

In vitro におけるビオチンのマウス胎児の口蓋突起発育に及ぼす影響

渡辺敏明

(山形大学医学部衛生学教室*)

Effect of Biotin on Palatal Development of Mouse Embryos In Vitro

Toshiaki WATANABE

Department of Hygiene and Preventive Medicine, Yamagata University School of Medicine

The palatal development of mouse embryos on day 12 of gestation was studied by a suspension culture technique of the maxilla. In palatal explants of control embryos after 72 hours in culture, the fusion of palatal processes was significantly increased to about 80% in biotin-supplemented medium (more than 10^{-8} M), as compared with 27% in the biotin-free medium. Organic acids associated with biotin enzymes such as propionic acid and menthyl crotonic acid, as well as avidin affected the development and fusion of palatal processes. In biotin-deficient palatal explants, the incidence of the palatal fusion was only 30% even in biotin-supplemented medium (10^{-6} M). The development of biotin-deficient palatal processes was not completely recovered by biotin supplementation and injection. No pathological changes were observed in the palatal processes cultured in biotin-free medium. These findings indicate that biotin plays an important role as a growth factor in the development of palatal processes and/or that organic acids may interfere with palatal development in biotin-deficient embryos.

ビオチン (ビタミン H) は、生体内においてビオチン酵素として炭酸固定反応や炭酸転移反応に直接関与し、重要な役割を果たしている。このため、ビオチンが欠乏すると、ビオチン酵素の活性が低下し、糖新生や脂肪酸合成が阻害され、有機酸などが蓄積されることが知られている¹⁾。また、詳細な機序は明らかではないが、ビオチンは、脂質代謝、糖質代謝および骨の成熟などと間接的に関与している。ビオチン欠乏動物では、成長抑制、脱毛、皮膚炎や骨格の異常などの症状 (卵白障害) がみられる。ビオチンの生殖生理作用については、鳥類や哺乳動物で知られている。鳥類ではビオチン要求量が高いため、精製飼料を与えると、比較的容易にビオチン欠乏状態となる。若鶏をビオチン欠乏状態にすると、孵化率が低下し、雛の脚や翼に形態異常が誘発される^{2,3)}。哺乳動物では、最近までビオチンは妊娠の維持

*所在地：山形市飯田西 2-2-2 (〒990-23)

には必要であるが、胎児の形態形成には関与していないとされていた^{4,5)}。しかし著者ら⁶⁻⁸⁾は、妊娠中ピオチン欠乏状態にすると、マウス胎児の顔面頭部や四肢に種々の形態異常が誘発されることをみいだした。これらは「先天性ピオチン欠乏症候群」と呼ばれている。この発現機序については、いまだ不明である。

近年、哺乳小動物胎児の細胞（神経堤細胞、間葉細胞）や器官（肢芽、上顎）を用いた種々の培養法が開発されている。これらは、in vitroにおいて正常な器官の発生や分化あるいは形態形成異常の発現機序などを解明するために有用な手段である。Shiota⁹⁾らは、最近、無血清合成培養液でマウス胎児の上顎（口蓋）を培養する浮遊培養法を確立した。

そこで、本研究では、マウス胎児の上顎培養を利用して、ピオチン欠乏状態による口蓋裂の発現機序を形態学および組織学的に検討した。

実験方法

1. 実験動物および飼料

本実験で用いた動物は、CD-1系成熟雌および雄マウス（25-35g）である。すべての動物は、気温（23±3℃）および照明時間（明期：0600-1800）が一定にコントロールされている動物室で維持された。雌マウスを雄マウス（1：2）と早朝2時間交配させ、妊娠動物を得た（受精栓確認日＝妊娠0日）。妊娠動物は、糞食を防ぐためにステンレス網ケージで飼育した。

妊娠動物には、実験期間中ピオチン欠乏飼料あるいは対照飼料を与えた。ピオチン欠乏飼料は乾燥卵白を25%配合した精製飼料である。対照飼料にはピオチン5mg/kgを添加した。精製飼料の組成は、著者ら⁶⁾がこれまでに使用しているものと同じである。これらの飼料と飲料水は自由に与えた。これまでの実験結果から、両飼料の摂取量に差異は認められていない。

なお、ピオチン欠乏妊娠マウスの一部には、妊娠11日にピオチン100μgを1回腹腔内投与した。

2. 上顎培養および発育評価

妊娠12日胎児の上顎部を切除し、無血清合成（MEM）培地で72時間回転培養（25rpm）を行った（Fig. 1）。培養ビンには、それぞれ4mlの培養液を入れ、混合ガス（酸素濃度50%、炭酸ガス5%）を12時間ごとに置換した。培養開始時にピオチン、ピオチン酵素に関連した有機酸（propionic acid, PA; methylcrotonic acid, MC; hydroxyisovaleric acid, HV）あるいはピオチン結合物質であるアビジンを添加した。

培養終了後、口蓋突起の発育の指標として、発育ステージおよび突起と上顎の長さを用いた（Fig. 1）。発育ステージは、Burdiら¹⁰⁾の分類を基準にして、ステージIからVIに分類をした。また、癒合の割合およびその長さを計測し、分化の指標とした。

3. タンパク質合成量の測定

上顎におけるタンパク質合成量を知るため、培養液に³⁵S-met（メチオニン）（4μCi/ml）を加え、15時間培養した。培養終了後、上顎をPBSで洗浄し、測定するまで-40℃で保存した。タンパク質合成量は、液体シンチレーションカウンターで測定した。

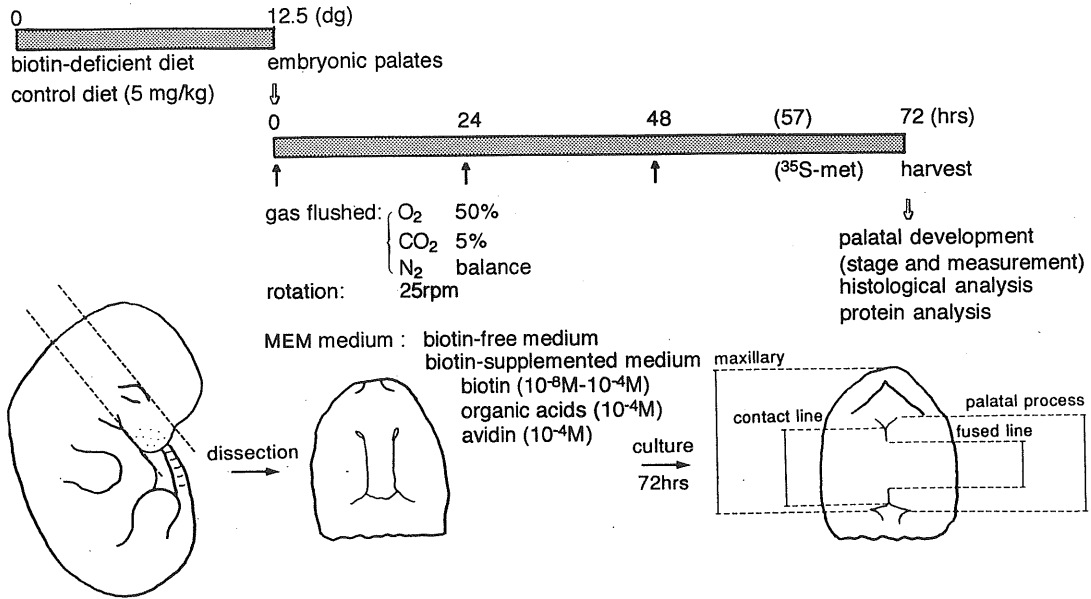


Fig. 1. Experimental procedure for culturing embryonic palates and diagram of palatal explants showing four dimensions measured.

4. 催奇形作用

妊娠マウスの残りには、ビオチン欠乏飼料あるいは対照飼料を妊娠17日まで与えた。常法に従って、ビオチン欠乏状態の妊娠および胎児発育に及ぼす影響を観察した。

5. 統計学的解析

各実験群間の違いは、t-検定およびノンパラメトリックのマンホイットニーU検定を用いた。

実験結果

CD-1 マウスにおけるビオチン欠乏状態の生殖生理機能に及ぼす影響をみると、ビオチン欠乏群では、妊娠中の母体の体重増加が対照群の78%であったが、母体にビオチン欠乏症状とみられる所見は観察されなかった。また、生存胎児数の減少がみられ、これらの98%に、口蓋裂、小顎症および短指症などの形態異常がみられた (Fig. 2)。

Table 1 は対照胎児の上顎を培養した結果をまとめたものである。ビオチン無添加培養液では、口蓋突起の発育ステージは平均5.3で、癒合率は27%であった。ビオチンを 10^{-8} M以上添加すると、突起の癒合率は約80%となり、癒合線の長さもビオチンの添加濃度に依存して増加した。突起は細胞レベルでも完全に癒合しており、口蓋ひだも良く発達していた (Fig. 3)。

ビオチン酵素と関連した有機酸やビオチン結合物質アビジンを添加しても、突起の癒合は影響されなかった。しかし、PA, MC およびアビジン添加によって突起や癒合線の長さが減少した。

ビオチン欠乏胎児の上顎を培養し、突起の発育・癒合をみたものが Table 2 である。ビオチン無添加培養液では、発育ステージは3.5で、突起の癒合率も9.5%であった。ビオチンを添加しても、癒合率は

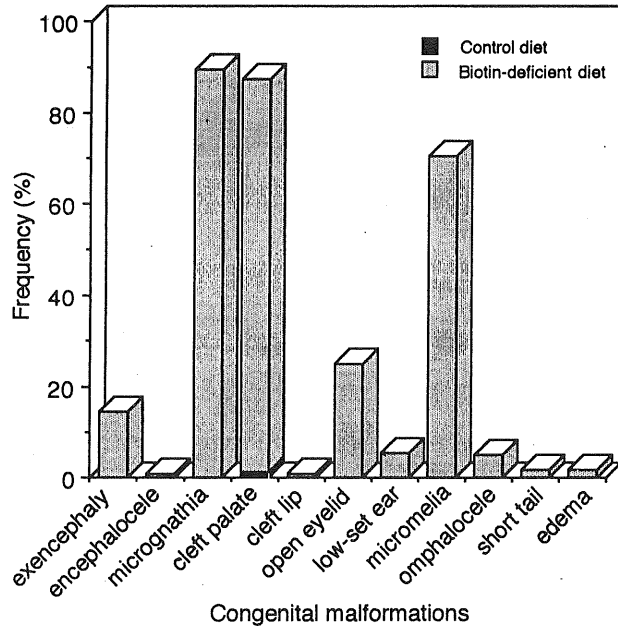


Fig. 2. Histogram of congenital malformations observed in biotin-deficient CD-1 mice.

Table 1. Effects of biotin and organic acids on the development of palatal processes from control embryos in vitro

	No. of explants	Mean stage	Palatal length	Fused line	Maxillary length	Percentage at stage VI
Biotin-free	11	5.3(5-6) ^a	1.21 ^b	0.65 ^{b, #}	—	27.3
Biotin 10 ⁻⁸ M	6	5.8(5-6)	1.18	0.85 [#]	—	83.3 [*]
10 ⁻⁷ M	9	5.7(5-6)	1.20	0.90 [#]	—	77.8 [*]
10 ⁻⁶ M	10	5.9(5-6)	1.24	0.96 [#]	—	90.0 ^{**}
Biotin 10 ⁻⁶ M	12	6.0(6)	1.19	0.94	2.40 ^b	100.0
PA 10 ⁻⁴ M	12	5.9(5-6)	1.00 [‡]	0.82	2.18	92.0
MC 10 ⁻⁴ M	9	5.9(5-6)	1.11 ⁺	0.83	2.31	88.9
HV 10 ⁻⁴ M	7	5.9(5-6)	1.17	0.95	2.29	85.7
avidin 10 ⁻⁴ M	8	5.8(5-6)	1.14	0.78 ⁺	2.24	75.0

*. ** Significantly different from the biotin-free group by Fisher's exact test ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively).

Significantly different from among groups by ANOVA ($p < 0.05$).

+ . ‡ Significantly different from the biotin alone-supplemented group (10⁻⁶M) by Mann-Whitney U test ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively).

PA, propionic acid; MC, methylcrotonic acid; HA, hydroxyisovaleric acid.

^a mean (min-max).

^b mean : mm.

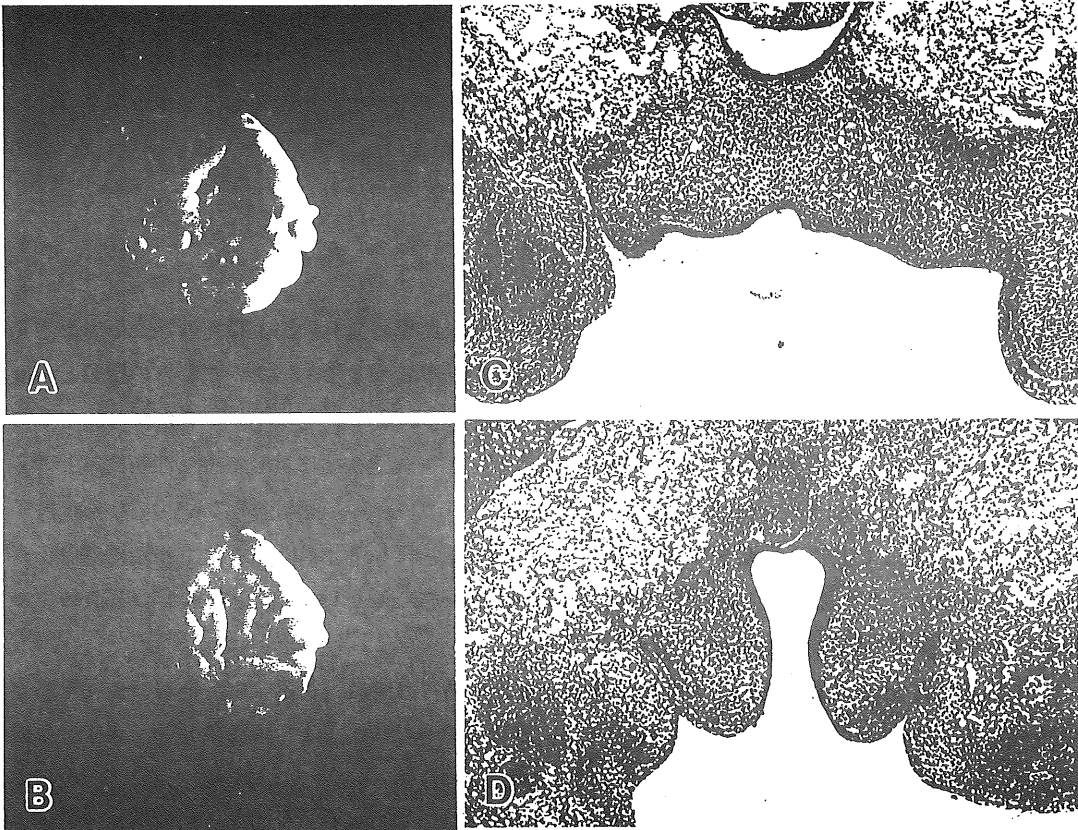


Fig. 3 Palatal explants cultured for 72 hours and their transverse sections. A, C : control explants. B, D : biotin-deficient explants.

Table 2. Effects of biotin on the development of palatal processes from biotin-deficient embryos in vitro

	No. of explants	Mean stage	Palatal length	Fused line	Percentage at stage VI
Biotin-free	21	3.7 (2-6) ^a	0.89 ^b	0.53 ^b	9.5
Biotin 10 ⁻⁸ M	9	4.9 (3-6)	0.92	0.48	44.4
10 ⁻⁷ M	10	4.2 (3-6)	0.94	0.68	30.0
10 ⁻⁶ M	9	4.3 (3-6)	0.98	0.40	33.3
10 ⁻⁴ M	9	4.5 (3-6)	0.90	0.76	22.2
Biotin-free ^c	12	4.8 (3-6)*	0.99	0.49	33.3
Biotin 10 ⁻⁷ M ^c	16	5.4 (4-6)*	1.02	0.58	50.0

* Significantly different from respective groups without biotin injection by Mann-Whitney U test ($p < 0.05$).

^a mean (min-max).

^b mean : mm

^c injected intraperitoneally with 100 μ g of biotin on dg 11.5.

30%にしかならなかった。なお、突起の組織学的観察では、上皮や間葉細胞に変化は認められなかった。一方、妊娠11日にビオチンを投与しても、ビオチン欠乏胎児の上顎で、癒合率に改善がみられなかった。

口蓋におけるタンパク質合成量をみると、対照胎児およびビオチン欠乏胎児とも、ビオチンを添加しても変化はみられなかった。しかし、ビオチン欠乏口蓋においては、対照と比べ、低値を示した (2.6 vs 3.0cpm/mg 組織)。

考 察

本研究で用いた CD-1 マウスにおいて、ビオチン欠乏状態は胎児の発育抑制と種々の外表奇形を誘発した。観察された主な形態異常は、口蓋裂、短指症、および小顎症などであった。これらの種類と頻度は、著者ら¹¹⁾がこれまでに報告した他系統のマウス (ICR, C 57 BL) やハムスターで観察されたものと同じであった。つまり、顔面頭部および四肢の形成はビオチン欠乏状態に対して感受性が高いと考えられる。このように、ビオチンは哺乳動物胎児の成長ばかりでなく、形態形成においても発育因子 (growth factor) として重要な役割をはたしていることが示唆される。とくに羊水および胎児皮膚に存在しているビオチンが利用されている¹²⁾。なお、口蓋裂は、先天性ビオチン欠乏症候群の特徴の1つであるが、その詳細な発生機序はあまり明らかではない。

マウス胎児の *in vivo* における口蓋の形成は妊娠10日から15日の間に起こる。口蓋突起は最初上顎からの隆起として認められ、舌の両側に下垂してくる。その後突起は舌の上方に向きを変え、水平に位置する。両突起は接触し、最終的に癒合して口蓋盤を形成する¹⁰⁾。 *in vitro* での本実験において、口蓋突起の発育・分化は妊娠12日以後もビオチン添加培養液の中で正常に行われた。対照の口蓋突起は大部分がステージ VI に達し、左右の突起は組織学的レベルでも癒合していた。形態学および組織学的特徴は *in vivo* のものとほとんど同じであった。一方、ビオチン欠乏の口蓋突起は培養液にビオチンを添加したり、妊娠11日 (上顎切除 1 日前) にビオチンを投与しても、完全に発育しなかった。これは口蓋突起においておそらくビオチンが十分に利用されていないことによる。しかしながら、ビオチン欠乏口蓋突起において、間葉細胞や上皮細胞に何ら変化は認められなかった。また、 *in vivo* 実験でも、妊娠中期および後期においてビオチン欠乏胎児の口蓋突起に組織学的変化は観察されなかった¹³⁾。これらのことからビオチンはマウス胎児の口蓋形成に不可欠であり、とくに間葉細胞の増殖や分化と関連していることが考えられる。

ビオチンはカルボキシラーゼの補酵素として、糖新生、脂肪酸合成および糖代謝などと係わっている。このためビオチンが欠乏すると、広範な代謝障害や代謝性アシドーシスの生ずることが考えられる¹⁾。本研究において、ビオチン酵素に関連した有機酸が口蓋突起の発育にのみ影響を及ぼした。このことは、 *in vivo* においてもビオチン欠乏母体に蓄積した有機酸が、口蓋の正常な発育分化を妨げている可能性を示している。

以上のように、ビオチンは、 *in vitro* でも、口蓋突起の発育および分化に重要な役割を果たしている。とくにビオチン欠乏胎児では、上顎におけるビオチンの利用が障害され、口蓋突起での間葉細胞の増殖が抑制されていることが示唆される。このことが、結果として、口蓋裂の発生と関連しているのかもしれない。

れない。

謝 辞

本研究の一部は、Manitoba 大学医学部の Dakshinamurti, K. 教授および Persaud, T. V. M. 教授との共同で行ったものである。ここに感謝の意を表する。

文 献

- 1) Dakshinamurti, K., and J. Chauhan (1989) Vitam. Horm. 45 : 337.
- 2) Cravens, W. W., E. E. Sebsta, C. A. Elvehjem, and J. G. Halpin (1942) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 50 : 101.
- 3) Couch, J. R., W. W. Cravens, C. A. Elvehjem, and J. G. Halpin (1948) Anat. Rec. 100 : 29.
- 4) Giroud, A., J. Lefebves, and R. Dupuik (1956) C. R. Soc. Biol. 150 : 2066.
- 5) Levin, S. W., B. A. Roecklein, and A. B. Murherjee (1985) Res. Exp. Med. 185 : 375.
- 6) Watanabe, T. (1983) J. Nutr. 113 : 574.
- 7) 渡辺敏明 (1990) ビタミン 64 : 429.
- 8) Watabane, T. (1993) J. Nutr. 123 : 2101.
- 9) Shiota, K., T. Kosazuma, S. Klug, and D. Neubert (1990) Acta Anat. 137 : 64.
- 10) Burdi, A. R., and R. G. Silvey (1969) Cleft Palate 6 : 1.
- 11) Watabane, T., and A. Endo (1989) J. Nutr. 119 : 255.
- 12) 渡辺敏明, 福井徹 (1994) ビタミン 68 : 373
- 13) Watanabe, T. (1990) Cong. Anom. 30 : 79.