



Title	in vivoマウス体細胞突然変異検出法に関する基礎的研究
Author(s)	中島, 裕夫
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/1118">https://hdl.handle.net/11094/1118</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	中島 裕夫
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 7647 号
学位授与の日付	昭和62年3月26日
学位授与の要件	医学研究科生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	<u>in vivo</u> マウス体細胞突然変異検出法に関する基礎的研究
論文審査委員	(主査) 教授 坂本 幸哉 (副査) 教授 小塙 隆弘 教授 野村 大成

### 論文内容の要旨

#### 〔目的〕

人類は、絶えず放射線や、化学物質など環境有害因子にさらされている。これら外来因子による遺伝的影響は、毛色変異を指標にした特定座位法等により数百万匹のマウスを用いて調べられてきた。しかし微量の放射線や化学変異原の遺伝子影響を検出するには、その数十倍のマウスを必要とし、全盛期のアメリカに於ても不可能だった。そこで、生殖細胞でなく、毛色劣性遺伝子をヘテロに持った胎児に放射線を作用させることにより、in vivoでのマウス体細胞突然変異の検出が可能かどうか Russellにより約30年前に予備実験が行われた。

本研究では、Russellの原法に改良を加えたPT-HTF法を用い、in vivoの体細胞突然変異の検出が可能な胎児期の決定、および胎児発生時期による突然変異感受性の差の有無について基礎実験を行い、生殖細胞突然変異との比較および、体細胞突然変異の癌研究への応用性について検討を行った。

#### 〔方法〕

大阪大学医学部無菌動物実験室で系統維持を行っている毛色変異系マウスPT及びHTを用いた。PT雌とHT雄を交配し、受精後、8.5, 10.5, 12.5または、14.5日目に、X線(110R)急照射あるいは、ウレタン(1.0mg/8体重)皮下注射を行った。F<sub>1</sub>胎児は、7つの毛色劣性遺伝子座b(brown茶色)、p(pink-eyed dilutionうす茶色)、c<sup>ch</sup>(chinchillaチンチラ色)、d(dilute灰色)、pa(pallidあかるい茶色)、ln(leadene鉛色)、pe(pearl黒真珠色)で野生型遺伝子とヘテロになっている。F<sub>1</sub>マウスを生後6週令に調べた。上記毛色遺伝子座の野生型遺伝子に変異が起こると、その変異細胞由来の部分だけが、黒色の毛皮の中に茶～灰色のスポットとなって検出された。変異遺伝子座は、変異部位の毛を抜去し顯

微鏡下で色素顆粒の色、形、分布を観察することにより同定した。また、マウス胎児細胞の突然変異感受性を正確に知るために、変異スポット中の変異毛の数と全体の毛の数との比率を求ることにより、生存標的細胞数を推定した。

#### [成績]

##### 1) X線、およびウレタン誘発体細胞突然変異の検出

毛色変異スポットは、X線照射および、ウレタン注射により明確に観察された。マウスあたりのスポットの出現頻度は、8.5, 10.5, 12.5日目X線(110R)照射により、それぞれ12/141(0.085), 26/218(0.119), 39/140(0.279), ウレタン(1.0mg/g)注射により11/53(0.208), 24/148(0.162), 36/138(0.261)であり、Russellの報告(10.5日目胎児のみが検出可能)に反し発生時期が進むにつれ、より高頻度に観察された。特に、胎生12.5日目に処理した場合、生殖細胞での特定座位法の2,000分の1のマウス数で突然変異が検出できることがわかった。14.5日目X線照射により誘発された変異スポットの頻度は、5/20(0.250)であった。対照群は22/750(0.029)である。

##### 2) 胎児発生時期と突然変異感受性

X線により誘発された毛色変異スポットの大きさは、発生時期が進むにつれて小さくなり、14.5日目照射では肉眼による検出はかなり困難であった。

8.5, 10.5, 12.5日目胎児での標的細胞数はそれぞれ404, 530, 2,375個と推定され、発生が進むにつれ増加していた。これをもとに、1R, 1遺伝子座あたりの突然変異率を求めるとき、8.5日目の胎児で $1.6 \times 10^{-7}$ , 10.5日目の胎児で $1.9 \times 10^{-7}$ , 12.5日目の胎児で $1.2 \times 10^{-7}$ と、1R, 1遺伝子座あたりの突然変異率は、ほぼ同じであり、突然変異感受性には処理した発生時期による差はなかった。12.5日目処理により極めて高率に突然変異が検出されたのは、単純に、標的細胞数の増加によるものであった。なお、ウレタンにおいても同様の結果を得た。

#### [総括]

1. P T - H T F<sub>1</sub>法を用い、X線、およびウレタンを8.5, 10.5, 12.5日目マウス胎児に作用させることにより、高頻度に体細胞突然変異が検出された。しかも、Russellの報告に反し12.5日目処理により極めて高率に突然変異が検出され、生殖細胞での特定座位法の2,000分の1のマウス数で充分であった。
2. 1R, 1遺伝子座あたりの突然変異は、処理した発生時期に関係なく一定の値( $1.2 \sim 1.9 \times 10^{-7}$ )を示した。この値は、精原細胞での突然変異率( $2.3 \sim 10^{-7}$ )とよく一致しており、in vivoマウス体細胞突然変異検出法は、微量変異原の遺伝子影響研究の有力な武器であることがわかった。
3. マウス胎生12.5日目は、発癌高感受性期であり、がん化と体細胞突然変異のかかわり合いの研究に重要な実験手技を与えるものと思われる。

#### 論文の審査結果の要旨

本論文は、数少ない個体レベルでの遺伝的影響検出法のひとつとして、in vivoマウス体細胞突然変異

検出法 (P T - H T F<sub>1</sub>法) について, X線及びウレタンを用いて基礎的実験を行っている。本論文より, in vivo 体細胞突然変異の検出可能な胎児期が決定され, 胎生12.5日目処理により生殖細胞法の2,000分の1のマウス数で突然変異を検出できることが示された。しかも 1 R, 1 遺伝子座あたりの突然変異は, 精原細胞のそれと一致していた。その結果, 生殖細胞法では事実上不可能であった微量変異原の遺伝的影響を調べる有力な方法であることを明らかにした本論文は, 環境有害因子に絶えずさらされている人類へのリスクを推定する上で, 極めて重要な知見を含んでおり, 医学博士論文にふさわしいものである。