

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	https://hdl.handle.net/11094/1118
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

in vivo マウス体細胞突然変異検出法に関する基礎的研究
Basic Studies for Detecting *in vivo* Somatic Mutation in Mice大阪大学医学部癌研究施設腫瘍生化学
Dept. of Biochem., Inst. for Cancer Res., Osaka Univ. Med. School中島裕夫
Hiroo Nakajima

(昭和62年1月29日受付)

Basic studies were carried out for somatic mutations in mice by treating F₁ embryos heterozygous at 7 recessive coat color genes from PT and HT cross.

Numbers of mutant spots per mouse induced by X rays or urethane increased when embryos were treated at later stages from day 8.5 to 12.5, that is, with the increase of numbers of target cells (melanoblasts). Numbers of mice used to detect one mutant were 1/2000 of those for spermatogonial mutation.

There was no difference in the mutation rate/R/locus among different treated stages, and the value was similar to that for spermatogonial mutations, which indicates that the method is very useful to detect genetic hazards.

Key words : *in vivo* somatic mutation, PT-HTF₁ method, Mouse, X rays, Urethane

緒言

人類は、絶えず放射線や、化学物質などの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¹⁻⁹⁾。しかし、微量の放射線や化学変異原の遺伝的影響を検出するには、その数十倍のマウスを必要とし、経済的あるいは、規模的にアメリカに於ても不可能であった。そこで生殖細胞ではなく、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L.B. RussellとM.H. Major¹⁰⁾により約30年前に予備実験が行われた。この方法では、胎生期にすでに数百～数千個存在する色素芽細胞に変異原を作用させることにより、変異をおこした色素芽細胞由来の毛の部分だけが茶～灰白色の小さなスポットとして検出される仕組みになっている。従って生殖細胞法にくらべ標的細胞が多い分だけ、より効果的に突然変異を検出できることが期待された。事

実、野村により¹¹⁾¹²⁾この方法が極めて高感度な検出法であることが報告されており、また、化学変異原にも応用されはじめている¹³⁾¹⁴⁾。しかしながら*in vivo*体細胞突然変異に関する基礎的研究は、殆んどなされていない。変異原を作用させる胎児期すら決定されていないのが現状である¹⁰⁻¹⁴⁾。

本研究では、Russellらの原法¹⁰⁾に改良を加えたPT-HTF₁法¹¹⁾¹²⁾を用いて、*in vivo*体細胞突然変異の検出が可能胎児期の決定、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った。さらに生殖細胞突然変異と比較することにより、環境有害物質のヒトへの遺伝的影響を推定する数少ない個体レベルの検出法の1つとして、使用可能かどうか検討した。

材料および方法

1. 動物

PTおよびHTの2系統のマウスを使用した。これらのマウス系統は、大阪大学医学部無菌動物実験室において野

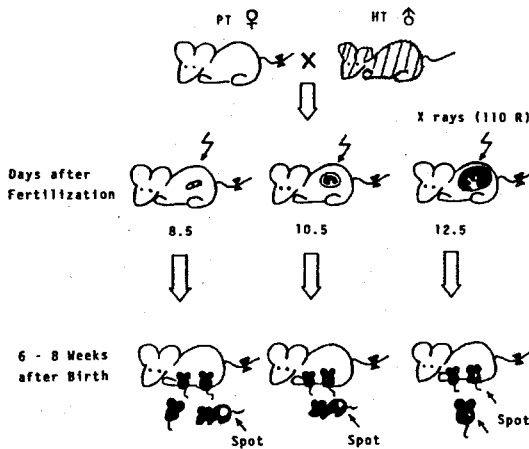


Figure 1. Experimental Procedure.

村により継代維持されてきたものである。PTは、a (non-agouti 毛色を均一化させる), b (brown 茶色), p (pink-eyed dilution うす茶色), c^{ch} (chinchilla チンチラ色), d (dilute 灰色), se (short-ear 小さな耳になる), s (piebald 白斑), HTは、ln (leaden 鉛色), pa (pald あかるい茶色), pe (pearl 黒真珠色), fz (fuzzy ちぢれ毛), bp (brachypodism)の毛色および他の劣性遺伝子をそれぞれホモに持っている¹⁰⁾¹¹⁾¹⁴⁾。

マウスは、完全なバリエーションシステムの中で恒温(22~24°C)、滅菌飼料(CRF-1, 日本チャールズリバー, 神奈川)、および滅菌水にて飼育した。

2. 化学変異原投与とX線照射

a. ウレタン投与

ウレタン(ethyl carbamate 和光純薬・大阪)を使用直前に10%水溶液として調整し1.0mg/g 体重量をマウスの皮下に注射した。

b. X線照射

X線発生装置として、SHT-250M-3(島津製作所, 京都)を用いた。20mA, 180kvp, 距離53cmで0.5mm Cu 1.0mm Alのフィルターを用いて、マウスに全身照射した。照射線量は、110Rであり、本照射条件での線量率は、50~53R/minである。

3. *in vivo* マウス体細胞突然変異検出法

a. マウスの交配

発情期にあるPT雌を膣の外観より識別し¹⁵⁾、午後2時以降に2~3匹のHT雄のケージに入れた。翌朝膣腔の確認を以て妊娠0日目とした。マウス飼育室は、午前4時から午後6時まで点灯しているために、排卵は、交配した翌朝の午前2時に起り、受精も排卵と同時に成立する¹⁶⁾¹⁷⁾。

b. 投与および照射時期

膣腔確認後8日目, 10日目, 12日目および14日目の午後2時(受精後8.5日目, 10.5日目, 12.5日目, 14.5日目となる)に, X線110R 急照射, あるいは, ウレタン1.0mg/g 体重を皮下注射した(Figure 1)。

c. 変異スポットの検出

F₁マウスを生後6~8週齢に屠殺して毛皮を調べた。F₁マウスは、a座位以外は、7つの毛色劣性遺伝子座b, p, c^{ch} , d, pa, ln, peで野生型遺伝子とヘテロになっているため、均一な黒色の毛皮により被われている。

胎児期に上記毛色遺伝子座の野生型遺伝子に変異が起ると、その変異細胞由来の部分の毛だけが、生後黒色の毛皮の中に茶~灰白色のスポットとして検出される仕組みになっている¹⁰⁻¹⁴⁾(Figure 1)。

4. 変異遺伝子座の同定

変異部の毛を抜去し顕微鏡下で毛を観察し色素顆粒の色, 形, 分布より変異遺伝子座を同定した。また, 2週間後に, 毛を抜去した部位に同一の形質の毛が再生することより, 毛色変異は, 遺伝物質の変異に基づくものとされている¹²⁾。

5. 生存標的細胞数と突然変異率の推定

毛皮の永久標本を作り, まず毛色変異部の面積と毛皮全体の面積の比(A)を求めた。変異部では, 正常の毛(黒色)と変異毛とが混合しているのので, 顕微鏡下で変異毛と正常の毛との比率(B)を求めた。全体の毛の中での変異毛の比率は, AとBの積によって求められ, この比率ABの逆数をとって, 変異原処理後の生存標的細胞数を推定した。

さらに, マウス1匹あたりのスポット数を生存標的細胞数, 照射線量(R)および関連遺伝子座で割り, 1R, 1遺伝子座あたりの突然変異率を求めた¹²⁾。

結 果

1. X線およびウレタンの胎児期作用による出生率への影響

胎生8.5~12.5日は, 変異原を大量に作用させた時に, 胎児死亡や新生児死亡が高頻度にかかることが知られている。しかし本実験に使用した作用量(X線110R, ウレタン1.0mg/g 体重)では, X線, ウレタンともに作用時期による新生児の差は殆んど認められなかった(Table 1, 2)。

2. X線およびウレタンによる体細胞突然変異の誘発

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いずれの胎児期に作用させても有意に誘発された(Table 1, 2; $p < 0.001$)。X線照射によるマウスあたりの毛色変異スポットの出現頻度は, Figure 2に示す如く, 8.5日日照射, 10.5日日照射, 12.5日日照射と胎児発生の遅い時期に作用させると急激に増加している。同様の結果は, ウレタン(1.0mg/g 体重)注射によっても観察された(Figure 3)。

対照群では, マウス1匹あたりの変異スポット数は,

Table 1. *in vivo* somatic mutations in PT-HTF₁ mice induced by X rays (110R) given at various stages of gestation.

Treated days of gestation	No. of pregnant mice	Live-births	Colored spots	WMVS
		No. (Av.)	Incidence (%)	Incidence (%)
8.5	21 (20) ^a	147 (7.4) ^b	12/141 ^c (8.5)	1/141 ^c (0.7)
10.5	61 (38)	238 (6.3)	26/218 (11.9)	3/218 (1.4)
12.5	29 (21)	145 (6.9)	39/140 (27.9)	3/140 (2.1)
Control	155(124)	885 (7.1)	22/750 (2.9)	4/750 (0.5)

Incidences of somatic mutations and WMVS (white midventral spots) were given by the numbers of affected offspring per survivors. Statistical analysis was performed by χ^2 test against untreated controls. χ^2 test was applied with Yates' correction when expected value in a cell was less than 5.

a Numbers of pregnant mice which delivered live offspring. The remainder resulted in abortion or cannibalism.

b Average numbers of live-births per pregnant mouse which delivered live offspring.

c Numbers of offspring which survived more than 3 weeks.

Difference from live-births shows neonates which died a few days after birth.

Table 2. *in vivo* somatic mutation in PT-HTF₁ mice induced by urethane (1mg/g) given at various stages of gestation.

Treated days of gestation	No. of pregnant mice	Live-birth	Colored spot	WMVS
		No. (Av.)	Incidence (%)	Incidence (%)
10.5	46 (29)	200(6.9)	25/195(12.8)	12/195(6.2)
12.5	47 (21)	149(7.1)	33/138(23.9)	2/138 (1.4)
Control	155(124)	885(7.1)	22/750 (2.9)	4/750 (0.5)

a, b, c: details are given in the legends to Table 1.

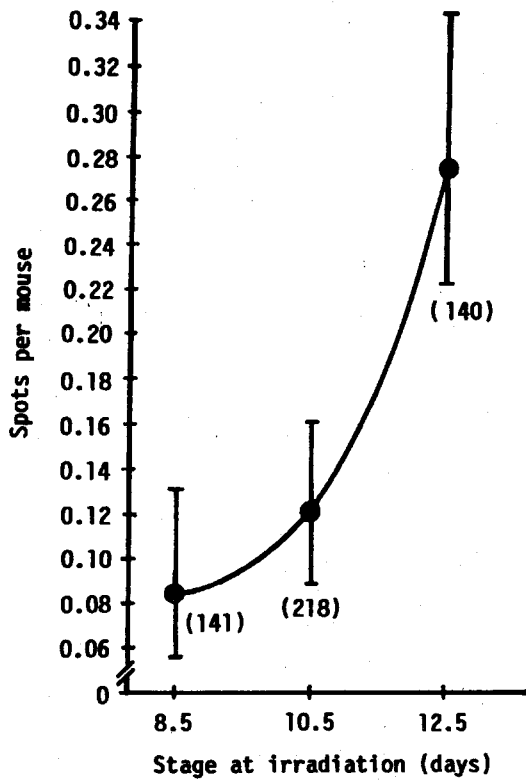


Figure 2. Somatic mutations in mice induced by X rays (110 R). Numbers of spots per mouse are given against treated stages of gestation. Vertical bars mean 95% confidence limit.

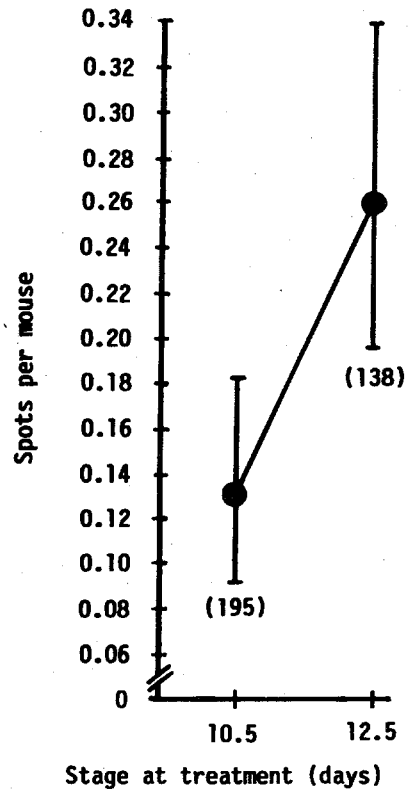


Figure 3. Somatic mutations in mice induced by urethane (1.0mg/g). Details are given in the legends to Figure 2.

0.029であった。

特に、X線を12.5日目胎児に照射した場合には、4匹に1個と極めて高頻度に変異スポットが誘発されている (Figure 2)。これは、1Rあたり、1つの突然変異を誘発するのに400匹のマウスで充分であることを示している。Russellらの行った生殖細胞での突然変異の場合、70万匹を必要としたのに対しに、本PT-HTF₁法が効率的に突然変異を検出しているか証明された (Table 3)。

また、細胞死によるとされる腹部正中白斑 (WMVS : white midvantral spot) は、ウレタン10.5日目投与群以外は、その増加は、わずかであった (Table 2)。

3. X線による変異遺伝子座

Table 4は、X線により突然変異を起した遺伝子座を示したものである。遺伝子座によって突然変異の起り易さに差が認められた。X線に関しては、W.L. Russellの行った生殖細胞での特定座位法¹⁸⁾と本体細胞突然変異検出法で共通の遺伝子座 b, c, d, p座で比較してみた。変異

Table 3. Numbers of mice used to detect one mutant by 1 R of X rays.

Method	No. of mice used for detecting one mutant per R
Germ-line (specific locus)	7×10^5
Somatic (PT-HTF ₁ , day 12)	4×10^2

は、b, d, p座で高く、c座では低く、両法による結果には、全く差はなかった。しかし特定座位法に用いられなかったln, pa, pe座では、低い値を示している。

Table 4. Gene loci mutated by X rays

Method	Affected loci								
	A	a	b	c	d	p	ln	pa	pe
Spermatogonia	5	-	45	27	42	38	-	-	-
Somatic cell	-	11	15	6	15	11	5	8	3

Table 5. Sensitivity of fetal pigment cells to X-ray induced somatic mutation in mice.

Treated day	Estimated No. of target cells	Mutation rate per locus per R
8.5	4.0×10^2	1.6×10^{-7}
10.5	5.3×10^2	1.9×10^{-7}
12.5	2.4×10^3	1.2×10^{-7}

4. 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日日照射では、肉眼による検出は、かなり困難であった。事実20匹中3個の小さな変異スポットしか検出できなかった。しかも変異毛は、わずか、数本であった。

変異毛と正常毛の比率より求めた、X線照射後の生存標的細胞数を Table 5 に示した。発生が進むにつれて急激に増加していた。即ち、X線による毛色変異スポットの頻度と標的細胞数の間に平行関係が存在することがわかった。

この値をもとに、1R、1遺伝子座あたりの突然変異率を求めると、8.5日目の胎児で 1.6×10^{-7} 、10.5日目の胎児で 1.9×10^{-7} 、12.5日目の胎児で 1.2×10^{-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 (Table 5)。

考 察

マウス体細胞突然変異検出法は、1957年に Russell と Major により数十匹のマウスを用いて予備実験がなされて以来、胎齢10.5日目以外の日に変異原を作用させても検出できないものと信じられてきた。しかし本実験において、X線はおろか、化学変異原、ウレタンをより早い、あるいは、遅い胎児期に作用させても高率に体細胞突然変異が検出されることがわかった (Table 1, 2, Figure 2, 3)。特に、12.5日目のX線照射では、極めて高く、4匹に1個の割合で変異スポットが検出された。したがって10.5

日目しか体細胞突然変異は検出されないという従来の報告¹⁰⁾¹¹⁾¹³⁾は、まちがいであることがわかった。

この方法がどのくらい効率よく突然変異を検出しているかは、Table 3に示した如く、生殖細胞での特定座位法の2000分の1のマウス数で充分であったので明らかである。しかし変異原処理時期をさらに遅らせた、14.5日目は、検出効率が更に上がることが期待されたが、X線により誘発された変異スポットは、非常に小さく、わずか数本の変異毛から成っており肉眼による検出は、かなり困難であり、変異スポットの頻度も、12.5日日照射の半分近くに低下していた。本法における肉眼的検出の限界と考えられる。

また、変異スポットは、正中線を越えることがなく、出現場所も変異原の作用時期がおそくなるにしたがって背側より腹側に多く誘発される傾向がある。これは、神経冠より由来する色素芽細胞の胎児発生に伴う腹側への移動によるものと思われる。

標的細胞である色素芽細胞は、胎齢10.5日目から12.5日目にかけて急激に増加しており、これに平行して、X線誘発変異スポットの頻度も増加していることがわかった (Figure 2)。従って、X線照射後の生存標的細胞数をもとにして求めた、1R、1遺伝子座あたりの突然変異率 (Table 5) は、処理した発生時期に関係なく一定の値を示しており、この値は、生殖細胞でも特に重要な精原細胞での特定座位法による1R、1遺伝子座あたりの突然変異率 2.3×10^{-7} とよく一致していた。

更に、特定座位法と本体細胞突然変異検出法で共通の遺伝子座 b, c, d, p 座で、突然変異の起りやすさを比較してみると、そのパターンには、全く差はなかった (Table 4)。以上の事実より、本 PT-HTF₁ 法による体細胞突然変異は、生殖細胞における突然変異と本質的に同一の現象を観察しているものと考えられる。本法の検出効率の高さを考え合わせると、環境変異原の遺伝的影響を *in vivo* で検出できる極めて有力な武器であると思われる。しかし遺伝子座によって突然変異を起しやすい座位と起しにくい座位があるということは、突然変異の機構の研究において興味あるところであるが、ヒトへのリスク推定に対する動物実験の限界を痛感している。

本研究において得られた *in vivo* マウス体細胞突然変異検出法(PT-HTF₁法)の最も検出効率の高いマウス胎生12.5日目は、野村¹⁵⁾¹⁶⁾がすでに報告している様に、発癌高感受性期でもある。このことは、今後の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。

総 括

1. PT-HTF₁法を用い、X線、及びウレタンを8.5、10.5、12.5日目マウス胎児に作用させることにより、体細胞突然変異を検出することができた。
2. マウス胎生10.5日目しか体細胞突然変異が誘発されないう従来からのL.B. Russellらの報告に反し、胎生12.5日目に処理することにより、極めて高率に体細胞突然変異が検出され、生殖細胞法の約2000分の1の数のマウスで充分であった。
3. 1R、1遺伝子座あたりの突然変異率は、処理した発生時期に関係なく一定値を示し、この値は、精原細胞での値と一致していた。更に変異遺伝子座も精原細胞のそれとよく一致しており、PT-HTF₁法は、微量変異原による遺伝的影響を調べるのに極めて有力な方法であることがわかった。また検出効率のよさは、胎児色素芽細胞の感受性のちがいによるものではなく、標的細胞数の増加によるものであることがわかった。
4. 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。

謝 辞

本論文の要旨は、第28回日本放射線影響学会¹⁹⁾と、第45回日本癌学会総会²⁰⁾に発表した。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました、大阪大学医学部癌研究施設腫瘍生化学教室 坂本幸哉教授、本研究の全般にわたり直接の御指導と御鞭撻を賜りました放射線基礎医学教室 野村大成教授に深く感謝致します。また御協力を戴きました、放射線基礎医学教室、腫瘍生化学教室の皆様にご心より感謝致します。

文 献

- 1) Russell WL, Russell LB, Kelly EM. : Radiation dose rate and mutation frequency. *Science*. 128 : 1546-1550, 1958.
- 2) Russell WL, Russell LB, Kelly EM. : Dependence of mutation rate on radiation intensity. *Int. J. Rad. Biol. (Suppl.)* : 311-320, 1960.
- 3) Russell WL. : The effect of radiation dose rate and fractionation on mutation in mice. Sobels FH, ed. ; *Repair from genetic radiation*. 205-217, Pergamon, Oxford, 1963.
- 4) Russell WL. : Mutation frequency in female mice and the estimation of genetic hazards of radiation in women. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 : 3523-3527, 1977.
- 5) Russell WL. : Dose response, repair and no-effect dose levels in mouse germ-cell mutagenesis. Tazima Y, Kondo S, Kuroda Y, ed. ; *Problems of threshold in chemical mutagenesis*, 153-160, *Env. Mutat. Soc. Jap.*, Mishima, 1984.
- 6) Ehling UH. : Dominant mutations affecting the skeleton in offspring of X-irradiated male mice. *Genetics*. 54 : 1381-1389, 1966.
- 7) Ehling UH, Favor Kratochilova J, Neuhauser-Klaus A. : Dominant cataract mutations and specific -locus mutations in mice induced by radiation or ethylnitrosourea. *Mutat. Res.* 92 : 181-192, 1982.
- 8) Ehling UH. : Methods to estimate the genetic risk. Obe G, ed. ; *Mutation in man*. 292-318, Springer-Verlag, Berlin, 1984.
- 9) Luning KG, Searle AG. : Estimate of the genetic risks from ionizing irradiation. *Mutat. Res.* 12 : 291-304, 1971.
- 10) Russell LB, Major MH. : Radiation-induced presumed somatic mutations in the house mouse. *Genetics*. 42-2 : 161-175, 1957.
- 11) 野村大成 : マウスにおける奇形と突然変異の高感度検出法。中馬一郎, 近藤宗平, 武部 啓, 編 ; *環境と人体II環境変異原*. 137-152, 東大出版, 東京, 1983.
- 12) Nomura T. : Quantitative studies on mutagenesis, teratogenesis and carcinogenesis in mice. Tazima Y, Kondo S, Kuroda Y, ed. ; *Problems of threshold in chemical mutagenesis*. 27-34, *Env. Mutat. Soc. Jap.*, Mishima, 1984.
- 13) Neuhauser-Klaus A. : An approach towards the standardization of the mammalian spot test. *Arch. Toxicol.* 48 : 229-243, 1981.
- 14) Nomura T. : Comparative inhibiting effects of methylxanthines on urethan-induced tumors, malformations, and presumed somatic mutations in mice. *Cancer Res.* 43 : 1342-1346, 1983.
- 15) Nomura T, Okamoto E. : Transplacental carcinogenesis by urethane in mice ; teratogenesis and carcinogenesis in relation to organogenesis. *Gann*. 63 : 713-742, 1972.
- 16) Nomura T. : An analysis of the changing urethan response of the developing mouse embryo in relation to mortality, malformation and neoplasm. *Cancer Res.* 34 : 2217-2231, 1974.
- 17) Hoppe PC. : Fertilizing ability of mouse sperm from

different epididymal regions and after washing and centrifugation. J. Exp. Zool. 192 : 291-222, 1975.

- 18) Searle AG. : Germ-cell sensitivity in the mouse : A comparison of radiation and chemical mutagens. Sugimura T, Kondo S, Takebe H. ; Enviromental mutagens and carcinogenes. 169-177, University of Tokyo Press, Tokyo, 1982.
- 19) 中島裕夫, 野村大成 : マウス体細胞突然変異よりみた胎児発生と放射線感受性の相関. 日本放射線影響学会第28回大会抄録168, 1985.
- 20) 中島裕夫, 後藤博子, 野村大成 : X線およびウレタン誘発マウス体細胞突然変異の発生時期感受性と癌研究への応用. 日本癌学会第45回総会記事38, 1986.