

マウス胎児末梢血液中の小核赤血球出現率に対する
放射線あるいは Mitomycin-C の影響および両者の共同効果

太田 勝 正

1

マウス胎児末梢血液中の小核赤血球出現率に対する
放射線あるいはMitomycin-Cの影響
および両者の共同効果

太 田 勝 正

目次

1 緒論および目的	1
2 研究方法	
2-1 実験動物	3
2-2 放射線の照射	3
2-3 Mitomycin-Cの投与	4
2-4 共同効果実験のための放射線とMitomycin-Cの 組合せおよび処置手順	4
2-5 小核赤血球の観察	5
2-6 統計的手法	6
3 研究結果	
3-1 放射線照射による小核赤血球出現率の変化	10
3-1-1 放射線照射後の経時変化	
3-1-2 線量-効果関係	
3-1-3 放射線の線量率効果	
3-1-4 反復照射による小核赤血球出現率の変化	
3-1-5 放射線に対する小核赤血球出現率の個体差	
3-2 Mitomycin-Cの投与と胎児末梢血液中の小核赤血球 出現率	21
3-2-1 小核赤血球出現率の経時変化	
3-2-2 Mitomycin-Cに対する投与量-効果関係	
3-2-3 Mitomycin-Cに対する小核赤血球出現率の 個体差	
3-3 放射線およびMitomycin-Cの併用による共同効果	28
4 考察	
4-1 マウス胎児末梢血液中の小核赤血球出現率の 特徴について	32
4-1-1 小核赤血球の形成と末梢血液中への放出	
4-1-2 線量-効果関係	
4-1-3 放射線に対する線量率効果	
4-1-4 小核赤血球の保存性と小核赤血球出現率の 加算性	
4-1-5 小核赤血球出現率の観察精度	
4-2 共同効果係数 ω による放射線とMitomycin-Cの 共同効果について	39

4-2-1	共同効果係数 ω の算定方法	
4-2-2	ω による放射線とMitomycin-Cとの共同効果の判定	
4-3	放射線と放射線以外の有害要因による共同効果研究への応用について	43
4-3-1	放射線と放射線以外の有害要因による共同効果研究の重要性	
4-3-2	胎児影響に関する定量的な影響指標としての条件	
4-3-3	放射線と放射線以外の有害要因による共同効果研究への応用	
5	結語	47
	謝辞	
	引用文献	

第1章 緒論および目的

胎児の放射線感受性は、成人と比べて特に高く[1,2]、放射線防護上の重要な対象となっている。また、母体の放射線診療に伴う予期せぬ被曝の機会が社会的にも大きな関心を集めており、胎児の放射線防護は、医療放射線利用の観点からも重要な問題となっている[3-5]。

現在の放射線防護基準は、放射線を単独で被曝した場合に対して決められており、放射線と他の有害要因との間の共同効果については、特に考慮されていない。しかし、近年、放射線と放射線以外の有害要因を同時に曝露した場合に、共同効果によって、それぞれを単独で曝露した場合よりも大きな影響が現れること（相乗的作用）があることが明かとなっている[6]。胎児は、母体環境中にあり、母体を通じて環境中の多くの有害要因および医薬品によって曝露される可能性がある。したがって、放射線に対する感受性の高い胎児について、それらの有害要因と放射線とを同時に曝露したときの共同効果は、放射線防護の観点からも重要な問題となる。

胎児に対する放射線と放射線以外の有害要因との共同効果については、従来、胎児奇形、胎児（胚）死、発育遅延、および出生後の腫瘍の発生等、主として個体レベルの症状に着目して行われてきた[2]。しかし、個体レベルの胎児影響の実験は、多くの労力と時間を要するため、限られた要因について研究が行われているに過ぎない。一方で、*in vitro*系の共同効果実験がいくつか行われているが、その結果を胎児個体レベルに外挿することは、母体内での代謝、胎児移行、特に胎盤通過性、および、胎児体内での代謝等の多くの要因が係わるため困難である[7]。

本研究においては、染色体異常に関連する簡便で比較的精度の高い試験法として知られている小核試験法[8-13]に着目し、マウス胎児の末梢血液中の小核赤血球出現率に対する放射線およびMitomycin-Cによるそれぞれ単独の効果、ならびに両者の共同効果に関して、次の3つの観点から、*in vivo*での実験的な検討を行った。

(1)放射線およびMitomycin-Cをそれぞれ単独で用いた場合について、①放射線を照射した時のマウス胎児の末梢血液中の小核赤血球出現率に関する、経時変化、

線量-効果関係、線量率効果、反復照射による効果、および、胎児間および母獣間の個体差、ならびに、②放射線以外の有害要因としてMitomycin-Cを投与した時のマウス胎児末梢血液中の小核赤血球出現率に関する、経時変化、投与量-効果関係、および、胎児間および母獣間の個体差を実験的に明かにする。

(2)放射線とMitomycin-Cを併用したときの胎児末梢血液中の小核赤血球出現率を実験的に求め、共同効果係数 ω に基づく共同効果の型および程度に関する定量的な評価を行う。

(3)胎児影響に関する定量的な影響指標としての必要条件について検討し、マウス胎児末梢血液中の小核赤血球出現率が放射線と放射線以外の有害要因による胎児影響に関する共同効果の定量的な影響指標として必要な条件を備えているか否かを明かとする。さらに、環境中に存在する多くの有害要因の中から、放射線防護上問題となる発がんおよび遺伝的影響に関する放射線との共同効果の詳細な実験を必要とする有害要因を選択するためのスクリーニングのために、胎児末梢血液中の小核赤血球出現率が利用可能であるか否かについて検討する。

第2章 研究方法

2-1 実験動物

本研究では、ICR系マウス(Charles River Japan:CD-1(ICR))を用いて放射線およびMitomycin-Cによる胎児末梢血液中の小核赤血球出現率に関する実験を行った。マウスは、日本チャールズ・リバー(株)がクローズドコロニーとして維持しているものを(株)日本生物材料センターから入手した。

交配は1週間の予備飼育によって健康状態を確認した9週齢以上の雌マウスを用いて、膣の充血腫脹状態によって発情を確認した後、交配予定日の前夜(原則として20時)から、翌朝(原則として10時)まで雄と同居させて行った。

交配は膣栓(vaginal plug)の確認によって行い[14,15]、膣栓が確認された日を妊娠0日として胎齢を起算した。

2-2 放射線の照射

胎児への放射線照射は、東京大学原子力研究総合センターの生物用照射装置の ^{137}Cs 線源(1989年2月現在、97.5 GBq; γ 線のエネルギー662 keV、LET 0.2 keV/ μm [16])を用いて写真2-1に示すように行った。

照射した線量は胎児吸収線量で0.5、1.0、1.9および3.8 Gyの4種類とした。線量率は原則として、0.19 Gy/分を用い、線量率効果の実験においては他に0.02 Gy/分および1.9 Gy/分を用いた。本実験に用いた最大の胎児吸収線量3.8 Gyは、マウス成体に対するLD₅₀[15]の約1/2に相当する線量である。

照射時のマウス胎児の胎齢は、原則として胎齢15日とし、胎児による小核赤血球出現率の変化を確認する実験においては胎齢14および16日にも照射を行った。

照射線量の校正は国立電子技術総合研究所の一次校正を受けた線量計によって行われており、さらに照射時間の誤差を確認しているため照射線量としての誤差は最大で2%となっている。さらに、照射線量(R)から胎児吸収線量(Gy)

への換算は、下記の式によって行い、本実験に用いた胎児吸収線量の誤差は最大2%以内となっている。

$$\text{吸収線量(Gy)} = \text{照射線量(R)} \times 0.957 (\text{rad/R}) \times 0.01 (\text{Gy/rad})$$

注) 0.957は、実験に用いた ^{137}Cs γ 線に対する照射線量から軟組織の吸収線量への換算係数、0.01はradからGyへの換算係数。

2-3 Mitomycin-Cの投与

胎児へのMitomycin-Cの投与は、胎齢15日に母獣大腿の付け根部に皮下注射によって行った。

Mitomycin-Cの投与量は1、2および4mg/kgの3種類とし、Mitomycin-C (Sigma製)を注射用蒸留水(小林製薬製)で溶解した後、それぞれの投与量について全量が1ml以下となるように皮下・静脈注射用の生理食塩液(小林製薬製)で希釈して調整した。

なお、Mitomycin-Cの蒸留水中での安定性は室温で7日、生理的食塩水中では12時間であり[17]、Mitomycin-Cの安定性を考慮し、蒸留水によって溶解した原液は冷蔵保管の上、3日以内に使用し、生理食塩液による希釈液は投与の都度作成している。また、本実験で用いた最大投与量4mg/kgは、マウス成体に対する皮下注射によるLD₅₀[18]の約1/2に相当する投与量である。

2-4 共同効果実験のための放射線とMitomycin-Cの組合せおよび処置手順

放射線とMitomycin-Cを用いた共同効果に関する実験は、胎齢15日にMitomycin-Cを投与し、その1時間後に放射線を照射して行った。なお、手順の違いによる共同効果の差について実験的に検討するため、この中の1群については同じく胎齢15日に放射線を照射し、その6時間後にMitomycin-Cを投与している。

共同効果実験における胎児吸収線量とMitomycin-Cの投与量の組合せは、それぞれ単独で用いた場合の量-効果関係が確認された範囲内で、表2-1に示すように設定した。

Table 2-1 Combination of fetal absorbed doses and doses of Mitomycin-C

Absorbed dose of fetus (Gy)	Administration dose of Mitomycin-C (mg/kg)
1	1 2 4
1.9	1 2 4
3.8	1 2

2-5 小核赤血球の観察

14-16日齢に放射線の照射およびMitomycin-Cの投与等の処置を行った母獣を、それぞれ24、25時間所後に頸椎脱臼により屠殺し、胎児を摘出した（写真2-2）。摘出した胎児の頸部をハサミで切開し、湧出する末梢血液をマイクロビベット（Drummond製、Microcaps）で正確に5 μ lずつ採取し、1母獣単位で牛胎児血清（Gibco製）を20%添加したタイロッド液（武藤化学薬品製）を満たした試験管にブールした。この後、1000rpmで10分間遠沈し沈査として回収し、下記の要領で試料の固定・染色を行った。

《固定・染色の手順》

- ①血液を塗抹したスライドガラスを室温で約1時間乾燥する。
- ②May-Grünwald（Merck製）の原液で3分間、固定・染色を行う。
- ③50%May-Grünwald液（PH6.8リン酸緩衝液による希釈液）で2分間染色する。
- ④PH7.2リン酸緩衝液で約10秒洗う。
- ⑤Giemsa液（武藤化学薬品製）をPH7.2リン酸緩衝液で5%に希釈した溶液で10分間染色する。
- ⑥流水で1分間水洗する。

⑦室温で約1時間、乾燥する。

注) 上記染色法の濃度、時間等の条件は、Schmid、Coleらの手法[9,19]を参考に改良を加え設定した。

作成したスライドは、光学顕微鏡を用いて、油浸レンズで1500倍に拡大して観察した。1スライド当り(1母獣当り)2000個以上の赤血球(多染性、正染性の区別を行わない)を観察し、小核赤血球(写真2-3)の出現率を求めた。小核赤血球の判定は以下の基準に従って行った。

- ①一つの赤血球中の小核の数にかかわらず、一つ以上の小核を有する赤血球(写真2-4)は1つの小核赤血球としカウントする[9,20]。
- ②小核の型は円型もしくはカシューナッツ型であること[9,20]。
- ③小核の色調は本染色法により赤紫色を呈すること。

2-6 統計的手法

本研究では、1群(1点)につき原則として4匹以上の母獣を用いて実験を行った。

実験結果の個体差に関して、トンブソンおよびスミルノフの棄却検定法を用いた検定を行い、統計上のはずれ値の有無を確認した(危険率5%)。ただし、統計上のはずれ値であっても平均値等の算定に際しては、当該データも含めて計算を行っている。

実験条件を変えたときの群間の有意差の検定は、 t -検定(危険率5%)およびウィルコクソンの順位検定(危険率片側5%)によって行った。

線量-効果関係として得られる回帰曲線の回帰係数は、 F 検定(危険率0.1%)を行い、各回帰項の有意性を検定した。

共同効果係数 ω については、経験的に対数正規分布に良く一致することが判っているため正規検定(危険率5%)をおこない、さらに、 $\omega = 1$ に対する有意差の検定を t -検定(危険率5%)によって行った[43]。

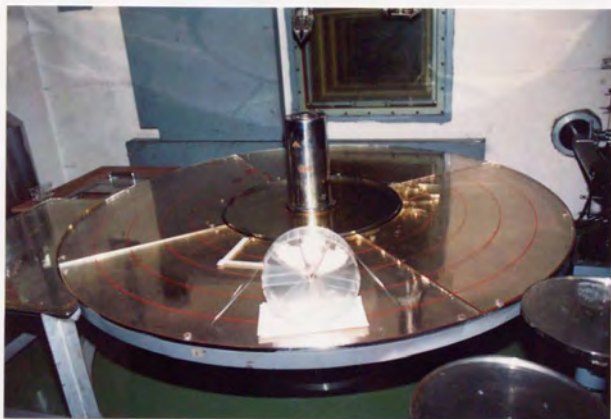


写真2-1 マウスに対する放射線照射の方法

マウス母獣をアクリル性のケージに入れ、所定の線量率となる照射台の位置に固定し、照射を行った。



写真2-2 摘出した胎児（胎齢16日）

摘出した胎児の頸部を切開し、湧出する末梢血液をマイクロピペットで正確に $5\mu\text{l}$ ずつ採取し、牛胎児血清を20%添加したタイロード液を満たした試験管に1母獣単位にブールした。

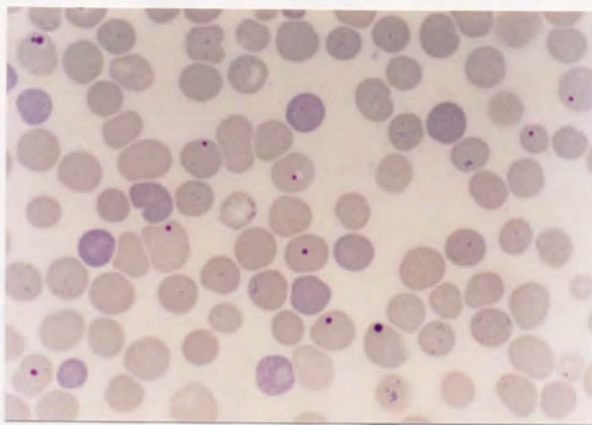


写真2-3 小核赤血球（胎齡15日に4 Gy照射、72時間後）

〔May-Grünwald-Giemsa染色、倍率×1500〕

赤血球の直径の1/10程度の大きさの小核をもった赤血球が10個観察される。

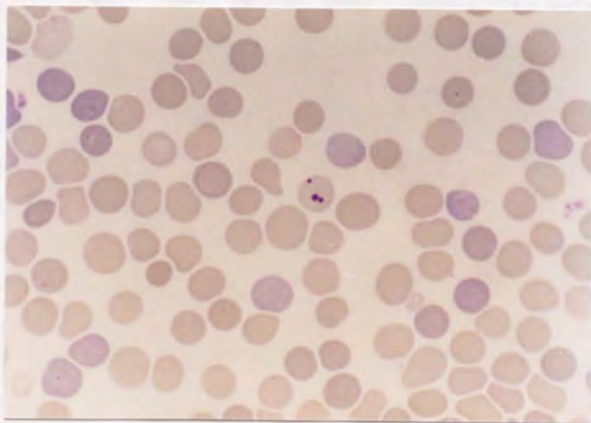


写真2-4 小核赤血球（胎齡15日に2 Gy照射、72時間後）

〔May-Grünwald-Giemsa染色、倍率×1500〕

3つの小核をもった赤血球が中央に観察される。

第3章 研究結果

3-1 放射線照射による小核赤血球出現率の変化

3-1-1 放射線照射後の経時変化

放射線照射後の胎児末梢血液中の小核赤血球出現率の経時変化を確認し、照射から小核赤血球出現率の観察までの時間を決定するために、胎齢15日の胎児に、 ^{137}Cs γ 線源を用いて1.9 Gyを全身照射（線量率0.19 Gy/分）し、照射16、24、32および48時間後の小核赤血球出現率を観察した。実験結果を図3-1に示す。

図から明らかなように、観察を開始した照射16時間後には既に、小核赤血球出現率の有意な増加が観察され、24時間後に小核赤血球出現率は4.1%となり最大値を示した。照射後24時間以降は、ゆるやかに減少しているが照射48時間後でも2.8%と非照射群と比べて有意な小核赤血球出現率が観察された。

胎齢14日および16日に1.9 Gyを照射した時の胎児末梢血液中の小核赤血球出現率の経時変化を図3-2に示す。胎齢とともに小核赤血球出現率の最大値は低下しているが、照射してから最大値に達するまでの時間については、胎齢による違いは認められなかった。

実験結果から、胎齢14-16日に照射した場合、小核赤血球出現率の最大値は、照射24時間後に観察され、その後約8時間そのピークが持続することが判明した。この結果を基に、本研究における放射線の照射から小核赤血球出現率の観察までの時間を24時間に設定した。

また、胎児に対する処置は胎齢15日とした。これは、胎齢14日に照射した場合、小核赤血球出現率を観察する胎齢15日に十分な末梢血液が得られないためであり、また、胎齢とともに胎児末梢血液中の小核赤血球出現率の最大値が低下するため、胎齢16日に照射した場合には、同じ統計上の精度を得るためにより多くの試料が必要となるからである。

3-1-2 線量-効果関係

共同効果実験の基礎となる放射線に対する胎児末梢血液中の小核赤血球出現率の線量-効果関係を得るために、胎齢15日のマウス胎児に0.5、1、1.9および3.8 Gyを照射した結果を表3-1および図3-3に示す。

胎児末梢血液中の小核赤血球出現率に対する放射線の線量-効果関係には次の関係が認められた。

- ①実験に用いた最小線量である0.5 Gy以上で、有意な小核赤血球出現率が観察された。
- ②線量-効果関係は0-1.9 Gyでは、ほぼ直線となったが、1.9 Gy-3.8 Gyの間で、直線関係から下方にずれ、飽和する傾向を示している。
- ③線量-効果関係は下記の2次回帰式によって回帰された。

$$R(\%) = 0.059 + 2.7D - 0.24D^2$$

但し、R：小核赤血球出現率(%)

D：吸収線量(Gy)

なお、F検定により、1次および2次の回帰係数項の有意性が確認されている(危険率0.1%)。さらに、回帰誤差 σ_E は0.37と小さい。

3-1-3 放射線の線量率効果

放射線による胎児末梢血液中の小核赤血球出現率に対する線量率効果を確認するために、胎齢15日のマウス胎児に0.02 Gy/分、0.19 Gy/分、1.9 Gy/分の3種類の線量率を用いて、1.9 Gyを照射した。実験結果を表3-2に示す。

それぞれの線量率における小核赤血球出現率は、4.4-5.0%の範囲に収まり、各群の間に統計上の有意差は認められなかった(危険率5%)。この結果、今回の線量率の範囲では放射線による胎児末梢血液中の小核赤血球出現率に対する線量率効果は認められないことが判明した。

3-1-4 反復照射による小核赤血球出現率の変化

放射線を反復して照射した場合の胎児末梢血液中の小核赤血球出現率の変化を確認するために、1回につき0.6 Gyおよび1.3 Gyの2種類の線量を用いて胎齢14日、15日および16日に反復照射を行い、胎齢17日における末梢血液中の小核赤血球出現率を観察した。また、3-1-1に示すように照射時の胎齢によって胎児末梢血液中の小核赤血球出現率が大きく変化するため、反復照射の対象群の小核赤血球出現率として、それぞれの胎齢で1.3 Gyを1回だけ照射した後の胎齢17日における末梢血液中の小核赤血球出現率を観察した。実験結果を表3-3に示す。

表に示すように胎齢14日、15日および16日に0.6 Gyおよび1.3 Gyを3回反復して照射した場合の胎齢17日における小核赤血球出現率は、それぞれ2.8%および5.1%となった。一方、胎齢14日、15日および16日に1.3 Gyを1回だけ照射した群の胎齢17日における小核赤血球出現率は、それぞれ1.9%、2.4%および1.9%となり、表3-3に示す式により、1.3 Gyを反復照射した場合の小核赤血球出現率の推定値5.6%が得られた。さらに、3-1-2に示すように末梢血液中の小核赤血球出現率の放射線に対する線量-効果関係が1.9 Gy以下でほぼ直線となることから、1.3 Gyを1回だけ照射した群の実験結果を基に0.6 Gyを1回だけ照射した場合の小核赤血球出現率を内挿法によって算定し、0.6 Gyを反復して照射した時の小核赤血球出現率の推定値3.0%を得た。以上の実験値および推定値に基づく統計的検定の結果、反復照射の実験値と1回照射の結果の合計値として得られる推定値との間には、統計上の有意差は認められなかった（危険率5%）。

3-1-5 放射線に対する小核赤血球形成の個体差

同一母獣内の胎児間の個体差およびブール血液中の小核赤血球出現率と胎児毎に観察した小核赤血球出現率の平均値との差について実験的に検討するために、摘出した胎児の末梢血液中の小核赤血球出現率を胎児毎に観察した。照射時の胎齢は15日および16日とし、放射線の照射から小核赤血球出現率の観察までの

時間は16時間から72時間まで変化させて実験を行った。なお、胎児吸収線量は一律に1.9 Gyとした。この結果を表3-4に示す。

表に示すように、100胎児の末梢血液中の小核赤血球出現率についてスミルノフおよびトンブソンの棄却検定を行った結果、危険率5%で4例が外れ値となったが、その外れ値が母獣毎の平均値に与える誤差は4%以下であった。さらに、母獣単位で得られた変動係数は最大0.2(20%)であり、放射線による小核赤血球の形成における同一母獣内の胎児間の個体差は有意でないことが示された。

また、ブール血液中の小核赤血球出現率と胎児毎に求めた小核赤血球出現率の平均値との比は、0.8-1.1の範囲に収束していることが確認され、本研究で採用したブール血液を用いて胎児末梢血液中の小核赤血球出現率を観察する方法の精度が高いことが示された。

さらに、母獣間の個体差(Litter effect)を検討するために行った、スミルノフおよびトンブソンの棄却検定の結果、統計上の外れ値は認められず(危険率5%)、放射線を照射した群の変動係数は、最大0.23(23%)であった。この結果、放射線照射による胎児末梢血液中の小核赤血球出現率に関する母獣間の個体差は有意でないことが示された。

Table.3-1 Dose response relationship for erythrocytes with MN.
after ^{137}Cs γ -ray irradiation

Absorbed dose Gy	Number of Dams	Number of outlier	Frequency of erythrocytes with MN.			Frequency of reticulocytes %
			Average %	Standard Deviation%	Coefficient of Variation	
0(Control)	4	0	0.29	0.12	0.41	96.7 ± 2.1
0.5	4	0	1.18**	0.27	0.23	95.5 ± 1.0
1.0	4	0	2.18**	0.05	0.02	97.6 ± 1.7
1.9	7	0	4.10**	0.58	0.14	$91.7 \pm 2.6^{**}$
3.8	4	0	6.89**	0.52	0.08	$89.5 \pm 2.0^{**}$

** Significant difference from control ($p < 0.05$).

Table.3-2 Dose-rate effect on erythrocytes with MN. in fetus

Dose rate (Gy/min)	Exposure time (min)	Number of dams	Frequency of erythrocytes with MN. (%)	Standard deviation (%)
0.02	100	5	4.4 *2	0.7
0.19	10	4	4.6 *2	0.1
1.9	1	4	5.0 *2	0.6

(Total dose 1.9 Gy)

*1 Fetus were irradiated on day 15 of gestation and sacrificed
at 24 hours after irradiation.

*2 There were no significant difference between each group ($p < 0.05$).

Table.3-3 Repeated exposure effect on erythrocytes with MN. in fetus

Repetitional exposure(3 times)			Single exposure					Estimated frequency (%)
Dose (Gy)	Number of dams	Erythrocytes with MN. (%)	Dose (Gy)	Age (days)	Time (hr)*2	Num. *3	Erythrocytes with MN.(%)	
*1 1.9	4	*6 2.8 ± 0.35	0.6	14	72	—	1.1 *4	*5,6 3.0
				15	48	—	1.4 *4	
				16	24	—	1.1 *4	
*1 3.8	3	*6 5.1 ± 0.35	1.3	14	72	3	1.9 ± 0.5	*5,6 5.6
				15	48	3	2.4 ± 0.6	
				16	24	3	1.9 ± 0.3	

*1 Fetus were repeatedly irradiated on day 14,15 and 16 of gestation and sacrificed at 24 hours after last irradiation.

*2 This column shows time after irradiation.

*3 This column shows number of dams of each group.

*4 Each value was estimated from average value after 1.3 Gy single irradiation.

*5 The frequency was estimated by following equation,

$$R(\%) = \sum_{n=14}^{16} (R(n) - R_0) + R_0$$

where, R : Estimated value of frequency of erythrocytes with MN.

R(n): Frequency of erythrocytes with MN. at each fetal age (n=14,15,16 days)

R₀ : Spontaneous incidence of erythrocytes with MN. on day 17 of gestation. (R₀ = 0.34%)

*6 There was no significant difference between estimated and experimental value. (P<0.05)

Table.3-3 Repeated exposure effect on erythrocytes with MN. in fetus

Repetitional exposure(3 times)			Single exposure					Estimated frequency (%)
Dose (Gy)	Number of dams	Erythrocytes with MN. (%)	Dose (Gy)	Age (days)	Time (hr)*2	Num. *3	Erythrocytes with MN. (%)	
*1 1.9	4	*6 2.8 ± 0.35	0.6	14	72	—	1.1 *4	*5,6 3.0
				15	48	—	1.4 *4	
				16	24	—	1.1 *4	
*1 3.8	3	*6 5.1 ± 0.35	1.3	14	72	3	1.9 ± 0.5	*5,6 5.6
				15	48	3	2.4 ± 0.6	
				16	24	3	1.9 ± 0.3	

*1 Fetus were repeatedly irradiated on day 14,15 and 16 of gestation and sacrificed at 24 hours after last irradiation.

*2 This column shows time after irradiation.

*3 This column shows number of dams of each group.

*4 Each value was estimated from average value after 1.3 Gy single irradiation.

*5 The frequency was estimated by following equation,

$$R(\%) = \sum_{n=14}^{16} (R(n) - R_0) + R_0$$

where, R : Estimated value of frequency of erythrocytes with MN.

$R(n)$: Frequency of erythrocytes with MN. at each fetal age ($n=14,15,16$ days)

R_0 : Spontaneous incidence of erythrocytes with MN. on day 17 of gestation. ($R_0 = 0.34\%$)

*6 There was no significant difference between estimated and experimental value. ($P < 0.05$)

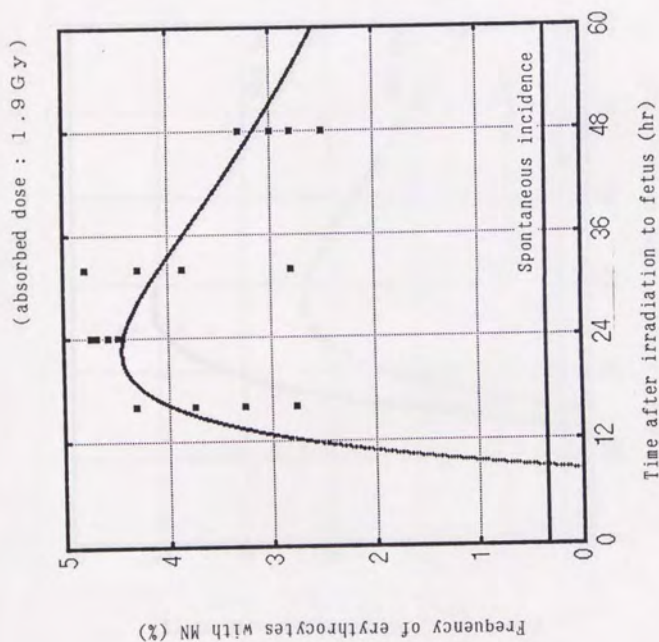


Fig .3-1 The change of frequency of erythrocytes with MN. after irradiation on day 15 of gestation. Solid square (■) shows experimental value. Solid line (—) shows theoretical value estimated by following equation,

$$R(t)(\%) = \frac{1 - e^{-0.173(t-8.5)}}{0.16 \times e^{0.017(t-8.5)}}$$

t : Time after irradiation

(absorbed dose : 1.9 Gy)

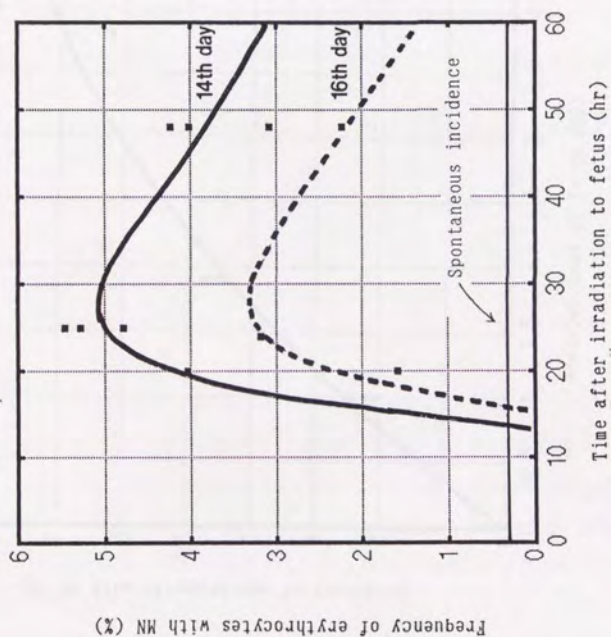


Fig.3-2 The change of frequency of erythrocytes with MN. after irradiation. Solid line (—) shows the frequency in the fetus irradiated on day 14 of gestation. Dash line (----) shows the frequency in the fetus irradiated on day 16 of gestation.

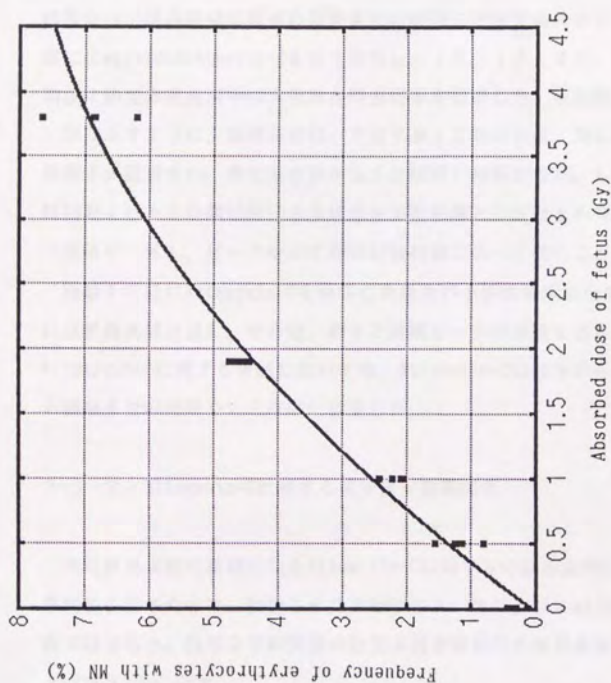


Fig.3-3 Dose response relationship for frequency of erythrocytes with MN. after irradiation on day 15 of gestation. Solid square (■) shows experimental value. Solid line (—) was estimated by following equation.

$$R(\text{frequency \%}) = 0.059 + 2.7 D - 0.24 D^2$$

D : Absorbed dose (Gy)

3-2 Mitomycin-Cの投与と胎児末梢血液中の小核赤血球出現率

3-2-1 小核赤血球出現率の経時変化

Mitomycin-C投与後の胎児末梢血液中の小核赤血球出現率の経時変化を確認し、投与から小核赤血球出現率の観察までの時間を決定するために、胎齢15日の母獣に2mg/kgのMitomycin-Cを皮下投与し、12、16、25、32および48時間後に胎児末梢血液中の小核赤血球出現率を観察した。実験結果を図3-4に示す。

図に示すように、観察を開始した投与後12時間には、既に有意な小核赤血球出現率が観察され、最大値は投与後32時間に観察された。しかし、投与後25時間および48時間における小核赤血球出現率との統計上の有意差は認められず（危険率1%）、ピークを示す期間が放射線に比べて長いことが明かとなった。

胎齢15日にMitomycin-Cを投与した場合の小核赤血球出現率は投与25時間後にほぼ最大値に達し、その後、約23時間ピークが持続することが判明したため、Mitomycin-Cに関する実験においては、Mitomycin-Cの投与から小核赤血球出現率の観察までの時間を25時間に設定した。

3-2-2 Mitomycin-Cに対する投与量-効果関係

共同効果実験の基礎となるMitomycin-Cに対する小核赤血球出現率の投与量-効果関係を得るために、胎齢15日の母獣に1、2および4mg/kgのMitomycin-Cを皮下投与した。投与25時間後の胎児末梢血液中の小核赤血球出現率を表4-5および図3-5に示す。

胎児末梢血液中の小核赤血球出現率に対するMitomycin-Cの投与量-効果関係には次の関係が認められた。

- ①実験に用いた最小投与量である1mg/kg以上から、有意な小核赤血球出現率が胎児末梢血液中に観察された。
- ②投与量-効果関係は、投与量とともに小核赤血球出現率が急激に増加する下記の2次式で回帰された。

$$R(\%) = 0.334 - 0.175A + 0.332A^2$$

ただし、R：小核赤血球出現率（％）

A：Mitomycin-C投与量（mg/kg）

なお、F検定により1次および2次の回帰係数項の有意性が確認されている（危険率0.1％）。さらに、回帰誤差 σ_e は0.40と小さい。

3-2-3 Mitomycin-Cに対する小核赤血球出現率の個体差

同一母獣内の胎児間の個体差およびブール血液中の小核赤血球出現率と胎児毎に観察した小核赤血球出現率の平均値との差について実験的に検討するために、胎齢15日の母獣に2mg/kgのMitomycin-Cを投与し、投与25時間後に摘出した胎児の末梢血液中の小核赤血球出現率を胎児毎に観察した。実験結果を表3-6に示す。

表に示すように、同腹の胎児間の変動係数は最大0.3であったが、34胎児についてスミルノフおよびトンブソンの棄却検定による外れ値は認められなかった（危険率5％）。また、同腹の個々の胎児の小核赤血球出現率から求めた平均値と、ブール血液試料中の小核赤血球出現率との比は0.8-0.9に収束していることが確認された。

母獣に皮下投与したMitomycin-Cによって胎児末梢血液中に小核赤血球が形成されるためには、Mitomycin-Cが母獣血に吸収され、胎盤を通過し肝および脾に達し、代謝、還元による活性化によって赤芽球およびその前駆細胞にDNA損傷を生じることが必要である[18]。したがって、Mitomycin-Cの場合、胎盤通過性や胎児臓器における代謝活性などの差によって、放射線と比べて大きな小核赤血球出現率の胎児間の個体差を示すことが予想される。しかし、上記の結果により、胎児間の個体差は少ないことが示され、母獣血中に吸収されたMitomycin-Cの胎児移行および胎児臓器における代謝、還元作用に関する個体差は有意でないことが示唆された。

一方、母獣間の個体差については、1mg/kgおよび4mg/kg投与群では、変動係数は最大0.4であったが、スミルノフおよびトンブソンの棄却検定による外れ値が認められなかった。しかし、2mg/kg投与群では変動係数が最大0.3であったが、21母獣中3母獣が外れ値となり（危険率5％）、母獣間には個体差がある

第3章

ことが示された。これは、母獣に投与したMitomycin-Cの母獣血中への吸収および代謝にある程度の個体差があることを示唆している。

以上のように、Mitomycin-C投与後の胎児末梢血液中の小核赤血球出現率については、放射線と比べて多少大きな個体差が示された。しかし、1群の規模を約4匹とした本実験においても変動係数は最大0.3～0.4に収束しており、Mitomycin-C投与後の胎児末梢血液中の小核赤血球出現率を定量的に評価する上で、特に問題がないことが判明した。

項目	1群	2群	3群	4群	5群
胎児末梢血液中の小核赤血球出現率 (%)	12.5	15.0	18.0	20.0	22.0
変動係数	0.3	0.4	0.3	0.2	0.1

Table.3-5 Dose response relationship for frequency of erythrocytes with MN. after Mitomycin-C administration

Dose of MMC mg/kg	Number of Dams *1	Frequency of erythrocytes with MN.		
		Average %	Standard Deviation%	Coefficient of Variation
1.0	4	0.67	0.07	0.10
2.0	5 *2	1.24	0.38	0.31
4.0	4	4.96	0.54	0.11

*1 Mitomycin-C was injected subcutaneously on day 15 of gestation.

*2 One of 5 dams was excepted by both Smirnov's and Thompson's statistical analysis. ($p < 0.05$)

Table.3-6 Individual variation of frequency of erythrocytes with MN.
after Mitomycin-C administration

Number of fetus *1	Frequency of erythrocytes with MN.			Frequency of erythrocytes with MN. in pooled blood	Ratio *2
	Average %	Coefficient of variation	Number of outlier		
1 0	0.8 2	0.3 0	0	1.0	0.8
1 1	0.9 0	0.1 7	0	1.0	0.9
1 3	0.9 3	0.2 3	0	1.0	0.9

*1 Mitomycin-C was injected subcutaneously on day 15 of gestation and erythrocytes were observed at 25 hours after injection.

*2 Ratios of frequencies from average of each fetus to these from pooled blood of all fetuses were calculated by following equation,

Ratio = $\frac{\text{average of frequency of erythrocytes with MN in each fetal blood}}{\text{frequency of erythrocytes with MN in pooled blood of all fetuses}}$

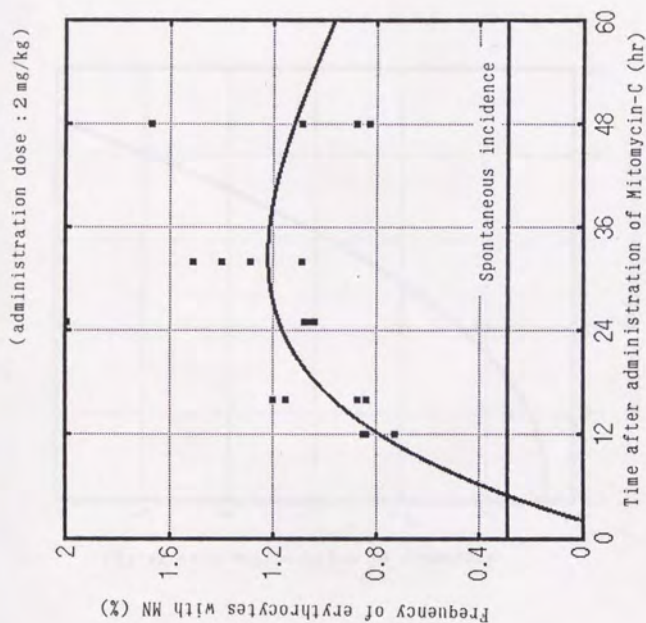


Fig.3-4 The change of frequency of erythrocytes with MN. after administration of Mitomycin-C on day 15 of gestation. Solid square (■) shows experimental value. Solid line (—) shows theoretical value estimated by following equation,

$$R(t)(\%) = \frac{1 - e^{-0.024(t-2)}}{0.22 \times e^{0.022(t-2)}}$$

t : Time after administration of Mitomycin-C (hr)

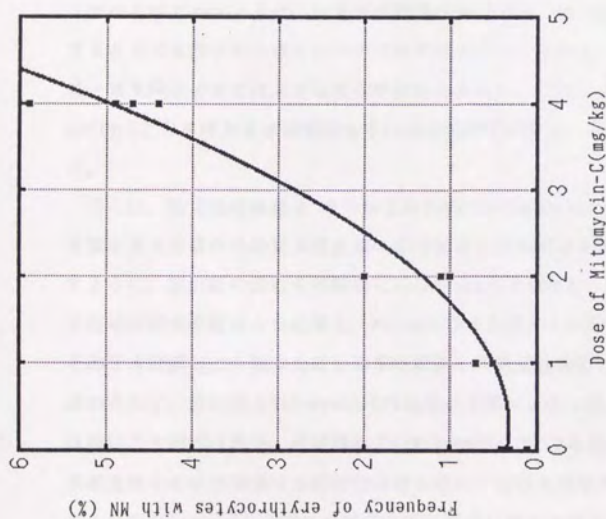


Fig.3-5 Dose response relationship for frequency of erythrocytes with MN. after Mitomycin-C administration on day 15 of gestation. Solid square (■) shows experimental value. Solid line (—) was estimated by following equation,

$$R(\text{frequency \%}) = 0.334 - 0.175 A + 0.332 A^2$$

A : Dose of Mitomycin-C(mg/kg)

3-3 放射線およびMitomycin-Cの併用による共同効果

胎齢15日の胎児を表2-1に示す組合せのMitomycin-Cの投与量および胎児吸収線量を用いて、放射線とMitomycin-Cを併用したときの胎児末梢血液中の小核赤血球出現率を観察した。この結果を、表3-7および図3-6に示す。なお、Mitomycin-Cは放射線の照射1時間前に投与し、小核赤血球出現率の観察は放射線照射24時間後(Mitomycin-Cの投与から25時間後)に行った(2-4項参照)。

表から明らかなように、胎児吸収線量が同じでも、Mitomycin-Cの投与量を増加すると末梢血液中の小核赤血球出現率が増加する。しかし、図に示すように、線量-効果関係の形には大きな変化が認められない。このことから、放射線とMitomycin-Cとの共同効果は相乗的あるいは拮抗的ではなく、相加的であると判断された。

さらに、胎児吸収線量3.8 GyとMitomycin-C 2 mg/kgの組合せについて、処置手順を変えた場合の胎児末梢血液中の小核赤血球出現率を表3-8に示す。表に示すように、放射線の照射6時間後にMitomycin-Cを投与し、その18時間後に小核赤血球出現率を観察した結果と、Mitomycin-Cの投与1時間後に放射線を照射し、その24時間後に小核赤血球出現率を観察した結果との間には統計上の有意差が認められず、放射線とMitomycin-Cの処置の手順による小核赤血球出現率への影響はないことが示された。放射線およびMitomycin-Cによる処置手順を変えても胎児末梢血液中の小核赤血球出現率に有意な変化が認められなかったことは、放射線およびMitomycin-Cとの間に小核赤血球の形成に係わる相互作用がなかったことを示唆している。

なお、放射線照射後の胎児末梢血液中の小核赤血球出現率の経時変化はMitomycin-C投与後の経時変化より大きいことが3-1および3-2の実験結果から判っているため、本実験においては放射線照射から末梢血液中の小核赤血球出現率の観察までの時間を一定にして実験を行っている。

Table.3-7 Combined effects of radiation and Mitomycin-C on fetus *1

Absorbed dose of γ -ray(Gy)	Dose of MMC (mg/kg)	Number of dams	Frequency of erythrocytes with MN.*2		
			Average(%)	S.D.(%)	C.V.
1	0	4	2.18	0.05	0.02
	1	4	3.28	0.90	0.27
	2	4	4.90	0.86	0.18
	4	4	6.33	0.44	0.07
1.9	0	7	4.10	0.58	0.14
	1	4	5.38	0.53	0.10
	2	4	6.17	0.91	0.15
	4	4	7.14	0.97	0.14
3.8	0	4	6.89	0.52	0.08
	1	4	7.24	0.22	0.03
	2	4	7.81	0.21	0.03

(S.D.:standard deviation C.V.:coefficient variation)

*1 Fetus were irradiated on day 15 of gestation at 1 hour after Mitomycin-C administration.

*2 Frequency of erythrocytes with MN. were observed at 24 hours after irradiation.

Table.3-8 Combined effect of radiation and Mitomycin-C on fetus

Treatment procedure *1	Number of dams *2	Frequency of erythrocytes with MN.		ω value
		Average %	Standard Deviation	
γ -ray irradiation 1 hour after MMC administration	4	*3 7.8 1	0.2 1	1.0 0
γ -ray irradiation 6 hours before MMC administration	4	*3 7.2 2	0.7 1	0.9 5

*1 Frequency of erythrocytes with MN. were observed at 24 hours after irradiation.

*2 All dams were treated with 3.8 Gy of γ -ray and 2 mg/kg of Mitomycin-C.

*3 There was no significant difference between two groups ($p < 0.05$)

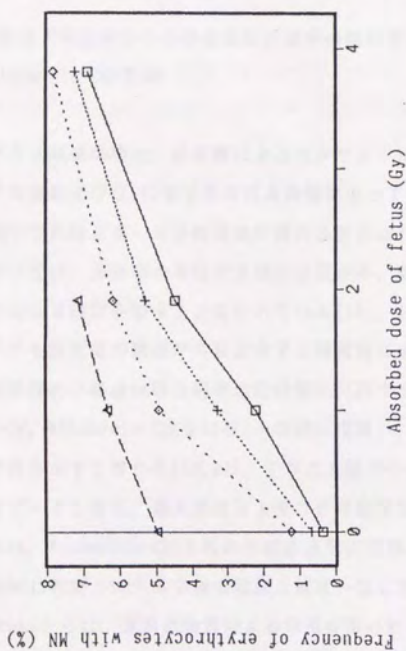


Fig.3-6 Frequency of erythrocytes with MN. after combined treatment with radiation and Mitomycin-C

- irradiation only
- + administration of 1 mg/kg Mitomycin-C before irradiation
- ◇ administration of 2 mg/kg Mitomycin-C before irradiation
- △ administration of 4 mg/kg Mitomycin-C before irradiation

第4章 考察

4-1 マウス胎児末梢血液中の小核赤血球出現率の特徴について

4-1-1 小核赤血球の形成と末梢血液中への放出

1)胎児末梢血液中の小核赤血球出現率の経時変化に対する放射線および Mitomycin-Cの影響

マウス成体の場合、放射線によるセルサイクルの遅延がなければ、放射線によってS期およびG₂に生じたDNA損傷によって形成される小核赤血球のピークは骨髓中で照射24-30時間後に現れると言われている[22,23]。また、胎児造血においては、赤芽球の最後の2回の分裂から、脱核を経て末梢血液中へ移行するまでに22時間を要すると言われている[19]。したがって、小核赤血球出現率のピークも放射線の照射からおよそ22時間後に出現すると考えられ、今回の放射線照射後の小核赤血球出現率の経時変化に関する実験結果とほぼ一致している。

一方、Mitomycin-Cは主にG₁-S期に作用し、DNA合成の阻害、あるいは切断作用を示すと言われ[18,21]、マウス大腿骨中の小核赤血球出現率は24時間以降にピークとなり、最大値はおおよそ36時間後に観察されると言われている[24]。これは、Mitomycin-C投与後の小核赤血球出現率のピークが投与後25時間から48時間に観察された本実験の結果とほぼ一致していると考えられる。

Schmidらは、変異原物質による作用が強ければ強いほど末梢血液中への小核赤血球の移行が妨げられるため、末梢血液中の小核赤血球出現率を観察対象とすべきでないと指摘している[25]。しかし、上記のように今回着目した胎児末梢血液中の小核赤血球出現率は、従来、マウス成体の大腿骨骨髓中の小核赤血球について観察された結果と良く一致しており、胎児末梢血液中の小核赤血球出現率を観察対象とした本研究手法には、感度、精度等に係わる問題が特にないこと、および、放射線およびMitomycin-Cによるセルサイクルへの影響は、成体と同様であることが明かとなった。

なお、Mitomycin-C投与後の胎児末梢血液中の小核赤血球出現率のピークが放射

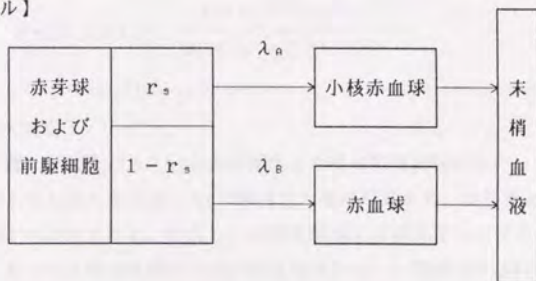
線照射後のピークと比べて多少遅れて出現するのは、細胞周期上の作用時期の違いによる小核赤血球の形成および末梢血液中への放出までの所要時間の差によるものと考えられる。

2) 小核赤血球形成モデル

胎児末梢血液中の小核を有する赤血球、すなわち小核赤血球は、造血臓器中の赤芽球およびその前駆細胞に生じたDNA損傷によって形成された無動原体性の染色体断片が小核を形成し、赤芽球の脱核の際に細胞質内に取り残されて観察されるものである[8,9]。

放射線照射およびMitomycin-C投与後の胎児末梢血液中の小核赤血球出現率の経時変化の実験結果を解析し、小核赤血球形成に関する以下のモデルおよびパラメータを得た。放射線照射の場合のモデル式に対する回帰誤差 σ_{ϵ} は0.45、Mitomycin-C投与の場合のモデル式に対する回帰誤差 σ_{ϵ} は0.27であり、本モデルへの実験結果の適合性は良好であった。

【モデル】



- ①赤芽球およびその前駆細胞 (N_0) から形成される小核赤血球の時刻 t における数 $N_a(t)$: (時間とともに飽和値に達する)

$$N_a(t) = r_s N_0 (1 - e^{-\lambda_a (t - T_d)})$$

$N_a(t)$: 時刻 t における小核赤血球

r_s : 放射線によるヒットを受けた割合

N_0 : 赤芽球およびその前駆細胞の数

λ_n : 小核赤血球の形成速度

T_d : 赤血球、小核赤血球が末梢血液中に放出されるまでの時間

②赤芽球およびその前駆細胞 (N_0) から形成される正常な赤血球の時刻 t における数 $N_B(t)$: (時間とともに指数関数的に増加)

$$N_B(t) = (1 - r_s) N_0 e^{\lambda_B (t - T_d)}$$

$N_B(t)$: 時刻 t における赤血球数

λ_B : 赤血球の形成速度

③時刻 t における小核赤血球出現率 $R(t)$ (%) :

$$R(t) (\%) = \frac{r_s N_0 (1 - e^{-\lambda_n (t - T_d)})}{(1 - r_s) N_0 e^{\lambda_B (t - T_d)}} \times 100$$

④実験結果に基づく数値解析による最適解: 放射線の場合

$$R_R(t) (\%) = \frac{1 - e^{-0.173 (t - 8.5)}}{0.16 \times e^{0.017 (t - 8.5)}}$$

実験結果に基づく数値解析による最適解: Mitomycin-Cの場合

$$R_M(t) (\%) = \frac{1 - e^{-0.024 (t - 2)}}{0.22 \times e^{0.022 (t - 2)}}$$

[モデルの説明]

①増殖・分裂を行っている赤芽球およびその前駆細胞の中の r_s の部分が放射線によるヒットを受け、 λ_n の割合で小核が形成され、小核赤血球として末梢血液中へ放出される。ただし、小核を形成する赤芽球およびその前駆細胞には、あらゆる細胞周期のものが含まれるため、小核赤血球は時間とともにある程度まで増加し、やがて飽和する。

②一方、ヒットを受けない $(1 - r_s)$ の部分からは、赤芽球およびその前駆細胞の正常な分裂・増殖によって小核をもたない赤血球が λ_B の割合で形成され、末梢血液中の赤血球は指数関数的に増加する。

③上記①、②で得られた赤血球数に対する小核赤血球数の割合が小核赤血球出現率 (%) となり、2つの指数関数の合成関数として表される。

4-1-2 線量-効果関係

0-3.8 Gy の範囲における放射線に対する胎児末梢血液中の小核赤血球出現率の線量-効果関係は、2次項が負、すなわち約2 Gy以上の線量領域で次第に飽和する直線-2次曲線で回帰された。

in vitro 系の研究では、小核発生に関する線量-効果関係は一般に、直線あるいは2次項が正の直線-2次曲線として得られる。例えば、ヒトリンパ球を用いた実験では、Huber、Bauchinger、PincuおよびHallらは線量-効果関係が直線的であることを示し[26-29]、一方、Kormos、BettegaおよびKrepinskyらは直線-2次曲線関係となることを示している[30-32]。また、V79細胞およびマウスの胚芽細胞を用いた同様のin vitro 実験でMidanderら[33]は0-0.3 Gyの範囲で、Mullerら[34,35]は0-4 Gyの範囲で線量-効果関係が直線となることを示している。

これに対して、in vivo 系の実験では、セルサイクルの遅延により、ある線量領域以上で小核赤血球出現率が飽和傾向を示すことが知られている。JenssenらはX線を用いて、マウス大腿骨中の小核赤血球を観察した結果、照射線量が0.1 Gy以上で、小核赤血球出現率の増加割合が極端に低下することを確認した[23]。この理由として、 ^3H 標識チミジンを用いた実験により、セルサイクルの遅滞を指摘している。

本研究においては、0-2 Gyまでは、ほぼ直線と見なせる線量-効果関係を示しており、Jenssenらの実験と小核赤血球出現率の増加が飽和傾向を示す線量範囲が異なっているが、2 Gy以上では飽和傾向を示しており、この線量範囲でセルサイクルが遅延していることが推定される。これは、本研究において小核赤血球と同時に観察した胎児末梢血液中の網状赤血球数の観察結果からも支持される。表3-1に示すように、幼弱な赤血球である網赤血球の出現頻度が1.9 Gy以上でコントロールおよび1 Gy以下の照射群と比べて有意に減少する傾向を示しており（危険率5%）、1.9 Gy以上の線量範囲でセルサイクルの遅延等の何等の造血機能上の障害が生じていたことが示唆されている。

Mitomycin-Cによる胎児末梢血液中の小核赤血球出現率については、2次項が正の投与量-効果関係が得られている。網赤血球出現頻度の観察の結果、Mitomycin

n-Cの投与量4 mg/kgまでは、網赤血球数の有意な減少が認められておらず、Mitomycin-Cによる赤血球造血機能等への有意な影響はなかったことが示唆された。

4-1-3 放射線に対する線量率効果

低LET放射線による染色体異常形成には、線量率効果があることが知られている[36]。したがって、無動原体性の染色体断片によって小核赤血球が形成される場合には、線量率効果が認められると予想されるが、小核の形成に関する線量率効果の研究は充分に行われていない[20]。

このため本研究で、0.02 Gy/分(100分間照射)、0.19 Gy/分および1.9 Gy/分(1分間照射)の3種類の線量率を用いて線量率効果の実験を行った結果、3-1-3に示すように3種類の線量率の間に統計上有意な差は認められず、この線量率の範囲における線量率効果はないことが判明した。

交換型の染色体異常の場合には、初期障害の修復に関連した線量率効果が認められるはずであり、今回、 ^{137}Cs の低LET γ 線によって線量率効果が認められなかったことは、胎児末梢血液中に観察される小核の大部分は切断型の染色体異常によって形成されたものであり、交換型の染色体異常によって形成されたものはわずかであることを示唆している。なお、Mitomycin-Cによって形成される小核については、マウス精原細胞に着目した実験によって約75%が染色分体切断によって生じたものであり、染色分体の交換型異常によるものは約25%であることが知られている[37-39]。

4-1-4 小核赤血球の保存性と小核赤血球出現率の加算性

赤血球中に一旦形成された小核は、その赤血球中にそのまま保存されることが知られている[20]。したがって、反復照射を行った場合には、それぞれの照射によって形成された小核が、次第に累積されて観察されることになる。図4-1は、この様子を4-1-1に示す小核赤血球形成モデルに従って、1回毎の照射後の胎児末梢血液中の小核赤血球出現率の積算値の変化として示したものである。

本研究の結果、3-1-4に示すように、反復照射によって観察される胎児末梢血液中の小核赤血球出現率と、1回だけ照射を行った場合の胎児末梢血液中の小核赤血球出現率から算定した反復照射の推定値との間には統計上の有意差がないことが判明した。これは、放射線によって形成され、胎児末梢血液中に放出された小核赤血球がそのまま末梢血液中に保存されていること、および、小核赤血球形成の原因となるDNA損傷の形成に関して、放射線の反復照射による増感、拮抗等の相互作用がないことを示唆するものであると考えられる。

4-1-5 小核赤血球出現率の観察精度

本研究では、SchmidおよびHeddelらによって確立された小核試験法[8,9]を基本とし、KingおよびColeらの手法に準じて、1母獣の全胎児から末梢血液を採取し[19,40]、2-5章に示すいくつかの改良を加えて胎児末梢血液中の小核赤血球出現率を観察した。

KingらはC3HおよびC57BLを用いた実験によって、胎齢16日では約50%が正染性の赤血球であるため、赤血球中の小核を赤血球中の多染性の赤血球に限定して観察する方法を採用している[40]。これに対して、本手法では、赤血球を多染性および正染性に区別せずに全ての赤血球について観察している。しかし、この手法の違いによる誤差については、小核赤血球出現率の観察と同時にを行った網状赤血球の観察により、胎齢16日の胎児末梢血液の場合、90%以上が多染性赤血球であることが観察され(表3-1参照)、両者を区別しないことによる観察結果の誤差は10%以内であることを確認している。

また、胎児末梢血液中の小核赤血球出現率の胎児間の個体差、母獣間の個体差によって観察結果の統計的誤差が大きくなる可能性があるが、3-1-5および3-2-3に示すように、本研究の結果に影響を与える統計的に有意な誤差は生じていないことを確認している。

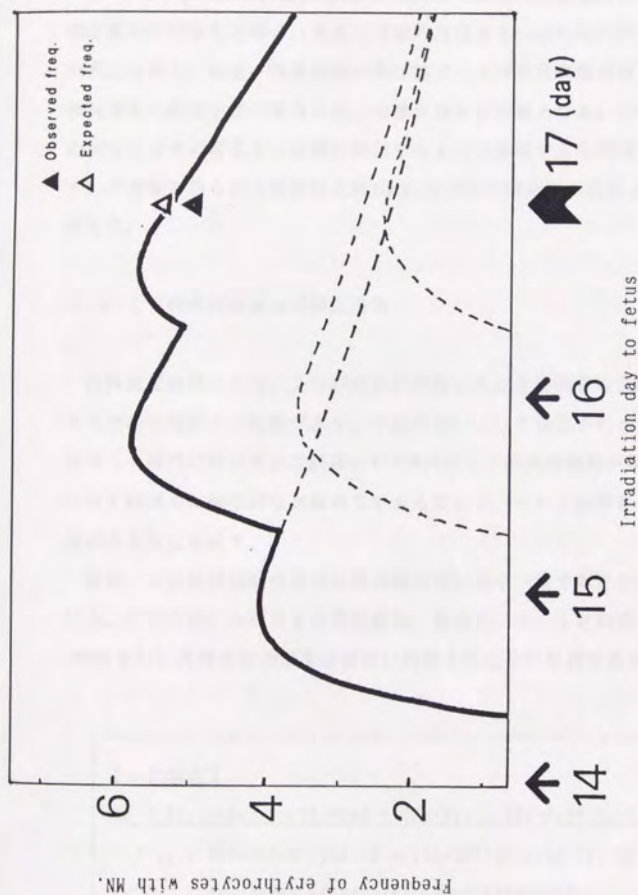


Fig.4-4-1 The change of frequency of erythrocytes with MN. after repeated irradiation

Dash line (- - - -) shows frequency of erythrocytes with MN. after single irradiation. Solid line (—) shows sum of frequency of erythrocytes with MN. after each irradiation.

4-2 共同効果係数 ω による放射線とMitomycin-Cとの共同効果について

3-3に示すように、放射線とMitomycin-Cによる共同効果の型を線量-効果関係の形から判断した場合、有意な相乗的作用あるいは拮抗的作用はないと判断された。しかし、線量-効果関係の形に基づく共同効果の型の判定は定性的であり、共同効果の程度が弱い場合には、的確な判定が困難となる。このため、共同効果の型およびその程度を定量的に判定する1つの指標である共同効果係数 ω を用いて、本実験で得られた放射線とMitomycin-Cの共同効果の型および程度について検討した。

4-2-1 共同効果係数 ω の算定方法

共同効果係数 ω とは、2つの要因を併用したときの両者の共同効果の型を判定するための統計上の指標であり、下記の式によって算定される[41,42]。 $\omega = 1$ は両者（本研究においては放射線とMitomycin-C）の共同効果が相加的であることを、 $\omega > 1$ は両者に相乗的な共同効果があることを、 $\omega < 1$ は両者に拮抗的な共同効果があることを示す。

なお、 ω の統計的な分布は対数正規分布に良く一致することが経験的に判っている。このため、 ω に対する正規検定、および、 $\omega = 1$ との有意差についてのt-検定を行い共同効果の型を定量的に判断することが可能である[43]。

【 ω の算定】

$$\omega = (Pr_{\cdot c} - P_0) / ((Pr - P_0) + (P_c - P_0) - (Pr - P_0) * (P_c - P_0) / (1 - P_0))$$

$Pr_{\cdot c}$: induction rate of erythrocytes with MN. by combined treatment of radiation and Mitomycin-C

Pr : induction rate of erythrocytes with MN. by radiation

P_c : induction rate of erythrocytes with MN. by Mitomycin-C

P_0 : spontaneous incidence of erythrocytes with MN.

4-2-2 ω による放射線とMitomycin-Cとの共同効果の判定

3-3に示した放射線とMitomycin-Cを併用した時の胎児末梢血液中の小核赤血球出現率の実験結果について、前項の式に基づく共同効果係数 ω を算定した。その結果を表4-1に示す。なお、表には放射線とMitomycin-Cが相加的に作用したと仮定した場合の小核赤血球出現率の推定値を併せて示した。

表に示されるように、共同効果係数 ω は0.78-1.63となった。 ω の統計的検定の結果、8群中6群については、放射線とMitomycin-Cの相加的作用を仮定したときの推定値 [$\omega = 1.0$] に対する有意差が認められず相加的作用であることが示された。一方、8群中2群、すなわち胎児吸収線量1 Gy、Mitomycin-Cの投与量2 mg/kgの組合せ ($\omega = 1.63$)、および、胎児吸収線量1.9 Gy、Mitomycin-Cの投与量4 mg/kgの組合せ ($\omega = 0.78$) については、 $\omega = 1.0$ に対する有意差が認められ、それぞれ相乗的作用および拮抗的作用であることが示唆された(危険率5%)。しかし、これについては以下の理由により真の相乗的作用および拮抗的作用ではないと判断した。

Mitomycin-Cの投与量が4 mg/kgで、胎児吸収線量を1および1.9 Gyとした群では、両群ともに $\omega < 1$ となり、このうち胎児吸収線量を1.9 Gyとした組合せでは、 $\omega = 0.78$ という統計的に有意な拮抗作用を示した。しかし、この実験群の母獣には、母獣の衰弱、毛並の乱れ、腹水の貯留など、放射線とMitomycin-Cの併用によると考えられる重度の急性かつ全身性の障害が観察され、胎児の造血臓器・組織にも同様に重篤な障害が発生していることが推測される。本研究で観察している末梢血液中の小核赤血球は、赤芽球およびその前駆細胞の分裂およびその末梢血液中への放出を経て初めて観察されるものである。したがって、放射線およびMitomycin-Cによって胎児造血臓器・組織自体に障害が生じた場合、胎児末梢血液中の小核赤血球出現率が減少し、拮抗的作用と同様な変化を示す可能性がある。このため、本研究においてはMitomycin-Cの投与量4 mg/kg、胎児吸収線量1.9 Gyとした組合せによって得られた実験結果を真の拮抗的作用とは評価しなかった。

一方、放射線と放射線以外の有害要因との相乗的作用は、それぞれの要因の量が増すとともに共同効果の程度が増大すると考えられている[44]。実際に、放射

線とDNA修復阻害剤であるカフェインによる胎児外表奇形に関する共同効果実験によって、放射線およびカフェインの量を増加すると共同効果係数 ω も約2-3倍に増大することが確認されている[41,42]。今回行った実験では、胎児吸収線量1 Gy、Mitomycin-Cの投与量2 mg/kgの組合せについて統計上有意な相乗効果が認められたが、胎児吸収線量を1 Gyから1.9 Gyおよび3.8 Gyに増加した群、あるいは、Mitomycin-Cの投与量を2 mg/kgから4 mg/kgに増加した群においては、 ω は増大せず、逆に減少している。したがって、1つの組合せで相乗効果が認められたという結果をもって、放射線とMitomycin-Cとの共同効果を相乗的と判断することは妥当でないと判断した。

以上のように、放射線とMitomycin-Cの併用による共同効果は、一部の組合せで統計的に有意な相乗的關係、あるいは、拮抗的關係が認められた。しかし、相乗効果のメカニズム、あるいは、胎児造血臓器・組織に対する影響から判断して、それらの共同効果は、相加的關係からのずれであると考えられた。したがって、放射線とMitomycin-Cの共同効果の型は、相加的であると判断した。これは、3-3に示す線量-効果関係の形に基づく共同効果の型の判定結果と一致している。

Table.4-1 Combined effects of radiation and Mitomycin-C on frequency of erythrocytes with MN. in fetal peripheral blood *1

Absorbed dose of fetus(Gy)	Dose of Mitomycin-C (mg/kg)	Observed frequency of erythrocytes with MN. by experiment (%) *2	Evaluated frequency of erythrocytes with MN. by Additive Model(%) *2	ω value *3
1	1	2.98	2.26	1.32
	2	4.61**	2.82	1.63**
	4	6.04	6.47	0.93
1.9	1	4.99	4.63	1.08
	2	5.87	5.18	1.13
	4	6.85**	8.74	0.78**
3.8	1	6.95	6.95	1.00
	2	7.52	7.49	1.00
	4	—	—	—

** Significant difference from $\omega = 1.0$ ($p < 0.05$)

*1 Fetus were irradiated at one hour after Mitomycin-C administration on day 15 of gestation and frequencies were observed at 24 hours after irradiation.

*2 These frequencies were subtracted spontaneous incidence($P_0 = 0.0029$), i.e. net frequencies.

*3 ω value were estimated as follows:

$$\omega = (P_{r+c} - P_0) / ((P_r - P_0) + (P_c - P_0) - (P_r - P_0)(P_c - P_0)/(1 - P_0))$$

P_{r+c} : induction rate of erythrocytes with MN. by combined treatment of radiation and Mitomycin-C

P_r : induction rate of erythrocytes with MN. by radiation

P_c : induction rate of erythrocytes with MN. by Mitomycin-C

P_0 : spontaneous incidence of erythrocytes with MN.

4-3 放射線と放射線以外の有害要因による共同効果研究への応用について

4-3-1 放射線と放射線以外の有害要因による共同効果研究の重要性

環境中には多くの有害要因が存在し、放射線はその中の1つに過ぎず、複数の要因が人体への影響に関係しあっている。したがって、放射線に対するリスクを評価する場合に、放射線とそれらの有害要因との共同効果の型およびその程度を明かとするのが重要となる。

たとえば、放射線による肺がんの発生率が喫煙によって相乗的に増加することが知られており[45]、放射線防護の観点からもヒトの疫学調査および動物実験による放射線と放射線以外の有害要因との共同効果の解明に大きな関心が寄せられている[2,6]。

また、日常生活環境に広く存在するカフェインは、菌類を用いた実験によって変異原性が古くから知られており[46]、マウス *in vivo* 実験ではLD₅₀レベルの投与量でわずかに小核およびSCEを形成する程度であるが[47]、マウス胎児器官形成期に放射線と同時にカフェインを投与すると、放射線を単独で使用した場合と比べて胎児奇形の発生率が相乗的に増加することが明かにされている[41, 42]。in vitro 系の実験でもX線とカフェインの併用によるPLDの相乗的な増加[48]、およびマウス胎芽細胞中の小核形成に関する相乗的作用[35]として観察されている。

現在の放射線防護体系は、放射線が単独に作用した場合のリスクに基づいて構築されているため、このように放射線以外の有害要因と放射線とが相乗的に作用していることになれば放射線防護の観点から重要な問題である。

前述のように、胎児の放射線感受性は成体より高く、また、胎児の放射線防護に対する社会的関心も高い。このため胎児影響に対する放射線と放射線以外の有害要因との共同効果に関してもさらに実験的に明かにしていく必要がある。

現在のところ、in vitro 系の実験では、放射線とニトロソ化合物[23, 49, 50]、フェノール[34]、ウレタン、アクチノマイシンD、鉛、カドミウム等多くの物質について研究が行われている。しかし、in vivo しかも胎児に対する放射線と放射線以外の有害要因との共同効果に関する研究は、X線と高周波による胎児の発育遅

延、X線とウレタンによる発がん、およびγ線とカフェインによる胎児奇形に関する研究があるのみで情報は限られている[2]。したがって、今後、他の多くの有害要因について放射線との共同効果について研究を進めていく必要がある。

4-3-2 胎児影響に関する定量的な影響指標としての条件

放射線と放射線以外の有害要因との共同効果に関する定量的な検討を行うためには、着目する影響指標が放射線等による影響を量的に正確に反映することが必要である。現在、生物学的線量評価指標として事故被ばく、あるいは長期間に及ぶ職業被ばくなどによる影響評価に広く用いられているヒト末梢血液中のリンパ球中の染色体異常は下記の優れた特徴を有している[51]。

- ①要因に対する特異性があること
- ②要因に対する感度が高いこと（放射線に対しては約0.1 Gy以上で有意な出現率を観察できる[36]）
- ③要因に対する線量-効果関係が得られていること
- ④要因に対する曝露がない場合の発生率（自然発生率）が小さいこと（2動原体染色体および環状染色体の自然発生率は0.02% [36]）
- ⑤評価すべき期間中、その影響が保存されていること

しかし、ヒト末梢血液中のリンパ球中の染色体異常は、検査に熟練を要し、培養・観察にある程度の時間を要する。このため、要因に対する感度および線量-効果関係により優れ、しかも、検査が迅速かつ容易な新たな検査手法が求められていた[29]。これに対して、本実験で着目したマウス胎児末梢血液中の小核赤血球出現率は、第3章に示したように放射線およびMitomycin-Cに対して下記の特徴を持つことが明かとなった。

- ①放射線およびMitomycin-Cによって末梢血液中の小核赤血球出現率が特異的に増加する。
- ②放射線は0.5 Gy、Mitomycin-Cは1 mg/kg以上で末梢血液中に有意な小核赤血球出現率が観察される。
- ③線量-効果関係は、放射線について2次項が負の直線-2次曲線、Mitomycin-Cについて2次項が正の直線-2次曲線が得られ、それぞれ回帰誤差も小さ

い。

④胎齢15-17日の胎児末梢血液中の小核赤血球自然発生率は約0.3%である。

⑤放射線およびMitomycin-Cによる処置を行ってから最大値を示すまでの時間はほぼ一定である。また、処置後、48時間を経過しても有意な小核赤血球出現率が観察される。

⑥検査手法は迅速、かつ特に熟練を要しない。

⑦胎児間および母獣間の個体差は大きくない。

以上の特徴は、ヒトリンパ球中の染色体異常が生物学的線量評価指標として有する特徴にほぼ匹敵するものであるとともに、検査手法の簡便性の点ではより優れたものであると考えられる。

本実験では、有害要因として放射線以外にはMitomycin-Cを用いたが、他にもmethyl methanesulphonate[23]、cyclophosphamide、procarbazine、trenimon[40]、dimethylnitrosamine [52]等、多くの有害要因についてマウス等を用いたin vivo実験によって投与量-効果関係が確認されており、これらに対しても今後、母体から胎児への移行や胎児体内での代謝等を含めた個体差等に関する特徴を実験的に確認した上で、定量的な影響指標としてこの胎児末梢血液中の小核赤血球出現率を利用することが可能であると考ええる。

4-3-3 放射線と放射線以外の有害要因による共同効果研究への応用

本研究においては、マウス胎児末梢血液中の小核赤血球出現率に着目して放射線およびMitomycin-Cによる共同効果について実験を行った。この結果、3-3および4-2に示すように共同効果係数 ω による定量的な評価によって、共同効果の型が相加的であること、および、本研究手法を用いることによって1群4匹、全体で16群程度の程度の母獣を用いた実験により、 $\omega < 2$ 程度の弱い相乗的作用も検出できることが明かとなった。この理由の1つは、上述のように胎児末梢血液中の小核赤血球出現率が生物学的線量評価指標としての特性を備えており、精度のよい定量的な実験データを提供できることによると考えられる。

放射線防護上、特に問題となる発がんおよび遺伝的影響の原因は、現在まだ完

全に解明されていないが、DNAの損傷もその原因の一つであると言われている。本研究において着目した胎児末梢血液中の小核赤血球は、DNA損傷を起源とする影響を反映するものである[11-13]。したがって、発がんおよび遺伝的影響の原因の一部に関連した定量的な影響指標となることが期待できる。しかも、本研究で採用した実験手法は、胎児in vivoの影響を観察するものであり、母獣による有害要因の吸収、胎盤通過、および胎児体内での代謝を総合的に反映するものである[19,40]。

環境中には、多くの変異原性物質が存在し、その全てについて多数の動物と多くの時間、労力を必要とする発がん、遺伝実験等を行うことは困難である。これに対して、胎児末梢血液中の小核赤血球出現率に着目した本実験手法はin vivo実験でありながら、簡便かつ精度の良い実験結果を提供できる。したがって、本実験手法を用いて、環境中の多くの有害要因の中から放射線との相乗効果等、放射線防護上特に問題となる作用を示す有害要因を予めスクリーニングすることにより、多数の実験動物と多大な時間と労力を要する従来手法のin vivo発がん、遺伝実験をより効率的に行うことが可能となると考える。

第5章 結語

放射線およびMitomycin-Cをそれぞれ単独で用いた場合のマウス胎児末梢血液中の
小核赤血球出現率に対する影響に関して、以下の特徴が明らかとなった。

1) 放射線による胎児末梢血液中の小核赤血球出現率への影響

- ①照射後の経時変化：ピークは照射24-32時間後に出現
- ②線量-効果関係：2次項が負の直線-2次曲線（0-3.8 Gy）
1.9 Gy以上で飽和傾向
- ③線量率効果：0.02-1.9 Gy/分の範囲では認められない
- ④反復照射：末梢血液中の小核赤血球出現率の加算性が認められる
- ⑤個体差：胎児間および母獣間ともに有意な個体差はない

2) Mitomycin-Cによる胎児末梢血液中の小核赤血球出現率への影響

- ①照射後の経時変化：最大値は照射25-48時間に出現
- ②投与量-効果関係：2次項が正の直線-2次曲線（0-4 mg/kg）
2 mg/kg以上で急激に増加
- ③個体差：放射線と比べて大きな個体差が認められる

胎児吸収線量0-3.8 Gy、Mitomycin-C投与量0-4 mg/kgの組み合わせを用
いて放射線とMitomycin-Cの共同効果に関する実験を行った結果、以下のことが明
かとなった。

- ①共同効果係数： $0.78 \leq \omega \leq 1.63$
- ②処置手順：共同効果への影響はない
- ③共同効果の型：相加的

環境中にはDNA損傷および染色体異常の原因となる多くの有害要因が存在し、
発がんおよび遺伝影響に関する放射線との共同効果が問題となる。しかし、全て
の有害要因について放射線との共同効果をin vivo発がん実験および遺伝実験によ
って解明していくことは不可能であり、放射線防護上問題となる有害要因を予め
スクリーニングしておくことが重要である。

マウス胎児末梢血液中の小核赤血球出現率は、放射線およびMitomycin-Cをそれ
ぞれ単独で用いた実験によって、線量-効果関係等に優れた特性を有することが
明かであり、実験手法が簡便である。さらに、小核赤血球はマウス胎児造血臓器

結語

・組織中の赤芽球およびその前駆細胞に生じたDNA損傷を起源とする染色体異常によって形成されることが知られている。したがって、本実験で採用した胎児末梢血液中の小核赤血球出現率を相乗効果等、放射線防護上特に問題となる共同効果を判定する影響指標として用いることにより、環境中の多くの有害要因の中からDNA損傷あるいは染色体異常を1つの原因として発生するがんおよび遺伝的影響に関してさらに詳細なin vivo 発がん、遺伝実験を行う必要のある有害要因を予めスクリーニングすることが可能となると考える。

今後、実際にMitomycin-C以外のいくつかの有害要因と放射線との共同効果をマウス胎児末梢血液中の小核赤血球出現率を用いて定量的に明かとし、放射線防護上、着目すべき有害要因を選択して行く予定である。

謝 辞

本研究のテーマを与えて頂き、さらに研究に当たってのご指導を頂きました放射線健康管理学教室の吉澤康雄名誉教授、草間朋子助教授に感謝します。

また、実験に際しいろいろとご指導、援助を頂いた甲斐倫明助手、杉浦紳之君、江口星雄技官（原子力総合研究センタ）に感謝します。

〔引用文献〕

- 1 ICRP Publication 45; Quantitative bases for developing a unified index of harm, Annals of the ICRP, 15, 41-45(1985)
- 2 United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, 1986 Report to the General Assembly, Genetic and somatic effects of ionizing radiation, 315-319, United Nation, New York(1986)
- 3 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection, ICRP Publication 6, 33, Pergamon Press, London(1962)
- 4 ICRP Publication 49; Developmental effects of irradiation on the brain of the embryo & fetus, Annals of the ICRP, 16, 14-28, (1986)
- 5 NCRP Report No.91; Recommendations on limits for exposure to ionizing radiation, National Council on Radiation Protection and Measurements, 29-31, U.S.A.(1987)
- 6 Upton A.C. et al; Radiation carcinogenesis, 437-449, Elsevier Sci. Publ. Inc., New York(1986)
- 7 松岡 理他訳; Principles of animal extrapolation - 動物種差と外挿 -, 350-352, ソフトサイエンス社(1984)
- 8 Heddle J.A.; A rapid in vivo test for chromosomal damage, Mutat. Res. 18, 187-190(1973)
- 9 Schmid W.; The micronucleus test, Mutat. Res. 31, 9-15(1975)
- 10 Jensen M.K. and Huttel M.S.; Assessment of the effect of azathioprine on human bone marrow cells in vivo, combining chromosome studies and the micronucleus test, Dan. Med. Bull. 23, 152-154(1976)
- 11 Heddle J.A. and Carrano A.V.; The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by γ -irradiation: Evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments, Mutat. Res. 44, 63-69 (1977)
- 12 Trzos R.J., Petzold G.L., Brunden M.N. and Swenberg J.A.; The evaluation of sixteen carcinogens in the rat using the micronucleus

- test, *Mutat. Res.* 58, 79-86(1978)
- 13 Prosser J.S.; Micronuclei, *NRPB Radiological Protection Bulletin*, 96, 23-25(1988)
 - 14 Rugh R.; The mouse. Its reproduction and development, 45-46, Burgess Publishing Company, U.S.A.(1968)
 - 15 Green E.L.; Biology of the laboratory mouse, 195-196, McGrawHill Book Company, New York(1966)
 - 16 ICRU Report 16; Linear energy transfer, International Commission on Radiation Units and Measurements, 27-28, U.S.A.(1970)
 - 17 Baker C.E.Jr. et al; Physicians' Desk Reference(48th Ed.), 776-777, Medical Economics Company, New Jersey(1988)
 - 18 熊谷 洋監修; 臨床薬理学体系、第11巻B:抗腫瘍薬、107-119、中山書店(1973)
 - 19 Cole R.J. and Taylor N.A.; Transplacental effects of chemical mutagens detected by the micronucleus test, *Nature*, 277, 317-318(1979)
 - 20 Almassy Z., Krepinsky A.B., Bianco A. and Koteles G.J.; The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection A review, *Int. J. Radiat. Appl. Instrum[A]*, 38, 241-249(1987)
 - 21 Goodman L.S. and Gilman A.; Pharmacological basis of therapeutics (7th Ed.), 1288-1289, McMillan Company(1985)
 - 22 Chaubey R.C., George K.P. and Sundaram K.; X-ray-induced micronuclei in the bone-marrow erythrocytes of mice, *Int. J. Radiat. Biol.* 33 507-510(1978)
 - 23 Jenssen D. and Ramel C.; Factors affecting the induction of micronuclei at low doses of X-rays, MMS and dimethylnitrosamine in mouse erythroblasts, *Mutat. Res.* 58, 51-65(1978)
 - 24 Salamone M., Heddle J., Stuart E. and Katz M.; Towards improved micronucleus test - Studies on 3 model agents mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene, *Mutat. Res.* 74, 347-356(1980)
 - 25 Ledebur M.V. and Schmid W.; The micronucleus test. Methodological

- aspects, *Mutat. Res.* 19, 109-117(1973)
- 26 Huber R., Streng S. and Bauchinger M.; The suitability of the human lymphocyte micronucleus assay system for biological dosimetry, *Mutat. Res.* 111, 185-193(1983)
- 27 Eisert W.G. et al.; *Biological Dosimetry*, 15, Springer Verlag, Berlin(1984)
- 28 Pincu M., Bass D. and Norman A.; An improved micronucleus assay in lymphocytes, *Mutat. Res.* 139, 61-65(1984)
- 29 Hall S.C. and Wells J.; Micronuclei in human lymphocytes as a biological dosimeter: preliminary data following beta irradiation in vitro, *J. Radiol. Prot.* 8, 97-102(1988)
- 30 Kormos C. and Koteles G.J.; Micronuclei in X-irradiated human lymphocytes, *Mutat. Res.* 199, 31-35(1988)
- 31 Bettega D., Bombana N., Pelucchi T., Poli A. Tallone L.A. and Fuhrman C.A.M.; Multinucleate cells and micronucleus formation in cultured human cells exposed to 12 MeV protons and gamma-rays, *Int. J. Radiat. Biol.* 37, 1-9(1980)
- 32 Krepsinsky A.B. and Heddle J.A.; Micronuclei as a rapid and inexpensive measure of radiation-induced chromosomal aberrations. In Ishihara T. et al.; *Radiation-induced chromosome damage in man*, 93, Alan R. Liss Inc., New York(1983)
- 33 Midander J. and Revesz L.; The frequency of micronuclei as a measure of cell survival in irradiated cell populations, *Int. J. Radiat. Biol.* 38, 237-242(1980)
- 34 Muller W.U., Streffer C. and Zamboglou N.; Effects of a combined treatment with X-Rays and phenols on preimplantation mouse embryos in vitro, *Radiat. Environ. Biophys.* 19, 247-258(1981)
- 35 Muller W.U., Streffer C. and Wurm R.; Supraadditive formation of micronuclei in preimplantation mouse embryos in vitro after combined treatment with X-rays and caffeine, *Teratogenesis Carcinogen. and*

- Mutagen. 5, 123-131(1985)
- 36 牧野佐二郎編; 放射線・化学物質と染色体異常、27-250、医学書院(1982)
 - 37 Adler I.D; Comparative cytogenetic study after treatment of mouse spermatogonia with mitomycin-C, Mutat. Res. 23, 369-379(1974)
 - 38 Adler I.D; Aberration induction by mitomycin-C in early primary spermatocytes of mouse, Mutat. Res. 35, 247-256(1976)
 - 39 Manyak A. and Schleiermacher E.; Action of mitomycin-C on mouse spermatogonia, Mutat. Res. 19, 99-108(1973)
 - 40 King M.-T. and Wild D.; Transplacental mutagenesis: The micronucleus test on fetal mouse blood, Hum. Genet. 51, 183-194(1979)
 - 41 Kusama T. and Yoshizawa Y.;The synergistic effects of Radiation and caffeine on embryonic development in mice, J. Radiat. Res. 25, 225-233(1984)
 - 42 Kusama T., Sugiura N., Kai M. and Yoshizawa Y.;Combined effects of radiation and caffeine on embryonic development in Mice,Radiat. Res. 117, 273-281(1989)
 - 43 Kai M., Kusama T. and Yoshizawa Y.; The statistical analysis of combined effects of two agents on embryonic development in mice, (To be published)
 - 44 岡本和人; 核および非核エネルギーの環境への影響評価—データに基づく各種エネルギーの相対比較—、156-161、日本原子力情報センター(1981)
 - 45 Hammond E.C, Selikoff I.J and Seidman M.; Asbestos exposure and cigarette smoking and death rates, Ann. N.Y. Acad. Sci. 330, 473-490 (1979)
 - 46 Fries N. and Kihlman B.; Fungal mutations obtained with methyl xanthines, Nature 162, 573-574(1948)
 - 47 Aeschbacher H.U., Meier H. and Jaccaud E.; The effect of caffeine in the in vivo SCE and micronucleus mutagenicity tests, Mutat. Res.174, 53-58(1986)
 - 48 Sasaki H. and Nishimoto T.; X-ray-related potentially lethal damage

引用文献

- expressed by chromosome condensation and the influence of caffeine, Radiat. Res. 120, 77-82(1989)
- 49 Muller W.U., Streffer C. and Fischer C.; Combined treatment of pre-implantation mouse embryos in vitro with sodium nitrite and X-rays, Radiat. Environ. Biophys. 20, 187-194(1982)
- 50 Peraino C. Grdina D.J. and Carnes B.C.; Synergistic induction of altered hepatocyte foci by combined gamma radiation and diethyl-nitrosamine administered to neonatal rats, Carcinogenesis, 7, 445-448(1986)
- 51 石原隆昭; 放射線の影響評価と染色体異常、保健物理、13、171-182(1978)
- 52 Bauknecht Th., Vogel W., Bayer U. and Wild D.; Comparative in vivo mutagenicity testing by SCE and micronucleus induction in mouse bone marrow, Hum. Genet., 35, 299-307(1977)

