OUKA
Osaka University Knowledge Archive

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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

緒言

1950年Baxterら[1]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、口蓋形成に関しての研究が進められ数多くの報告がなされてきた[2)-4)]。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Cohen[5)]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、Bedrickら[9]はA/Jマウスにcortisone acetate（CA）を100μg/g body weight、EGFを40μg/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、翌朝膣栓を確認して妊娠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と、点灯約2時間前に排卵がおこるので[16]、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 μg/g body

weight 2.EGF0.8μg/g body weight（マウス一匹につき総量20μg投与したこととなるので以下EGF 20と略す）3. CA 100 μg/g body weightとEGF 0.4 μg/g body weightの併用（CA+EGF10） 4. CA 100 μg/g body weightと EGF 0.8 μg/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。Tylerらの方法[17]に従って、トリプシン（Flow Laboratories,U.K.）とパンクレアチン（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分間撹拌し、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（100I.U./ml）-ストレプトマイシン（100μg/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に、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°C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 100μg/g body weightとEGF 0.8μg/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10μg/mlのトリプシン インヒビター（Type I-S,Sigma）および1μg/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×gで30分4°Cで遠沈し、得られた上清を使用して以下のようにNexøらの方法[10]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100μl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）100μl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^{125}Iでラベルした EGF（約100000 cpm、アマシャム・ジャパン、東京）100μl、および20000倍に希釈した家兎抗EGF血清（Collaborative research）100μlを加え、4°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 μl、および10倍に希釈したヤギ抗家兎IgG 100 μl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 ^{125}I 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、5.3mg/100ml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×g 4°Cで10分間遠沈し、得られた上清をさらに100000×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。なお得られた胎仔上清は、Lowryの方法[19]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

^{3}H-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，HEPM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10μg/ml、200μg/mlあるいは500μg/mlとなるように

し、20時間培養後 ^{3}H-チミジン1 μCi/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で中和後バイヤルに移し、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．のように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1μg/mlあるいは10μg/mlとなるように希釈して、20μl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パラフィン切片とし、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10μg,20μg と増量していくと、それにとも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の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 μg/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 0.3pmol/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55.2cpm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48.6cpm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10μg/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200μg/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10μg/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１μg/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10μg/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 1μg/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 μg/g body weightをCAにあわせて投与した結果と逆に、EGF 0.8 μg/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 μg/g body weightにした場合と0.8μg/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 μg/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マウスではの投与した時は、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日で融合の起こっ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から[20)-22)]、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の菲薄化は起こるという報告[23)]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 A/J マウスでは口蓋突起の水平転位が遅く、そうした事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[10)]等と同じように、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・レセプターの調整にアンドロゲン[26)]、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^{M1})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によって減少することを報告している[29)30)]。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[32]を用いて、組織中のEGFを染色した報告[33-35]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。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Nexøら[10]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（0.12pmol/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（0.62pmol/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、0.05M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

したものと同じ傾向を示し、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^{125}I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、 Calvert ら[37]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[7) 10)-15) 38)]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とした。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[39) 40)]、上皮と間葉組織の関係[11) 17)]、細胞

の接着[41]、programmed cell death[42)43)]などの点が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。

^{3}H－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10μg/ml含むように加えた場合CA+EGF20，CA，無処置胎仔上清の順に^{3}H－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[12)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[16]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EGF 20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

グ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[59)]や、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[60)61)]、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 μg/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 μg/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 μg/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、EGF 20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10μg/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　1μg/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1μg/mlのCA+EGF20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（0.8μg/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（0.8μg/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

れた。さらにその作用は口蓋突起の増殖、正中縁端上皮の消失に関与している可能性が示された。

稿を終えるにあたり、本研究課題を与えられ、御指導と御校閲を賜わった、大阪大学歯学部口腔外科学第二講座作田正義教授に深く感謝致します。また、本研究の実施にあたりひとかたならぬ御指導と御助言を頂いた口腔外科学第二講座菅原利夫講師に心から謝意を表わすとともに、先天異常の研究について幅広い御助言を頂いた大阪大学医学部放射線基礎医学講座野村大成助教授に深謝致します。さらに組織切片作製について御助言を頂いた歯学部附属病院検査部の方々に深謝致します。

最後に本研究を進めるにあたり、御援助、御協力を頂いた口腔外科学第二講座教室員諸兄に深謝致します。

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 μg/g of epidermal growth factor (EGF) and/or 100 μg/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 deffects 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): Fetilizing 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（1 g^{ML}）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) accelates 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., Babiarz,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., Babiarz,B.S., Lessard,J.L. and Zimmerman,E.F. (1980): Palatal morphogenesis. I. Immunological and ultrastructual 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 menbranes from liver, placenta and other target tissues. Arch. Biochem. Biophy., 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 microsopic autoradiographic studies. J. Clin. Endoclinol. 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., Foidart,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)Westermark,K., Karlsson,F.A. and Westermark,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 μg/g body weight
ＥＧＦ10　：epidermal growth factor 0.4 μg/g body weight
ＥＧＦ20　：epidermal growth factor 0.8 μg/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 μg/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 μg/g body weight）とコントロール（生理的食塩水）、CAとEGF20(0.8 μg/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

$$\frac{\text{水平転位あるいは正中縁端上皮の菲薄化の明らかに起こっている胎仔数}}{\text{観察胎仔数}} \quad (\%)$$

で表わしたものである。

CA（ 100μg/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 μg/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（ 100μg/g body weight)、EGF20(0.8 μg/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 μg/g body weight ）投与グループでは４回、EGF 20（ 0.8 μg/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 μg/g body weight）投与胎仔上清をタンパク量が１μg/mlの濃度で添加した場合、50% で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 μg/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１μg/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 μg/g body weight ）にＥＧＦ20（0.8 μg/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 μg/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、ＥＧＦ20（0.8 μg/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±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ＥＧＦ20（0.8 μg/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が、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が、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 ×10^4 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１μCi/ ディッシュの^{3}H- 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、^{3}H- 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10μg/mlで添加した時、３グループ間で^{3}H- 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２×10^4 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１μCi/ ディッシュの^{3}H- チミジンを加え、さらに４時間インキュベートし^{3}H- 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^{3}H- 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）。

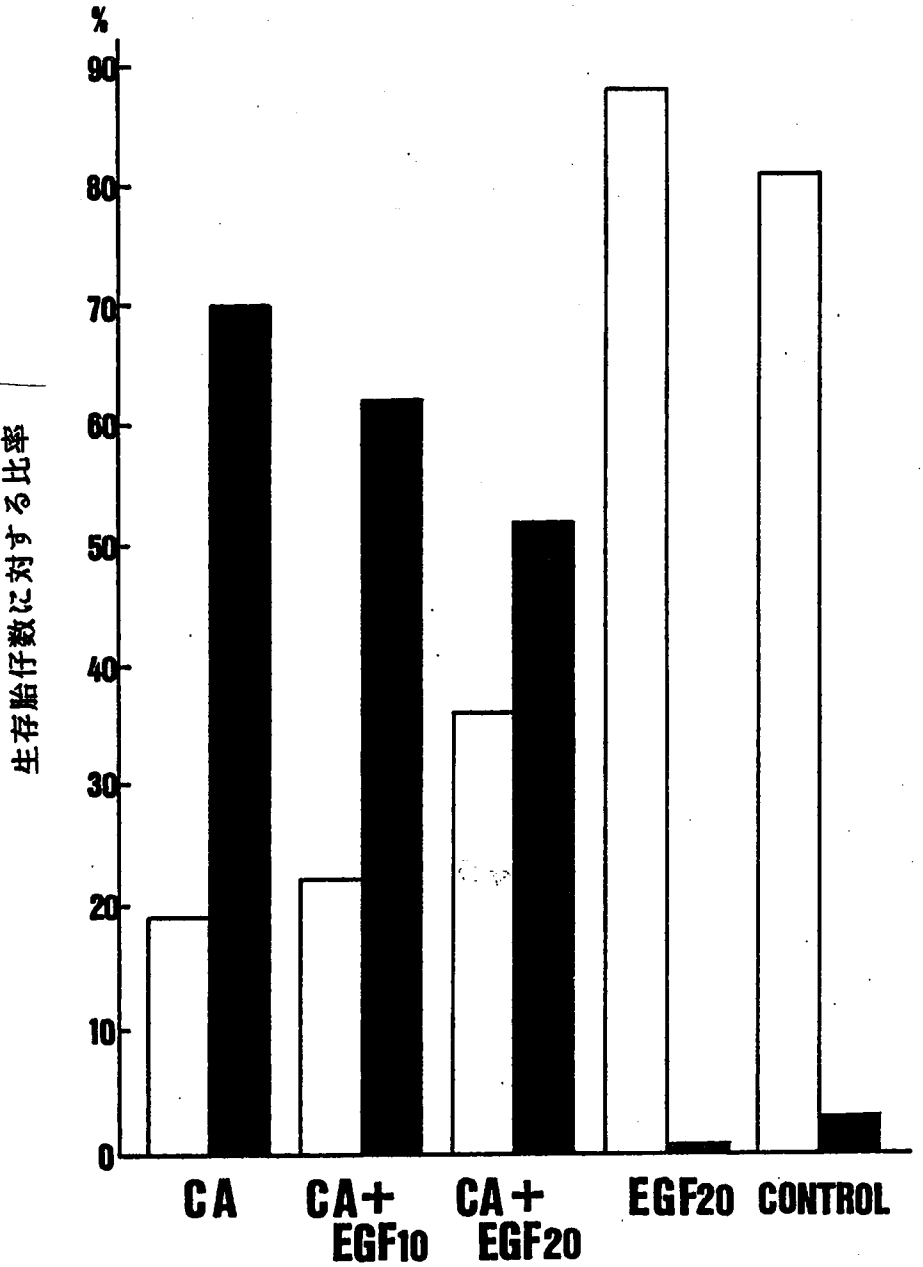
%
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
生存胎仔数に対する比率
CA
CA+ EGF10
CA+ EGF20
EGF20
CONTROL

図 1

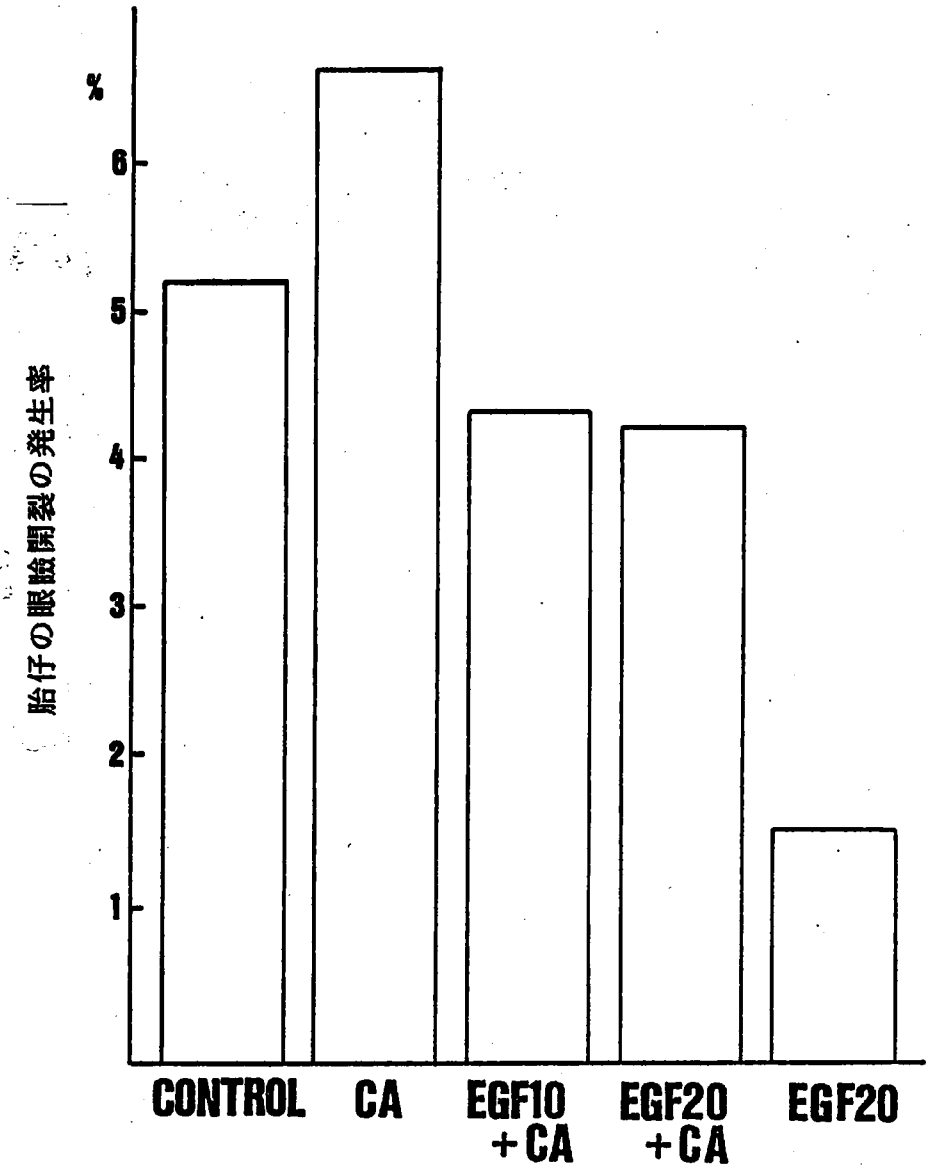

図 3

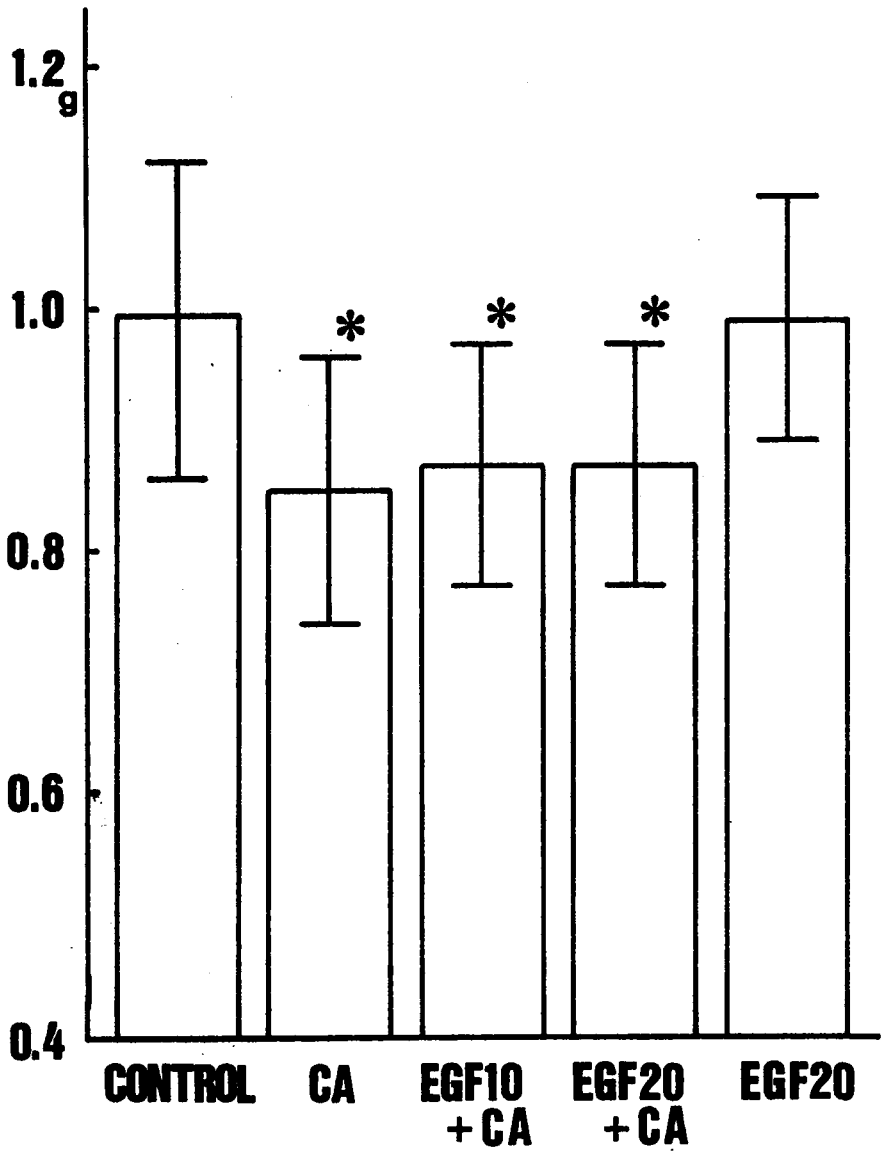

図 4

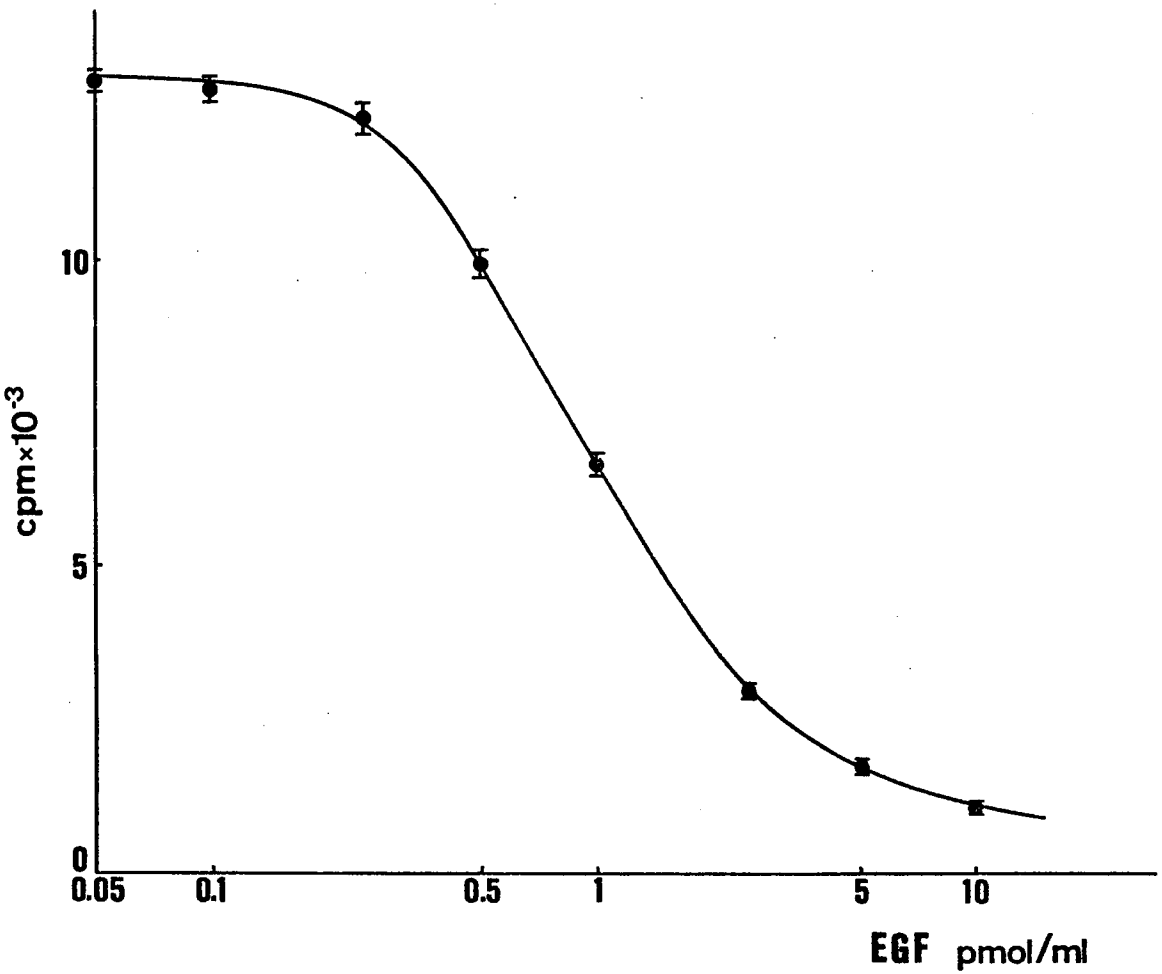

図 6

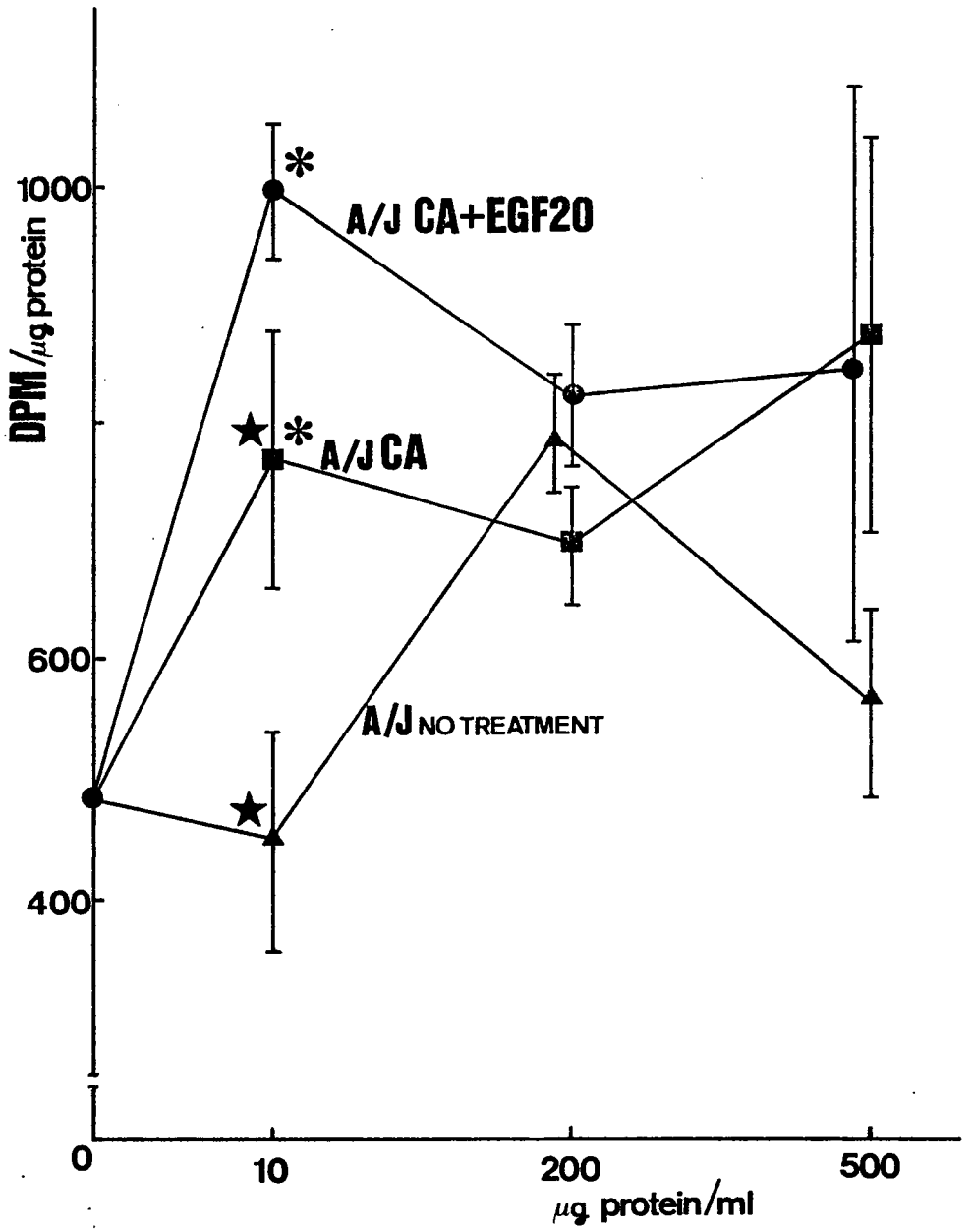
DPM/μg protein
1000
600
400
0
10
200
500
μg protein/ml
A/J CA+EGF20
A/J CA
A/J NO TREATMENT

図 7

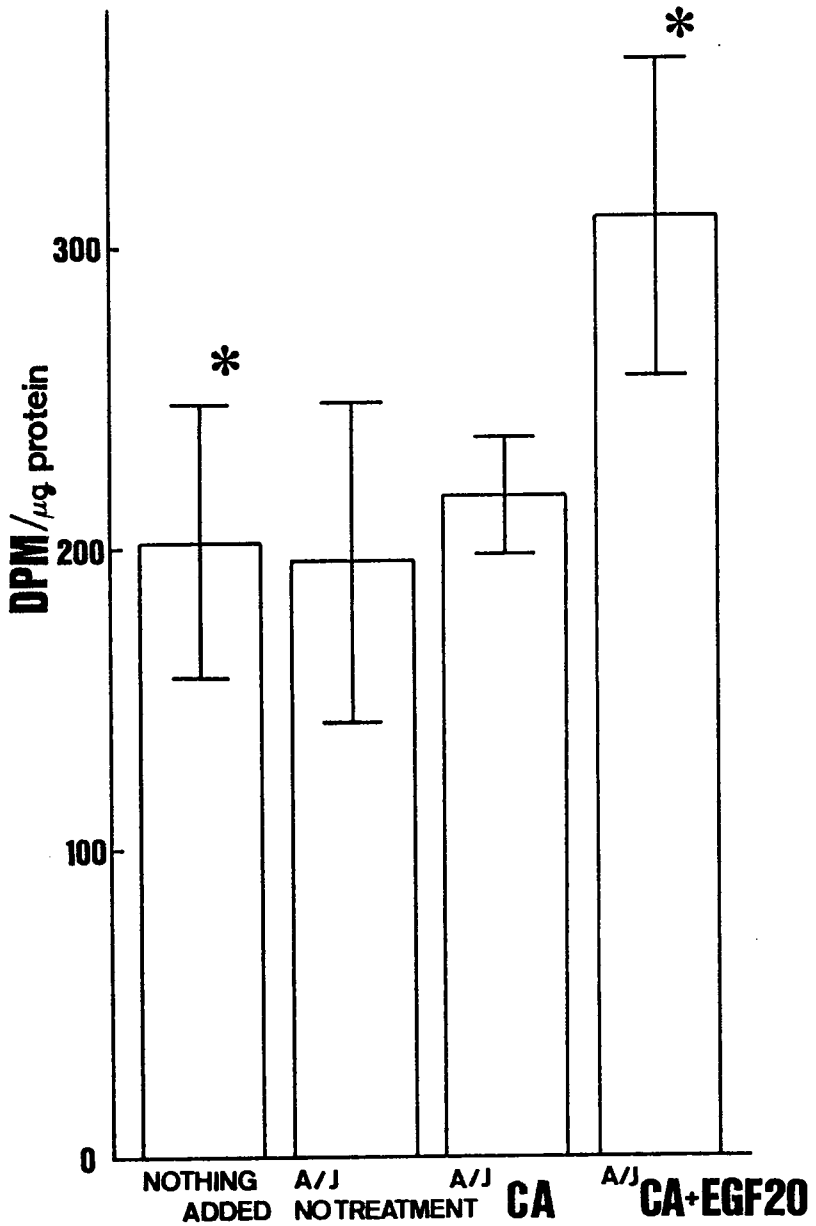
DPM/μg protein
300
200
100
0
*
*
NOTHING ADDED
A/J NO TREATMENT
A/J CA
A/J CA+EGF20

図 8

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	0．37	1．36	0．91	0．02＊
CA	CONTROL	1．36	84．12 ＃	0．80	96．09＊＃
CA+EGF20	CONTROL	1．78	40．69 ＃	0．35	54．16＊＃
EGF20	CA	2．69	84．33 ＃	0．05	78．35＊＃
EGF20	CA+EGF20	3．16	43．90 ＃	0．18	43．87＊＃
CA	CA+EGF20	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		ＣＡ		ＣＡ＋ＥＧＦ２０		ＥＧＦ20	
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
	９／１０（９０）	８／１０（８０）	９／１３（６９）	７／１３（５４）	８／９（８９）	８／９（８９）	11/11（100 ）	10/11（９１）

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	ＥＧＦ２０	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	CONTROL
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 μg/ml)[1.]	A/J(10μg/ml)	C57(1 μg/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

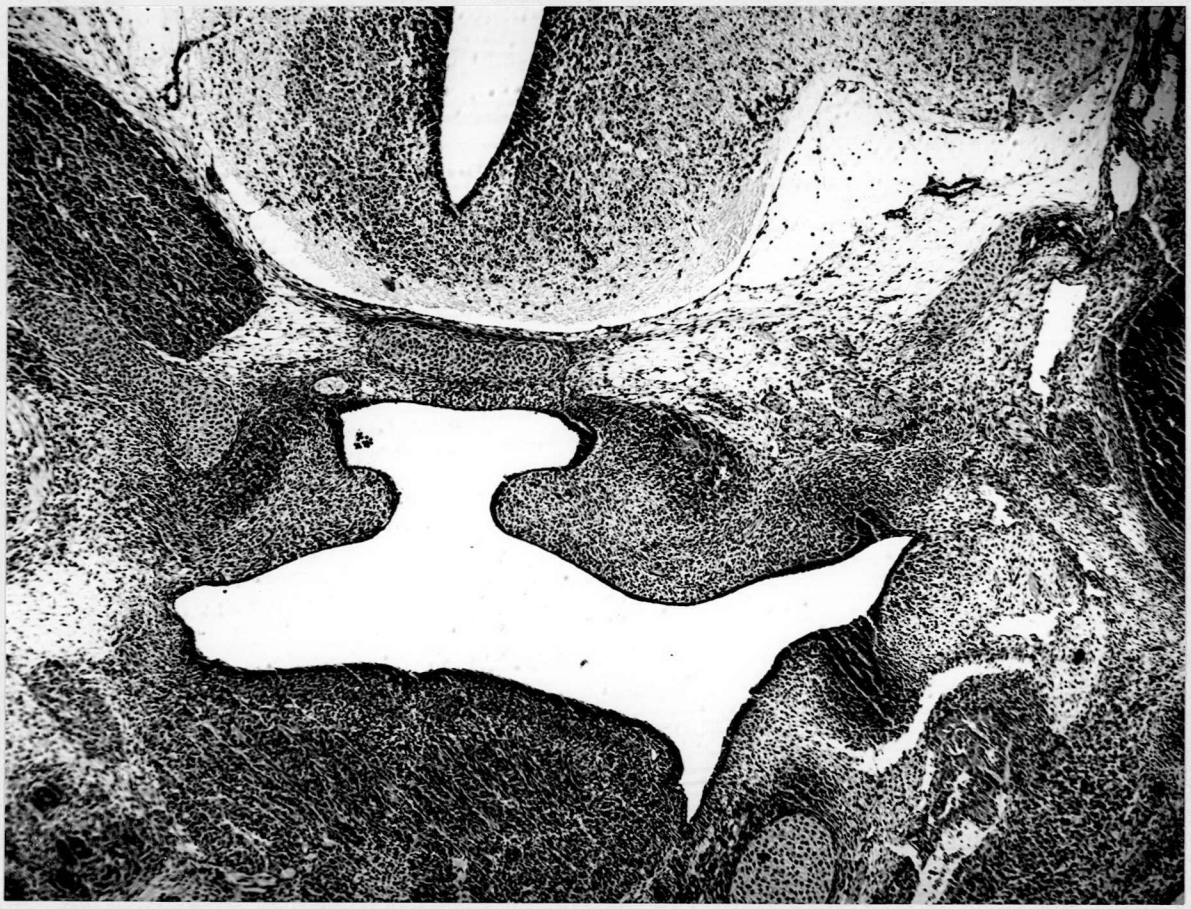

図2A

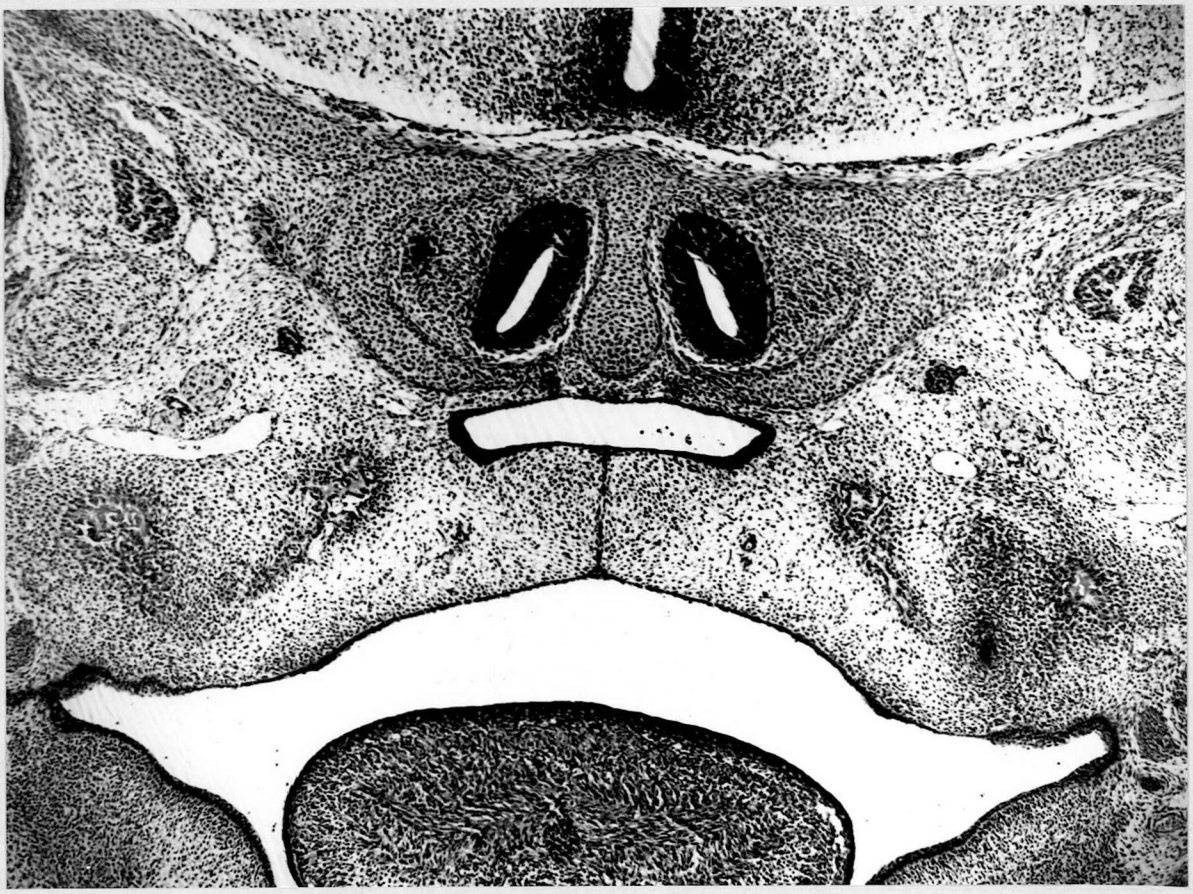

図 2B

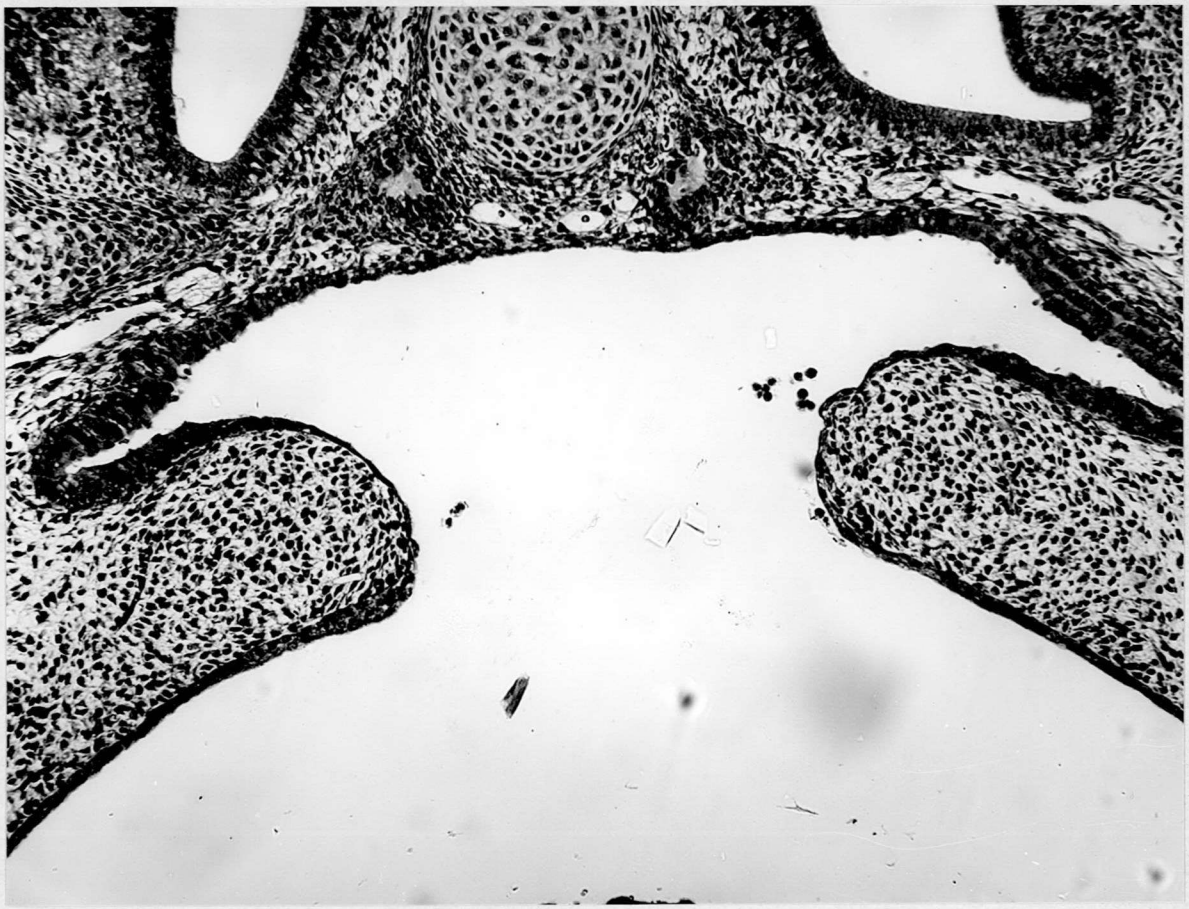

図 2C

図2D

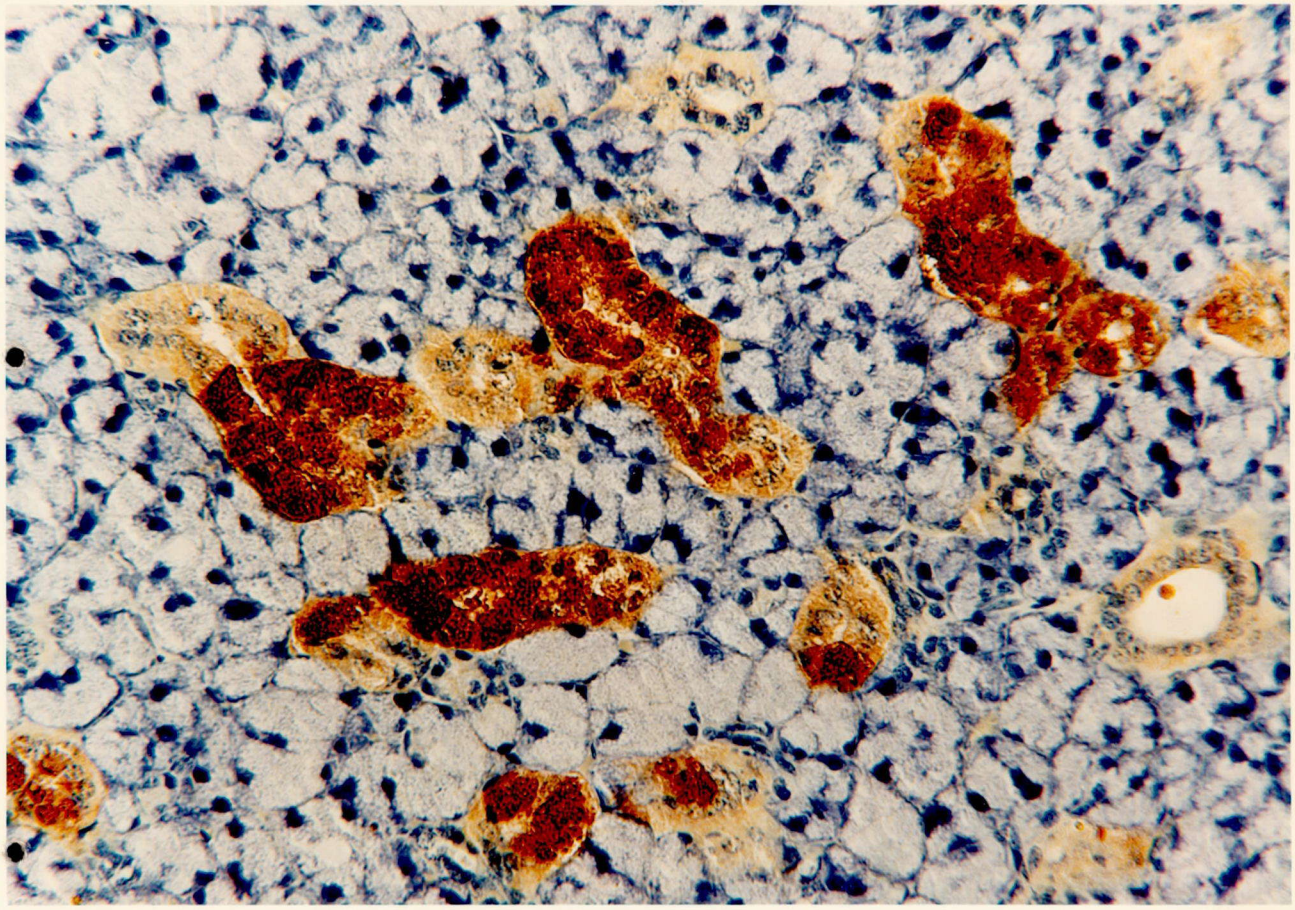

図5A

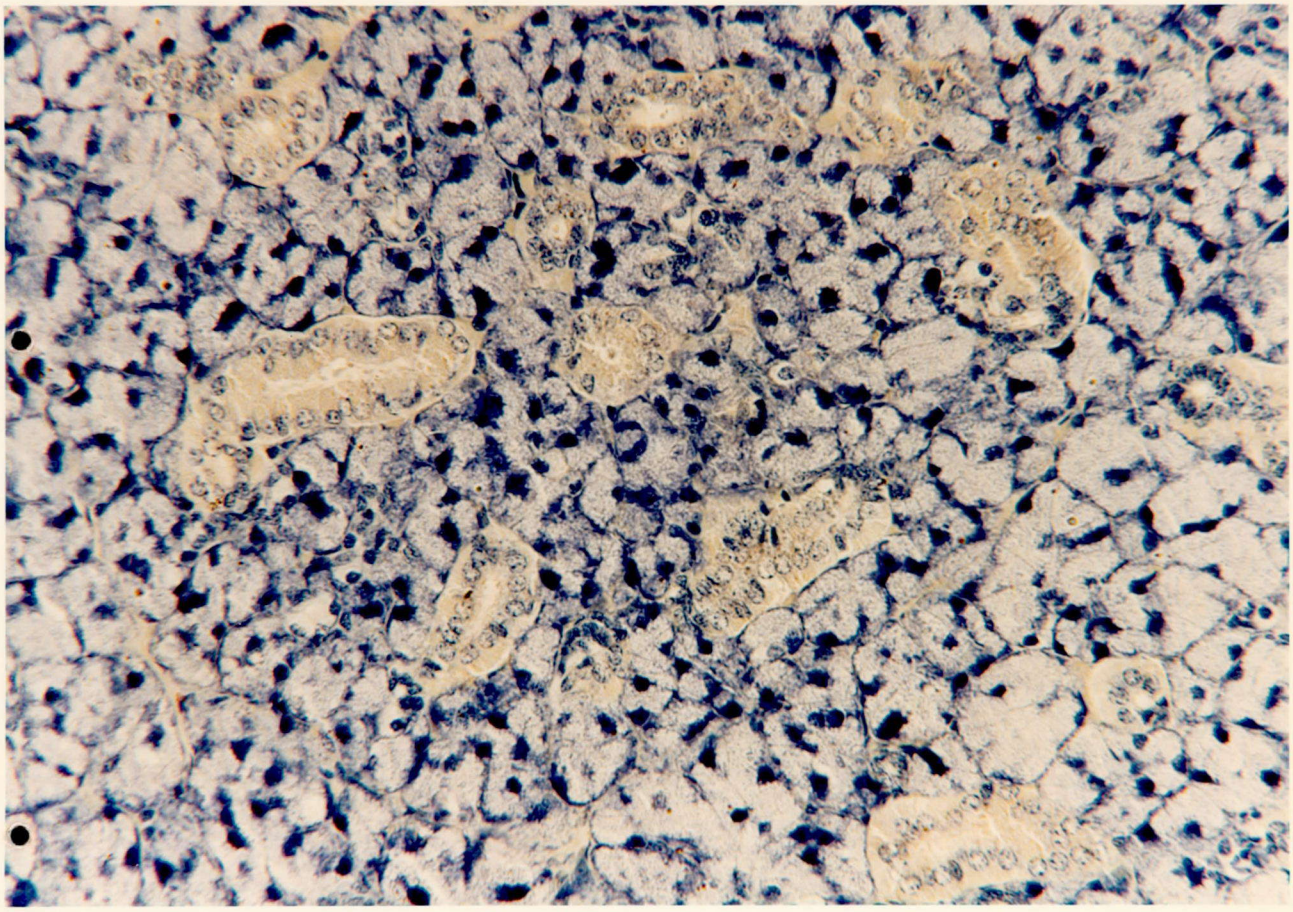

図 5B

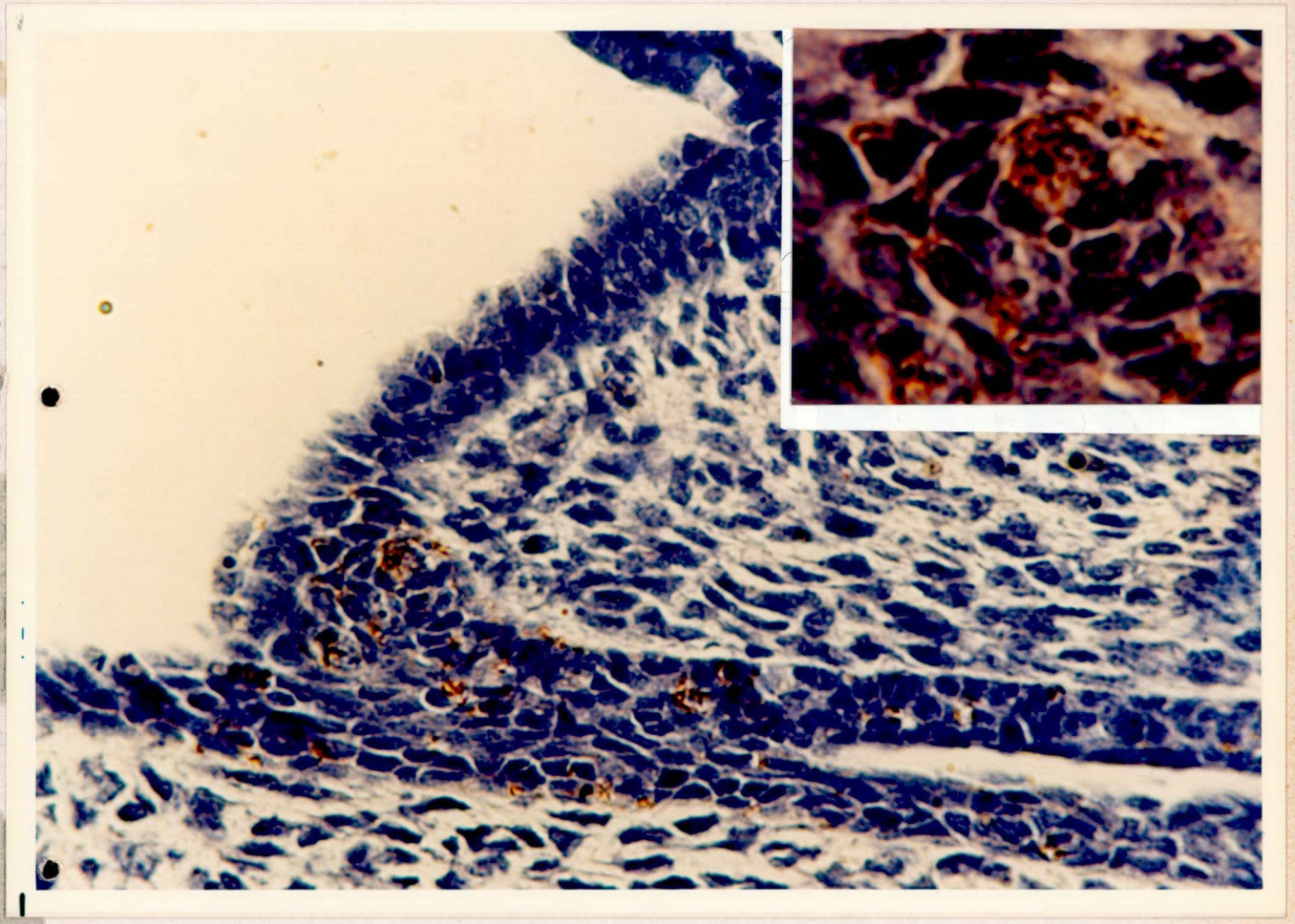

図5C

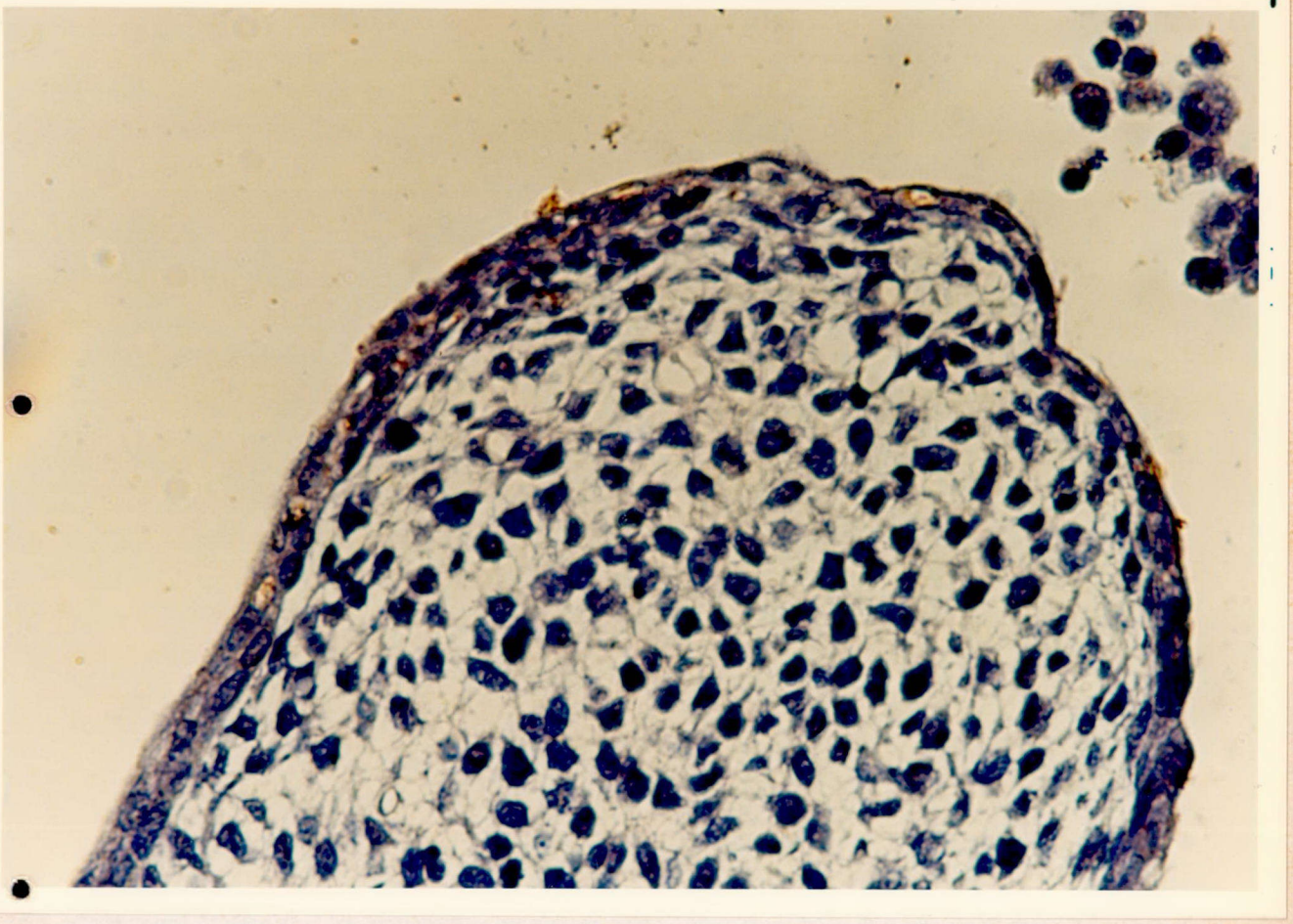

図 5D

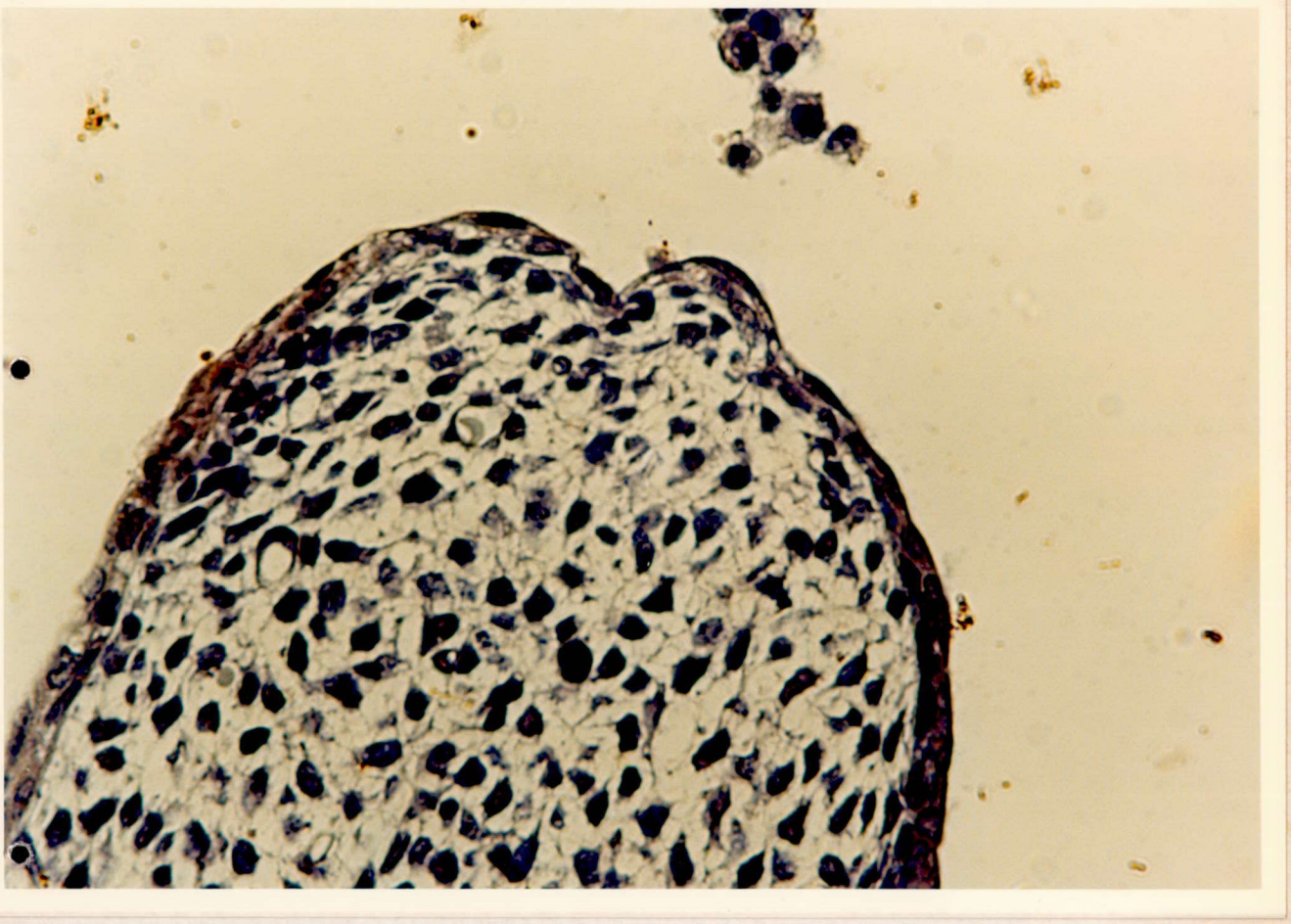

図5E

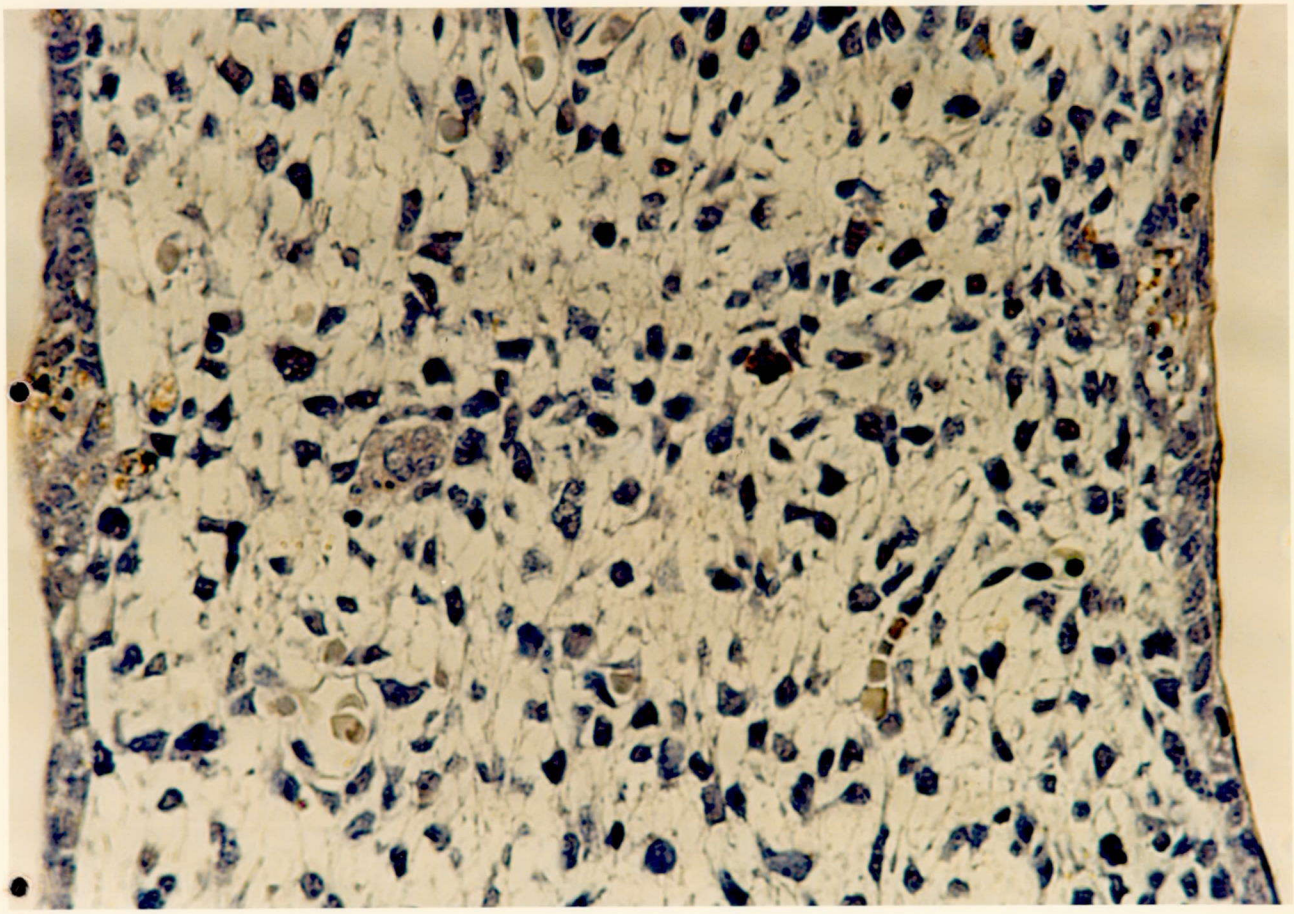

図 5F

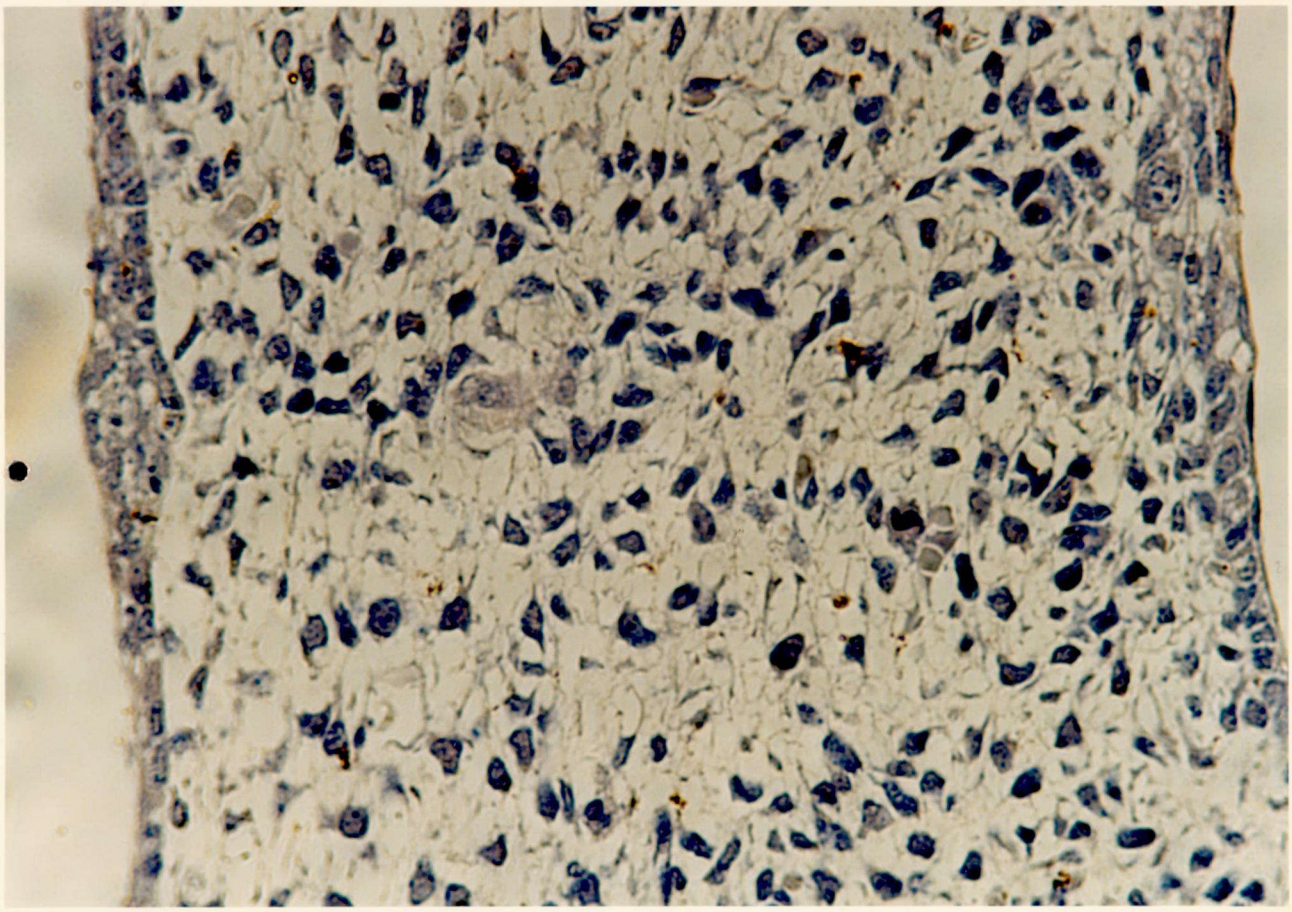

図 5G

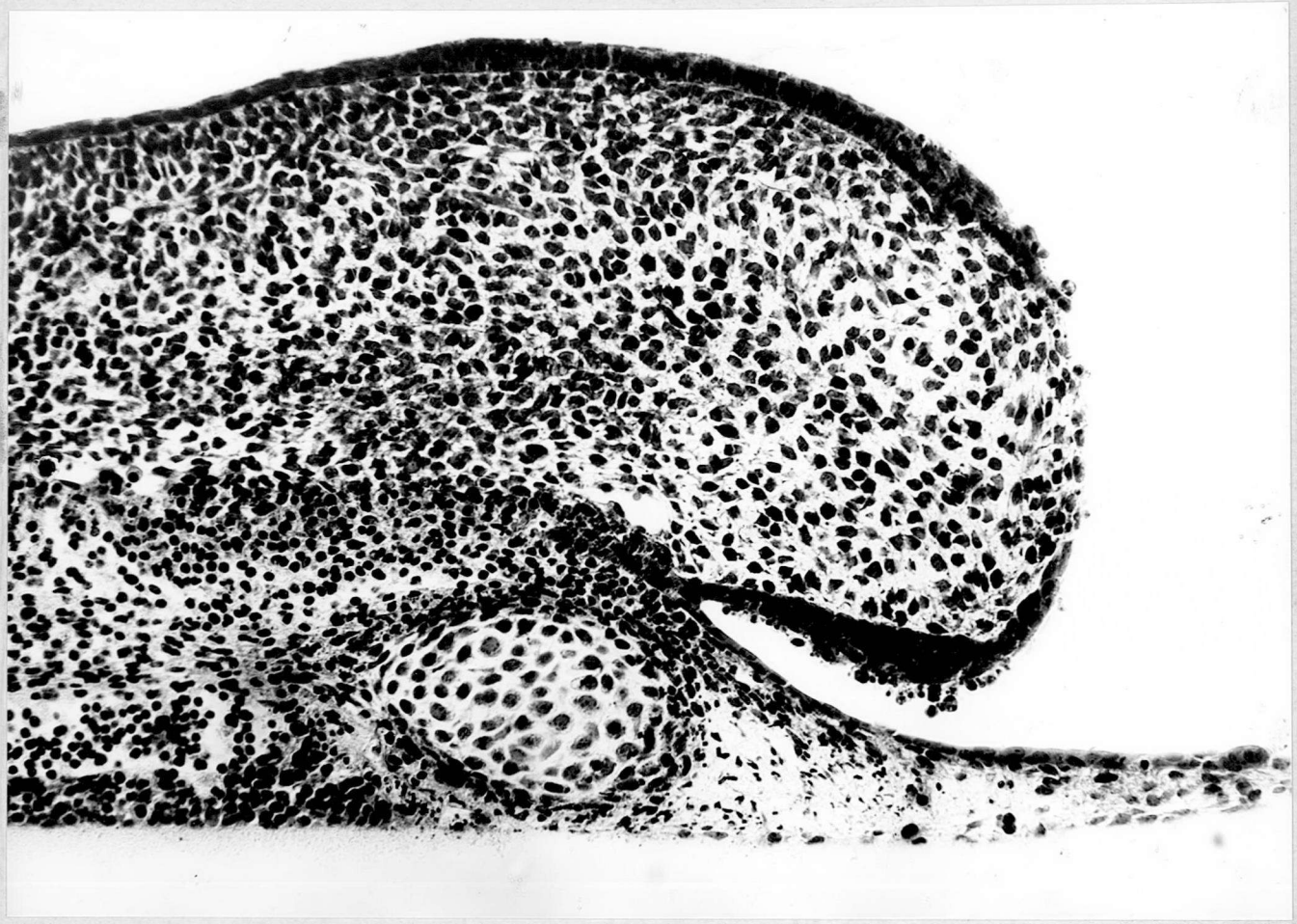

図 9A

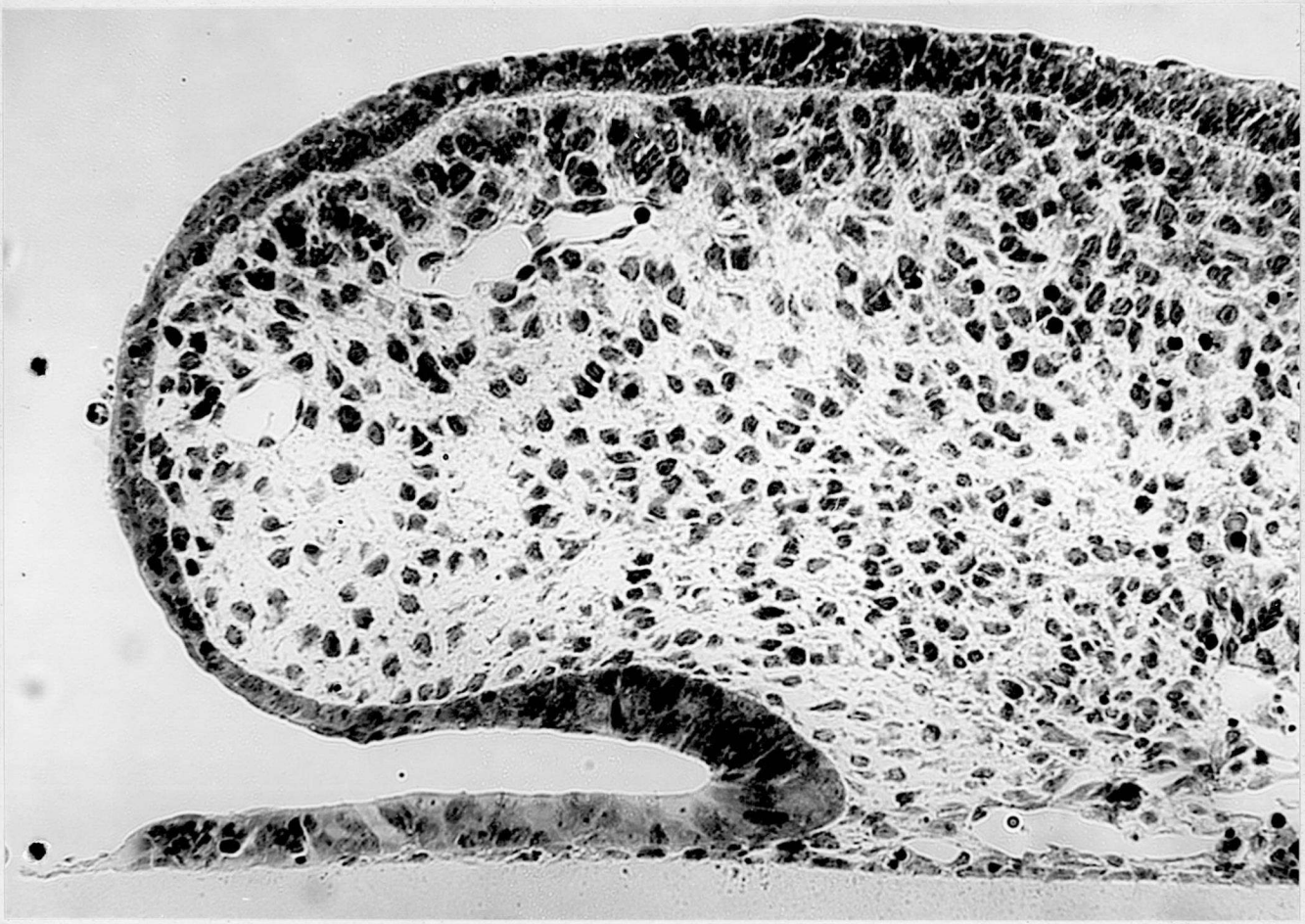

図 9B