

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：32704

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560068

研究課題名(和文) 個体発生における骨形成過程の追跡と妊娠期のカルシウム欠乏がおよぼす影響の解析

研究課題名(英文) Bone development and the effect of Ca²⁺ deficiency during the pregnancy

研究代表者

佐藤 容子 (MOMOSE-SATO, Yoko)

関東学院大学・栄養学部・教授

研究者番号：70251501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アリザリンレッドSを用いた骨染色法を発生初期胚に適用し、鶏胚ならびにマウス胚の個体発生に伴う骨形成過程の詳細を明らかにした。硬骨が形成される部位は発生段階によって異なり、鶏胚では孵卵12日(E12)頃に、上顎、下顎、頭蓋骨(側頭部)、大腿、下腿、中足骨、上腕、前腕で染色が見られた。マウス胚では、胎生14日(E14)から下顎、鎖骨で最初の染色が見られた。鶏胚、マウス胚とも、頭部は硬骨の形成が早く、脊柱や足趾、手指などは、他の部位と比べて硬骨の発生時期が遅いことなどが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We examined developmental processes of bone formation in chick and mouse embryos using a bone staining method with alizarin red S. The stage of bone formation was different between regions. In the chick embryo, the first staining of the bone was observed at E (days of incubation) 12 in the maxillary, mandibular, cranial, femoral, tibial/fibular, metatarsal, humeral, and radial/ulnar bones. In the mouse embryo, the first staining of the bone was observed at E (days of pregnancy) 14 in the mandibular bone and clavicle. In both the chick and mouse embryos, development of the cranial bone was earlier, and that of the vertebral and digit bones was later than formation of the other regions.

研究分野：生理学

キーワード：骨形成 発生

1. 研究開始当初の背景

妊娠期におけるミネラル・ビタミンの欠乏は、胎児に様々な悪影響を及ぼすことが知られている。我が国では、ミネラルの中でも特にカルシウムの摂取量が不足している。胎児の骨形成に必要なカルシウムは母体から供給されるカルシウムに依存しているため、母体のカルシウム不足は胎児に大きな影響を与えると考えられており、妊娠期におけるカルシウムの積極的な摂取の重要性が指摘されている。胎児の骨形成は、発生の中でもある一時期に集中して起こるが、その時期を考慮した上での栄養指導はほとんど行われておらず、カルシウム欠乏の影響がどのように現れるのかについても明らかにされていない。この原因は、胎児の骨形成過程の詳細なデータが得られていないこと、妊娠期の栄養状態についての評価が出生前後の時期に限局していることなどがあると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、骨・軟骨染色法を発生初期胚に応用し、個体発生に伴う骨形成過程の詳細を明らかにするとともに、カルシウム欠乏の影響について考察することを目的として計画された。時間的な制約から、カルシウム欠乏の影響については詳細を詰めることができなかったため、本報告書では、骨形成過程について得られた結果を中心に報告する。

3. 研究の方法

(1) 標本の固定・洗浄

本研究の実施においては、関東学院大学生物研究倫理委員会の承認を得、日本学術振興会「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を遵守した。

鶏胚の解析では、受精卵 (White Leghorn: 白石実験動物供給所、埼玉) を 38℃、湿度約 60% の孵卵器に入れ、孵卵 5~18 日目 (E5~E18) に孵卵器から取り出した。鶏卵か

ら鶏胚を取り出し、Ringer 液中で周囲の余分な膜を取り除いた。発生段階 (Hamburger-Hamilton stage) を確認し、必要に応じて写真撮影を行った後、10%ホルマリン液中で、5~8 週間保存した。鶏胚をシャーレに移し、リン酸緩衝液 (0.1M) 中で内臓、眼球 (網膜も含む) を取り除いた。標本をリン酸緩衝液で洗浄し、50%エタノール中に 2 日置いた後、100%エタノールに置換した。実験に用いた Ringer 液の組成は、NaCl 138mM、KCl 5.4mM、CaCl₂ 1.8mM、MgCl₂ 0.5mM、glucose 10mM、Tris-HCl buffer (pH7.26~7.28) 10mM である。

マウスの解析では、マウス母体 (日本生物材料研究所) にエーテル麻酔を施した後頸椎を脱臼し、胎仔を摘出した。実験には E13~E18 の胎仔、P0~P2 の新生仔を使用した。E は胎生日数、P は出生後日数を示す。氷冷した Ringer 液中で周囲の余分な膜を取り除いた後、10%ホルマリン液中で 1 週間~5 ヶ月保存した。その後、胎仔・新生仔をシャーレに移し、リン酸緩衝液 (0.1M、pH7.4) 中で内臓を取り除いた。E13、E14 の一部の標本では、標本の形をきれいに保つため、内臓の除去を行わないか、肝臓のみを取り除いた。実験に用いた Ringer 液の組成は、NaCl 149mM、KCl 5.4mM、CaCl₂ 1.8mM、MgCl₂ 0.5mM、Tris-HCl buffer (pH7.41~7.43) 10mM である。

(2) 軟骨の染色

一部の標本では、タンパク質の溶解の前に軟骨染色を行った。標本を 50%エタノール中に 1 日置いた後、100%エタノールに置換した。エタノールを軟骨染色液 (100%エタノール 80 ml、氷酢酸 20 ml、アルシアンブルー 1 ml の割合で混合) に置換し、1 日つけて軟骨を青く染色した。軟骨染色液を抜き取り、約 2 時間 30 分間隔で 95%、50%、20%エタノール、四ホウ酸ナトリウム飽和水溶液に置換した。

(3) タンパク質の溶解

ホルマリン固定後の標本（硬骨染色のみの場合）、または軟骨染色後の標本（硬骨・軟骨染色両方行った場合）を、トリプシン液（四ホウ酸ナトリウム飽和水溶液 30 ml、脱イオン水 70 ml、トリプシン（乾燥粉末）約 1 g の割合で混合）に浸し、40℃ の恒温器内に 1 日～39 日においてタンパク質を溶解させた。トリプシン液は、濁りが生じたら新しい液に取り換えた。

(4) 硬骨の染色とタンパク質のさらなる透明化

トリプシン液を 0.5 %水酸化カリウム液に置換し、標本を洗浄した。さらに、0.5 %水酸化カリウム液を硬骨染色液（0.5 %水酸化カリウム溶液 100 ml、アリザリンレッド S 2 mg の割合で混合）に置換し、1 日において硬骨を赤紫色に染色した。硬骨染色液を 0.5 %水酸化カリウム液に置換し、透明化の様子を見ながら 1 日～39 日おいた。水酸化カリウム液中に 39 日においても透明化が不十分だった標本では、再びトリプシン液に戻して透明化を促進させた。

(5) グリセリン置換

0.5 %水酸化カリウム液を、濃度の低いグリセリン液から濃度の濃いグリセリン液に 3 日間隔で順番に浸し、最終的に保存液（グリセリン 100 ml、チモール 25mg の割合で混合）に置換し、保存した。

4. 研究成果

本実験では、軟骨染色と硬骨染色の両方を行ったが、軟骨の染色が明瞭ではなかったため、硬骨染色の結果に着目してデータの整理を行った。

(1) 鶏胚における骨形成過程の解析

鶏胚標本では、E11 までは硬骨は全く染色されず、このことから硬骨は E11 までは未発生だと考えられた。硬骨の染色は、E12 の発生段階で初めて認められ、上顎、下顎、頭蓋骨（側頭部）、大腿、下腿、中足骨、上腕、前

腕の骨が染色された（図 1）。



図 1 E12 鶏胚の全身写真



図 2 E13 鶏胚の全身写真

E13 では、E12 で染色された部分がよりはっきりと識別できるのに加えて、頭蓋骨の前頭部と後頭部、中手指、肋骨、肩甲骨、寛骨が新たに染色された（図 2）。

E14 では、頭蓋骨の頭頂部が新たに染色され、また、E13 まではみられなかった脊柱（頸部、胸部）と足趾の染色が認められた。さらに、E13 で初めて染色された頭蓋骨の前頭部、中手骨、肋骨、肩甲骨、寛骨で、染色の増大がみられた。

E15 では、頭蓋骨各部位と脊柱（頸部、胸部）の染色が増大した。足趾に関しては、E14 の 1 例で染色が認められたにも関わらず、E15 では染色されたものと染色されなかったものが混在し、発生の進み具合に個体差のあることが示唆された。

E16 では、新たに手指の染色が認められ、また、E15 までは明瞭ではなかった脊柱腰部

の染色がはっきりと識別できるようになった。さらに、E15 と比べて、頭蓋骨の前頭部、後頭部、頭頂部、脊柱の頸部、肋骨、肩甲骨、寛骨、上肢の各部位(上腕、前腕、中手骨)、下肢の各部位(大腿、下腿、中足骨、足趾)の染色が増大した。

E17 以降に新たに染色が確認された部位はなく、全体に骨が大きく、染色がより明瞭になった。E16 に比べて E17 で染色が増大したのは、脊柱の胸部、腰部であり、E17 に比べて E18 では、さらに足趾と手指の染色された骨の個数が増大した。

(2) マウスにおける骨形成過程の解析

マウス胚では、E13 までは硬骨は全く染色されず、このことから硬骨は E13 までは未発生だと考えられた。硬骨の染色は、E14 の発生段階で初めて認められた。E14 では個体差が大きく、ある標本では全く染色が見られなかったが、別の標本では下顎と鎖骨が染色され、さらに他の標本では、前頭部と上腕、肋骨、肩甲骨にも染色が見られた。最も染色領域が広がった標本では、前頭部、側頭部、上顎、下顎、上腕、前腕、大腿、鎖骨、肋骨、肩甲骨に、明らかな染色が認められた。

個体間での染色の違いは E15 でも大きく、染色されなかった標本と染色された標本が混在し、発生の進み具合に個体差のあることが示唆された。E15 で最も広い領域が染色された標本では、E14 で最も広い領域が染色された標本と比較して、頭頂部、脊柱(頸部、胸部)の染色が新たに認められたが、一方で下肢の染色は認められなかった。

E16 では、後頭部、下腿、寛骨が新たに染色され、また E15 までではみられなかった脊柱(腰部)の染色が認められた。さらに、E14 ~ E15 で個体差の見られた、頭部、上顎、下顎、上腕、前腕、大腿、鎖骨、肋骨、肩甲骨、脊柱(頸部、胸部)の染色が、すべての標本で認められるようになった。

E17 では、上肢の中手骨が新たに染色された。また、側頭部、後頭部、上顎、下顎、上腕、前腕、大腿、下腿、鎖骨、肋骨、肩甲骨、寛骨、脊柱(頸部、胸部、腰部)など、広い部位の染色が増大した。

E18 では、新たに上肢の手指、下肢の中足骨、足指の染色が認められた。また、上顎、中手骨、大腿、下腿、寛骨の染色が増大した。

P0 以降に新たに染色が確認された部位はなく、全体に骨が大きく、染色がより明瞭になった。E18 に比べて P0 で染色が増大したのは、頭部の骨、上肢の中手骨、手指、下肢の中足骨、足指であり、P0 に比べて P1 では、さらに上肢の手指、下肢の中足骨、足指の染色が増大した。P2 では、軟部組織の透明化が不完全だったために硬骨染色の度合いを明瞭に判断できなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Sato, K. and Momose-Sato, Y. (2017) Functiogenesis of the embryonic central nervous system revealed by optical recording with a voltage-sensitive dye. *The Journal of Physiological Sciences* 67: 107-119. (査読有) DOI: 10.1007/s12576-016-0482-z

Sato, K., Nariyai, T., Momose-Sato, Y. and Kamino, K. (2017) Intraoperative intrinsic optical imaging of human somatosensory cortex during neurosurgical operations. *Neurophotonics* 4, 031205:1-5. (査読有) DOI: 10.1117/1.NPh.4.3.031205

Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2016) Development of spontaneous activity in the avian hindbrain. *Frontiers in Neural Circuits* 10: Article 63, 1-8. (査読有) DOI: 10.3389/fncir.2016.00063

Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2016) Development of synaptic networks in the mouse vagal pathway revealed by optical mapping with a voltage-sensitive dye. *European Journal of Neuroscience* 44: 1906-1918. (査読有) DOI: 10.1111/ejn.13283

Sato, K., Hayashi, S., Inaji, M. and Momose-Sato, Y. (2016) Oscillations in the embryonic chick olfactory bulb:

initial expression and development revealed by optical imaging with a voltage-sensitive dye. *European Journal of Neuroscience* 43: 1111-1121. (査読有)
DOI: 10.1111/ejn.13189

Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2015) Voltage-sensitive dye imaging during functional development of the embryonic nervous system: a brief review with special thanks to Professor Larry Cohen. *Neurophotonics* 2, 021009:1-5. (査読有)
DOI: 10.1117/1.NPh.2.2.021009

[学会発表](計 11 件)

Sato, K. and Momose-Sato, Y. Optical mapping of neuronal activity in the facial motor nucleus of the embryonic rat brainstem. 第 94 回日本生理学会大会、2017 年 3 月 28 日～30 日、アクトシティ浜松 (静岡県・浜松市)

Momose-Sato, Y. and Sato, K. Effects of *in ovo* blockade of the spontaneous depolarization wave on the formation of synaptic networks in the embryonic brainstem. 第 94 回日本生理学会大会、2017 年 3 月 28 日～30 日、アクトシティ浜松 (静岡県・浜松市)

Sato, K. and Momose-Sato, Y. Optical imaging of widely-spreading wave activity in the embryonic chick forebrain induced by olfactory nerve stimulation. Society for Neuroscience 46th Annual Meeting, November 12-16, 2016, San Diego (USA).

Sato, K. and Momose-Sato, Y. Voltage-sensitive dye imaging of widely-spreading wave activity in the embryonic chick forebrain induced by olfactory nerve stimulation. 第 39 回日本神経科学学会、2016 年 7 月 20 日～22 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

Sato, K. and Momose-Sato, Y. Widely-spreading wave activity in the embryonic chick forebrain induced by olfactory nerve stimulation: Optical imaging with a voltage-sensitive dye. 第 93 回日本生理学会大会、2016 年 3 月 22 日～24 日、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

Momose-Sato, Y. and Sato, K. Development of functional synaptic networks in the mouse vagal pathway: optical mapping with a voltage-sensitive dye. Society for Neuroscience 45th Annual Meeting, October 17-21, 2015, Chicago (USA)

Sato, K. and Momose-Sato, Y. Optical

analysis of developmental changes in oscillatory activity in the embryonic chick olfactory bulb. Society for Neuroscience 45th Annual Meeting, October 17-21, 2015, Chicago (USA)

Sato, K. and Momose-Sato, Y. Developmental changes in oscillatory activity in the embryonic chick olfactory bulb: Optical imaging with a voltage-sensitive dye. 第 38 回日本神経科学学会、2015 年 7 月 28 日～31 日、神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

Momose-Sato, Y. and Sato, K. Development of functional synaptic networks in the mouse vagal pathway: Optical mapping with a voltage-sensitive dye. 第 38 回日本神経科学学会、2015 年 7 月 28 日～31 日、神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

Sato, K. and Momose-Sato, Y. Functiogenesis of the embryonic CNS revealed by multiple-site optical recording with a voltage-sensitive dye. 第 92 回日本生理学会大会、2015 年 3 月 21 日～23 日、神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

Momose-Sato, Y. and Sato, K. Optical mapping of vagus nerve-related brainstem nuclei in the mouse embryo. 第 92 回日本生理学会大会、2015 年 3 月 21 日～23 日、神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

[図書](計 1 件)

Momose-Sato, Y., Sato, K. and Kamino, K. (2015) Monitoring population membrane potential signals during development of the vertebrate nervous system. In: *Membrane Potential Imaging in the Nervous System and Heart*, Eds. Canepari, M., Zecevic, D. and Bernus, O., Springer International Publishing, Switzerland, pp213-242.

DOI 10.1007/978-3-319-17641-3_9

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 容子 (MOMOSE-SATO, Yoko)
関東学院大学・栄養学部・教授
研究者番号: 7 0 2 5 1 5 0 1

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

佐藤 勝重 (SATO, Katsushige)
駒沢女子大学・人間健康学部・教授
研究者番号: 8 0 2 9 1 3 4 2