



Title	センチクバエ蛹の呼吸とDNA合成に対する放射線の影響
Author(s)	佐藤, 周子; 栗冠, 正利
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1967, 26(12), p. 1574-1578
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/16665
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

センチクバエ蛹の呼吸と DNA 合成に 対する放射線の影響

東北大学医学部放射線基礎医学教室

佐藤 周子 粟 冠 正 利

(昭和41年7月21日受付)

Radiation Effects on the Respiration and DNA Synthesis in the Pupa of
Sarcophaga peregrina

by

Chikako Sato and Masatoshi Sakka

Dept. Radiation Research, Tohoku Univ. School of Med. Sendai, Japan

The pupae of *Sarcophaga peregrina* received x-irradiation at the final stage of prepupa and their oxygen consumption was measured by Warburg manometers throughout the pupal stage. Irradiation resulted in the inhibition of adult formation as well as the inhibition of the increase of oxygen uptake at the late pupal stage. Three patterns of radiation effects were found according to doses. 1) With small dose (below 4.6 kR) on the first day of puparium formation, oxygen uptake at 8 days of age decreased linearly with increasing dose. Pupae failed to emerge, but morphologically reached certain stages of development which were different according to the dose. The survival time, however, was about 11 days, the same as that in non-irradiated and non-fed pupae. 2) With medium doses (6.9 to 55 kR), the amount of respiration was maintained at an extremely low level throughout the pupal stage, but survived far longer than the non-irradiated control pupae. 3) With large doses (above 69 kR), oxygen uptake was exponentially reduced with time after the irradiation, leading the organism to death in the early pupal stage.

DNA of the whole organism was extracted with hot 5% perchloric acid following Schneider's method 3 hours after the injection of ^3H -thymidine, and its radioactivity was measured by a liquid scintillation counter. Incorporation of label was reduced by irradiation. The response was different with dose as shown in Fig. 4.

Autoradiographs were made three hours after the injection of tritiated thymidine to know the radiation effects on DNA synthesis of various tissues. Synthesis of DNA in the cells of the central nervous system was most extensive at the puparium formation and decreased with age. Incorporation of label was also detected in the thoracic myoblasts, hypodermal histoblasts and leg myoblasts during 72 hours after the puparium formation. No trace of label were recognized in the muscle cells after the fusion of myoblasts.

The proportion of labeled cells was extensively reduced after the irradiation in brain cells, myoblasts and hypodermal histoblasts, but never in the cells of alimentary canal that have polytene chromosome. Therefore it was difficult to determine only the single target organ most responsible for radiation injury from these autoradiographic studies.

目的

成虫組織の形成に伴う蛹期後半の呼吸量上昇¹⁾~⁴⁾は放射線照射により抑えられる^{5)~7)}. この抑制は成虫組織形成抑制と平行していると思われるので個体発生に対する放射線の影響を酸素消費量測定によって定量化し, 又, 障害の原因となつている細胞をオートラジオグラフ法で検索することが本実験の目的である.

材料と方法

センチニクバエ幼虫が蛹殻形成により運動を停止した時を蛹の0時間令とし以後±1時間の正確さで令をわけた. この材料の性質については文献を参照されたい^{8)~11)}. 呼吸量測定は蛹1匹ずつを容器に入れてワールブルグ検圧計で25°Cで行った. 24~26時間令に照射し, その後24時間ごとに酸素消費量を測定してすべての個体の呼吸量がゼロになるまで追跡した.

DNA合成細胞の検索は, 蛹の腹部に³H-TdR 0.5 μ Ci/mm³を注射し3時間27°Cに放置したあとアルコールブアンで固定しパラフィン切片を作った. 脱パラフィン後スライドガラスごと5%過塩素酸に30分つけ, 2%過塩素酸を2回通してDNAにとりこまれていない³H-TdRを洗い流した. さくら液体乳剤NR-MIをデイツピングし, 14日間露光後現像, ヘマトキシリン-エオジン染色を行った. 核当りの銀粒子数が4個以上のものを取りこみ(+)とした. 全個体のDNA合成率は, 蛹1匹当り³H-TdR 0.5 μ Ci/mm³を腹部に注射し27°Cで3時間とりこませた後, 蛹10匹を1群として組織をポッター型ホモジナイザーで磨碎しSchn-eider法DNAで抽出して求めた. DNA抽出液1cm³にBrayのシンチレーションカクテル10cm³を加えて容器に入れ, ヌクレアシカゴ製液体シンチレーションカウンターで放射線を測定した.

照射は蛹を1層に並べ, 50kVp, 5mA (460R/min)のX線で行った. (ソフテックス社製) FSD=21cm.

成績

1. 呼吸に対する障害と線量

非照射蛹および25±1時間令に照射を受けた蛹

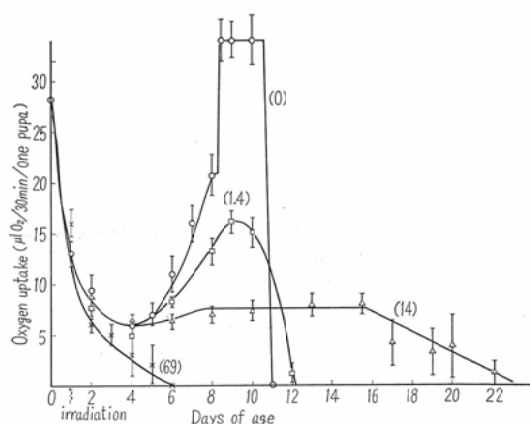


Fig. 1 Respiration curve following the irradiation. oxygen uptake was measured at 27°C. Cross bar represents one standard deviation. Seven to 28 pupae were used for each point. The increase of respiration at late pupal stage was inhibited by irradiation. The number in the parenthesis indicates the exposure (kR).

の呼吸量は, 日令と共に図1のように推移した. 非照射蛹の酸素消費量は蛹殻形成直後には蛹1コあたり28.3 μ lO₂/30minの高い値を示すが, のち減少して4日令には6.1 μ lO₂/30minと最も低く, 日令が進むにつれて再び上昇する. 8日令後半に羽化がおこるが, 羽化運動中および羽化直後の45分以内に酸素消費量は急上昇して46.3 μ lO₂/30minとなり生存中はその値がつづく. 12日令の死んだ個体の酸素消費量はゼロである. 照射に対する反応は複雑であるが, ここでは25±1時間令に

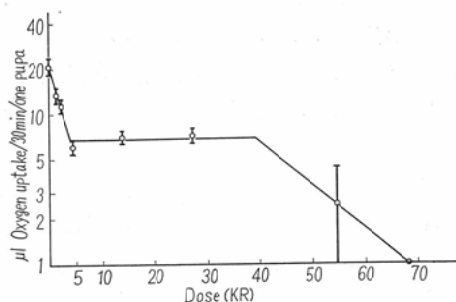


Fig. 2 The relationship between the amount of oxygen uptake (at 25°C) and exposure. Pupae were irradiated at one day of age and their oxygen uptake was measured at eight days of age. The dose-effect curve is composed of three portions.

照射をうけた蛹が 192 ± 1 時間令にいたった時の呼吸量を測定し、線量との関係を図2に示した。この時間は非照射蛹が羽化する約7時間前に相当する。線量—効果曲線が異なる3部分から成ることから、線量範囲によつて3種類の障害にわたることができる。

第1は4.6 kR以下の線量による障害である。この線量域の反応の照射日令によるちがいのついてはすでに報告した⁹⁷⁾。1.4 kR照射された蛹の約95%は羽化できないが、蛹期後半の呼吸量上昇はおこり8日令の酸素消費量は同時刻の非照射蛹の値の $\frac{2}{3}$ を示し、9日令に最高値に達した後減少する。8日令呼吸量は線量が増すと線量に対して指数的に減少し、成虫組織形成の抑制も大きくなる。線量と外部形態形成抑制の関係を表1にまとめた。

第2の型の障害は4.6~27.6 kR照射によつておこる。この範囲の照射を受けた蛹の呼吸量は96時間令の低い値を持続し蛹後半にいたつても呼吸の上昇が全くみられない。この反応は4.6~27.6 kRの線量範囲では等しく、線量—効果曲線上でプラトーを作る。

第3の型の障害は69 kR以上の大線量照射でのみおこる。呼吸量は図1に示すように照射後の時間に対して指数的に減少をつづけて4~6日の間にゼロになる。これは我々が溶解死または早期死と呼んでいるもので、囲蛹殻の中で虫体が縮小して4~6日の間に正常の $\frac{1}{3}$ 以下の体積になる。

2. 生存時間に対する放射線の影響

はじめ50匹から成る標本を照射し、照射後24時間ごとに7又は14匹を任意に抽出して1匹ずつ呼吸量を測定し、酸素消費のないものを死んだ個体として平均生存時間を計算しその値を図3に示した。蛹期後半の呼吸上昇がおこる程度の小線量照射(1.4~4.6 kR)をうけた蛹の呼吸は非照射対照に等しく囲蛹殻形成後約11日で停止する。但しこの場合対照の羽化後成虫には餌を与えずにおく、中線量(4.6~27.6 kR)をうけたため低い呼吸量のままとどまり形態的にも成虫化の行われない蛹は、照射後16~30日間も呼吸を続ける。但し1匹当りの呼吸量は図1にみるように低いまま

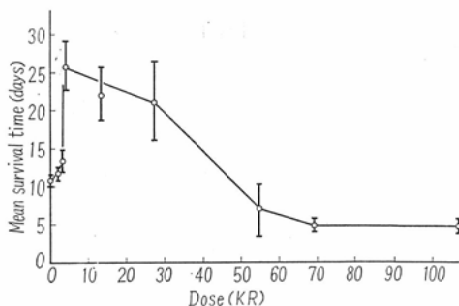


Fig. 3 The change of mean survival time after various dose irradiation at one day of age. The organism survived far longer after medium dose irradiation than after smaller or larger exposure.

である。更に大線量(69 kR以上)照射では4日令から6日令の間に溶解死がおこる。2日令以後の蛹に照射した場合には溶解死はおこらないが230 kR以上の巨大線量では生存時間が短くなる。但し350 kR以下では即死はおこらない。

3. DNA合成に対する放射線の影響

25~27時間令の蛹に1.38 kR又は13.8 kR照射後いろいろな時間に蛹の腹部に ^3H -TdR 0.5 μCi を注射し、DNAにとりこまれた放射能を図4に示した。非照射蛹では細胞数が増加するので蛹1コ当りのDNA合成率が増加する。1.38 kR(小線量)をうけた蛹では照射後5時間でDNA合成

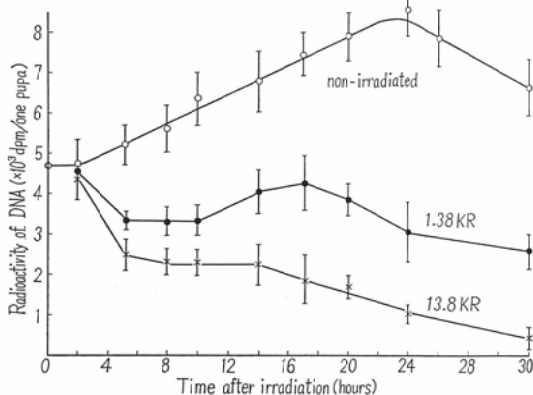


Fig. 4 The rate of DNA-synthesis after irradiation. H-TdR (0.5 μCi per one pupa) was injected to the abdomen at various interval from the irradiation and DNA was extracted by Schneider's method after the incubation of three hours at 27°C.

率が1度低下するが14時間後には再び増加する。1.38 kR (中線量) 照射後2時間のDNA合成率は照射前と変わらず、5時間から14時間までの合成率は照射前の約 $\frac{1}{2}$ の値になりその後更に一方的に減少して30時間後にはゼロに近くなる。

4. DNA合成細胞の検索

非照射蛹の各時期における標識係数を ^3H -TdR ととりこみによるオートラジオグラフで測定し図5に示した。蛹の初期には組織芽細胞、筋肉芽細胞および神経細胞にとりこみが著明である。大脳半球および胸部神経筋におけるDNA合成細胞の割合は固蛹殻形成直後に最大だが時間と共に減少し60時間令にはほとんどゼロである。脚部筋芽細胞の標識係数は24時間令(前蛹期)までは約40%だが頭部膨出後の36時間令には65%に上昇する。72時間令から再び減少するが筋芽細胞の融合が完了している7日令でも11.9%を示していた。成虫の飛翔筋を作るべき筋芽細胞は36時間令から幼虫の3対の背部筋のまわりに集つて70~80%の細胞が ^3H -TdR をとりこむが、幼虫筋肉の中に入りこんで融合をはじめた細胞には全くとりこみがみられない(写真), 96時間令以後には筋芽細胞の融合が

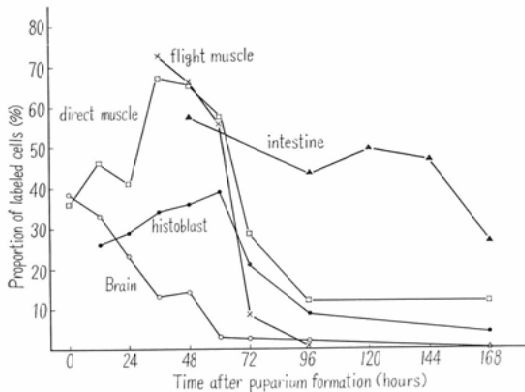


Fig. 5 DNA-synthesizing cells at various stage of pupa. 0.5 μCi of ^3H -TdR per one pupa was injected to the abdomen at various age and autoradiographs were made after the labeling time of three hours. The cells of cephalic complex and the blast cells from imaginal buds incorporated the label actively during first three days, and the cells of alimentary canal did also at later stage.

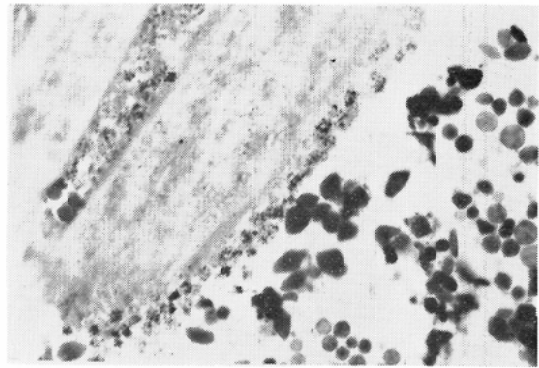


Plate. Autoradiograph of the section of muscle tissue in 48 hours old pupae. Incorporation of label is found in only free myoblasts around the larval muscle and not in the myocyte after the fusion in the larval tissue. 0.5 μCi Of ^3H -TdR per one pupa, labeling time 3 hours, 14 days exposure.

が進んで標識係数が低下する。3日令以後にDNA合成を行う主なものは、消化管、成虫の脂肪体細胞、外性器をつくる腹部成虫芽細胞等である。昆虫の消化管上皮細胞は多糸染色体を持つことが知られており、細胞分裂を伴わないDNA合成であるかもしれない。

25~27又は48~50時間令の蛹に1.38, 2.3又は13.8 kR 照射し、19時間後に ^3H -TdR を注射して標識係数と線量の関係を図6に示した。標識細胞率の照射による減少は脳組織、組織芽細胞および筋芽細胞では著明なものに対し、後腸および前胃の腹部成虫芽細胞のとりこみは2.5 kR 照射によつては全く減少しない。1.38 kR 照射後の脳組織および下皮組織芽細胞には、壊死に落ちついた細胞の周囲に銀粒子を多数もつた標識細胞の集団がみられたが、13.8 kR 照射後にはそのような回復像はみられなかった。

考 察

蛹は幼虫組織の崩壊および時期を異にした各成虫組織の形成が行われている¹²⁾複雑な系であり、定量的取扱いは困難ではあるが、8日令の酸素消費量が個体の発生程度と良く対応しているので、放射線による発生抑制の程度と線量との関係を呼吸量測定によつて定量化した。8日令呼吸量の線

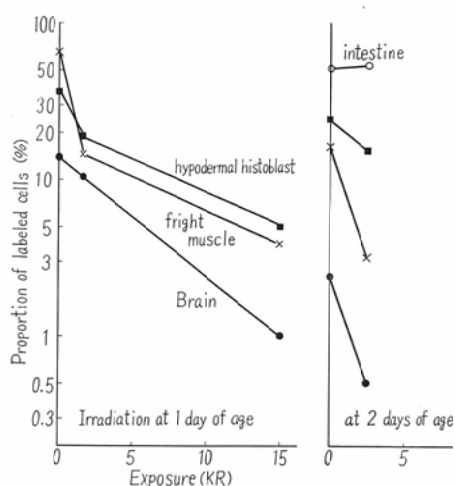


Fig. 6 The relation between the diminution of DNA-synthesizing cells and exposure. The brain cells, myoblasts and hypodermal histoblasts were radiation sensitive, whereas cells of alimentary canal were resistant. Irradiated at 25 to 27 hours or 48 to 50 hours after puparium formation, injected with H-TdR 19 hours after the exposure, labeling time 3 hours.

量—効果曲線がはつきりと3部分から成り、線量—生存時間曲線の3部分と線量の点で対応していることから3つの型の障害があることが示唆された。照射後におこる成虫組織形成抑制は、組織学的方法によれば2つの型にわけることができるという報告がある¹³⁾¹⁴⁾。このちがいは測定方法のちがいがからおこったものであると考えられる。つまり形態学的には区別できない小、中線量照射による死亡に2つの反応型のあることが呼吸曲線に対する影響から示された。

成虫組織を作るべき細胞は囲囀殻形成直後にはいくつかの成虫芽として存在しており、その組織芽細胞が主に蛹期のはじめの3日間に増殖し、後、成虫組織へ分化する。どの組織が放射線の影

響を強く受けるかを知る目的で³H-TdR注射後のオートラジオグラフを作製し、照射によるDNA合成細胞率の減少を調べたが、消化管上皮細胞のとりこみが影響を受けない他は、脳細胞、下皮組織芽細胞および筋芽細胞のDNA合成はいずれも強く障害を受けており、特定の標的臓器のみを考えることはできなかった。

謝辞 本研究の一部は文部省科学研究費の援助で行われた。ここに記して謝意を表す。

文 献

- 1) Schneiderman, H.A. and C.M. Williams: Biol. Bull., 105 (1953), 320—334.
- 2) 伊藤智夫: 蚕糸試験場報告, 14 (1954), 263—278.
- 3) 小林勝利: 蚕糸試験場報告, 15 (1957), 181—273.
- 4) Agrell, I: Physiology of Insecta I p. 130—133. 1964. Academic Press, New York and London.
- 5) Henshaw, P.S. and A.B. Golomb: Radiology 34 (1940), 721—730.
- 6) Sato, C: Tohoku J. exp. Med. 90 (1966), 1—8.
- 7) 佐藤周子, 佐々木俊作, 栗冠正利: 日本医放会誌, 26 (1966), 8号.
- 8) 栗冠正利: 日本医放会誌, 15 (1956), 1099—1105.
- 9) Sakka, M: Tohoku J. exp. Med. 86 (1965), 325—333.
- 10) Sakka, M: Bull. Tokyo Med. Dent. Univ. 7 (1960), 231—235.
- 11) 加納六郎: 日本のハエ (衛生害虫叢書 II), DDT協会, 東京 (1954).
- 12) Demerec, M: Biology of Drosophila, p. 283—419. John Wiley & Sons, Inc. New York. 1950.
- 13) Fritz-Niggli, H: Fortsch. Röntgenstr. 76 (1952), 218—254.
- 14) 佐々木俊作: 動物学雑誌, 75 (1966), 207—214.
- 15) Bowers, B. and C.M. Williams: J. Biol. Bull. 126 (1964), 205—219.