

放射線影響の生物学的指標としてのマウス 胎児組織の細胞分裂指数

東京大学医学部放射線健康管理学教室（主任：吉沢康雄教授）

草 間 朋 子 吉 沢 康 雄

（昭和50年4月17日受付）

（昭和50年5月12日最終原稿受付）

The Mitotic Index in the Mouse Fetus Liver as a Biological Indicator of Radiation Effects

By

Tomoko Kusama and Yasuo Yoshizawa

Department of Radiological Health, Faculty of Medicine University of Tokyo

(Director: Prof. Yasuo Yoshizawa)

Research Code No.: 409

Key Words: Low dose, Biological indicator, Mitotic index, Mouse fetus

This study was carried out in order to know whether the mitotic index in mouse fetus liver tissue can be practically used for a biological indicator of radiation effects. The pregnant mice (ddY strain) which were in the 14th and 16th day of gestation age were given 5, 10, 25, 50 and 100R of whole body γ -ray irradiation. At 30, 60 and 90 minutes after exposure, the pregnant mice were sacrificed to remove the fetuses. Smear specimens were prepared from minced fetus liver. The mitotic index and frequency of prophase cell in liver were measured by observations of 10,000 cells in every fetus. The change of mitotic index and frequency of prophase cell with fetus age between the 14th and 16th days were observed. The change of mitotic index and frequency of prophase cell with time after γ -irradiation was observed. This was a decrease at 30 minutes and an increase at 90 minutes after irradiation. It was found that the threshold dose in regard to the decrease of mitotic index and frequency of prophase cell in mouse fetus liver was between 5R and 10R.

緒 言

放射線影響の研究に際しては、生物学的指標として何をを用いるかということが重要な課題である。従来、数多くの指標が注目されてきた。指標の大きさという点から眺めると、小は分子レベルの変化⁵⁾¹⁵⁾から、大は個体ないし集団を対象¹⁸⁾¹⁹⁾²³⁾

とした指標にいたるまでその範囲はきわめて広い。本研究では、組織あるいは、細胞レベルでの放射線影響の指標として、mitotic index（細胞分裂指数）に注目した。mitotic index²⁾³⁾⁸⁾¹⁴⁾は、古くから注目されてきた対象であるが、近年になりトレーサとしてのトリチウムチミジンなどの導

入により細胞分裂の機序の解明がすすみ⁴⁾⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾⁽¹⁷⁾⁽²⁰⁾⁽²¹⁾⁽²²⁾、生物学的指標としての細胞分裂像の変化が、改めて注目されてきたと考えられる。

著者らは、低線量被ばくによるマウス胎児における被ばく直後の mitotic index の変化に注目して研究を行つた。小児は、放射線影響を論ずる場合の重要な対象である¹⁶⁾。そして、胎児には、小児の特質がより著明に表現されているものと解釈できる¹³⁾。これは、本研究で胎児をとりあげた主な理由の1つである。

なお、本研究で肝臓をとりあげた理由は、小さい胎児から比較的摘出しやすい臓器であること、および、胎児の肝臓には造血系の細胞が大量¹²⁾に含まれていることなどの点から、著者らの今後の研究の手法を確立するための当面の対象としては適当であると考えたからである。

研究方法

1. 実験材料

実験に用いた動物は、ddY 系ハツカネズミである。ddY 系ハツカネズミは、吉沢ら¹⁸⁾⁽¹⁹⁾⁽²³⁾が、放射線の催奇効果に関する一連の研究で使用しているものである。生後8週齢の成熟未経産の ddY 系ハツカネズミを購入し、室温23°C、湿度60%の飼育条件下で、2週間予備飼育し実験に供した⁶⁾⁽⁹⁾。

生後10週齢の雄1匹に、発情期の雌1匹を、午後6時から翌朝9時まで配し、膣栓 (vaginal plug) の認められた日を妊娠0日として胎齢を起算した⁷⁾。

本実験に使用した妊娠マウスは102匹、これから得られた胎児は917匹であつた。

2. γ線照射

γ線照射には、東京大学・原子力研究総合センター生物照射装置 (¹³⁷Cs・4000Ci) を用いて妊娠マウスの全身照射を行つた。

照射線量は、100R、50R、25R、10R、および、5Rであり、5Rの場合を除いては、照射時間は10分である。5R照射群の照射時間は5分である。

照射時のマウス胎児の胎齢は、14日、および16

日であつた。

3. 塗抹標本の作成

γ線照射後、0.5時間、1時間、および、1.5時間後に、母獣を頸椎脱臼法により屠殺し、胎児を取り出した。さらに、胎児より肝臓を摘出し、生食中でよく洗浄し、ろ紙で水滴をふき取つたあとシャーレに移し、ハサミで細かく切り刻み (mince 法) 組織をできるだけバラバラにしたのち、固定・染色の際にガラス板からの塗抹試料の剝離するのを防ぐため、切り刻んだ組織片に卵白グリセリンを加え、塗抹標本を作成した。塗抹標本は、空気乾燥ののち、メタノールで固定し、ヘマトキシリン・エオジン重染色を行い、観察用標本とした。

4. 細胞分裂指数の観察、および、表わし方

作成した塗抹標本は、光学顕微鏡により約1800倍に拡大して観察した。1匹の胎児につき、10,000個の細胞を観察し、分裂細胞数の計数、および、分裂細胞の時期の分類¹⁾ (前期、中期、後期、および、終期) を行なつた。分裂細胞数は mitotic index (細胞分裂指数: 分裂細胞数/観察細胞数) として表わし、分裂時期の分類の結果は、frequency of prophase cell (分裂前期細胞頻度: 前期細胞数/観察細胞数) として表わした。前期細胞は、数のうえで比較的多く統計処理上都合がよく、さらに mitotic index の増減をもつとも敏感に反映するものと考えられる。

観察の対象とした細胞は未分化な胎児細胞であるため、分裂像が分化した成熟時の細胞と異なり、early prophase cell の識別が困難であつた。したがつて、分裂細胞としては prometa phase 以降の細胞を計数対象とした。故に、ここで求めた mitotic index、および frequency of prophase cell は、ともに prometa phase 以前の前期細胞が含まれておらず、一般通念としての数値よりも小さい値になつてはいるはずである。

結果および考察

1. 非照射群、および、照射群について、mitotic index、および、frequency of prophase cell の母獣間 (litter 間) の差を、統計的に検討した。そ

の結果、5%の危険率で母集団間の差はないことが分かった。

2. 非照射群の mitotic index, および frequency of prophase cell の胎齢 (胎齢14日, 16日, 18日, および, 19日) による差を図1に示す。胎齢14日, 16日の胎児では, mitotic index, および frequency of prophase cell は, それぞれ2.3%, および1.3%を示し, 胎齢による差は認められなかった。しかし胎齢18日では, mitotic

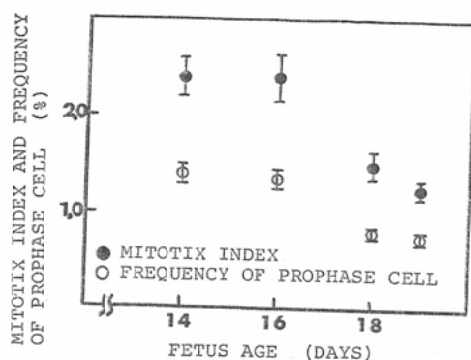


Fig. 1. The Change of Mitotic Index and Frequency of Prophase Cell in Mouse Fetus Liver with Age

index および, frequency of prophase cell ともに, 胎齢14日, および16日の胎児に比べ, 約50%低下している。顕微鏡下で観察した細胞の形態についても, 胎齢14日のものと, 胎齢18日のものとは明らかに異なり, 両者の分化の程度が違うことがわかる。

3. 胎齢16日のマウスについて, 100 R, 50 R, 25 R, 10 R, および5 R全身照射後の, mitotic index の経時変化を図2に示した。100 R, 50 R, 25 R, および10 R照射群は, 照射後0.5時間で mitotic index の減少が認められ, 各線量とも1.5時間では mitotic index が増加の傾向を示す。5 R照射群では, 各時間とも非照射群との差は認められなかった。

胎齢16日のマウス胎児の mitotic index を指標とした場合の「しきい線量」は5 Rから10 Rの間にあるものと思われる。

4. 胎齢14日のマウスに25 R, 10 R, および,

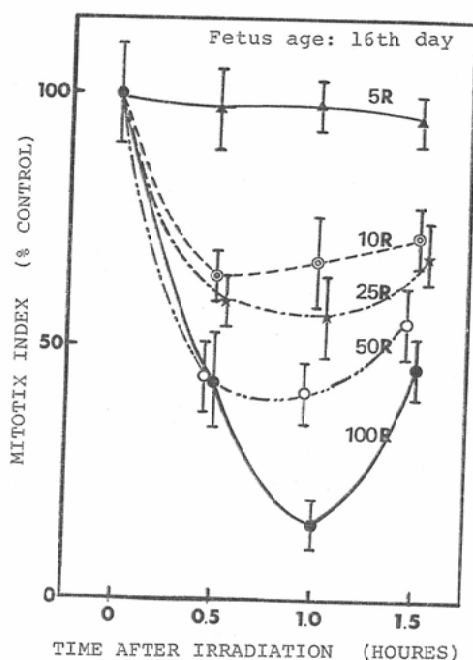


Fig. 2. The Change of Mitotic Index in Mouse Fetus Liver with Time after Irradiation

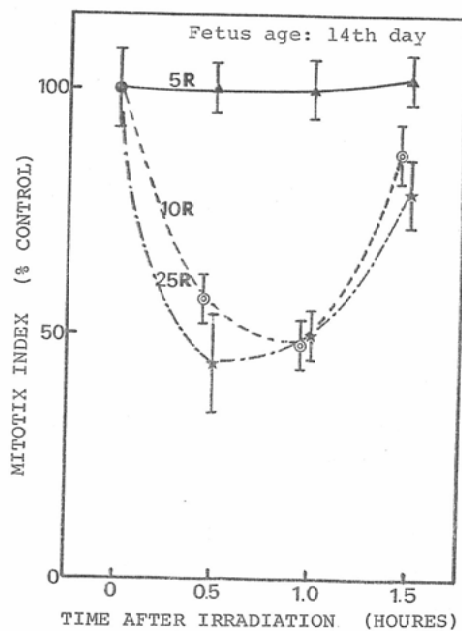


Fig. 3. The Change of Mitotic Index in Mouse Fetus Liver with Time after Irradiation

5 Rの全身照射後の mitotic index の経時的变化を図3に示した。5 R照射群では、各時間とも非照射群との差は認められなかつた。その他の照射線量では、胎齢16日のマウスとはほぼ同様の傾向が示されているが、照射後1時間の mitotic index は胎齢14日のほうが、胎齢16日に比べて有意に低い(危険率5%)。しかし、mitotic index の増加の傾向は、胎齢14日のほうが早い。mitotic index の減少の程度に関しては、胎齢14日のほうが放射線感受性が高い。

胎齢14日のマウス胎児の場合も、胎齢16日の場合と同様に、mitotic index を指標とした場合の「しきい線量」は5 Rから10 Rの間にあるものと思われる。

5. frequency of prophase cell の照射後の経時的变化を、胎齢16日のマウス胎児については図4に、胎齢16日のマウス胎児については図5に示した。胎齢16日のマウスでは、1時間後に増加の傾向が示されているのに、胎齢14日のマウスでは1時間まで減少し、減少の程度は胎齢16日のマウ

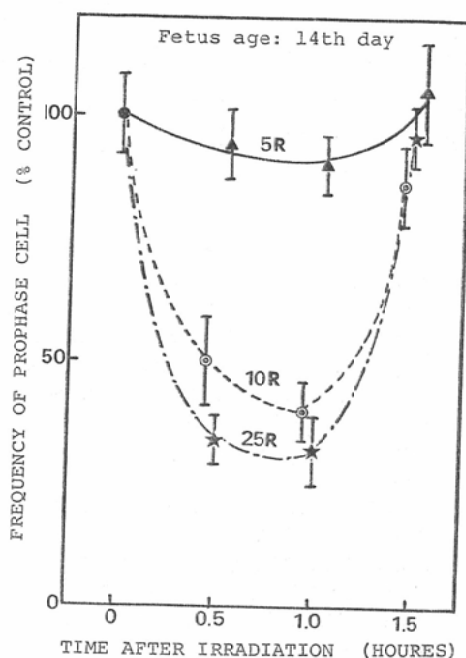


Fig. 5. The Change of Frequency of Prophase Cell in Mouse Fetus Liver with Time after Irradiation

スよりも大きい。胎齢16日、および14日では、5 R照射群は、各時間とも非照射群との間に有意な差がない。frequency of prophase cell に関しても、mitotic index の場合と同様に、5 Rと10 Rの間に「しきい線量」があるものと思われる。

結 語

本研究では、mitotic index の観察という古くから注目されている手法を用いて、放射線照射後の初期の影響を中心として検討をすすめた。この結果、mitotic index, あるいは、frequency of prophase cell が放射線影響の生物学的指標として有用であるとの示唆を得た。

この mitotic index の減少という放射線照射後の初期の効果が、胎児に対するその後の発育あるいは催奇形性などの機能的・器質的な変化にどのような関連をもつかについては、今後、検討をすすめたい。

胎児の肝臓には、造血臓器系の細胞群と、肝細胞系の細胞群とが混在しており¹²⁾、しかも、細胞の増殖・分化の stage が異なるために、細胞分裂

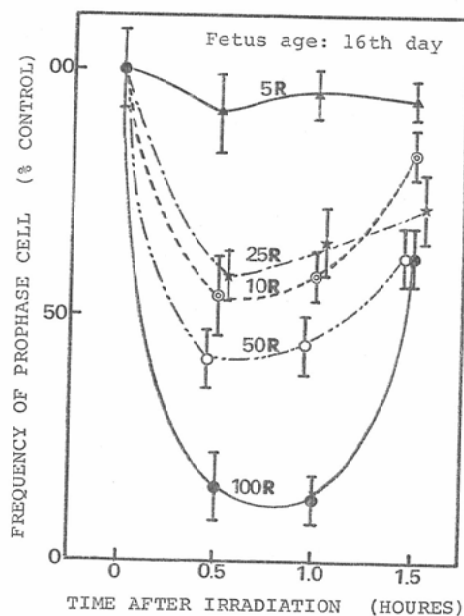


Fig. 4. The Change of Frequency of Prophase Cell in Mouse Fetus Liver with Time after Irradiation

遅延のメカニズムの解明を行うという点では幾多の問題がある。しかし、低線量の放射線影響の研究に際しての指標という観点に立つと、本研究の成果は、今後の研究に何等かの示唆を与えているものと思われる。

文 献

- 1) Brachet, J.: *The Cell* 3 (1961), Academic Press.
- 2) Canti, R.C. and Donaldman, M.: *Proc. Roy. Soc. London* 100 (1926), 413—419.
- 3) Conger, A.D.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 63 (1956), 926—937.
- 4) Deway, W.C. and Humprey, P.M.: *Rad. Res.* 16 (1962), 503—530.
- 5) Doida, Y. and Okada, S.: *Rad. Res.* 38 (1969), 513—529.
- 6) 江崎孝三郎：遺伝, 21 (1967), 49—53.
- 7) 亀山義郎：遺伝, 22 (1968), 66—71.
- 8) Kim, J.H. and Evans, T.C.: *Rad. Res.* 21 (1964), 129—143.
- 9) 小山良修：動物実験手技 (1958), 協同医書出版.
- 10) Leeper, D.B., Schneidman, M.H. and Deway, W.C.: *Rad. Res.* 53 (1973), 326—337.
- 11) Puck, T.T. and Steffen J.: *Biophys. J.* 3 (1963), 379—397.
- 12) Rugh, R.: *The Mouse* (1968), Burgess Publishing Company.
- 13) 坂元正一, 小林登：胎児医学 (1974), 同文書院.
- 14) Schneider, D.O.: *Rad. Res.* 28 (1966), 657—667.
- 15) Stanners, C.P. and Till, J.E.: *Biochem. Biophys. Acta* 37 (1960), 406—419.
- 16) *The Evaluation of Risks from Radiation: A Report prepared by a Task Group of Committee 1, ICRP Publication 8, (1966), Pergamon Press.* 訳：日本アイソトープ協会
- 17) Till, J.E.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 95 (1961), 911—919.
- 18) 上田慶子, 吉沢康雄：日医放學誌, 30 (1971), 7—15.
- 19) 上田慶子, 吉沢康雄：日医放學誌, 31 (1971), 964—970.
- 20) 渡部郁雄：放医研ニュース, 10 (1967), 37—45.
- 21) 渡部郁雄：放医研ニュース, (10) 1967, 89—107.
- 22) 渡部郁雄：放医研ニュース, 10 (1967), 169—184.
- 23) Yoshizawa, Y. and Ueda, K.: *J. Rad. Res.* 14 (1973), 1—7.