

遺伝性短曲尾マウスの発生学的研究

山口大学大学院連合獣医学研究科

獣医学専攻基礎獣医学講座博士課程（主指導教官：上原 正人教授）

松浦 哲郎

目次

序言	1
材料および方法	2
結果	
<i>knt/knt</i> マウスの短曲尾形質に関する遺伝的および形態学的解析	5
<i>knt/knt</i> マウスの頸椎に関する形態学的解析	7
<i>knt/knt</i> マウスの短尾と曲尾に関する発生学的研究	8
考察	12
総括	18
謝辞	20
文献	21

序言

ヒトやニワトリの尾の短さは尾椎数の少なさに起因している(Kunitomo 1918; Sandersら 1986)。日本ネコおよびブタでは一般に尾の曲がりが見られ、この奇形は神経系の異常を伴わず尾椎の奇形単独で生ずる。また、若干の短頭種のイヌと多くのManxネコにおいては仙骨と神経の欠損を伴った尾椎異常が報告されている(Sahekiら 1982; Noden and Delahunta 1985)。実験動物のマウスにおいても尾の異常はかなりの頻度で発生しており、数十種類の尾の形態に関与する遺伝子が報告されている(Lyonら 1996)。尾に異常を有するミュータントについては多くの形態学的研究がおこなわれており、尾の外観的異常はおおむねそれを構成している尾椎の異常に起因していることが明らかになっている。しかしながら、尾椎の異常が生ずる位置あるいは尾椎の変形の程度はそれぞれの系統によってまったく異なる。また、これらのマウスでは尾椎以外の脊椎あるいは肋骨等の付属骨に形態異常が併発することが多く、その出現部位も系統によってさまざまである(Theiler 1988)。今回の研究対象である短曲尾マウスはJcl:ICR系(日本クレア)由来であり、浜松医科大学実験動物施設で飼育されていたマウスの中から尾の異常なミュータントとして発見された。本ミュータントでは外観的に短く結び目のように曲がる特徴的な尾が観察され、この結び目状の形態にちなみ、この短曲尾マウスは*knotty-tail* (遺伝子記号: *knt*)と命名された(以下、本短曲尾マウスを*knt/knt*マウスと略す)。この*knt/knt*マウスの骨格形態を予備的に観察したところ、尾椎と頸椎に本ミュータントに特有な形質が発現している可能性が示唆された。そこで、1) *knt/knt*マウスについての短曲尾形質を遺伝学的に明らかにすること、2)その形態学的特徴から従来の尾椎と頸椎に異常を有する系統マウスとの相違を調べること、ならびに3) *knt/knt*マウスの尾の異常の発生機転を解明することを目的として、本ミュータントの短曲尾形質に関する遺伝学的および形態学的研究、頸椎に関する形態学的および発生学的研究、ならびに*knt/knt*マウスの短尾と曲尾に関する発生学的研究を企図した。

材料および方法

*knt/knt*マウスの起源およびその遺伝学的解析

総観察数1,887匹のうち、*knt/knt*同士の交配から得られた851匹、*knt/knt*とICR系マウス(+ / +)の交配から得られた90匹、*knt* / +同士の交配から得られた382匹、さらに*knt/knt*と*knt* / +間の戻し交配から得られた564匹を用い、短曲尾形質の遺伝学的解析を行った。

*knt/knt*マウスにおける骨格の形態観察および形態計測

本マウスを明暗各12時間で空調制御されたバリアシステムの飼育室内でプラスチック製ケージに収容して飼育し、固形飼料および水道水をそれぞれ自由に摂取させた。本実験では総計132匹のうち、*knt/knt*の雄56匹、雌16匹および雄胎仔10匹を、また対照としてICRの雄30匹、雌10匹および雄胎仔10匹をそれぞれ骨格の形態学的検査に供した。

すべての動物をエーテル麻酔下で腹大動脈から放血死させ剖検した。妊娠母体も同様の手順で剖検したのち、すばやく子宮から胎仔を剔出した。なお、妊娠母体については臏栓の存在により交尾を確認し、この日を胎生0日として胎仔の年齢を起算した。

骨格の形態的な検査については、*knt/knt*の雄を胎生18日に10匹、生後1、3、5および7週にそれぞれ10、9、12および7匹、また対照としてICRの雄を胎生18日に10匹、生後1、3、5および7週に各5匹用い、Inouye (1976)の方法に従いArizarin Red S と Alcian Blue 8GSによる二重染色標本作製した。

二重染色標本に供した動物とは別に5週齢の*knt/knt*の雄10匹および雌8匹ならびに52週齢の*knt/knt*の雄8匹および雌8匹を、また対照として5週齢および52週齢のICRの

雌雄各 5 匹を、それぞれパイン法による晒し骨標本に供し、形態計測的な検査を実施した。形態測定に際しては、剖検後に撮影した全身骨格の軟 X 線造影結果と照合して、各晒し骨標本について以下の項目を実体顕微鏡に装着したマイクロメーターで測定した。

5 週齢の各尾椎(Cd)では左右横突起の先端間の距離を尾椎の横幅(a)として、また前端から後端までの距離を尾椎の長さ(b)として測定し、それぞれの比率(b/a)を算出した(図 1)。Kaufman (1992) に従い、4 つの椎骨で仙骨が構成されるとみなし、それに続く最初の椎骨を第一尾椎(Cd1)とした。

また5週齢および52週齢のすべての頸椎(C)について、左右横突起の先端間の距離を頸椎の横幅(c)として、左右椎弓板間の内径の最大距離を椎孔の横幅(d)として、棘突起先端から椎体(あるいは腹板)の腹端までの距離を頸椎の高さ(e)として、椎孔の背端から腹端までの正中線上の距離を椎孔の高さ(f)として測定した(図 2-1)。さらに環椎について腹結節の横幅(g)と高さ(h)を、軸椎について椎孔背端からの棘突起の高さ(i)、棘突起の前後長(j)、椎弓板の前後長(k)および齒突起の長さ(l)を、第六頸椎について腹板の前後長(m)をそれぞれ測定した(図 2-2)。

計測値間の統計学的な解析についてはStudentのt検定を用い、すべてのデータを平均±標準偏差で表した。

*knt/knt*マウスにおける短尾と曲尾の発生学的研究

本実験の*knt/knt*マウスも浜松医科大学実験動物施設から供与され、明暗各12時間で空調制御されたバリアシステムの飼育室内でプラスチック製ケージに収容して飼育し、固形飼料および水道水をそれぞれ自由に摂取させた。本実験では140匹のホモ胎仔

(*knt/knt*)および70匹のヘテロ胎仔(*knt/+*)からなる計210匹の胎仔を使用した。

9週齢以上の*knt/knt*雌あるいはICR雌(+/+)マウスを15週齢以上の*knt/knt*雄と夕刻7時から翌朝8時まで1対1で終夜同居させ、雌の膈内を確認して膈栓が存在した時点を超尾後(胎生)0.0日とした。

胎生9.5日から12.5日の*knt/knt*および*knt/+*胎仔を0.5日ごとにそれぞれ20および10匹ずつ、剖検した。すなわち、母体をエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後、すばやく胎仔を子宮ごと母体から取り出し、そのまま冷却した生理食塩液に移した。次にマイクロメーターを装着した実体顕微鏡下で子宮を切開し、丁寧に胎仔を子宮から切り離した後、それぞれの胎仔について頭臀長を測定した。さらに1例ずつ10%中性緩衝ホルマリン液の入ったシャーレに胎仔を移し替えて、尾部領域を後肢芽の位置で切り離し、高感度インスタントフィルム(富士フィルム)による写真撮影をおこなった。

材料を24時間以上固定した後、実体顕微鏡下で写真と照合しながら胎児期尾部の体節数を測定した。すなわち、下方より透過光を胎児期尾部に照射すると、明瞭な境界線が体軸と直交するように現れ、これらの境界線によって区切られた領域を体節とみなした。またTam(1981)の方法に準じて、後肢芽の後ろに位置する4つの大きな体節群を仙骨領域とみなし、それに続く体節を尾部体節とした。

曲がった尾の標本についてはその横断面が正確に観察されるように、いくつかの部位で体節の境界と平行に切断し、この尾部の小片を2%の寒天ゲル中の円形の穴(φ: 2mm)にそれぞれ注意深く挿入した。次に、組織を寒天ごとエタノール系列(50-95%)で脱水し、さらに2時間4℃の条件で100%ヒストレジン液(Leica)に浸漬した。その後すばやく硬化剤を注入して、5分間冷却したまま組織をよく振とうし、そのまま冷凍庫(-20℃)に静置した。48時間後、組織とともにこの樹脂をゼラチンカプセルに流し込み、4℃で自然硬化させた。

樹脂は硬化後完全に透明になるため、体節を実体顕微鏡で確認しながら詳細な薄切位置を尾部を撮影した写真に記載した。すなわち、下方から透過光を照射すると尾部体節

の境界が識別されるため、たえず体節間の境界線を薄切用ナイフの刃と平行になるように標本をロータリーマイクロトーム(Jung)に設置し、薄切をおこなった。ナイフにはタンゲステン鋼を用い、1-2 μ の厚さで尾部の横断の連続切片を作製した。切片にヘマトキシリン-エオジン染色を施し、各位置の尾部の形態を光学顕微鏡下で観察した。

結果

*knt/knt*マウスの短曲尾形質に関する遺伝的および形態学的解析

1. 短曲尾形質の遺伝

*knt/knt*同士の交配では、851匹の出産仔のうちすべてが短曲尾の形質を有していた。また、*knt/knt*と+/+間の交配では90匹の出産仔のすべてが正常な尾であった。さらに*knt/+*同士の交配および*knt/knt*と*knt/+*の戻し交配では、正常と短曲尾の比はそれぞれ295 : 87および284 : 280であり、ほぼ3 : 1および1 : 1に近い比を示した(表1)。したがって、これらの短曲尾形質は明らかに単一の常染色体上の劣性遺伝子により支配されていることが明らかになった。なおホモ個体の生存率と繁殖率は雌雄ともに高く、その母体は良好な哺育状態を示した。

2. 形態学的解析

尾の平均長はICRマウスの3.20cm(1週齢)、5.00cm(3週齢)、9.74cm(5週齢)および10.64cm(7週齢)に対し、*knt/knt*マウスでは1.03cm(1週齢)、2.91cm(3週齢)、4.45cm(5週齢)および4.09cm(7週齢)であり、曲尾の長さは正常尾のほぼ3分の1から3分の2であった(表2)。また尾椎の平均骨化椎骨数はICRマウスの7.72(胎生18日)、27.60(1週齢)、32.75(3週齢)、32.00(5週齢)および31.80(7週齢)に対し、*knt/knt*マウ

スでは5.20 (胎生18日)、19.10 (1週齢)、19.89 (3週齢)、21.83 (5週齢)および20.86 (7週齢)であり、いずれの時期の曲尾の尾椎数もICRのほぼ3分の2にすぎず、生後5週齢をすぎても正常尾部の末端に存在するほぼ10個の尾椎は本ミュータントでは形成されていなかった (表3)。

軟X線あるいは二重染色による形態検査では、*knt/knt*マウスの尾部は近位の正常椎骨領域と遠位の変形椎骨領域とによって構成され、一つ或いはそれ以上の変形した尾椎により、しばしば結び目状の曲尾を形成した (図3a)。近位の骨端と遠位の骨端とが平行である正常尾椎に対して、変形尾椎ではその両骨端が本来の平行性を失い、曲部の内側に向かって交叉するように収束し、変形尾椎の頭尾方向の長さは正常尾椎より明らかに短縮化されていた。概して、遠位の尾椎は近位の尾椎に較べて形態的により変形の程度が強い傾向を示した (図3b)。また胎生18日胚尾部の遠位における尾椎軟骨はICRマウスではほぼ対称な円形構造であったが、*knt/knt*マウスでは非対称あるいはだ円形であった。

3. 形態計測学的解析

5週齢のICRマウスの尾椎では、横幅に対する長さの比率の平均値は近位から遠位にかけて連続的かつ緩やかに上昇する傾向を示した。個々のICRマウスの比率もほぼ同様の上昇傾向を示し、性別による差異は認められなかった。一方、5週齢の*knt/knt*マウスの尾椎比率では正常尾椎にみられた上昇傾向とはまったく異なった変化を示し、横幅に対する長さの比率は雄の第九尾椎以降および雌の第八尾椎以降でICRマウスより有意に低下し、遠位にいくほど正常値と乖離する傾向を示した (図4)。また、各個体でみると*knt/knt*マウスでは第六尾椎から第十尾椎の間で変形が認められはじめたが、第一尾椎から第五尾椎はICRマウスと比べても差のない形態的にも形態計測的にもきわめて安定した領域であった。

*knt/knt*マウスの頸椎に関する形態学的解析

1. 二重染色による形態観察

*knt/knt*マウスの二重染色標本では、尾椎の異常に加えて軸椎椎弓に局限した形態変化が観察された。胎生18日の*knt/knt*胎仔では軟骨化した軸椎椎弓はおおむね非対称であり、しばしば両椎弓板は正中線上で癒合できず、この部位の成長はICRマウスと比べて明らかに阻害されていた。これに対して、胎生18日のICRマウスの軸椎椎弓は均一な厚さでかつ左右対称な軟骨により構成されていた(図5)。生後1-3週齢の両系統マウスの頸椎全体で椎弓の骨化は徐々に進行していたが、*knt/knt*マウスでは依然として軸椎椎弓の非対称性が観察された(図6)。生後5-7週齢の*knt/knt*マウスでは軸椎棘突起の骨化はほぼ終了していたが、その成長度はICRマウスに比べて明らかに悪く、背側表面には複雑な溝あるいは裂が観察された。この時期には*knt/knt*マウスの軸椎椎弓の一部がしばしば吻側に突出あるいは分離し(図7)、重度の場合には突出した骨小片が環椎椎孔にまで到達して、脊髄を圧迫している例が観察された(図8)。二重染色標本では全ての*knt/knt*マウスの骨格を精査したが、尾椎および軸椎以外の骨について特に形態的な異常を検出することはできなかった。

2. 晒し骨標本による軸椎の形態観察および形態計測結果

晒し骨標本では、軸椎を立体的に観察することにより以下の形態変化をとらえることができた。すなわち、生後5および52週齢の*knt/knt*マウスの軸椎では、椎弓のほぼ中央部から円錐状および棒状の突起物(図9b, 9f)、あるいは結節状の隆起物(図9e)がしばしば椎孔内に突出していた。また、二重染色標本で認められた*knt/knt*マウスの軸椎棘突起の成長阻害は晒し骨標本ではより明確に確認され、成長阻害が重度の場合には二分脊椎が観察された(図9c)

生後5および52週齢の*knt/knt*マウスでは軸椎棘突起の高さはICRマウスのほぼ3分

の2にすぎず(図10上段左)、またその前後長も雌では有意に低下し(図10上段右)、*knt/knt*マウスにおける軸椎棘突起の低形成は明らかであった。しかしながら、軸椎椎弓板の前後長(図10下段左)および齒突起の長さ(図10下段右)には両系マウス間の差異はみられなかった。

3. *knt/knt*マウスの軸椎以外の頸椎の形態および形態計測変化

*knt/knt*マウスの頸椎の晒し骨標本では軸椎以外にもいくつかの軽度な異常が観察された。すなわち、生後5および52週齢の*knt/knt*マウスでは、雌雄に共通して頸椎の横幅および椎孔の横幅は、第三あるいは第四頸椎から第七頸椎の間でICRマウスより有意に延長した(図11)。頸椎の高さは生後52週齢の雌雄の*knt/knt*マウスの環椎および軸椎で低値であったが、椎孔の高さには雌雄に共通した両系統間の差は認められなかった(図12)。また、同時期における*knt/knt*マウスの環椎腹結節の横幅はICRマウスのほぼ2倍であり、その高さはICRマウスより低値であった(図13)。さらに第六頸椎腹板の前後長もICRマウスのほぼ2倍であった(図14)。*knt/knt*マウスの頸椎全体を肉眼的にICRマウスと比較すると、後半部分の頸椎は全体に横に広がったような形状であり(図15)、環椎の腹結節は扁平化し(図16)、さらに第六頸椎の腹板は前後に幅広くなっていた(図17)。

*knt/knt*マウスの短尾と曲尾に関する発生学的研究

1. 実体顕微鏡下における胎生期尾部の観察結果

胎生9.5日から10.0日では*knt/knt*および*knt/+*胎仔ともに尾部の形態は正常であった。胎生9.5日の両系統胎仔はいずれもほぼ30近くの体節を有しており、最終体節は腰仙椎領域に相当する後肢芽の位置まで達していた。したがって、この時期には尾部体節は形成されていなかった。後肢芽より尾側の残りの部位はまだ体節化されていない細長い領域であり、そこでは後部神経孔が開存していた(図18a, 18d, 19a, 19e)。胎生10.0日で

は、後肢芽の尾側に第一あるいは第二尾椎を形成する新たな尾部体節が出現し、この第一尾部体節(Cd1)は第三十六体節に相当した。この時期には後部神経孔は完全に閉鎖した。

胎生10.5日では*knt/knt*胎仔に形態的な異常が認められ始めた。すなわち、*knt/knt*胎仔の尾部体節数は3から7(平均4)に達し、尾部体節に肉眼的な異常は認められなかったが、これに続く末端の前体節領域では尾部の長軸が軽度ながら背側方向に弯曲した(図 18e, 19f)。一方*knt/+*胎仔では尾部体節数は3から10(平均5)に達し、その体軸はむしろ腹側方向にゆるやかに弯曲した(図 18b, 19b)。

胎生11.0、11.5および12.0日では*knt/knt*胎仔の尾部の異常はさらに明瞭になった。胎生12.0日の*knt/knt*胎仔の尾部の体節数は18から23(平均21)であり、*knt/+*胎仔における17から23(平均20)の体節数とほぼ同等であった。しかしながら、*knt/knt*胎仔の尾部はU字を呈するように明瞭に背側方向に曲がり、このU字部分を構成していた第六から第二十三までの尾部体節は背側が狭くなるような楔型であった。これらの異常な体節は胎生11.0から12.0日にかけて新たに形成されており、さらに体節に続く尾部先端の前体節領域も*knt/+*胎仔と比較すると著しく肥厚していた(図 18f, 19g)。

胎生12.5日の*knt/knt*胎仔では新たな体節は形成されず、体節数は胎生12.0日とほぼ同じ17から22(平均20)の範囲であった。その先端は血管の網で張りめぐらされ、しばしば血腫状であった(図 19h)。一方、*knt/+*胎仔ではさらに4から5個の新しい体節が加わり、体節数は23から27(平均25)に達した(図 19d)。

2. 胎生期尾部の組織学的観察結果

胎生期の尾部は実体顕微鏡下では体節領域とこれに続く前体節領域から構成されており、この前体節領域は光学顕微鏡下ではさらに近位部すなわち神経管、脊索、後腸(尾腸)およびsomitomereが含まれる未分節領域と、さらに遠位部の尾芽領域とに分けられた。以下に尾芽、未分節領域および体節についての組織学的観察結果、さらに未分節領域および体節の構成成分である神経管、脊索、後腸の組織学的観察結果を順に示す。

(1) 尾芽

便宜上、本研究では胎仔尾部の最先端に存在する表面外胚葉細胞に覆われた間葉細胞の集団を尾芽と定義した。観察期間中、いずれの胎仔の尾芽にも組織学的な異常は認められなかった。

(2) 未分節領域

胎生10.5日から12.0日の*knt/knt*胎仔では、実体顕微鏡下で観察された尾部末端部(前体節領域)の肥厚がその組織横断面の径の延長、すなわち未分節領域の背腹方向の径の延長からも確認された(図 20c-d, 21c)。この時期、*knt/knt*胎仔の未分節領域と尾芽の境界部では、核濃縮や核の断片化がしばしばその間葉細胞に認められ、またその変性細胞の位置は境界面の背側に限局する傾向があった(図 22b)。また、胎生12.5日の*knt/knt*胎仔では体節細胞が拡張した血管の間に島状に散在していたが、明瞭な体節構造は認められなかった(図 23b)。さらに、胎生10.0日から11.0日の両系統の未分節領域の腹側に丈の長い細胞が腹側外胚葉堤(VER)として現れ、このVERにも核濃縮や核の断片化が頻繁に観察された。*knt/knt*胎仔におけるVERの位置は*knt/+*胎仔(図 20 b)と比較するとわずかではあるが尾側にずれていた(図 20c-d)。

(3) 体節

胎生10.5日まで*knt/knt*胎仔の尾部体節には形態的な変化は認められなかった。しかしながら、胎生11.0日以降に形成された*knt/knt*胎仔の尾部体節は組織学的にも不規則でいびつな形状であり(図 21d)、異常の位置は肉眼的に観察された楔型体節の部位(図 18f, 19g)と完全に一致していた。

(4) 神経管

胎生9.5日の*knt/knt*胎仔では第一次神経管形成における異常は認められず、前体節領域では神経板から神経ひだの形成とその癒合を経て神経管が形成される正常な第一次神経管形成の過程が明瞭に観察された(図 24b)。

マウス胎仔では、第二次神経管形成はSchoenwolf (1984)の言う2つの事象、すなわちi)medullary rosette(胎生9.5日から10.0日)ないしはmedullary plate(胎生11日から12日)の形成、およびii)それらの内腔形成より成っていた。胎生10.0日から10.5日では、両系統胎仔の尾芽のやや吻側に円形の小腔を囲む放射状に伸張した細胞群としてmedullary rosetteが現れた(図 20a, 20c)。ついで胎生11.0日以後の正常胎仔ではほぼ同様の位置でスリット状の小腔を囲む板状の細胞群であるmedullary plate (図 21a)が形成されたが、*knt/knt*胎仔ではmedullary plateは現れず、菱形の小腔の周囲にmedullary rosette様の細胞群が存続していた(図 21c)。これに続く*knt/knt*胎仔の第二次神経管は胎生10.5日から12.0日の間、明らかに肥大し、正常な対称構造は失われていた(図 25b)。さらに、胎生12.5日の未分節領域では本来神経管が形成される部位に管腔形成がみられず、かわって扁平化あるいは分断された細胞群がしばしば観察された(図23b)。さらに、核濃縮や核の断片化は*knt/knt*胎仔の第二次神経管構成細胞にも観察された。これらの変性細胞は胎生10.5日から12.0日の間、前体節領域および尾部体節に形成された第二次神経管の背側にほぼ連続的に観察された(図 25b)。

(5) 脊索および後腸

両系統の胎仔の尾部では密度の高い間葉細胞の一群(tail cord)が神経管の直下に現れ、さらにその吻側で脊索および後腸に分化した(図 20)。脊索についてはいずれの時期の胎仔にも組織学的な異常は認められなかった。また、後腸についても、胎生9.5日から12.0日では両系統の胎仔間に組織学的な差異は認められなかったが、胎生12.5日の*knt/knt*胎仔の未分節領域では、第二次神経管形成の異常とともに後腸の正中線からの逸脱がごくまれに認められた。

考察

*knt/knt*マウスの短曲尾形質の遺伝的および形態学的解析

*knt/knt*マウスは短く結び目をつくるような曲尾を有しており、この形質は遺伝的に単一の常染色体の劣性遺伝子により支配されていることが明らかになった。尾椎に異常をもつミュータントマウスは数多く報告されてきた。半優性遺伝の短曲尾マウスとしては *Bn/+* (Grüneberg 1955b)、*Lp/+* (Strong and Hollander 1949)、*lu/+* (Forsthoefel 1958)、*Pt/+* (Berry 1960)、*Sd/+* (Grüneberg 1953)、*Tc/+* (Searle 1966) および *Ts/+* (Deol 1961) が知られている。しかしながら、*knt/knt*マウスの短曲尾形質は劣性遺伝であり、明らかに遺伝学的にこれらのミュータントと異なる。常染色体の劣性遺伝の曲尾マウスのうち *ct/ct*、*cy/cy*、*mea/mea*、*sc/sc* および *un/un* ミュータントの尾の外観は一見 *knt/knt*マウスと似ている。しかしながら、これらのミュータントは以下の点で *knt/knt*マウスと異なる。すなわち、*ct/ct*マウスでは二分脊椎が通常認められ、しばしば外脳症も観察される (Grüneberg 1954)。*cy/cy*マウスでは尾椎数は正常であり、尾椎の変形も一定の部位(第九から第十四尾椎)に限られる (Johnson and Wallace 1979)。*mea/mea*マウスでは尾椎の癒合および第四から第六尾椎の椎弓欠損が観察されている (Hollander and Waggle 1977)。*sc/sc*マウスでは尾椎数は正常であり、臄を除去すると尾は正常な形状に戻る (MacDowell and Polter 1942)。また *un/un*マウスでは強制的に尾を伸展すると曲がりは一時的に消失する (Grüneberg 1950)。*knt/knt*マウスではこれらの特徴はまったくみられず、本ミュータントにみられる短曲尾の形質は遺伝学的および形態学的に上記に示したマウスとは異なると考えられる。

報告されているミュータントマウスの中で唯一、*tail-kinks* (*tk/tk*)マウスの尾の形態は *knt/knt*マウスと酷似していた。すなわち、*tk*は常染色体上の劣性遺伝子であり、

*tk/tk*マウスの尾の遠位部も正常尾椎と異常尾椎から構成され、それぞれの変形尾椎は互いに独立し、癒合は認められない(Grüneberg 1955a)。両系統マウスの尾の外観および個々の変形尾椎の形態はかなり似ている。しかし*tk/tk*マウスでは尾の他に肋骨、胸骨、頸椎および上位胸椎にも奇形が現れ、特に尾椎以外の椎骨ではひとつの骨がいくつかの骨片に分解されたり、隣接する椎骨に属する骨片で癒合が起こるなど重篤な奇形を呈する(Grüneberg 1955a)。したがって、*tail-kinks*マウスと今回の*knotty-tail*マウスとは明らかに異なったミュータントである。

*knt/knt*マウスの尾椎異常の発生機転

胎生12.0日の*knt/knt*胎仔の体節数は平均21であり、正常胎仔の平均20とほぼ同等であった。しかしながら、胎生12.5日の*knt/knt*胎仔では体節細胞の集積は阻害され、新たな体節形成は行われなかった。これらの所見は出生後の*knt/knt*マウスの尾椎数の変化ときわめてよく一致していた。すなわち、7週齢の尾椎数は正常ICRマウスの平均32に対し、*knt/knt*マウスでは平均21でありICRマウスの3分の2程度の尾椎しか形成されていなかった。したがって、胎生12.5日以降の*knt/knt*胎仔尾部には新たに体節は初めから付加されず、このため出生後のほぼ第二十以降の尾椎は形成されなかったと考えられる。また、*knt/knt*ミュータントの最終的な尾部体節数は明らかに正常マウスより少ないが、その数は出生後の尾椎数とほぼ一致しており、一度形成された尾部体節は出生後も消失することなくすべての尾椎の形成に寄与していることも示唆された。

*knt/knt*マウスの尾の曲がりには曲部を構成している変形尾椎が関与しており、個々の尾椎の形態計測では第六尾椎以降の骨端部の成長の不均一がその変形に寄与していた。楔型形態が認められた*knt/knt*胎仔の第六から第二十三尾部体節では組織学的にも体節の変形が確認され、その位置は出生後における変形尾椎の出現部位とよく一致していた。こ

これらの結果から、本ミュータントの尾椎の形態変化に尾部体節自体の変形が寄与していることが明らかとなった。

椎骨の形態変化にはi)体節形成、ii)脊索あるいはiii)第一次神経管のうちいずれかが関与していると考えられている(Theiler 1988)。i)の体節形成異常をもつ系統マウスの報告は多いが、これらのミュータントでは脊椎全体に複合的な異常を持っているのみならず、肋骨等の他の付属骨にも形態異常は及んでいる(Theiler and Gluecksohn-Waelsch 1956; Matter 1957; Theilerら 1974; Theilerら 1975; Theiler and Varnum 1985; Theiler 1988)。また、脊椎動物では尾部の発生過程(第二次体形成)は体幹部の発生過程(第一次体形成)と異なることが知られているが(Holmdahl 1925)、体節形成異常マウスの多くが脊椎全体に複合的な異常を持っているため、発生学的な研究は体幹部の形態解析に限られる傾向があり(Theiler 1988)、尾椎の異常に対応する体節の研究はほとんどおこなわれていない。さらに、ii)の脊索異常は脊椎の個々の骨を識別できないほどの重篤な形態変化を引き起こし(Theiler 1988)、iii)の第一次神経管の異常は通常、後部神経孔の閉鎖不全および二分脊椎を誘発するが(Theiler 1988)、*knt/knt*胎仔には脊索あるいは第一次神経管の形成異常はみられない。したがって、*knt/knt*マウスはその尾椎変形に第二次体形成期のみの発生異常が関与するまったく新しいタイプの体節形成異常モデルであると考えられた。

*knt/knt*胎仔では、体節の形態変化の前にならず体節の尾側に位置する前体節領域の形態異常が現れた。正常なマウスの発生では新たな体節は前体節領域の間葉細胞から2から3時間ごとに形成され(Tam 1981)、また体節数は前体節領域に前もって存在しているsomitomereの数と密接に関与していると言われている(Tam 1986)。今回の観察では胎生12.5日の*knt/knt*胎仔の前体節領域では体節細胞は集積していたが、新たな体節形成には至らなかったことから、その0.5日前(胎生12.0日)に何らかの異常が肥厚した前体節領域すなわちsomitomereで生じていた可能性が示唆された。

また、胎生10.5日から12.0日の*knt/knt*胎仔では明瞭な細胞死が前体節領域のさら

に未分節領域と尾芽の境界部において認められた。尾部末端に位置する未分化間葉細胞の集団、すなわち尾芽は第二次体形成(尾部)の発生源であり(Holmdahl 1951; Peter 1951; Griffithら 1992)、さらにGaertner (1949)および Seichert and Jelinek (1968)によると、ニワトリの尾芽の前方境界部では未分化の細胞と分化した細胞が融合しており、この境界領域が伸展するために胎児の体長は増加するといわれている。この成長点、すなわち尾芽の前方領域は*knt/knt*胎仔の尾部の細胞死領域とまさに同部位であったことから、本ミュータントの尾芽前方境界部における強度の細胞死がsomitomere及び体節の異常に起因した可能性が推察された。

*knt/knt*胎仔の尾部の第二次神経管形成において、medullary rosetteは形成されたが、medullary plateは出現しなかった。また胎生10.5日以降の*knt/knt*胎仔では第二次神経管は明らかに変形し、肥厚も伴った。体節と神経管の両組織に異常が認められるミュータントはいくつか報告されているが、強度の神経管変性が体節の形態異常を誘発しないことから両組織の異常はそれぞれ独立した形質の発現であると考えられている(Theiler 1988)。また体節形成の第一ステップは神経管および脊索の存在とまったく無関係である(Hiranoら 1995)。したがって、今回の第二次神経管形成の異常も直接的には尾部体節の異常と関与していないと考えられる。胎生12.5日の*knt/knt*胎仔では第二次神経管形成時の管腔消失あるいは神経管の扁平化が観察されたが、これらはNievelsteinら(1993)によって報告された正常マウスにおける生理的な神経管変性の過程を反映している可能性もある。

*knt/knt*マウスの頸椎異常の解析

軸椎を含む頸椎に異常が出現するミュータントとして、*Mv/+* マウス (Theilerら 1975)、*pu/pu*マウス (Grüneberg 1961)、*rh/rh*マウス (Theilerら 1974)、*Ts/+* (Deol 1961)、*Tc/+*マウス (Searle 1966)および*tk/tk*マウス (Grüneberg 1955a) が知られている。しかしながら、これらのミュータントでは、癒合が複数の頸椎に及んだり、あるいは個々の形状を識別できないほど頸椎が断片化されている(Theiler 1988)。*knt/knt* マウスの頸椎異常はこれらのミュータントと比較するとはるかに軽度の変化であり、頸椎異常を支配する遺伝子は*knt/knt* マウスと他のミュータントでは明らかに異なっていると考えられる。

出生後の軸椎の異常を反映する形態変化がすでに胎生期の軟骨形成時期に出現していたことは本研究から明らかであり、この様式は他のミュータントマウスの結果と一致していた。すなわち、出生後の*Ts/+* マウスにみられた骨の形態変化は胎生14-17日の胎仔の軟骨においてもほぼ同様に観察され (Deol 1961)、*tk/tk*マウスの骨化異常も単に軟骨の形態変化が繰り返された結果であると報告されている (Grüneberg 1955a)。したがって、*knt/knt*胎仔の軸椎正中線上における両椎弓板の癒合不全(軟骨形成異常)が出生後の軸椎棘突起の形成阻害を引き起こした可能性は非常に高いと推察される。

ヒトあるいは動物において、頸椎異常は主として i)後頭骨と環椎との癒合、ii) 軸椎における歯突起形成の異常およびiii)椎孔の狭窄の3つのタイプに分類される。まず、後頭骨と環椎との癒合はヒトにおいて最もよくみられる後頭骨と椎骨との接合異常である (Gunther 1980; Smoker 1994)。後頭骨と環椎との癒合はアラブ馬(Mayhewら 1978) およびセントバーナード犬(Watsonら 1988) にも観察されるが、これらの動物では癒合がさらに軸椎まで及び、脊髄圧迫による障害が認められる。しかしながら*knt/knt*マウスでは、後頭骨および頸椎の癒合あるいはこれらの領域における関節異常は認められず、後頭

骨と椎骨の接合異常は関与していないと考えられる。次に、ii)のヒト軸椎でしばしば出現する歯突起の低形成、無形成および歯突起と椎体の癒合不全 (Davis and Gutierrez 1977; Smoker 1994)については、歯突起の低形成がイヌ (Dennyら 1977)に、また無形成がマウス (Searle 1966; Theiler 1951)で報告されている。しかしながら、*knt/knt*マウスにおける軸椎の歯突起は形態的および形態計測的に正常ICRマウスと同等であった。さらにiii)の頸椎孔の狭窄については、若いウマの中位の頸椎 (Mayhewら 1993; Tomizawaら 1994)および大型犬の後位頸椎 (Masson 1979; Lincoln 1992)にしばしば脊髄病変を伴った椎孔の狭窄が報告されている。しかしながら、今回の形態計測から*knt/knt*マウスでは椎孔の幅はむしろ正常ICRマウスより延長していた。したがって、*knt/knt*マウスに確認された軸椎異常は現在知られている主要な頸椎異常のどの型にも属さなかった。

*knt/knt*マウスの軸椎の晒し骨標本の形態学的検査から軸椎の椎孔内への骨の突出が確認され、形態計測学的検査からも軸椎棘突起に計量的な異常が生じていることが明らかとなった。近年、CTによりヒト軸椎の3次元的な異常を発見することが可能になってきた。ヒトの頸部異常の1症例では、二分脊椎を伴った軸椎の椎孔内に椎弓板から分離した小骨片が穹入し、これが脊髄障害を誘発していることがCT検査により明らかにされている (Koyamaら 1986)。別の1症例では、珍しい軸椎椎弓の無形成が観察されている (Bernini and Muras 1985)。また、Koyamaら (1986)はヒトの椎孔内に穹入した小骨片の存在は2次元X線画像では識別できず、3次元のCT検査のみがこの種の異常を診断できると報告している。したがって、このヒトの軸椎異常は報告されている症例数よりはるかに多く潜在していることを類推させる。ヒトの軸椎椎弓異常の発生的な研究はまったくおこなわれていないが、CTによって発見されたヒトと*knt/knt*マウスの軸椎椎弓の相似性を考慮すると、両者の胎生期の形態形成過程が近いことは十分予想される。かりに軸椎異常の発生過程が両者で同一であるならば、*knt/knt*マウスはヒトにおける軸椎椎弓の形成異常の有用な動物モデルになりうると考えられる。

さらに*knt/knt*マウスには軸椎の異常に加え、頸椎におけるいくつかの新しい形

質、すなわちi)頸椎後半の横幅の拡張、ii)環椎腹結節の肥厚と短小化およびiii)第六頸椎の腹板の肥厚が形態計測によって明らかになった。i)およびiii)の形質に関する報告はないが、これらは*un/un*マウスの頸椎と対称的な形質にもみえる。すなわち、*un/un*マウスでは頸椎の横幅は縮小し(Grüneberg 1950; Sofaer 1985)、第六頸椎の腹板は消失している(Grüneberg 1950)。以上の点から、*knt/knt* マウスには頸部異常に関する新しい対立遺伝子が存在する可能性も示唆される。ii)の環椎腹結節の形状は*Tc/+*マウスに報告されている形質と似ているが、この形態変化が*Tc*遺伝子と関与しているか否かは現在のところ不明である。

総括

1) 遺伝性短曲尾マウスはJcl:ICR系(日本クレア)由来のミュータントであり、浜松医科大学実験動物施設で飼育されていたマウスの中から尾の異常なミュータントとして発見された。本ミュータントは外観的に短く結び目状の曲尾を有しているため、その形態にちなみ *knotty-tail* (遺伝子記号: *knt*)と命名された。このミュータントマウスの尾椎と頸椎に他の系統マウスとは異なる形質が発現している可能性が示唆されたため、i) *knt/knt*マウスの短曲尾形質を遺伝学的に明らかにすること、ii) *knt/knt*マウスの形態学的特徴から従来の系統マウスの尾椎と頸椎に関する形態異常との相違を調べることで、ならびにiii) *knt/knt*マウスの尾の異常の発生機転をつかまえることの以上を目的として、本ミュータントの短曲尾形質に関する遺伝的および形態学的研究、頸椎に関する形態学的および発生学的研究、ならびに短尾と曲尾に関する発生学的研究を企図した。

2) 短曲尾形質の遺伝学的な解析から、この形質は明らかに単一の常染色体上の劣性遺伝子により支配されていることが明らかになった。

3) 軟X線あるいは二重染色による尾の形態検査では、*knt/knt*マウスの尾の長さは正常マ

ウスの3分の1から3分の2であり、本ミュータントでは生後5週齢をすぎても正常尾部の末端にある約10個の尾椎は形成されなかった。また、*knt/knt*マウスの尾は近位の正常椎骨領域と遠位の変形椎骨領域から構成され、変形尾椎ではその両骨端の平行性が失われ、曲部の内側に向かって交叉するように収束していた。

4) 尾椎の形態計測学的解析では、ICRマウスの横幅に対する長さの比率の平均値は近位から遠位にかけて連続的かつ緩やかに上昇する傾向を示したが、*knt/knt*マウスの尾椎比率は正常尾椎にみられた上昇傾向とはまったく異なった変化を示し、雄の第九尾椎以降および雌の第八尾椎以降でICRマウスより有意に低下し、遠位にいくほど正常値と乖離する傾向を示した。また、各個体でみると*knt/knt*マウスの第一尾椎から第五尾椎はICRマウスと比べても差のない形態的にも形態計測的にもきわめて安定した領域であった。

5) 頸椎の形態学的検査では、二重染色標本および晒し標本のいずれにおいても*knt/knt*マウスの軸椎椎弓は非対称および成長不良であり、これに加え軸椎ではしばしば二分脊椎、椎弓の分離および椎孔内への骨片の突出が観察された。形態計測的にも軸椎棘突起の成長阻害は明らかであった。

6) 胎生期頸椎の形態学的検査から、*knt/knt*マウスでは正中線上における両椎弓板の癒合不全が出生後の軸椎棘突起の成長阻害を誘発することが示唆された。

7) 頸椎の形態計測から、*knt/knt*マウスにはさらに新しい形質、すなわちi) 頸椎の横幅の拡張、ii) 環椎腹結節の肥厚と短小化およびiii) 第六頸椎の腹板の肥厚が存在することが明らかとなった。

8) 短尾の発生学的解析から、*knt/knt*胎仔では胎生12.0日まで尾部の体節数は正常胎仔と差がないが、胎生12.5日以降に体節細胞の集積は阻害され、新たな体節形成がおこなわれないことが明らかとなった。また最終尾部体節数と出生後の尾椎数がほぼ同一であることから、本ミュータントでは一度形成された尾部体節は出生後も消失することなくすべての尾椎の形成に寄与していることも示唆された。

9) 曲尾の発生学的解析から、出生後の *knt/knt* マウスの変形尾椎の出現部位と一致した第六から第二十三尾部体節に明らかに形態学および組織学的な異常が存在することが明らかとなり、本ミュータントが今までに報告のない新しい第二次体形成期の体節形成異常モデルであることが示された。さらに、*knt/knt* 胎仔では明瞭な細胞死が第二次体形成期の尾部領域の成長点である未分節領域と尾芽の境界部において認められ、この細胞死が somitomere 及び体節の異常に起因した可能性が示唆された。

10) 以上から、*knt/knt* マウスに関する短曲尾形質の遺伝学的特性および形態学的特徴、頸椎に関する形態学および発生学的特徴、ならびに短尾と曲尾に関する発生機転が、本研究を通じて明らかとなった。

謝辞

稿を終えるに臨み、本研究の開始から完成に至るまで、終始御指導、御鞭撻を賜りました鳥取大学農学部獣医学科家畜解剖学教室 上原 正人 教授に深甚なる謝意を表します。

また多くの有益なご助言を頂いた鳥取大学農学部獣医学科家畜解剖学教室 北川 浩 助教授ならびに今川 智敬 助手 摂南大学薬学部薬物安全科学研究所 奈良間 功 教授ならびに尾崎 清和 研究員に厚く感謝いたします。また動物の提供にご協力を頂いた浜松医科大学実験動物施設 西村 正彦 助教授に心から感謝いたします。

また本研究を遂行するにあたりご協力を頂いた元摂南大学薬物安全科学研究所の職員の皆様に心から感謝いたします。

文献

Bernini, F. P. and Muras, I. (1985). Case report 332: A complex anomaly of the craniovertebral junction representing a regressive malformation with agenesis of the neural arch of C-2, hypomorphogenesis at C5-C6 and instability of the upper cervical spine. *Skeletal Radiol.* **14**: 226-230.

Berry, R. J. (1960). Genetical studies on the skeleton of the mouse. XVI. Pintail. *Genet. Res.* **1**: 439-451.

Davis, D. and Gutierrez, F. A. (1977). Congenital anomaly of the odontoid in children. A report of four cases. *Child's Brain* **3**: 219-229.

Denny, H. R., Gibbs, C. and Gaskell, C. J. (1977). Cervical spondylopathy in the dog - a review of thirty-five cases. *J. Small Anim. Pract.* **18**: 117-132.

Deol, M. S. (1961). Genetical studies on the skeleton of the mouse XXVIII. Tail short. *Proc. R. Soc. Lond. [Biol.]* **155**: 78-95.

Forsthoefel, P. F. (1958). The skeletal effects of the luxoid gene in the mouse, including its interactions with the luxate gene. *J. Morphol.* **102**: 247-287.

Gaertner, R. A. (1949). Development of the posterior trunk and tail of the chick embryo. *J. Exp. Zool.* **111**: 157-174.

Griffith, C. M., Wiley, M. J. and Sanders, E. J. (1992). The vertebrate tail bud: three germ layers from one tissue. *Anat. Embryol.* **185**: 101-113.

Grüneberg, H. (1950). Genetical studies on the skeleton of the mouse. II. Undulated and its "modifiers". *J. Genet.* **50**: 142-173.

Grüneberg, H. (1953). Genetical studies on the skeleton of the mouse. VI. Danforth's short tail. *J. Genet.* **51**: 317-326.

Grüneberg, H. (1954). Genetical studies on the skeleton of the mouse. VIII. Curly-tail. *J. Genet.* **52**: 52-67.

- Grüneberg, H. (1955a). Genetical studies on the skeleton of the mouse. XVI. Tail-kinks. *J. Genet.* **53**: 536-550.
- Grüneberg, H. (1955b). Genetical studies on the skeleton of the mouse. XVII. Bent-tail. *J. Genet.* **53**: 551-562.
- Grüneberg, H. (1961). Genetical studies on the skeleton of the mouse. XXIX. Pudgy. *Genet. Res.* **2**: 384-393.
- Gunther, S. F. (1980). Congenital anomaly of the cervical spine: fusion of the occiput, atlas, and odontoid process. A case report. *J. Bone Joint Surg. Am.* **62**: 1377-1378.
- Hirano, S., Hirako, R., Kajita, N. and Norita, M. (1995). Morphological analysis of the role of the neural tube and notochord in the development of somites. *Anat. Embryol.* **192**: 445-457.
- Hollander, W. F. and Waggie, K. S. (1977). Meander tail; a recessive mutant located in chromosome 4 of the mouse. *J Hered.* **68**: 403-406.
- Holmdahl, D. E. (1925). Experimentelle Untersuchungen über die Lage der Grenze zwischen primärer und sekundärer Körperentwicklung beim Huhn. *Anat. Anz.* **59**: 393-396.
- Holmdahl, D. E. (1951). Die zweifache Morphogenese des Vertebra-tenorganismus. Die primäre (indirekte) und sekundäre (direkte) Körperentwicklung. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* **57**: 359-392.
- Inouye, M. (1976). Differential staining of cartilage and bone in fetal mouse skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Cong. Anom.* **16**: 171-173.
- Johnson, D. R. and Wallace, M. E. (1979). Crinky-tail, a mild skeletal mutant in the mouse. *J. Embryol. Exp. Morph.* **53**: 327-333.
- Kaufman, M. H. (1992). In "The atlas of mouse development." (London: Academic press), pp. 497.

Koyama, T., Tanaka, K. and Handa, J. (1986). A rare anomaly of the axis: report of a case with shaded three-dimensional computed tomographic display. *Surg. Neurol.* **25**: 491-494.

Sai

Kunitomo, K. (1918) The development and reduction of the tail and of the caudal end of the spinal cord. In "Contribution to embryology", Vol **26**. (Carnegie), pp. 161-198.

San:

Lincoln, J. D. (1992). Cervical vertebral malformation/malarticulation syndrome in large dogs. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **22**: 923-935.

Lyon F., Rastan S. and Brown S. D. M. (1996). In "Genetic variations and strains of the laboratory mouse". (New York: Oxford University Press).

MacDowell, E. C. and Polter, J. S. (1942). The manifold effects of the screw tail mouse mutation. *J. Hered.* **33**: 439-449.

Masson, T. A. (1979). Cervical vertebral instability (wobbler syndrome) in the dog. *Vet. Rec.* **104**: 142-145.

Matter, H. (1957). Die formale Genese einer vererbten Wirbelsäulenmissbildung am Beispiel der Mutante Crooked-tail der Maus. *Rev. Suisse Zool.* **64**: 1-38.

Mayhew, I. G., Watson, A. G. and Heissan, J. A. (1978). Congenital occipitoatlantoaxial malformations in the horse. *Equine Vet. J.* **10**: 103-113.

Mayhew, I. G., Donawick, W. J., Green, S. L., Galligan, D. T., Stanley, E. K. and Osborne, J. (1993). Diagnosis and prediction of cervical vertebral malformation in thoroughbred foals based on semi-quantitative radiographic indicators. *Equine Vet. J.* **25**: 435-440.

Ta:

Nivelstein, R. A., Hartwig, N. G., Vermeij-Keers, C. and Valk, J. (1993). Embryonic development of the mammalian caudal neural tube. *Teratology* **48**: 21-31.

m:

Noden, D.M. and DeLahunta A. (1985). In "The embryology of domestic animals. Developmental mechanisms and malformations". (Baltimore: Williams & Wilkins)

Peter, K. (1951). Die zweifache Entwicklung des Wirbeltierkörpers in finaler, erhaltungsfunktioneller Betrachtung. *Z. Mikros. Anat. Forsch.* **57**: 393-401.

Saheki, Y., Yamashita, C., Shimura, S. and Wakayama, Y. (1982). Morphological variability of caudal vertebrae in Japanese domestic cats - Surveys of Tokyo area between Aug. 1973 and Dec. 1974 -. *Juuichikusanshinpou* **734**: 25-28

Sanders, E. J., Khare M. K., Ooi V. C. and Bellairs R. (1986) An experimental and morphological analysis of the tail bud mesenchyme of the chick embryo. *Anat. Embryol.* **174**: 179-185.

Schoenwolf, G. C. (1984). Histological and ultrastructural studies of secondary neurulation in mouse embryos. *Am. J. Anat.* **169**: 361-376.

Searle, A. G. (1966). Curtailed, a new dominant T-allele in the house mouse. *Genet. Res.* **7**: 86-95.

Seichert, V. and Jelinek, R. (1968). Tissue shifts in the end and tail bud of the chick embryo. *Folia Morphol.* **16**: 436-446.

Smoker, W. R. (1994). Craniovertebral junction: normal anatomy, craniometry, and congenital anomalies. *Radiographics.* **14**: 255-277.

Sofaer, J. A. (1985). Developmental stability in the mouse vertebral column. *J. Anat.* **140**: 131-141.

Strong, L. C. and Hollander, W. F. (1949). Hereditary loop-tail in the house mouse accompanied by imperforate vagina and craniorachischisis when homozygous. *J. Hered.* **40**: 329-334.

Tam, P. P. (1981). The control of somitogenesis in mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **65**: 103-128.

Tam, P. P. (1986). A study on the pattern of prospective somites in the presomitic mesoderm of the mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morph.* **92**: 269-285.

Theiler, K. (1951). Die Entstehung der Densluxation bei der Short Danforth-Maus. *Arch. Julius Klaus-Shiftung Verteb. Forschung.* **26**: 450-454.

Theiler, K. and Gluecksohn-Waelsch, S. (1956). The morphological effects and the development of the fused mutation in the mouse. *Anat. Rec.* **125**: 83-103.

Theiler, K., Varnum, D. S. and Stevens, L. C. (1974). Development of rachiterata, a mutation in the house mouse with 6 cervical vertebrae. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **145**: 75-80.

Theiler, K., Varnum, D., Southard, J. L. and Stevens, L. C. (1975). Malformed vertebrae: a new mutant with the "Wirbel-Rippen Syndrom" in the mouse. *Anat. Embryol.* **147**: 161-166.

Theiler, K. and Varnum, D. S. (1985). Development of rib-vertebrae: a new mutation in the house mouse with accessory caudal duplications. *Anat. Embryol.* **173**: 111-116.

Theiler, K. (1988). In "Vertebral malformations". (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag).

Tomizawa, N., Nishimura, R., Sasaki, N., Nakayama, H., Kadosawa, T., Senba, H. and Takeuchi, A. (1994). Relationships between radiography of cervical vertebrae and histopathology of the cervical cord in wobbling 19 foals. *J. Vet. Med. Sci.* **56**: 227-233.

Watson, A. G., Lahunta, A. and Evans, H. E. (1988). Morphology and embryological interpretation of a congenital occipito-alanto-axial malformation in a dog. *Teratology* **38**: 451-459.

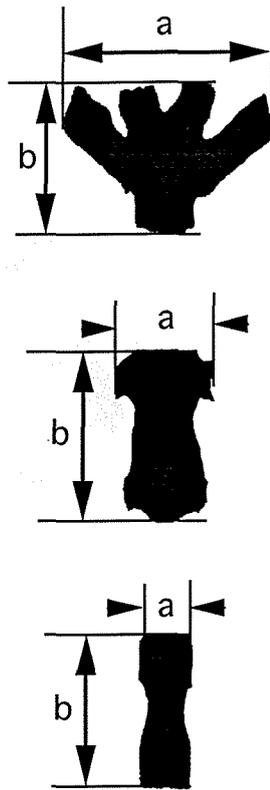


図 1 正常尾椎の概略図と形態計測部位。
上段に第一尾椎、中段に第七尾椎、
下段に第十七尾椎を示す。

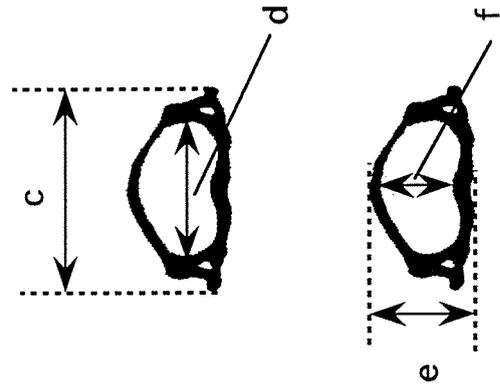


図 2-1 頸椎の概略図と形態計測部位。
上下段に第三頸椎を示す。

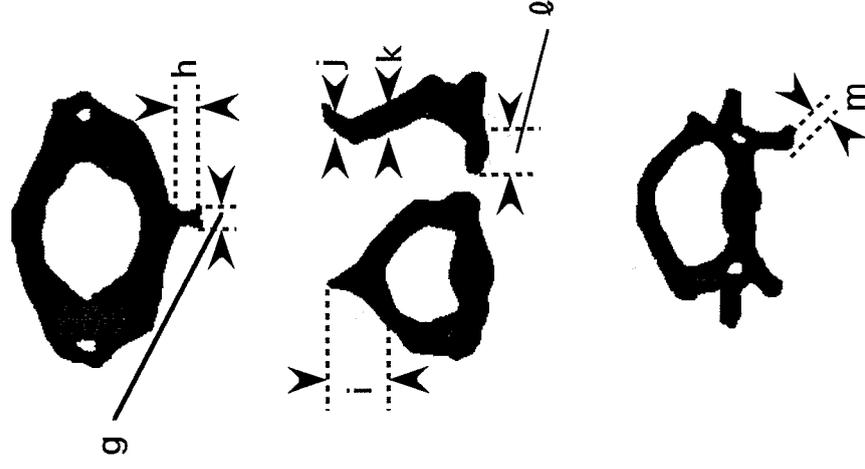


図 2-2 環椎、軸椎および第六頸椎の概略図と形態計測部位。
上段に第一頸椎(環椎)、中段に第二頸椎(軸椎)、下段に第六頸椎を示す。

表 1 knotty-tail マウスの遺伝様式

Matings	Progeny phenotype		Total	Expected Ratio	χ^2
	Normal	knotty tail			
$knt/knt \times knt/knt$	0	851	851	0 : 1	-
$knt/knt \times +/+$	90	0	90	1 : 0	-
$knt/+ \times knt/+$	295	87	382	3 : 1	1.009
$knt/knt \times knt/+$	284	280	564	1 : 1	0.028

表 2 雄マウスにおける平均尾長(cm)の推移

Age (weeks)	ICR	knt/knt	Ratio (knt/ICR)
1	3.20 ± 0.11 (n=5)	1.03 ± 0.22 (n=10)	0.32
3	5.00 ± 0.32 (n=5)	2.91 ± 0.48 (n=9)	0.58
5	9.74 ± 0.21 (n=5)	4.45 ± 0.51 (n=12)	0.46
7	10.64 ± 0.42 (n=5)	4.09 ± 0.85 (n=7)	0.38

数字は平均±標準偏差を示す。 **: 危険率0.01でICRマウスとの差が有意。

表 3 雄マウスの尾椎における平均骨化椎骨数の推移

Age (weeks)	ICR	knt/knt
gestation day of 18	7.72 ± 1.17 (n=10)	5.20 ± 0.66 ** (n=10)
1	27.60 ± 0.49 (n=5)	19.1 ± 1.76 ** (n=10)
3	32.75 ± 1.09 (n=5)	19.89 ± 3.93 ** (n=9)
5	32.00 ± 1.10 (n=5)	21.83 ± 2.58 ** (n=12)
7	31.80 ± 0.98 (n=5)	20.86 ± 1.88 ** (n=7)

数字は平均±標準偏差を示す。 **: 危険率0.01でICRマウスとの差が有意。

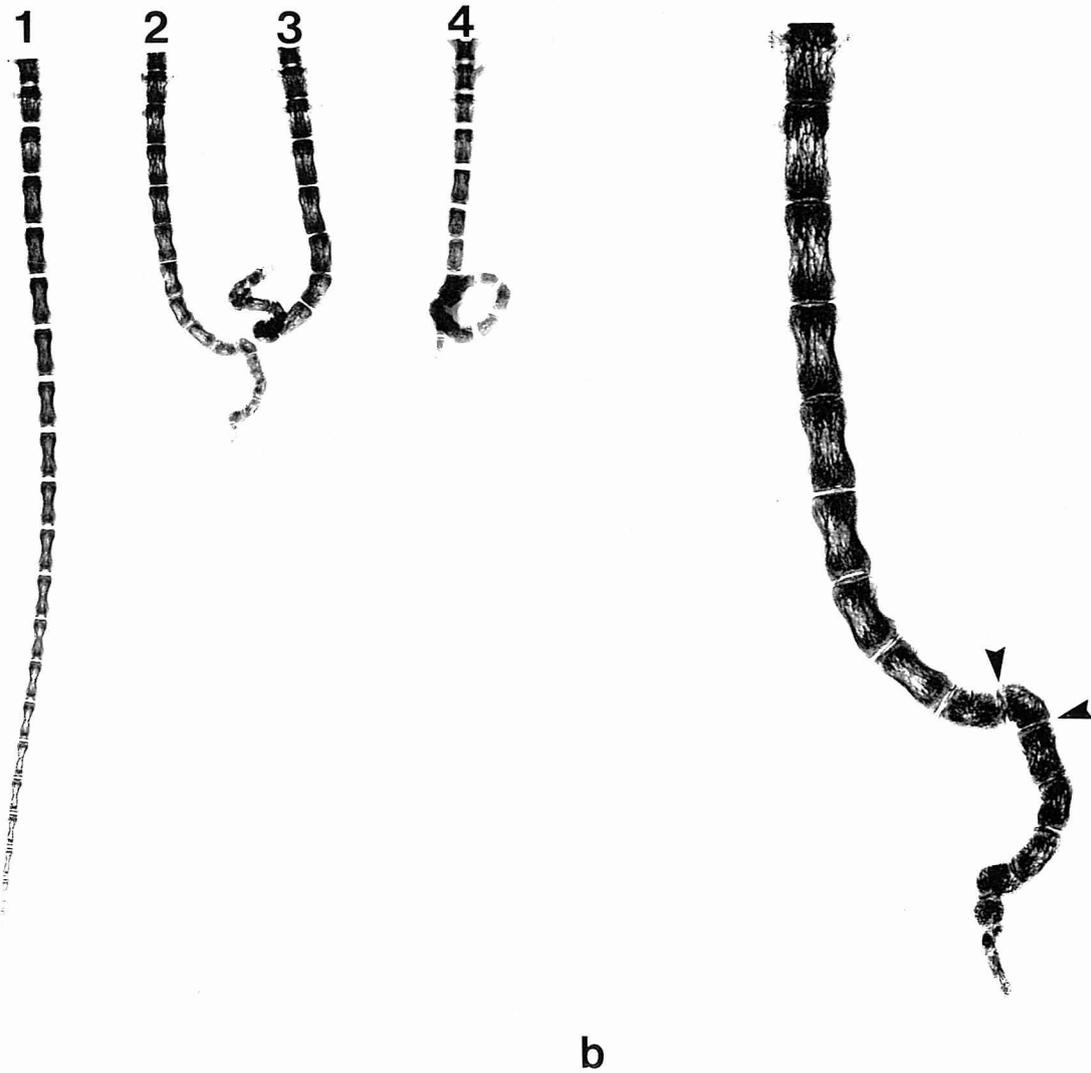


図 3a 5週齢雄マウスの尾の軟X線造影像(×2)。

1: ICRマウス 2-4: *knt/knt*マウス。 *knt/knt*マウスの尾部は近位の正常領域と遠位の变形椎骨領域によって構成され、遠位では結び目状の曲尾が観察される。

図 3b *knt/knt*マウスの曲尾部分の拡大図 (図 3aの2 ×4)。

变形尾椎では、両骨端の平行性が明らかに失われている(矢印)。遠位の尾椎ほど短縮化され変形の程度が強い。

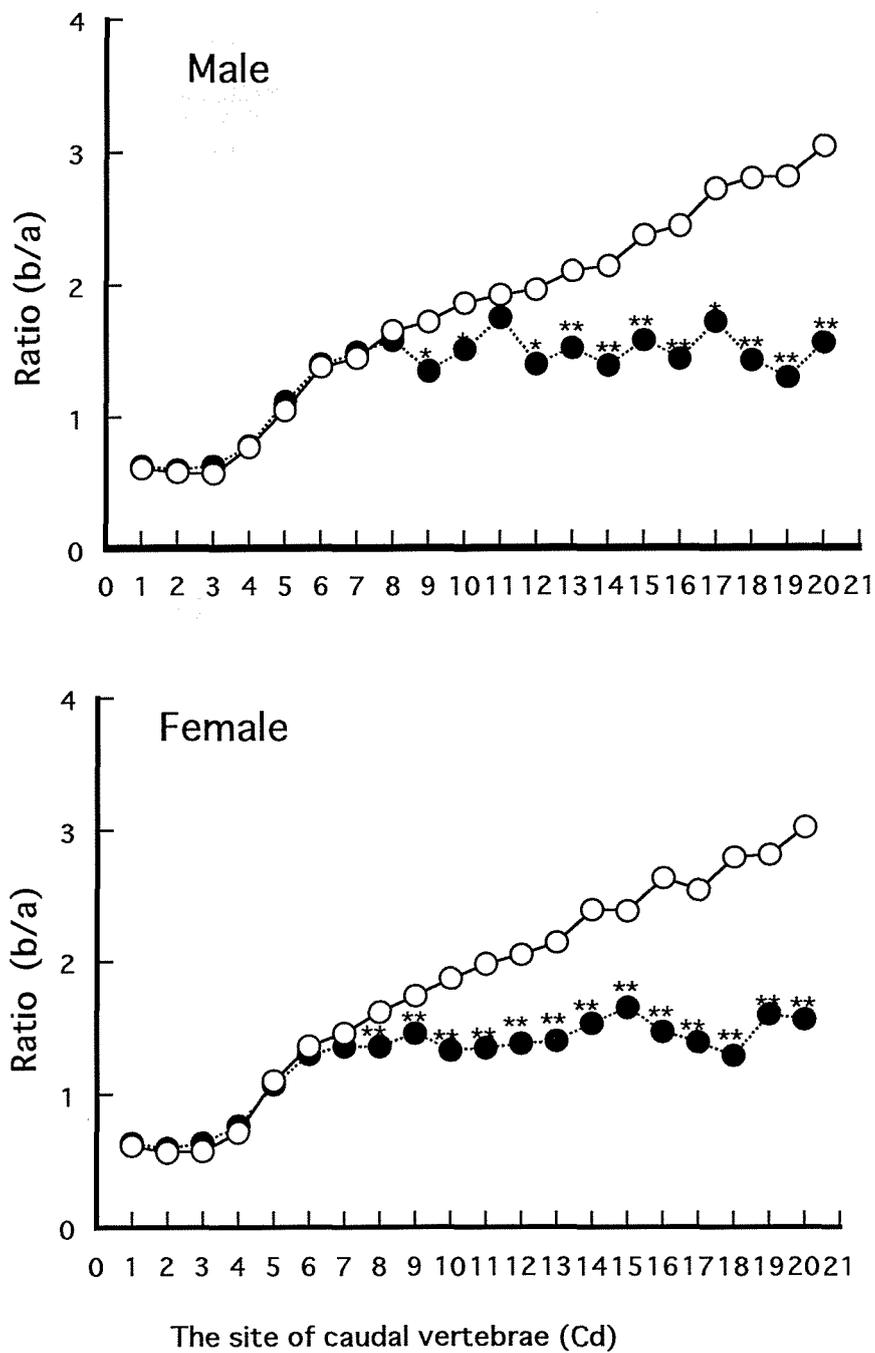


図4 5週齢の*knt/knt*マウスの平均尾椎比率(b/a)の変化(図1を参照)。
 ○: ICRマウスの平均尾椎比率 ●: *knt/knt*マウスの平均尾椎比率
 ★および★★: 危険率0.05および0.01でICRマウスとの差が有意。

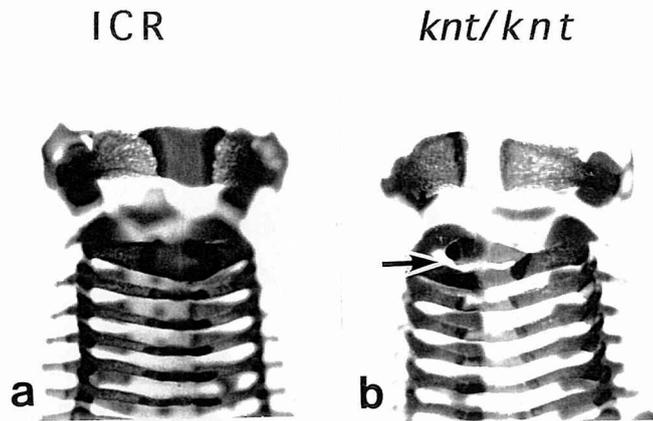


図5 二重染色を施した18日齢雄胎仔の頸椎(×10)。
a: ICR胎児 **b:** *knt/knt*胎児。 *knt/knt*胎児では両椎弓板の正中線上の正常な癒合はみられず(**b**矢印)、その成長はICRマウスと比べ明らかに阻害されている。

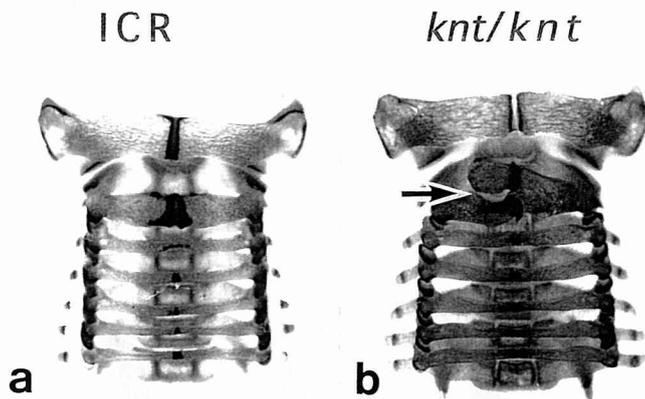


図6 二重染色を施した1週齢雄マウスの頸椎(×6.5)。
a: ICRマウス **b:** *knt/knt*マウス。両系統マウスともに椎弓の骨化は進行しているが、*knt/knt*マウスの軸椎椎弓は依然として非対称(**b**矢印)である。

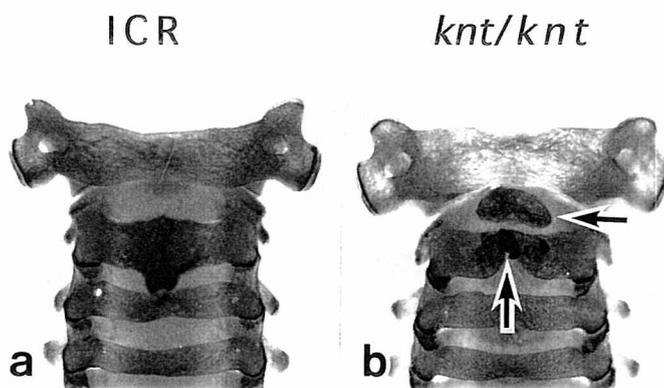


図7 二重染色を施した5週齢マウスの頸椎(×6.5)。
a: ICRマウス **b:** *knt/knt*マウス。両系統マウスともに椎弓の骨化はほぼ終了している。*knt/knt*マウスでは軸椎椎弓に大きな裂が観察され(**b**下中央矢印)、さらに椎弓の一部が吻側に分離している(**b**上右矢印)。

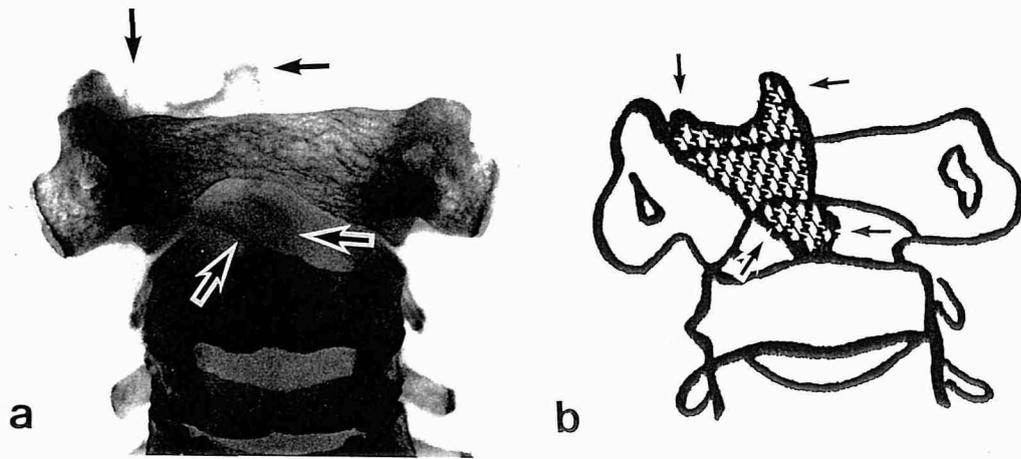


図8 二重染色を施した7週齢*knt/knt*雄マウスの頸椎(a, $\times 8.5$)とその概略図(b)。軸椎椎弓の前方背側から骨小片が吻側に突出し、さらにこの骨は環椎椎孔の内部を貫通している(矢印および網状部分)。

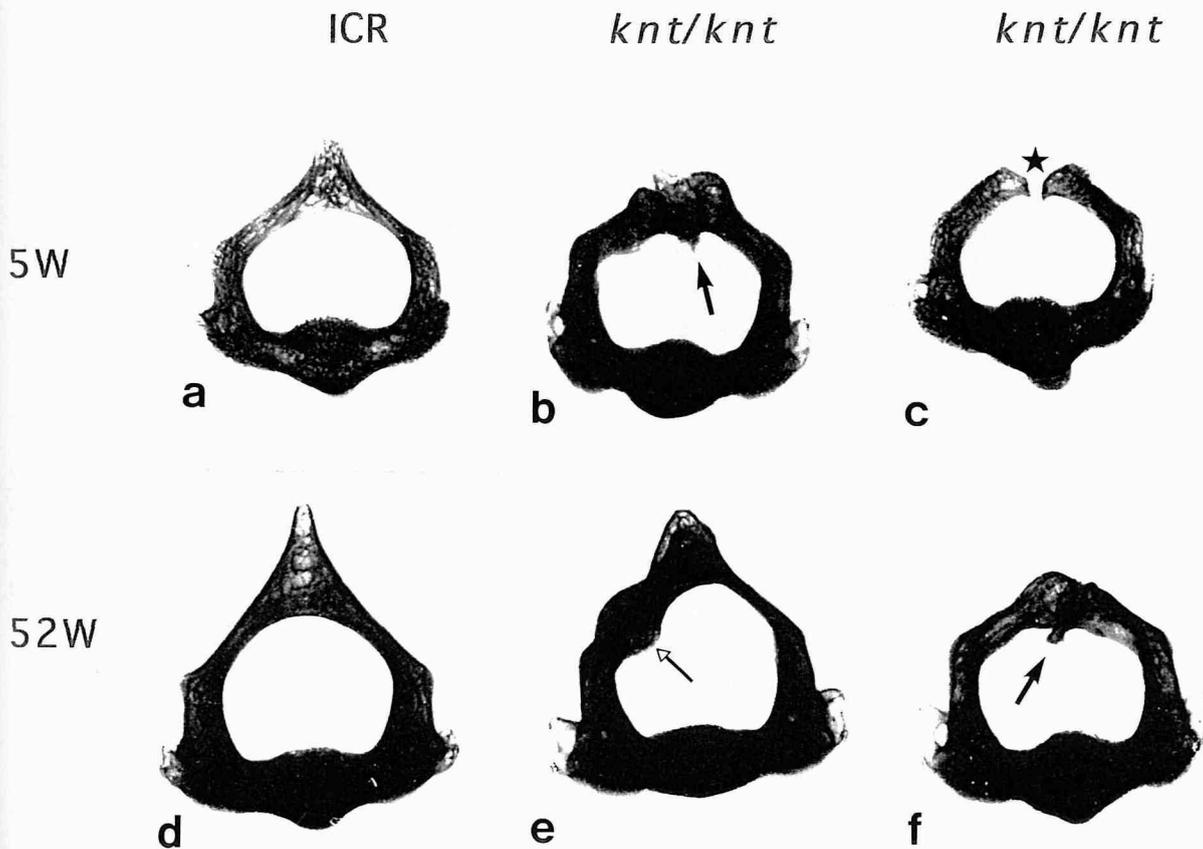


図9. マウス軸椎の軟X線造影像($\times 9$)。

a: 5週齢ICR雄マウス b, c: 5週齢*knt/knt*雄マウス d: 52週齢ICR雄マウス e, f: 52週齢*knt/knt*雄マウス。 *knt/knt*マウスの軸椎棘突起の成長阻害は明らかであり、軸椎背側面には複雑な亀裂が観察される。重度の場合には、二分脊椎が認められ(c, *印)、さらに椎弓のほぼ中央部から円錐状および棒状の突起物(b, f 矢印)あるいは結節状の隆起物(e 白ぬき矢印)が椎孔内に突出している。

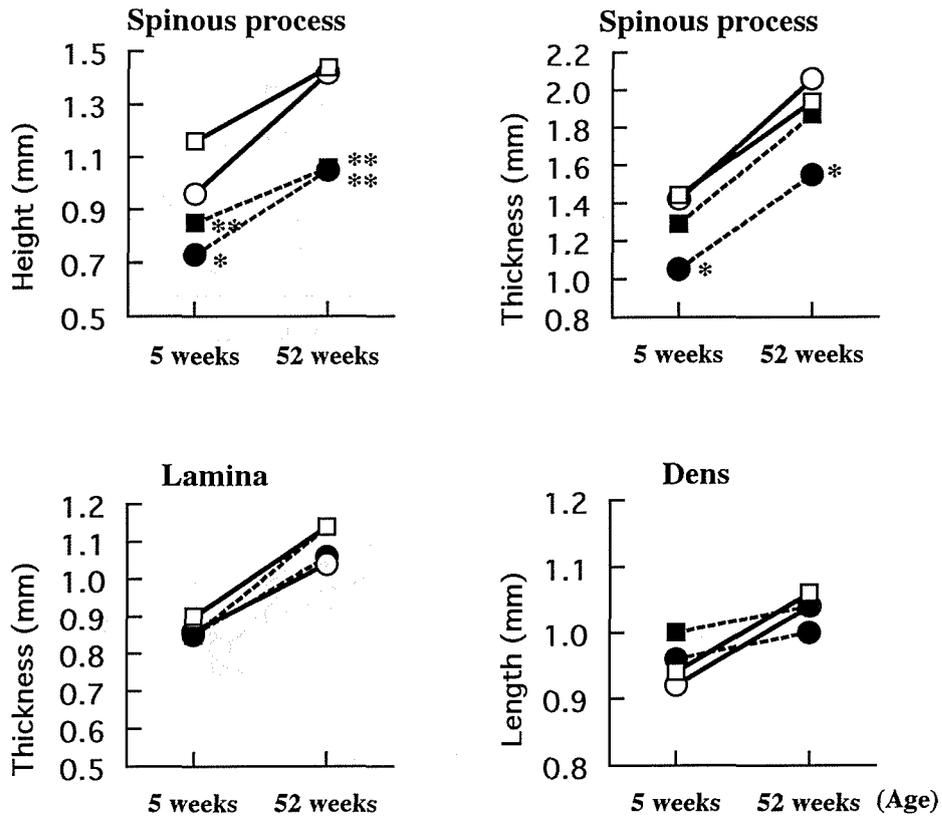


図 10 5および52週齢マウスの軸椎の形態計測結果
 上段左に棘突起の高さ、上段右に棘突起の前後長、下段左に椎弓板の前後長、
 下段右に歯突起の長さの測定結果を示す(図 2-2参照)。□:雄ICRマウス
 ■:雄 *knt/knt*マウス ○:雌 ICRマウス ●:雌 *knt/knt*マウス。
 *および**: 危険率0.05および0.01でICRマウスとの差が有意。

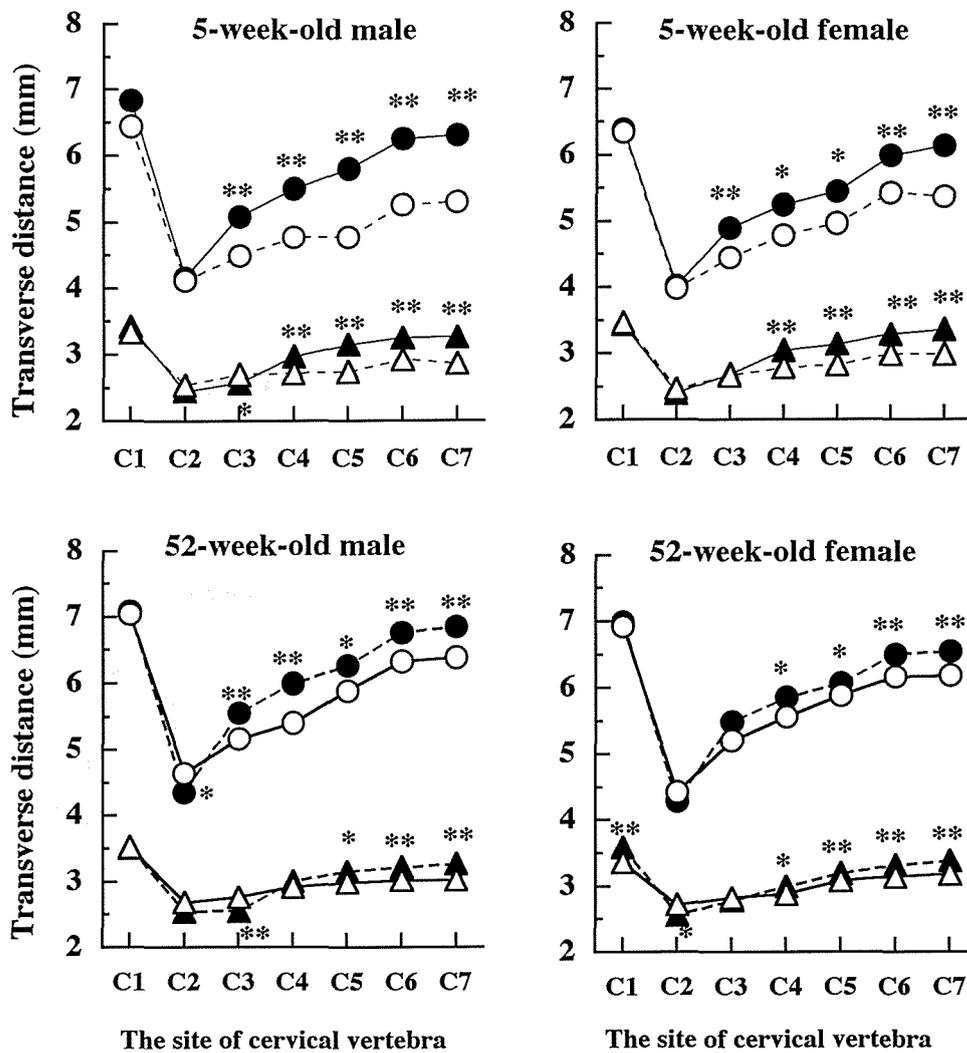


図 11 生後5および52週齢のマウスの頸椎および椎孔の横幅の変化
 図2-1を参照。○ICRマウスの頸椎の横幅 ●*knt/knt*マウスの頸椎の横幅
 △ICRマウスの椎孔の横幅 ▲*knt/knt*マウスの椎孔の横幅。
 *および**: 危険率0.05および0.01でICRマウスとの差が有意。

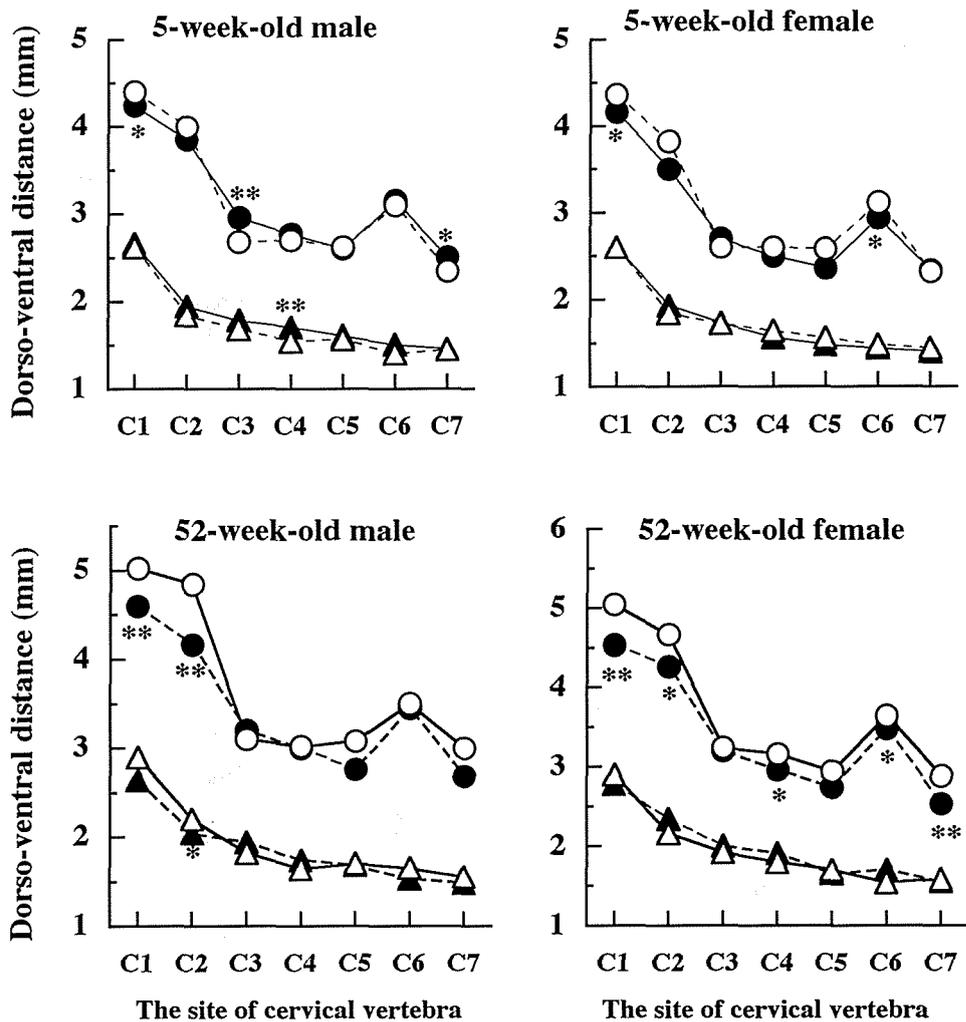


図 12 生後5および52週齢の Maus 頸椎および椎孔の高さの変化。
 図2-1を参照。○ICRマウスの頸椎の高さ ●knt/kntマウスの頸椎の高さ
 △ICRマウスの椎孔の高さ ▲knt/kntマウスの椎孔の高さ。
 *および**: 危険率0.05および0.01でICRマウスとの差が有意。

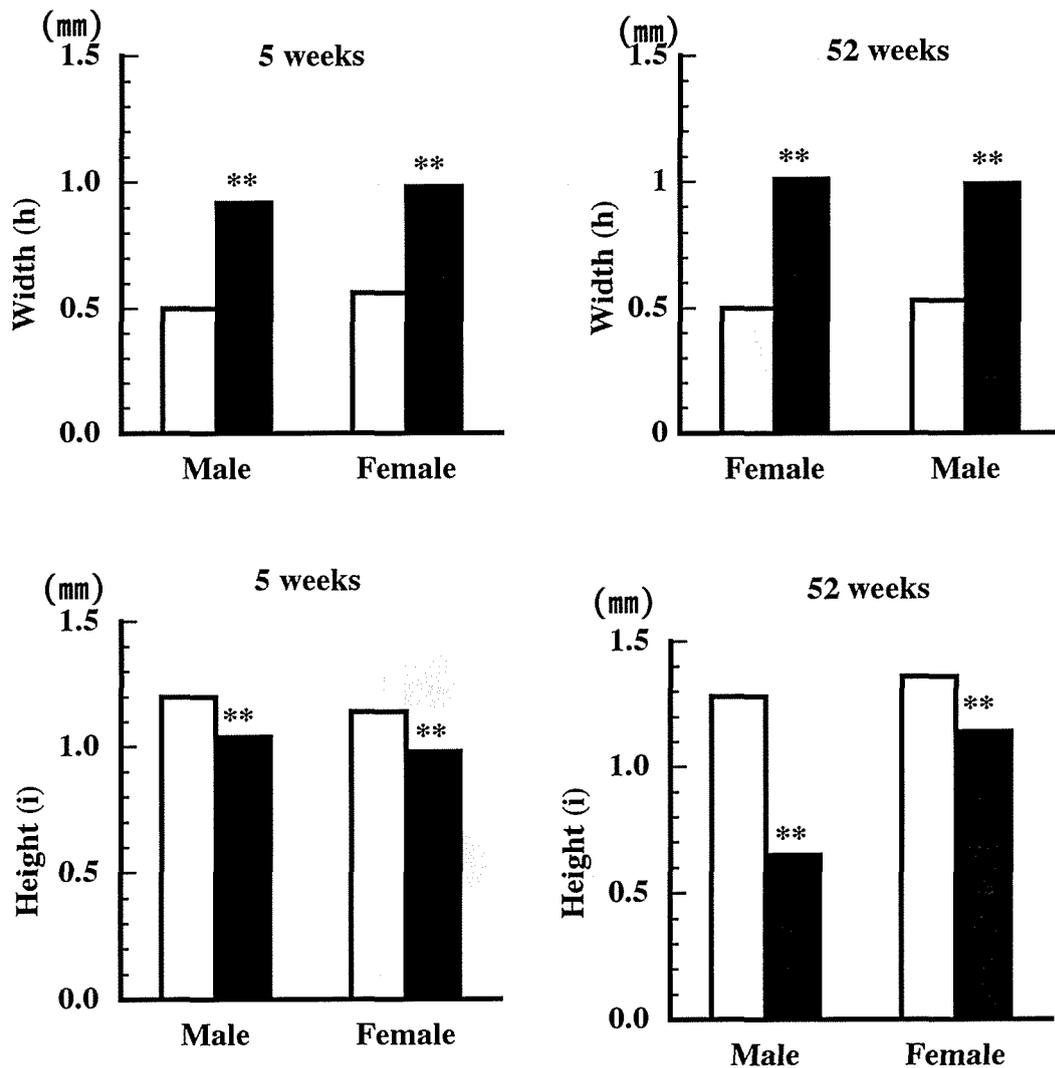


図 13 5および52週齢マウスの環椎腹結節の形態計測結果。
 上段左に5週齢マウスの腹結節の横幅を、上段右に52週齢マウスの腹結節の横幅を、
 下段左に5週齢マウスの腹結節の高さを、上段右に52週齢マウスの腹結節高さを示す。
 図 2-2を参照。□: ICRマウス ■: *knt/knt*マウス。
 ★および★★: 危険率0.05および0.01でICRマウスとの差が有意。

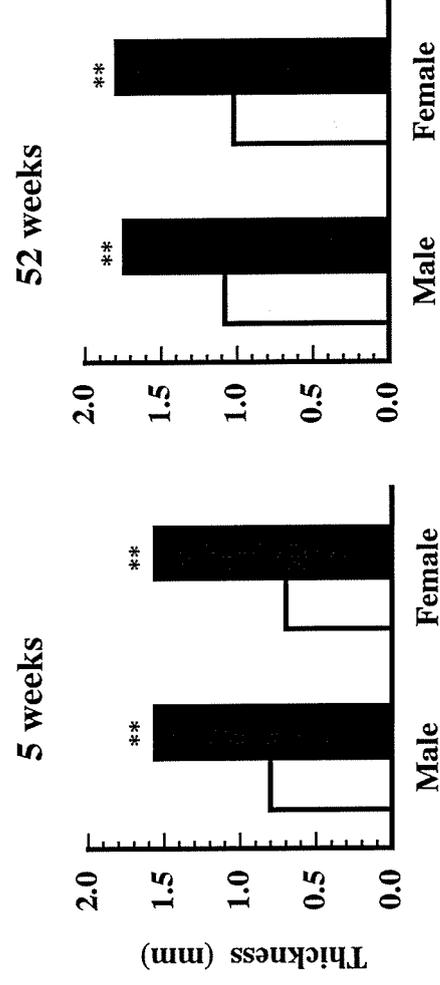


図 14 5および52週齢マウスの第六頸椎腹板の形態計測結果。
 左に5週齢の第六頸椎腹板の前後長を、右に52週齢の第六頸椎腹板の前後長を示す。
 図2-2を参照。□: ICRマウス ■: knt/kntマウス。
 ★および★★: 危険率0.05および0.01でICRマウスとの差が有意。

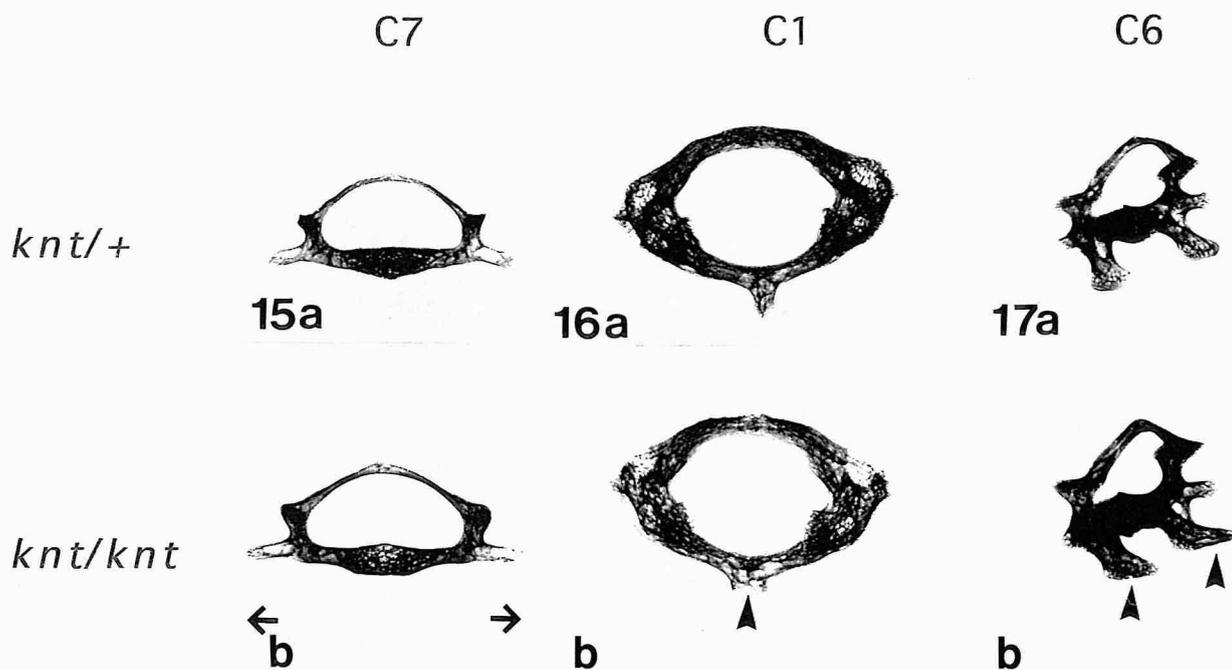


図 15 5週齢雄マウスの頸椎後半(第七頸椎)の軟X線造影像(×5)。
a: ICRマウス **b**: *knt/knt*マウス。*knt/knt*マウスの第七頸椎は
 ICRマウスと比較すると、横に広がっているように見える(**b** 矢印)。

図 16 5週齢雄マウスの環椎の軟X線造影像(×5)。
a: ICRマウス **b**: *knt/knt*マウス。*knt/knt*マウスの環椎腹結節は
 ICRと比較すると、扁平化している(**b** 矢頭)。

図 17 5週齢雄マウスの第六頸椎の軟X線造影像(×5)。
a: ICRマウス **b**: *knt/knt*マウス。*knt/knt*マウスの第六頸椎の腹板は
 ICRと比較すると、前後に幅広くなっている(**b** 矢頭)。

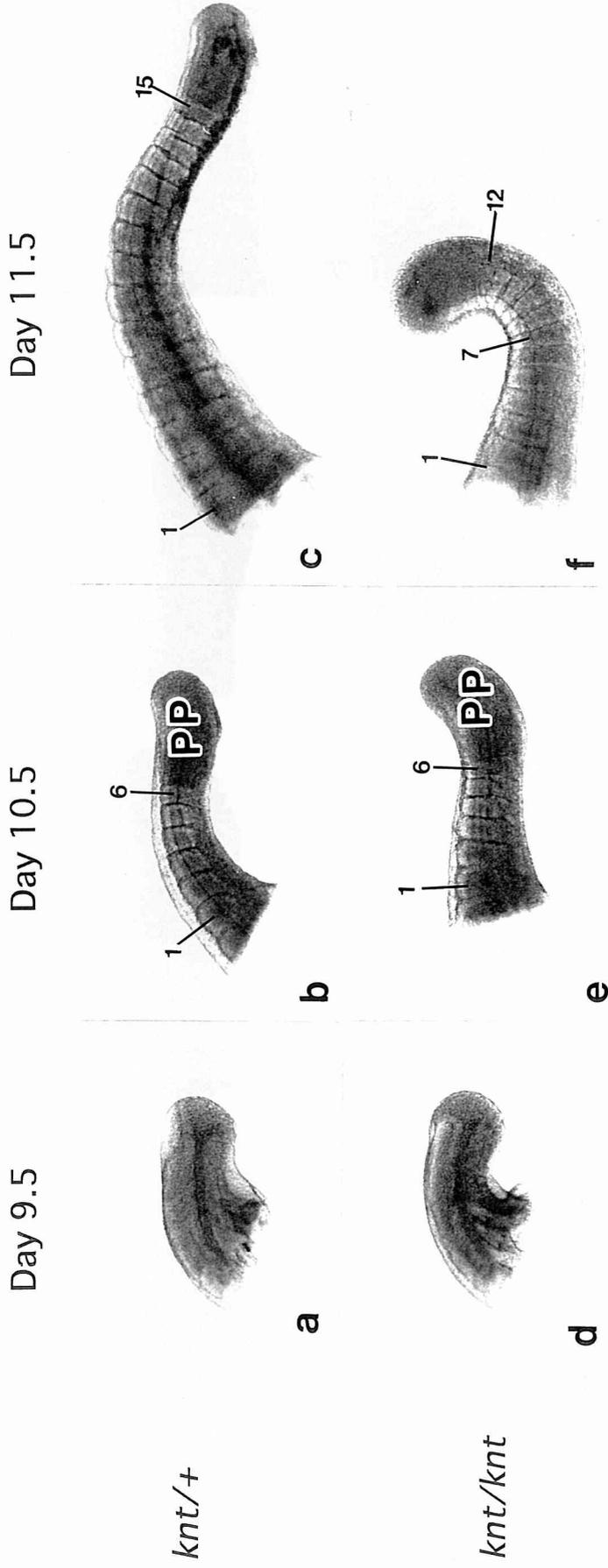


図 18 実体鏡下におけるマウス胎児期尾部の形態 (×27)。

a-c: *knt/+* 胎仔 (a: 胎生9.5日 b: 10.5日 c: 11.5日)

d-f: *knt/knt*胎仔 (d: 胎生9.5日 e: 10.5日 f: 11.5日) PP: 前体節領域。
 数字はその位置の尾部位節数を示す。胎生10.5日の *knt/knt* 胎仔(e)では
 尾部の長軸は末端の前体節領域で軽度ながら背側方向に彎曲している。

胎生11.5日の *knt/knt*胎仔(f)では尾部はさらに明瞭に曲がりU字状を呈している。
 このU字部分を構成している第七から第十二尾部位節は背側が狭くなるような楔形である。

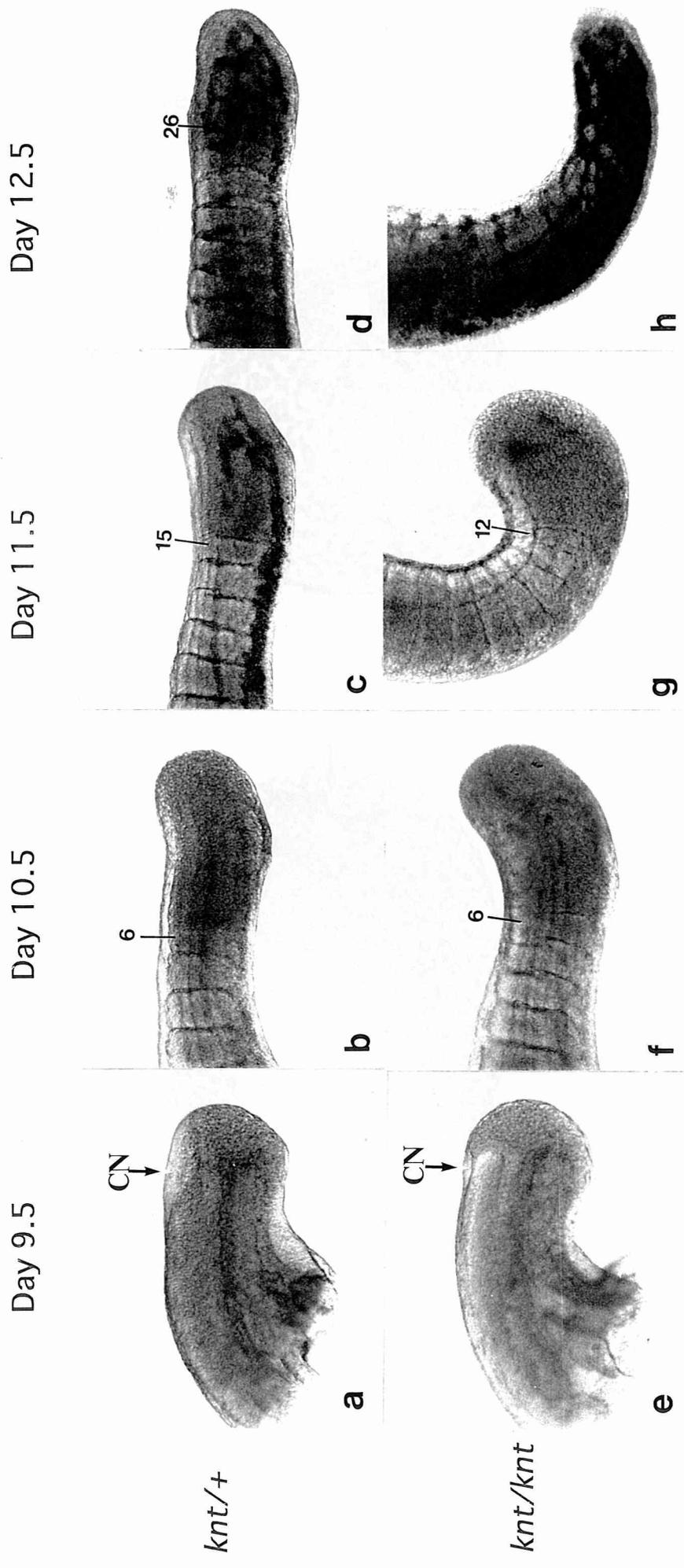


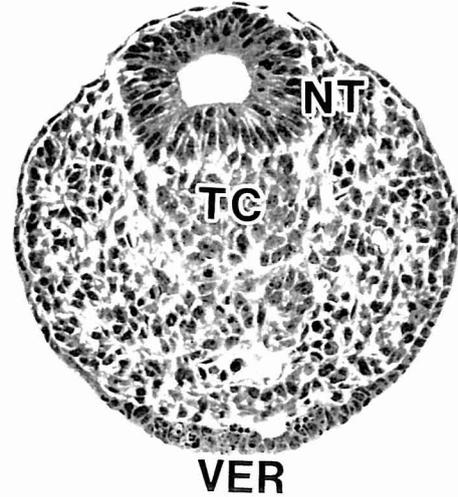
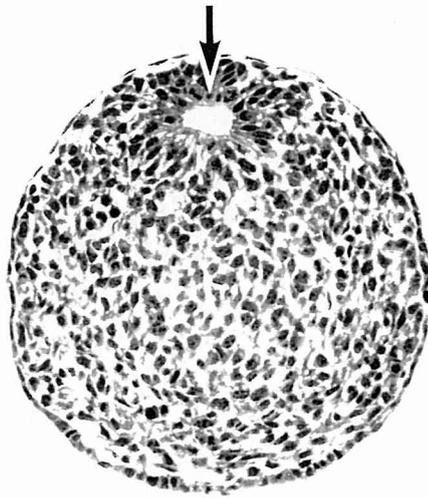
図 19 実体鏡下におけるマウス尾部先端の形態変化(×50)。

a-d: *knt/+* 胎仔 (a: 胎生9.5日 b: 10.5日 c: 11.5日 d: 12.5日)
 e-f: *knt/knt* 胎仔 (e: 胎生9.5日 f: 10.5日 g: 11.5日 h: 12.5日) CN: 後部神経孔
 数字はその尾部の最終体節番号を示す。胎生9.5日の両系統胎仔ではともに後部神経孔が開存している(a, e)。胎生11.5日の*knt/knt*胎仔では体節に続く尾部先端の前体節領域は著しく肥厚している(g)。胎生12.5日の*knt/knt*胎仔では新たな体節は形成されず、その先端は血管の網で張りめぐらされ、血腫状である(h)。

Presomitic part (Caudal)

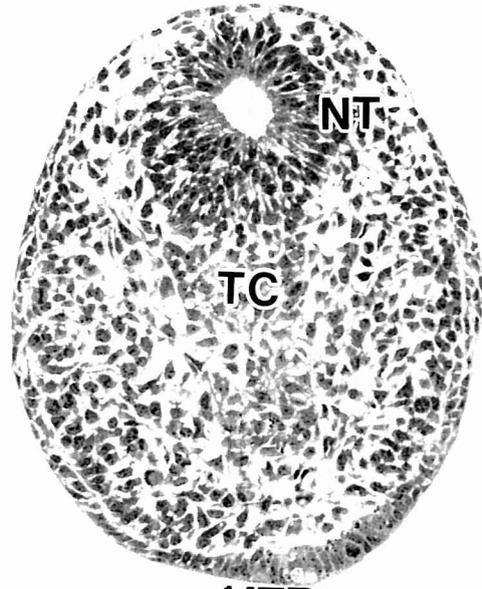
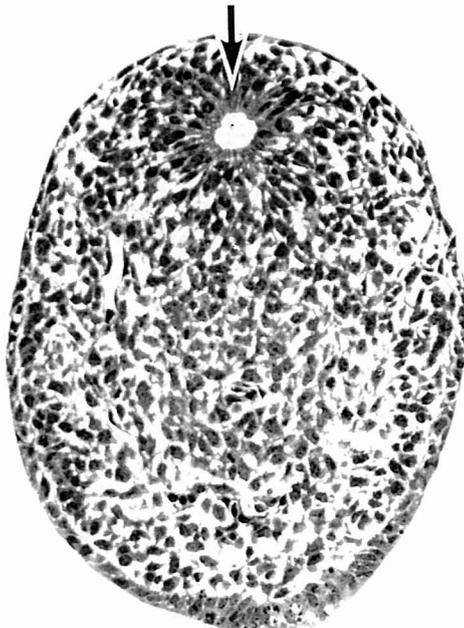
Presomitic part (Rostral)

knt/+



a

knt/knt



c

VER

d

VER

図 20 尾部の前体節領域における組織変化(胎生10.5日 横断面 ×100)。

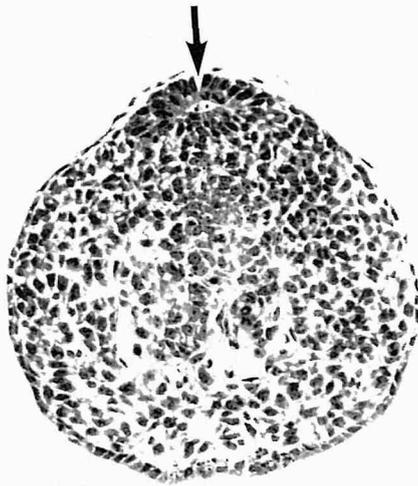
a - b: *knt/+*胎仔 c - d: *knt/knt*胎仔 ↓: medullary rosette NT: 第二次神経管

TC: 尾索 VER: 腹側外胚葉堤。 *knt/knt*胎仔では実体鏡下で認められた尾部末端部(前体節領域)の肥厚がその組織横断面の延長、すなわち未分節領域の背腹方向の径の延長から確認できる(c, d)。この時期の神経管形成はいずれの系統も正常であり、尾芽のやや吻側に円形の小腔を囲む正常なmedullary rosetteが形成されている(a, c)。 *knt/knt*胎仔のVERの位置(c, d)は *knt/+*胎仔の位置(b)と比較するとわずかなではあるが尾側にずれている。

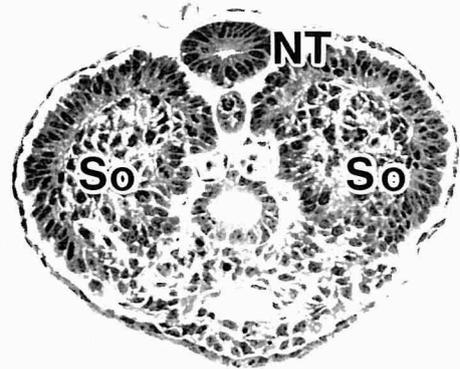
Presomitic part

Somitic part

knt/+

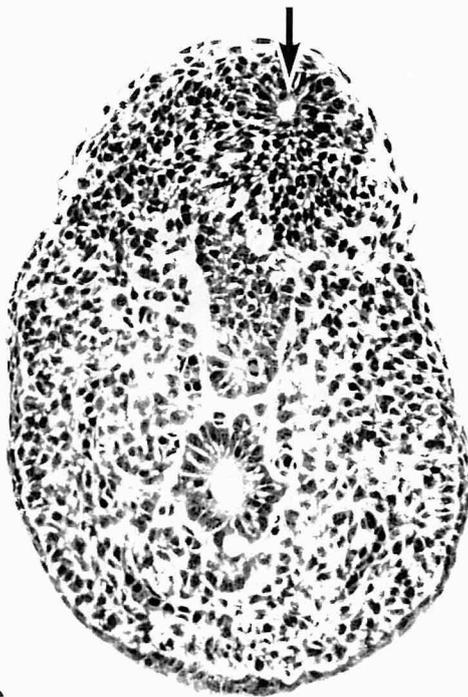


a

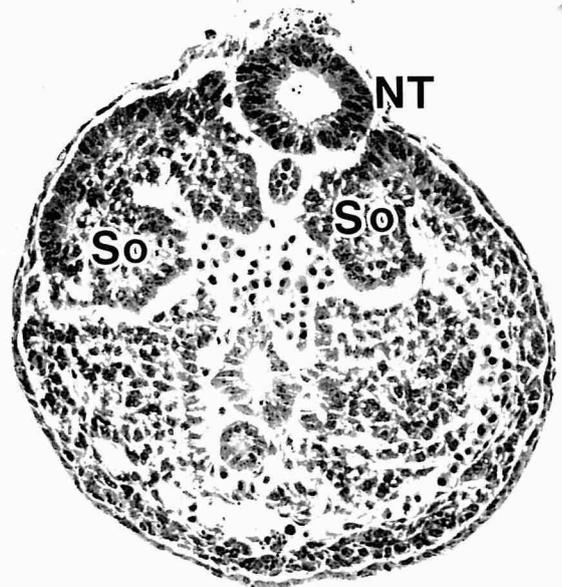


b

knt/knt



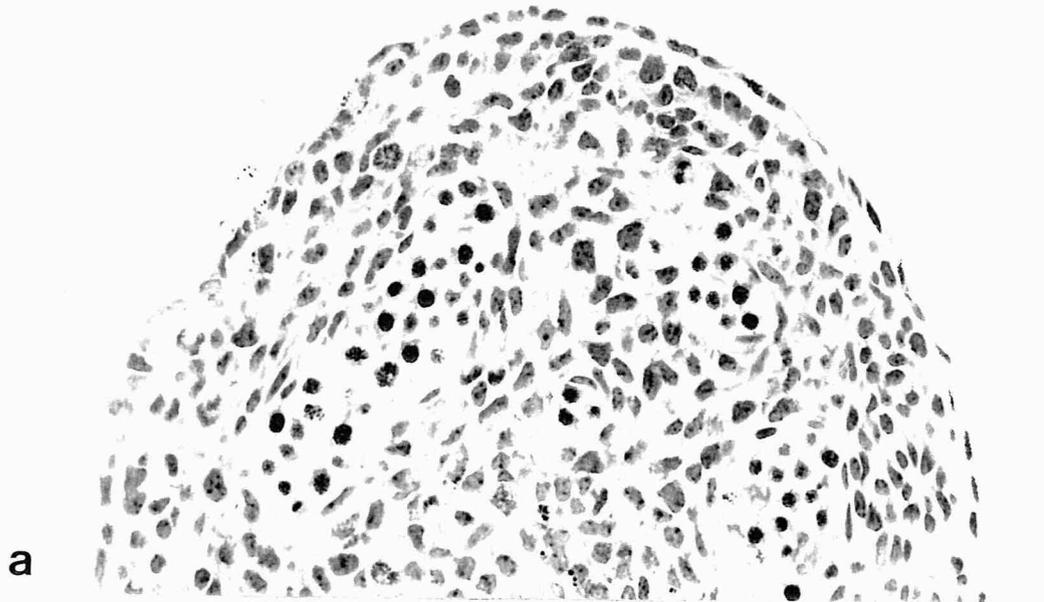
c



d

図 21 尾部の前体節および体節領域における組織変化(胎生11.5日 横断面 ×100)。
a-b: *knt/+*胎仔 c-d: *knt/knt*胎仔。↓: medullary plate (a)あるいは medullary rosette (b)様の細胞群 NT: 第二次神経管 So: 体節。*knt/knt*胎仔の未分節領域の背腹方向の径は延長している(c)。*knt/knt*胎仔では神経管形成においても異常が認められ、スリット状の小腔を囲む板状の細胞群medullary plate (a 矢印)は現れず、代わりに菱形の小腔の回りにmedullary rosette様の細胞群が形成されている(c 矢印)。また*knt/knt*胎仔の尾部体節は対称な正常体節(b)と比較すると明らかに不規則でいびつな形状である(d)。

knt/+



knt/knt

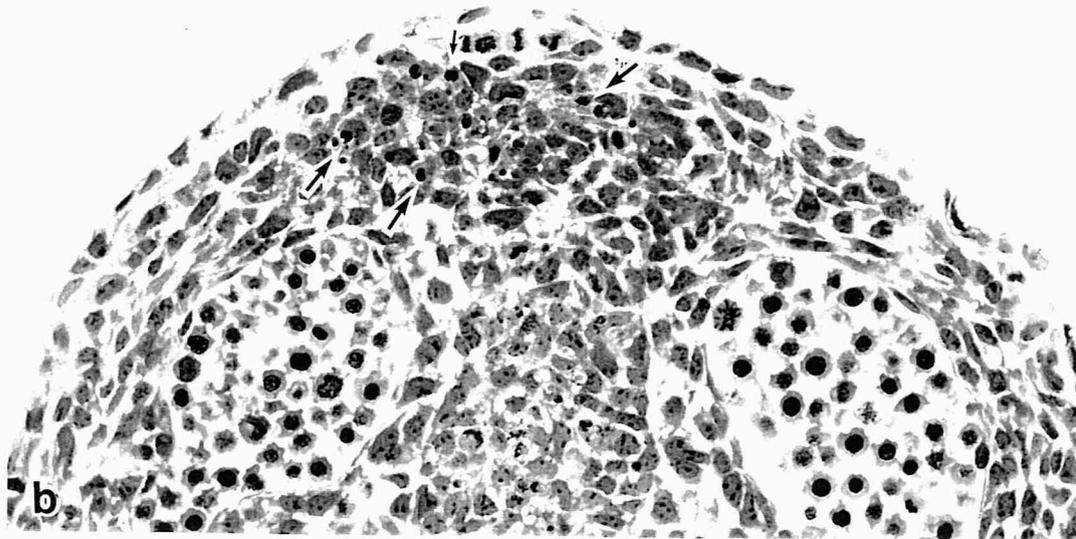


図 22 未分節領域と尾芽の境界部における組織変化(胎生11.5日 横断面 ×200)。
a: *knt/+*胎仔 b: *knt/knt*胎仔 矢印: 核濃縮や核の断片化を伴った変性細胞。
*knt/knt*胎仔の未分節領域と尾芽の境界部(b)では、核濃縮や核の断片化 (b矢印)
が間葉細胞に明瞭に認められ、その変性細胞の位置は背側に局限している。

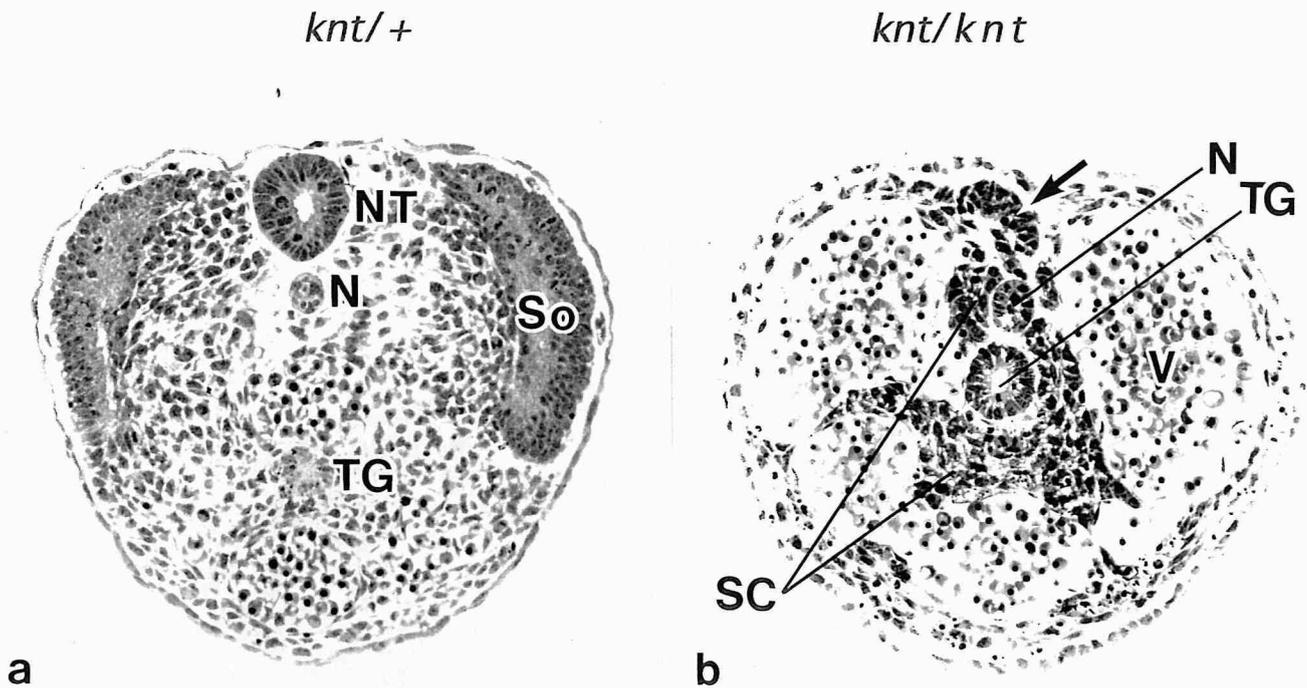


図 23 尾部先端の組織変化(胎生12.5日 横断面 ×100)。

a: *knt/+*胎仔 b: *knt/knt*胎仔 NT: 第二次神経管 矢印: 変性した第二次神経管
So: 体節 SC: 体節細胞 N: 脊索 TG: 尾腸 V: 血管。 *knt/knt*胎仔では体節細胞が拡張した血管内に小さな島を散在的に形成しているが(b)、明瞭な体節構造を確認できない(図 19hを参照)。神経管形成は明らかに阻害され、管腔は形成されず扁平化した構造物のみが観察される(b矢印)。一方、*knt/+*胎仔の尾部先端部(図 19dを参照)では明瞭な体節構造が左右対称な位置に観察される。

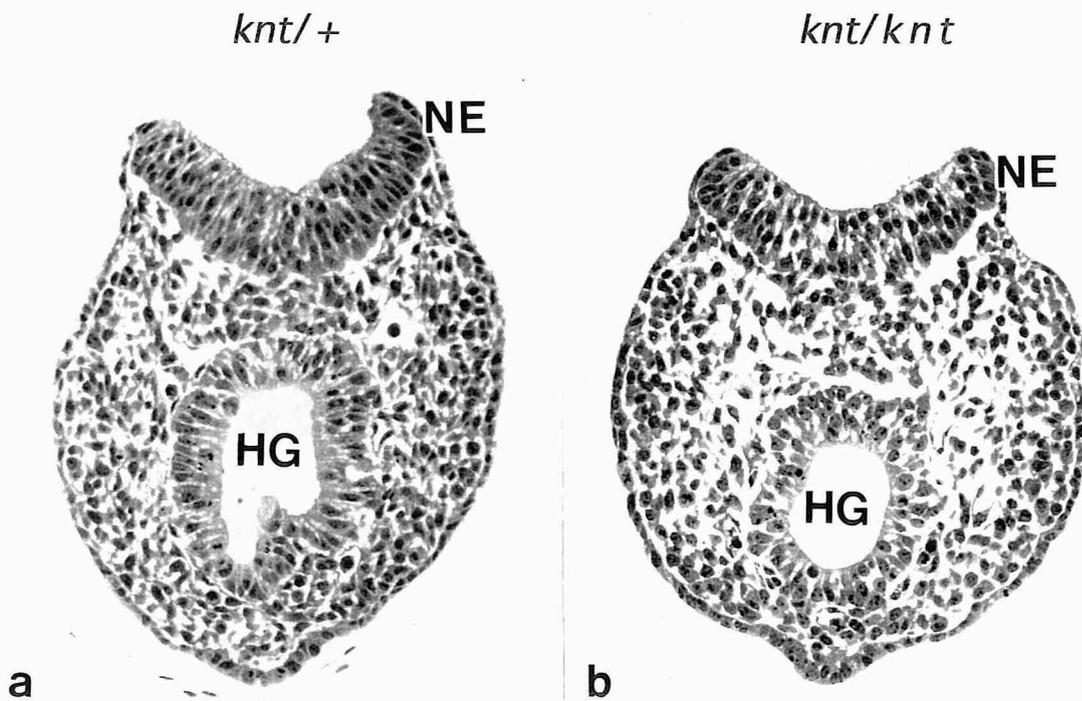


図 24 第一次神経胚形成における組織変化(胎生9.5日 横断面 ×100)。

a: *knt/+*胎仔 b: *knt/knt*胎仔 NE: 神経上皮細胞 HG: 後腸。
両系統ともに第一次神経胚形成の異常は認められず、写真では神経管が癒合する前の神経板から神経ひだが形成される過程が明瞭に観察される。

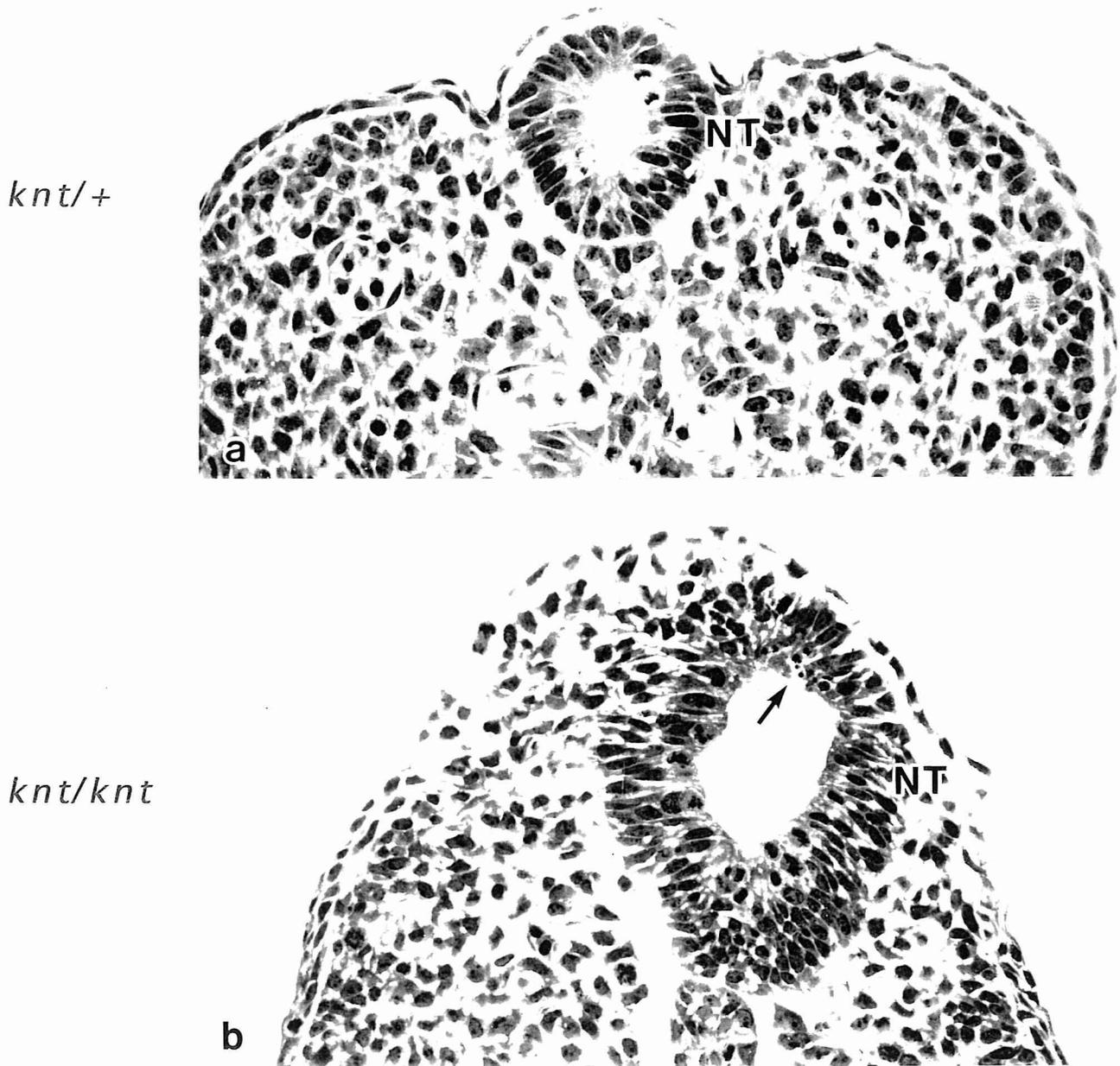


図 25 第二次神経管の組織変化(胎生11.5日 横断面 ×200)。

a: *knt/+*胎仔 b: *knt/knt*胎仔 NT: 第二次神経管 矢印: 核濃縮や核の断片化を伴った変性細胞。*knt/knt*胎仔の第二次神経管(b)では、核濃縮や核の断片化(b矢印)が神経上皮細胞に明瞭に認められ、その変性細胞の位置は背側に限局している。

END