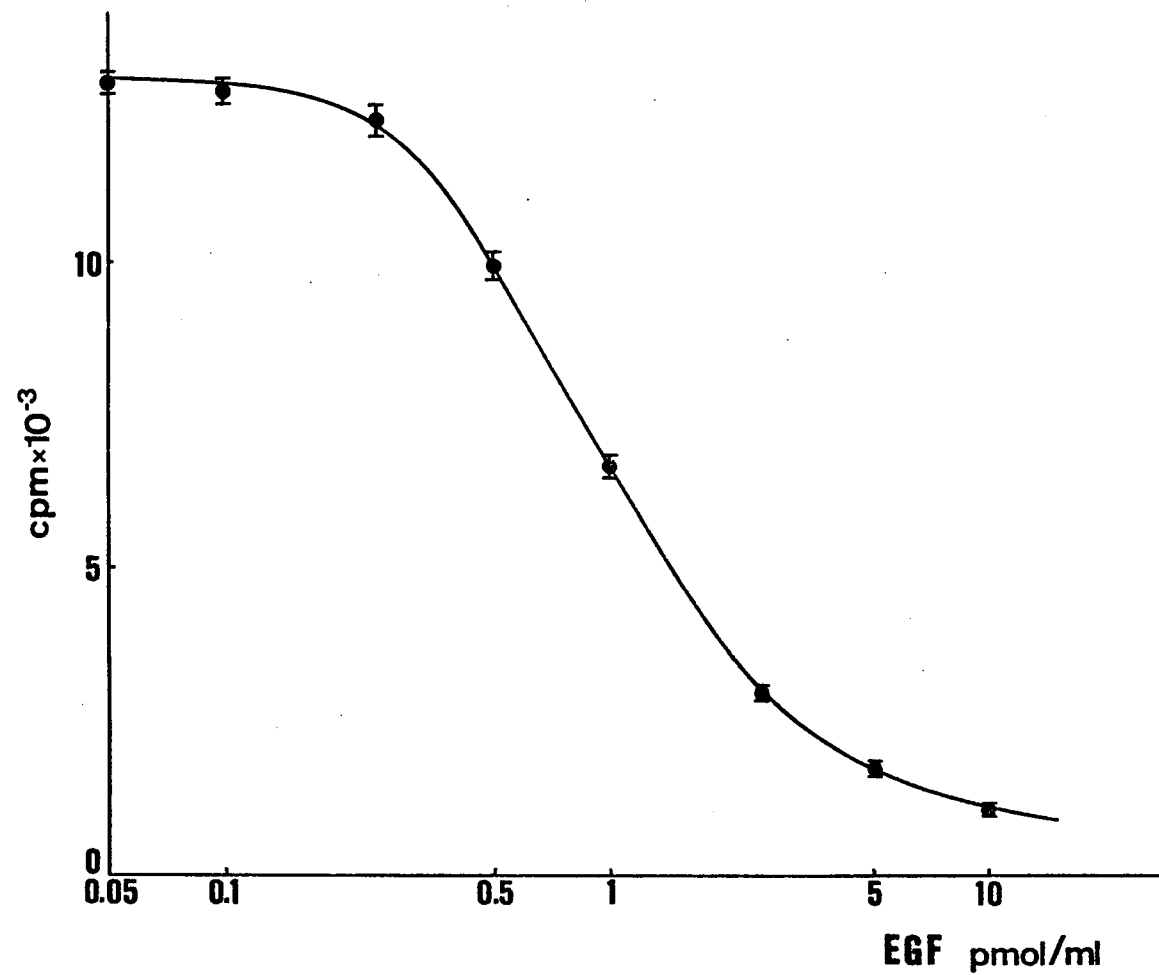


图 6

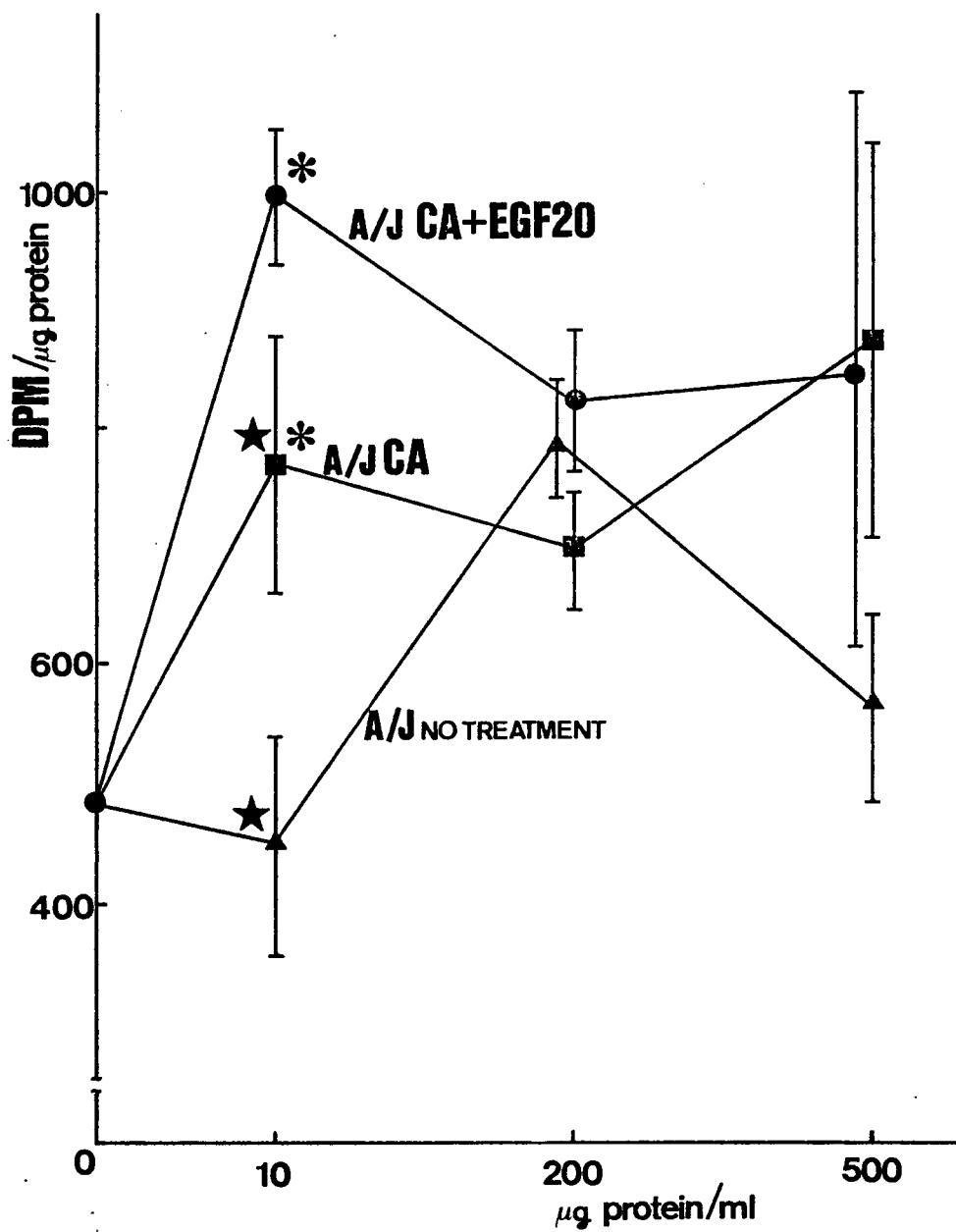


图 7

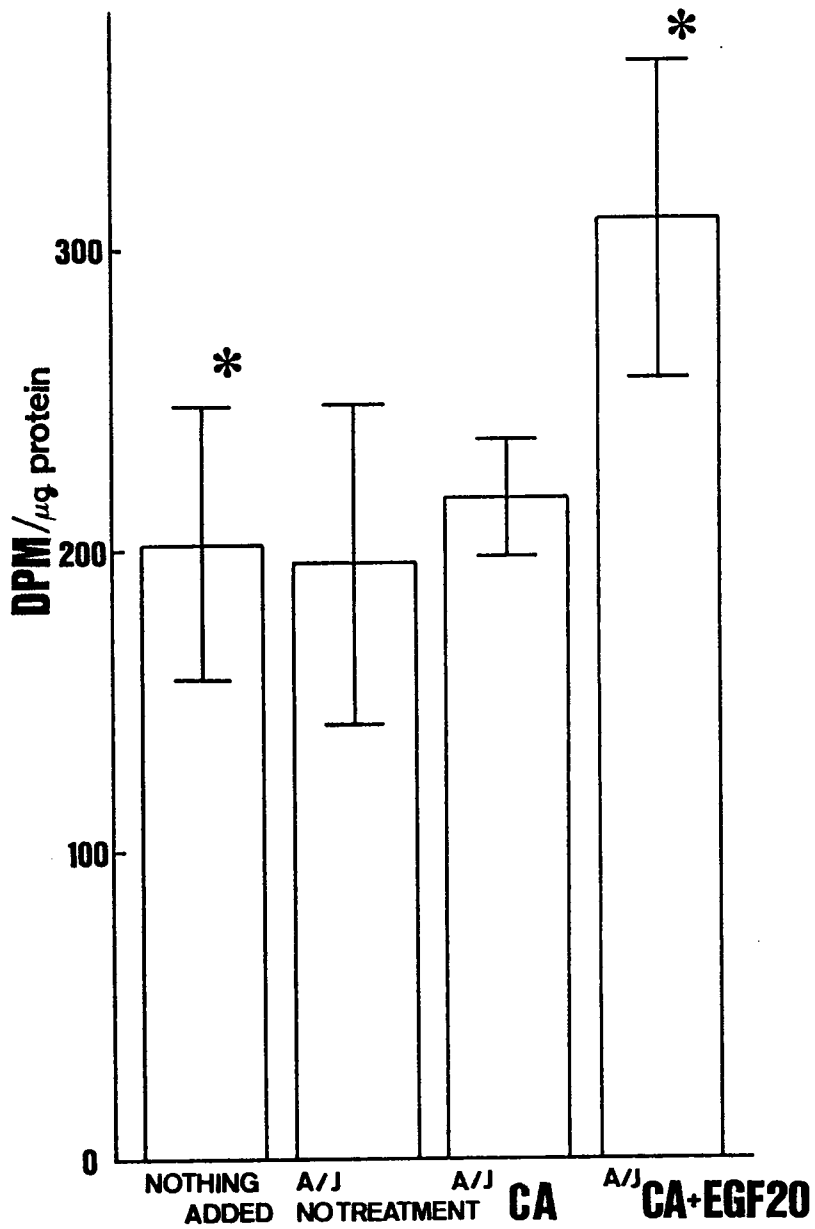


表 1

投与薬剤	着床数 (母獣数)	生存胎仔数 (%) ¹	口蓋裂のみを有する 胎仔数 (%) ²	唇裂と口蓋裂を有す る胎仔数 (%) ²
CONTROL	126 (16)	96 (76)	3 (3)	15 (15)
CA	174 (24)	122 (70)	85 (70)	14 (11)
CA+EGF10	99 (12)	69 (70)	43 (62)	11 (16)
CA+EGF20	138 (15)	95 (69)	49 (52)	12 (13)
EGF20	84 (11)	67 (80)	1 (1)	7 (10)

1. 着床数に対する%
2. 生存胎仔数に対する%

表 2

投与薬剤	着床数 (母獣数)	生存胎仔数 (%) ¹	口蓋裂のみを有する 胎仔数 (%) ²	唇裂と口蓋裂を有す る胎仔数 (%) ²
CONTROL	102 (12)	92 (91)	0 (0)	0 (0)
CA	135 (19)	118 (87)	13 (11)	0 (0)

1. 着床数に対する%

2. 生存胎仔数に対する%

表3

		着床したが 吸収された数 対 生存胎仔数	正常口蓋を 有する胎仔数 対 異常な唇・口蓋 を有する胎仔数	唇裂と口蓋裂を 有する胎仔数 対 その他のすべて の生存胎仔数	口蓋裂のみを 有する胎仔数 対 その他のすべて の生存胎仔数
EGF20	CONTROL 対	0.37	1.36	0.91	0.02*
CA	CONTROL 対	1.36	84.12 #	0.80	96.09*#
CA+EGF20	CONTROL 対	1.78	40.69 #	0.35	54.16*#
EGF20	CA 対	2.69	84.33 #	0.05	78.35*#
EGF20	CA+EGF20 対	3.16	43.90 #	0.18	43.87*#
CA	CA+EGF20 対	0.06	7.91 #	0.07	7.40 #

* : Yatesの補正を行なったもの

: 有意差あり $p < 0.01$

表 4

投与薬剤	CONTROL		C A		C A + E G F 2 0		E G F 20	
口蓋突起の水平転位・正中縁端上皮の菲薄化の観察されたもの（％）	水平転位	菲薄化	水平転位	菲薄化	水平転位	菲薄化	水平転位	菲薄化
	9 / 1 0 (9 0)	8 / 1 0 (8 0)	9 / 1 3 (6 9)	7 / 1 3 (5 4)	8 / 9 (8 9)	8 / 9 (8 9)	11/11 (100)	10/11 (9 1)

表5

投与薬剤	先天異常発生率(%)					
	口蓋裂のみ		唇裂と口蓋裂		眼瞼開裂	
	オス	メス	オス	メス	オス	メス
無処置	2/57(4)	0/49(0)	7/57(12)	4/49(8)	7/57(12)	1/49(2)
生理的食塩水	1/52(2)	2/44(5)	10/52(19)	5/44(11)	5/52(10)	0/44(0)
EGF20	1/29(3)	0/38(0)	6/29(21)	1/38(3)+	0/29(0)	1/38(3)
CA+EGF20	18/45(40)	31/50(62)	7/45(16)	5/50(10)	3/45(7)	1/50(2)
CA+EGF10	20/40(50)	23/29(79)	9/40(23)	2/29(7)	1/40(3)	2/29(7)
CA	45/70(64)	40/52(77)	10/70(14)	4/52(8)	5/70(7)	3/52(6)
合計	87/293(30)	96/262(37)	49/293(17)	21/262(8)*	21/293(7)	8/262(3)*

#,*,+:雌雄間で有意差を認めた (* p<0.05, # p<0.01, カイ二乗検定)
 (+ p<0.05 Fisher正確確率検定)

表 6

マウスstrain	A / J				C57BL/6N
投与薬剤	CONTROL	CA	EGF 20	CA+EGF20	CONTROL
平均値±S.D. pmol/g wet weight	0.88±0.42	0.87±0.14	0.76±0.21	0.80	0.56

表 7

¹²⁵ I - EGF	C O N T R O L
55.2±3.7 cpm	48.6±6.3 cpm

表 8

	口蓋突起を摘出したマウスのstrain		
	A/J(1 μ g/ml)	A/J(10 μ g/ml)	C57(1 μ g/ml)
無添加	6/6 (100)	—	5/5 (100)
A/J CA投与胎仔上清	4/8 (50)*	3/8 (38)	10/12 (83)
A/J CA+EGF20投与胎仔上清	11/11 (100)*	6/10 (60)	11/14 (79)
A/J EGF 20投与胎仔上清	11/13 (85)	—	3/4 (75)
A/J 無処置胎仔上清	9/10 (90)	4/4 (100)	7/7 (100)
C57BL/6N無処置胎仔上清	—	—	11/12 (92)

1. : 添加上清中のタンパク量



图 2A

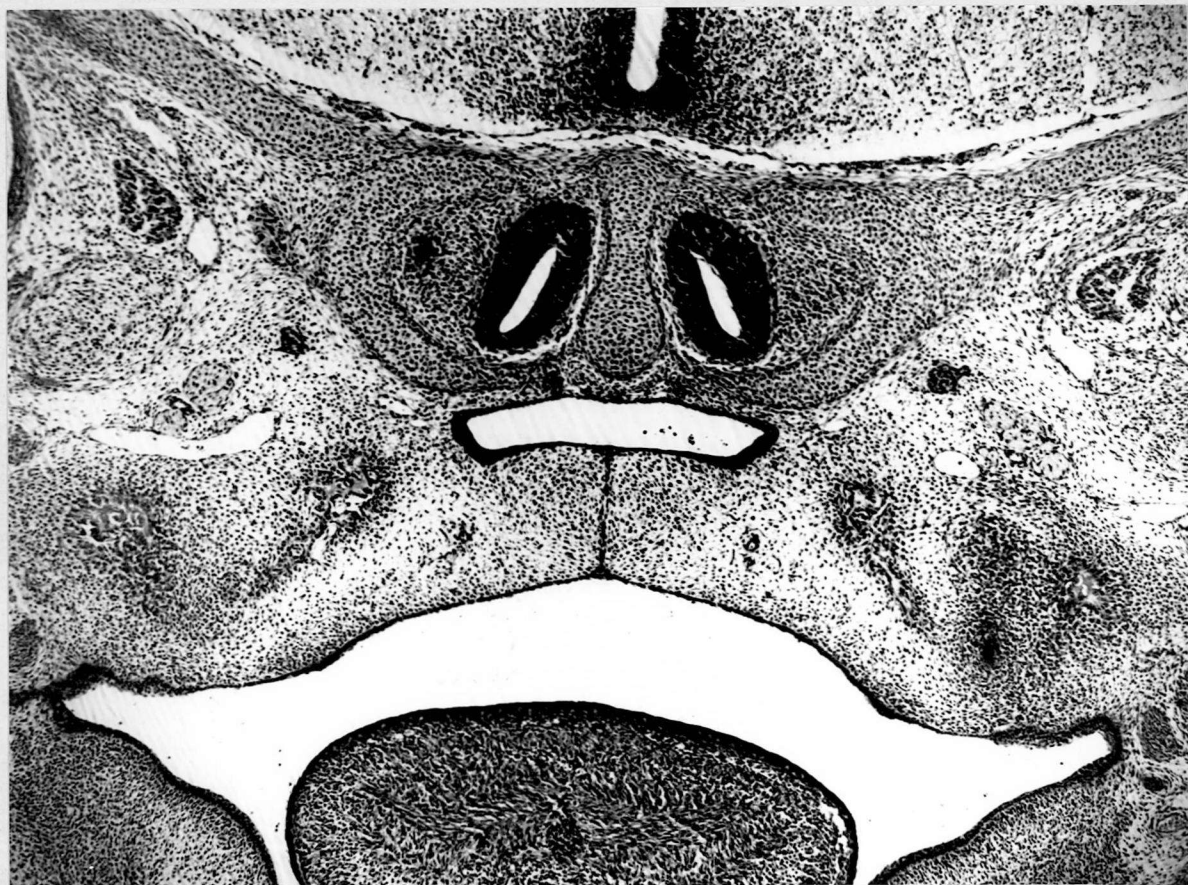


图 2B

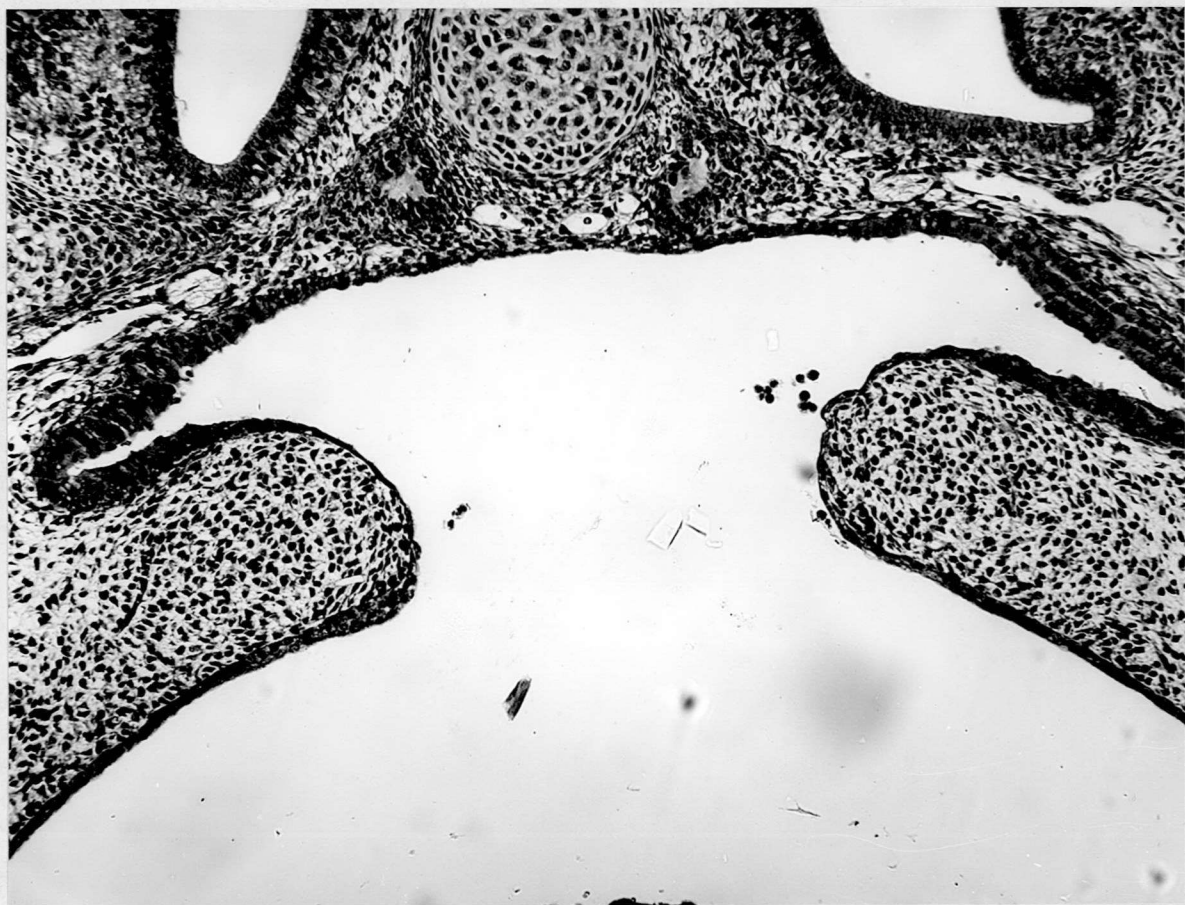


圖 2 C



图 2D

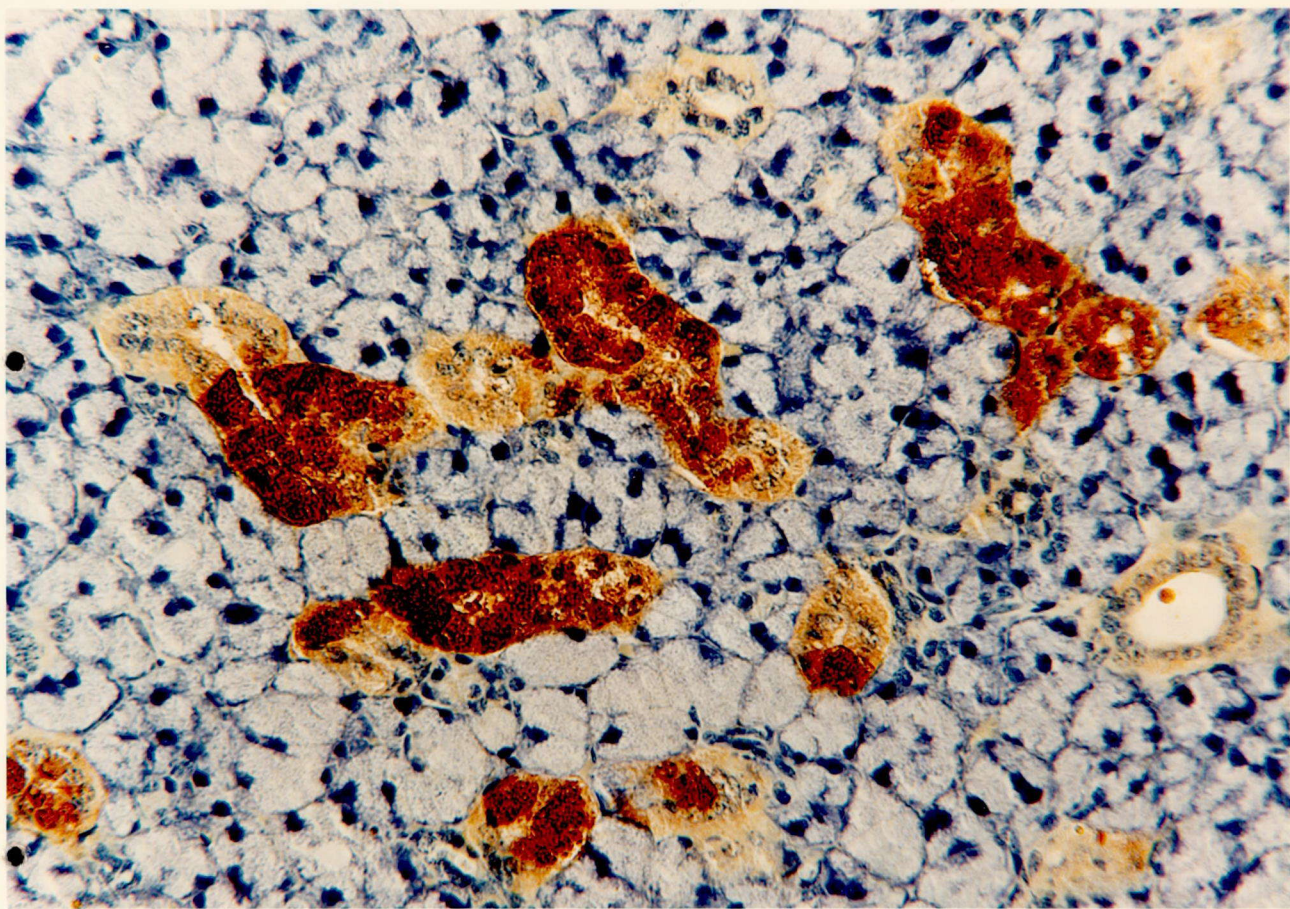


图 5A

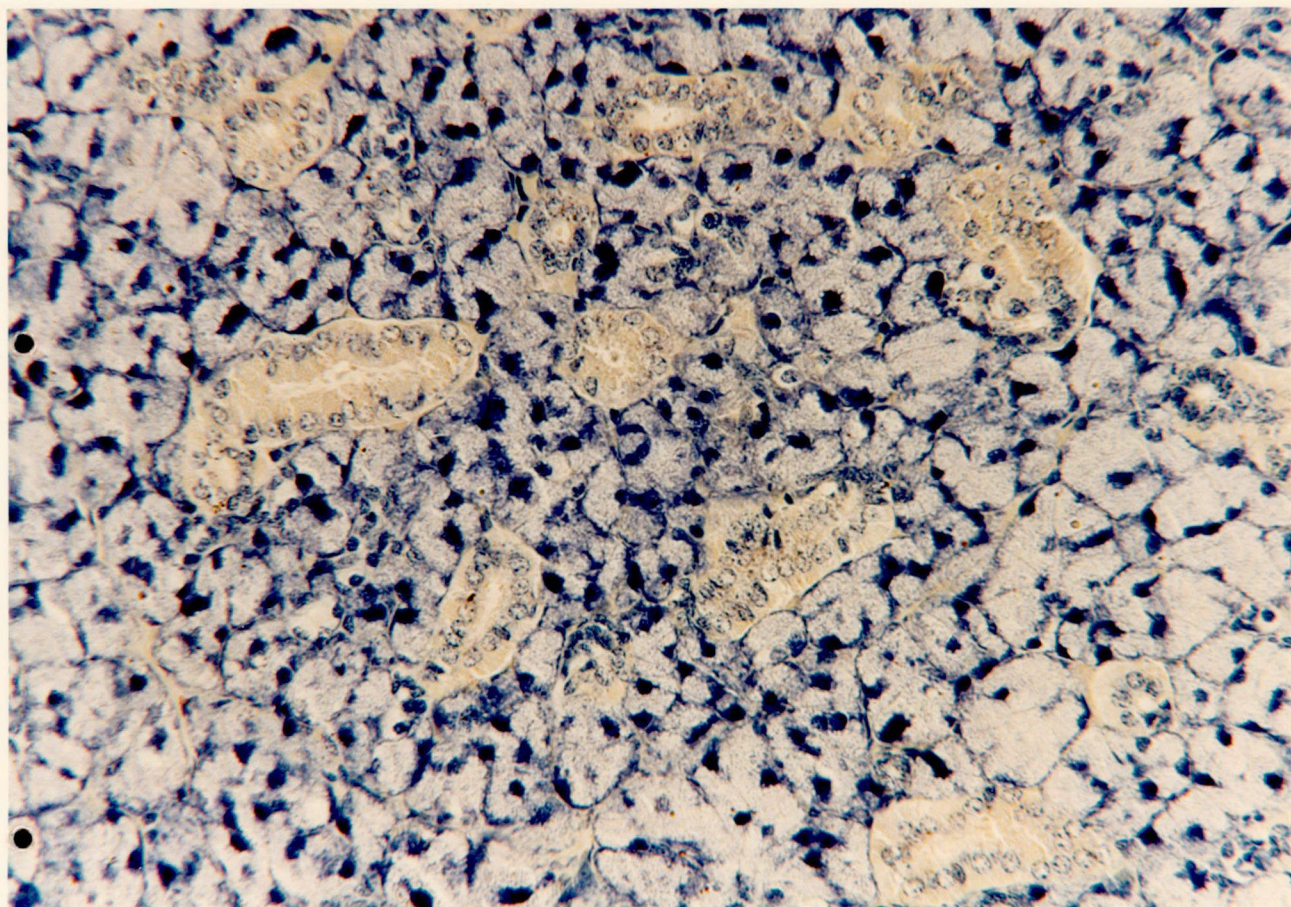


图 5B

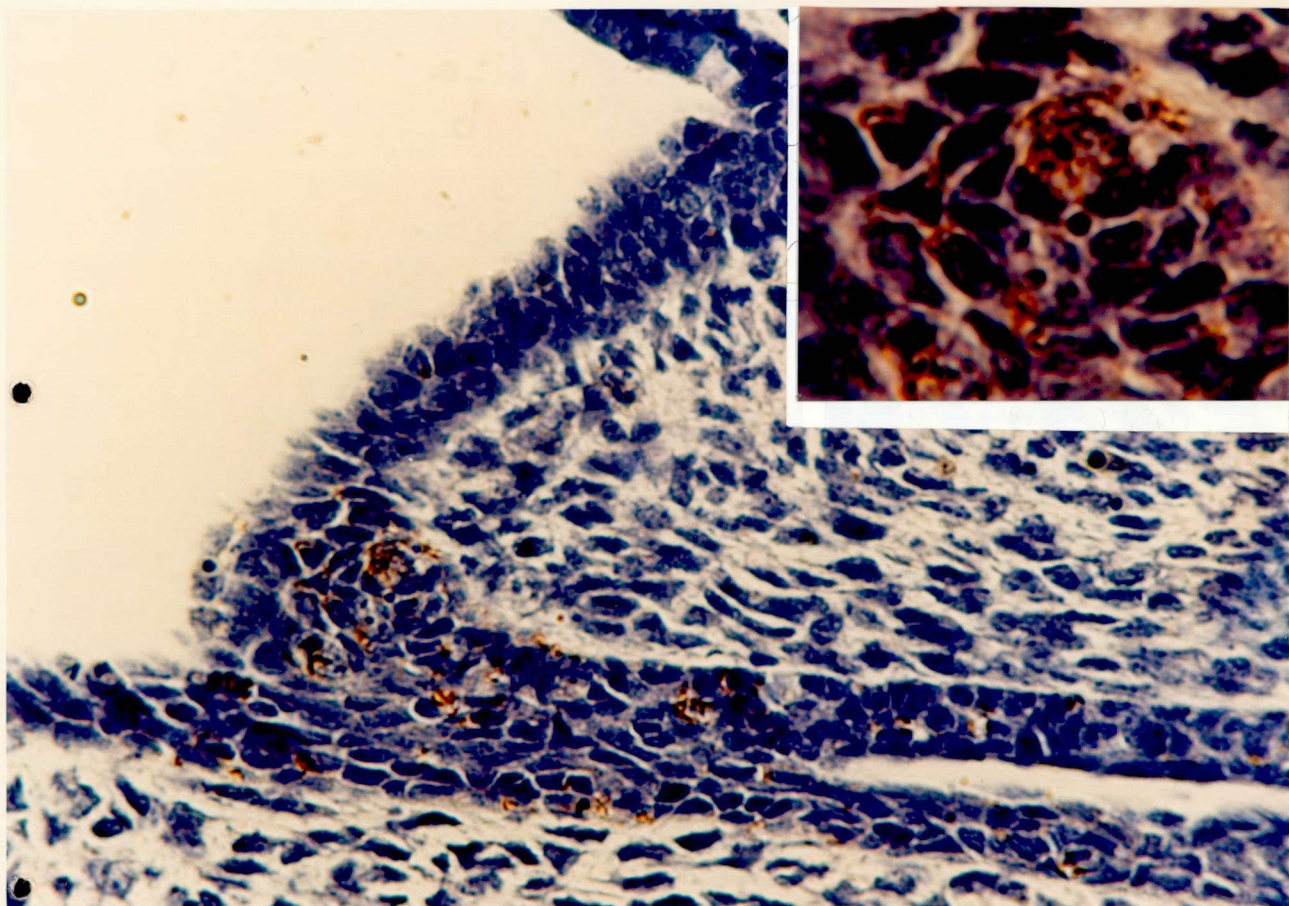


图 5c

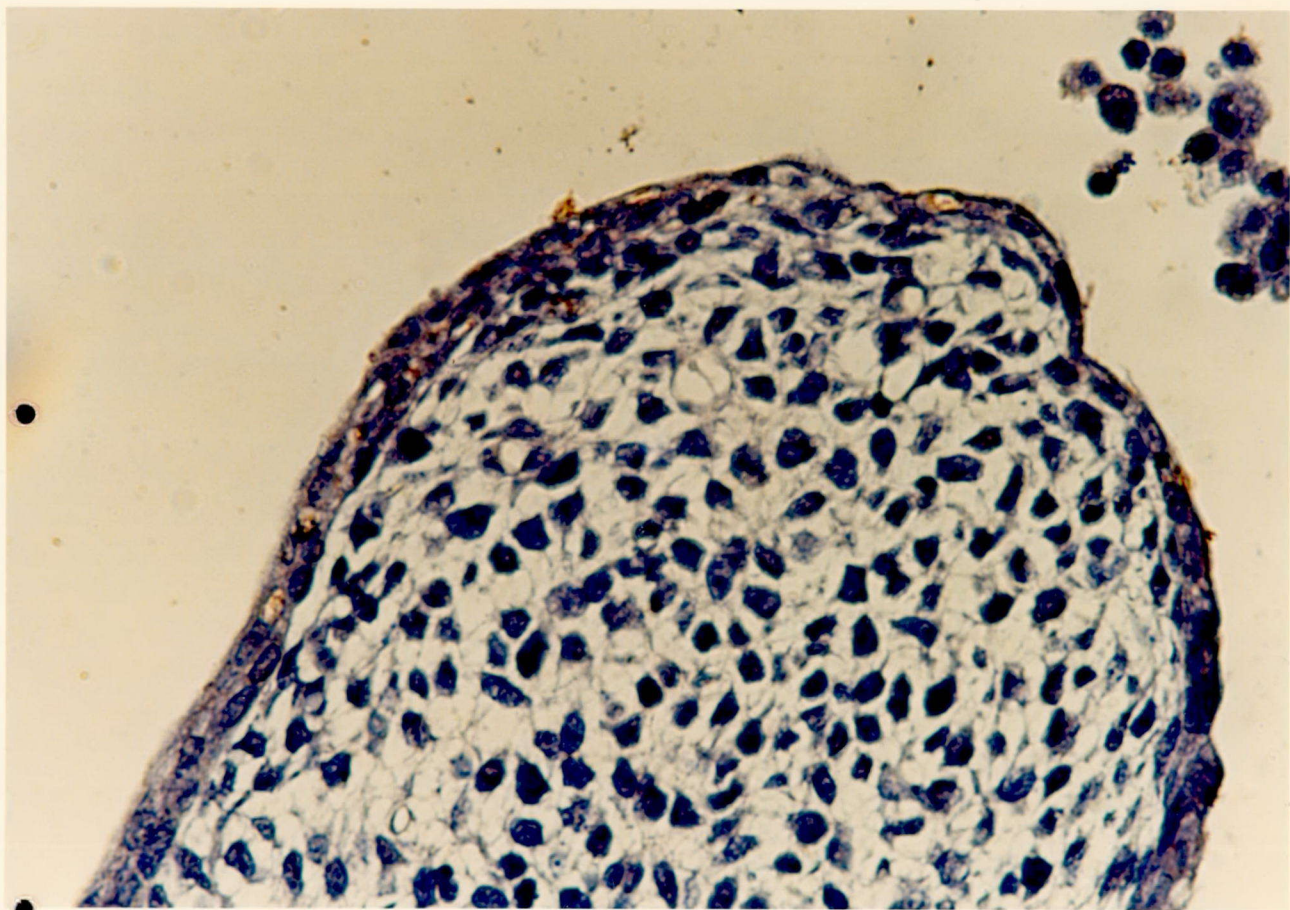


图 5D

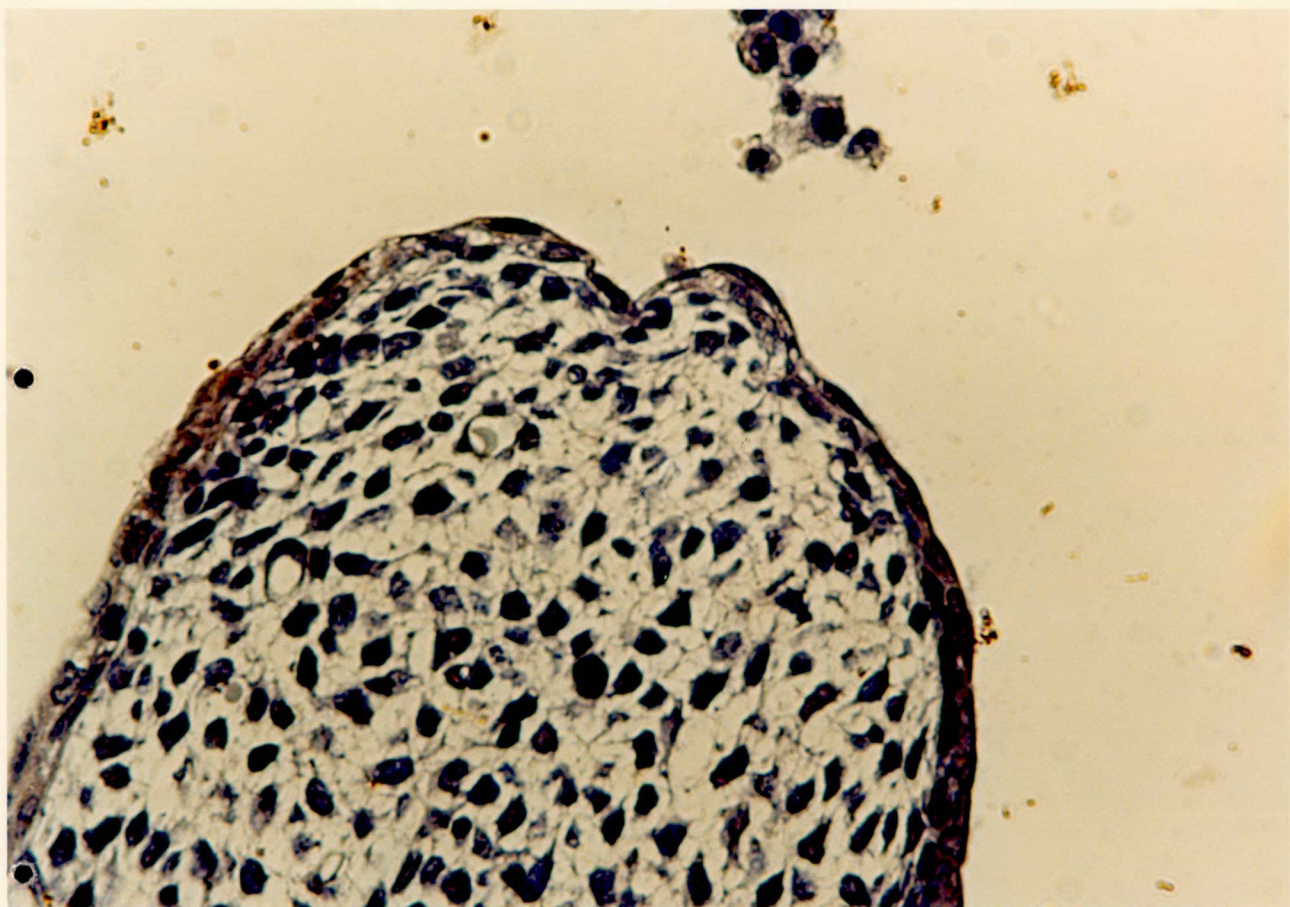


图 5E

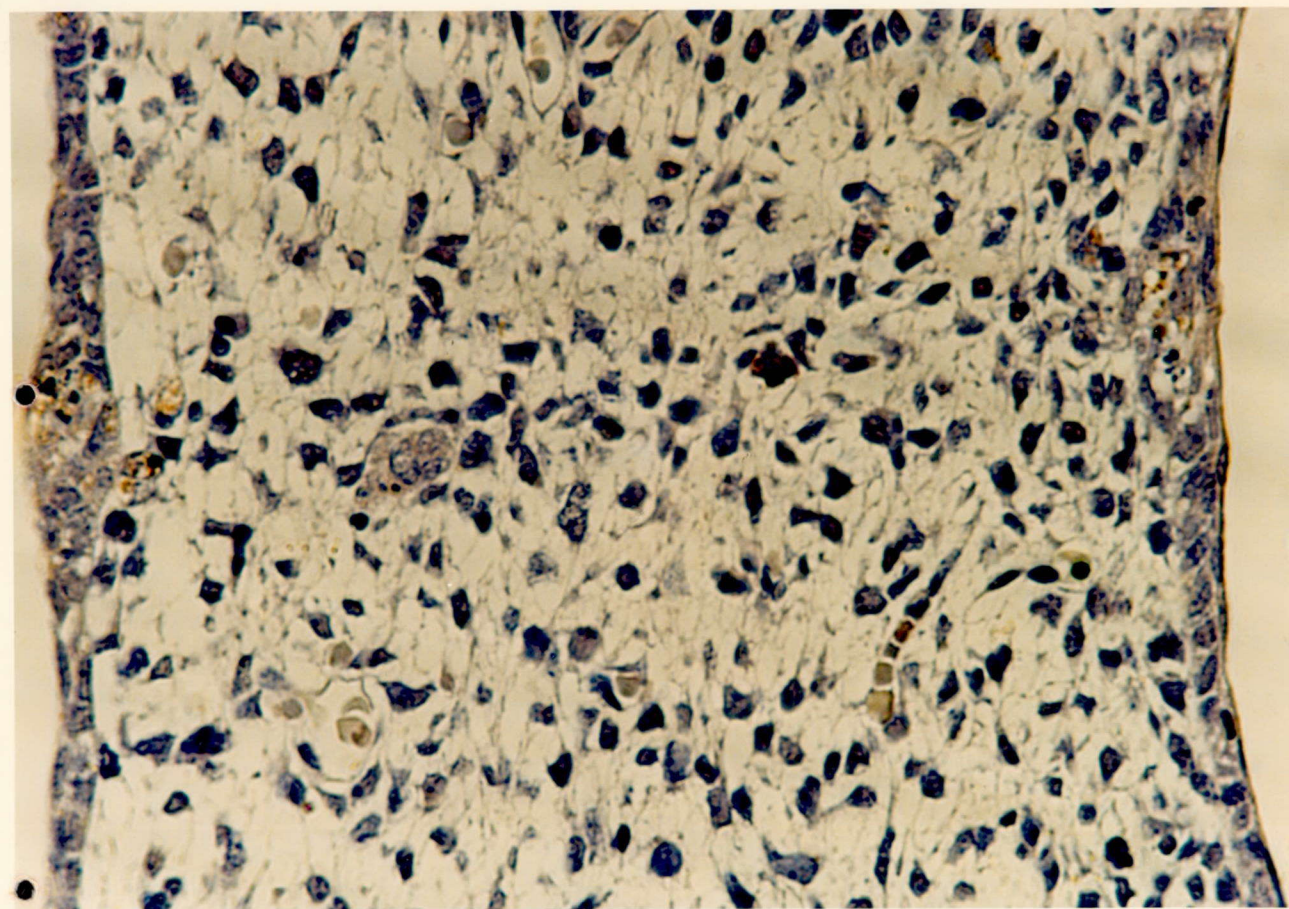


图 5F

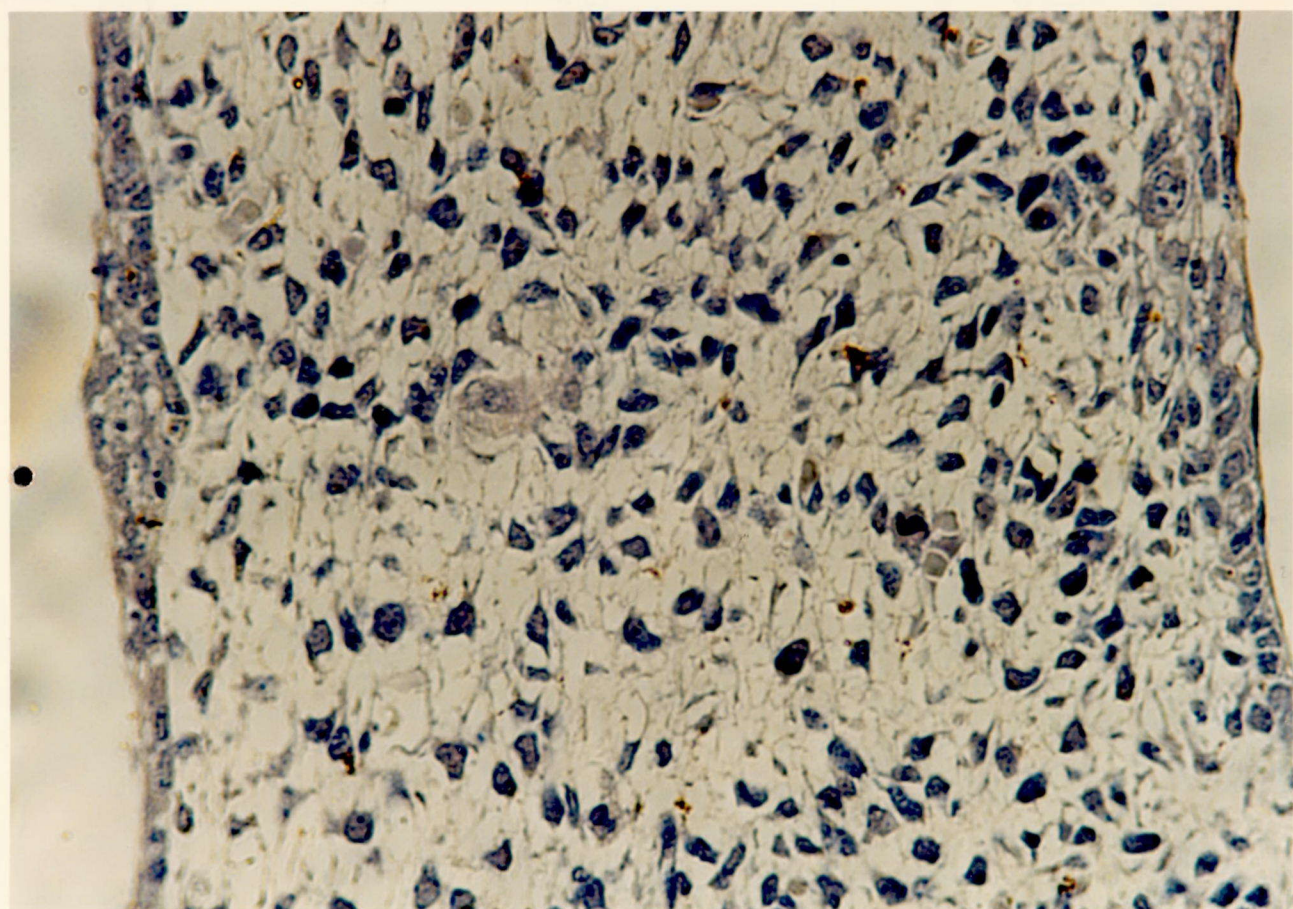


图 5G

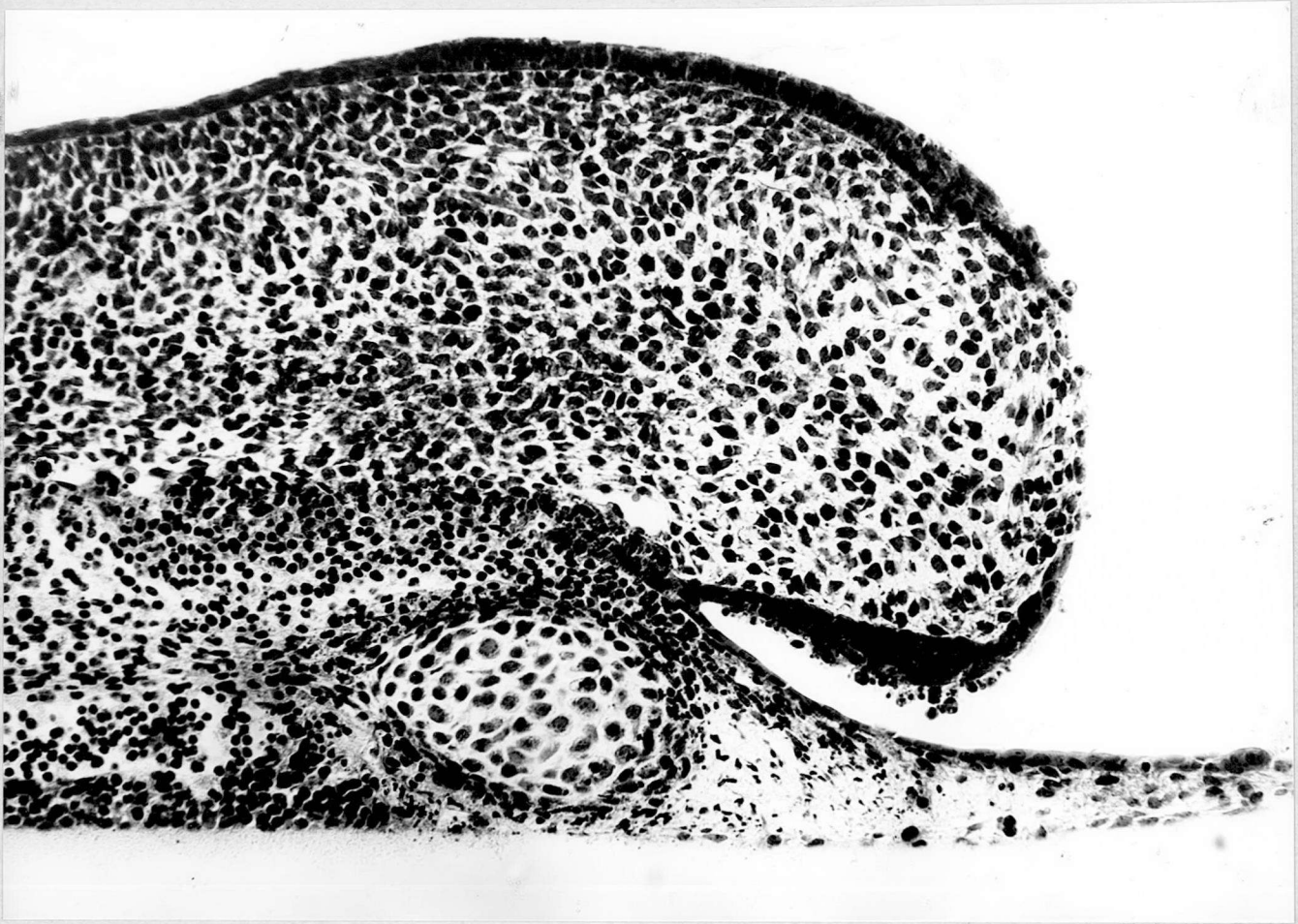


图 9A

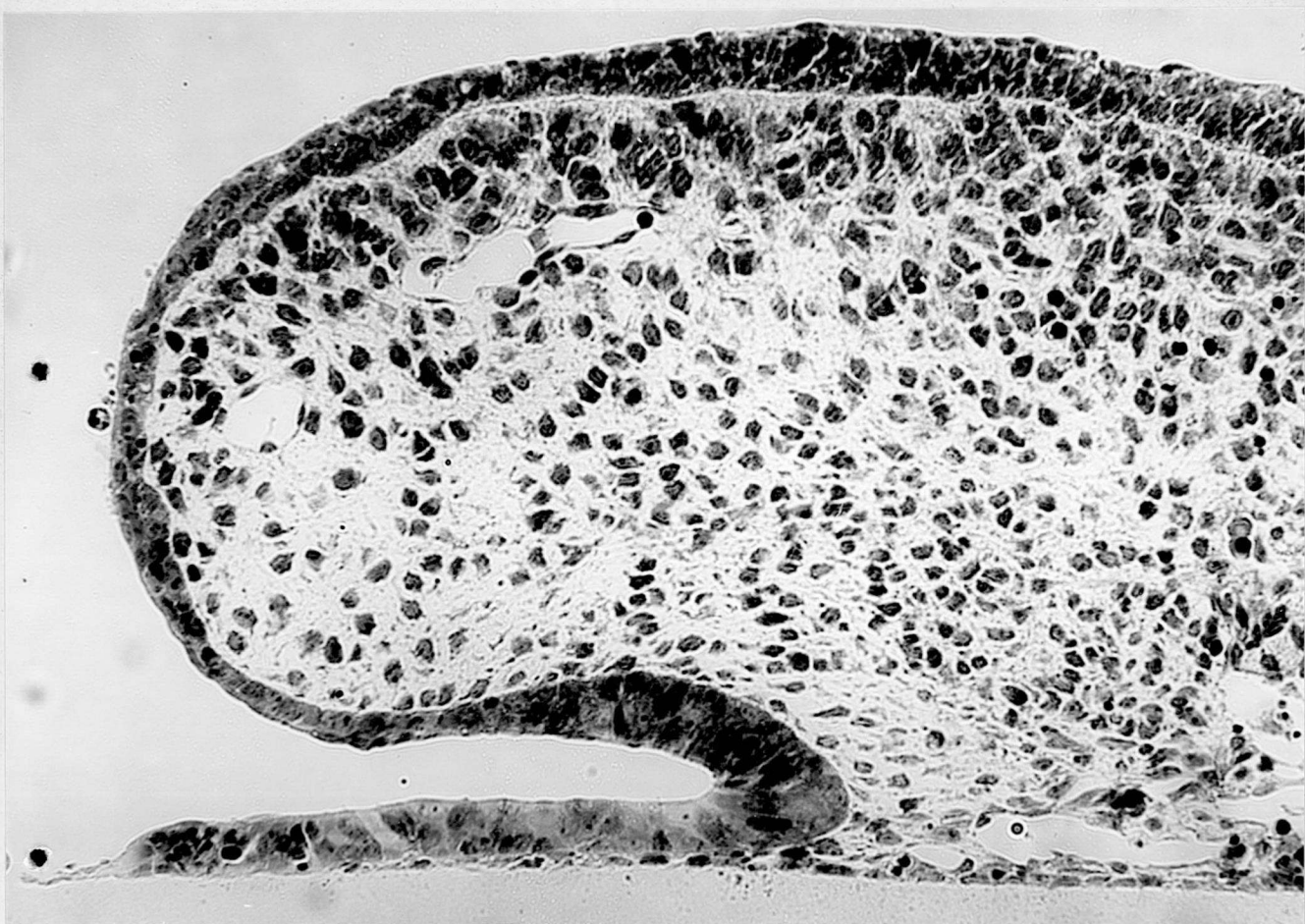


图 9B