



Title	ICRマウスの胎児影響に対するTMG(ビタミンE誘導体)の放射線防護効果の研究
Author(s)	具, 然和; 長谷川, 武夫; 金, 和坤 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 2000, 60(14), p. 845-855
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/19827
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

ICRマウスの胎児影響に対するTMG(ビタミンE誘導体)の放射線防護効果の研究

具 然和¹⁾ 長谷川武夫¹⁾ 金 和坤²⁾
鈴木 郁功¹⁾ 森 剛彦¹⁾ 山本 洋一¹⁾

1) 鈴鹿医療科学大学保健衛生学部

2) 韓国釜山カソリック大学放射線科

Study of the Radioprotective Effects of TMG on Teratogenic Malformations in Irradiated Mice

Yeunhwa Gu¹⁾, Takeo Hasegawa¹⁾,
Hwakon Kim²⁾, Ikukatsu Suzuki¹⁾,
Takehiko Mori¹⁾ and Youichi Yamamoto¹⁾

ICR mice fetuses in the organogenesis stage were used to clarify experimentally the mechanism of the protective effect of vitamin E derivant (TMG: 2-(α -D-Glucopyranosyl) methyl-2, -5, -7, -8-Teramethylchorman-6-working woman) on the effects of radiation. The authors paid careful attention to radiation, and the radioprotective effects of TMG on the induction of malformations was examined. Radiation is an important consideration because of its widespread use in the areas of medicine, nuclear energy, and industry. Malformations induced by radiation at the organogenesis stage, skeletal malformations, and the effects at the cellular level of embryos were examined in this research. Further, the mechanism of the protection effect of TMG against radiation-induced malformations was analyzed and observed experimentally. Thus, this study was done to provide fundamental data on the radioprotective agent TMG. It was clear that TMG exerted radioprotective effects against embryonic death and the rate of teratogenesis when administered before exposure. Such effects were also exerted against skeletal malformations and fetal body weight. In summary, radioprotective effects were observed at the whole-body level as well as at the cellular level.

Research Code No.: 408

Key words: Organogenesis stage, TMG, Radioprotective effects, Malformation, Teratogenesis

Received May 2, 2000; revision accepted July 14, 2000

- 1) Department of Radiological Technology, Suzuka University of Medical Science
- 2) Department of Radiological Technology, Busan Catholic University of Health Science

別刷請求先
〒510-0293 三重県鈴鹿市岸岡町1001-1
鈴鹿医療科学大学保健衛生学部
具 然和

はじめに

本研究では、胎児の器官形成期に注目して奇形実験に多く使われているICRマウスを用いて放射線に対するビタミンE誘導体(TMG: 2-(α -D-glucopyranosyl) methyl-2, 5, 7, 8-teramethylchorman-6-OL (以下, TMG))の防護効果のメカニズムについて実験的に解明した。

放射線に対する人への影響を考えるうえで、最も感受性が高い個体が胎児である¹⁾⁻⁷⁾。現在まで多くの研究者によって放射線に対する胎児影響はほぼ明らかにされている¹⁾⁻⁴⁾。奇形の誘発する時期は、主に器官形成期までで、妊婦が妊娠に気付かない時期でもある。このように自覚症状がない決定的な時期なので放射線から影響を受ける可能性が高い。

本研究では、これらの決定時期に着目して、従来から日本で奇形実験に多く使用されてきたICRマウスを用いて、環境要因のなかの放射線に対する外表奇形、骨格奇形を観察し、また、放射線に対する胎児の細胞レベルでの観察を行い、放射線による胎児影響について検討する。

TMGは、ビタミンEの構造と類似しており、先行研究により、*in vitro*の実験でフリーラジカルに対する防護効果があることが明らかにされている⁸⁾。そこで、本研究では放射線の胎児催奇形性に対するTMGの防護剤としての有無を実験的に検討し、放射線防護薬剤に資するための情報を入手することを目的とする。

実験対象と方法

1. 使用動物

ICR (Crj: CD-1 (Swiss Haucka))マウスを用いた。ICRマウスは、日本チャールスリバー社においてclosed colonyとして増産されたもので、日本生物材料センター(株)を通じて購入した。本研究の飼育条件に慣らすために最低一週間の予備飼育を行った後、実験に供した。本実験に用いたマウスの週齢は、femaleマウス9~13週、maleマウス9~15週である。

2. 飼育条件

conventionalな条件のもとで飼育し、明期AM 6:00~PM

Table 1 Embryonic/fetal death and fetal body weight of ICR mice irradiated at 192 hpc during organogenesis

Treatment (Gy)	Number of Dam	Preimplantation deaths		Embryonic deaths		Fetal deaths		Live fetuses		Litter size		No. of Implantation (%)	
		Number	%	Number	%	Number	%	Number	%	Mean	SD	Male	Female
Control	20	13	3.94	18	5.68	5	1.58	294	92.75	14.7	2.83	1.23 ± 0.12	1.16 ± 0.14
Sham control	20	56	16.92*	8	2.91	8	2.91	259	89.62	12.95	2.8	1.20 ± 0.19	1.16 ± 0.17
2.0 Gy	20	29	11.89*	134	62.33*	11	5.12*	70	32.56*	3.5*	3.46	1.12 ± 0.13**	1.04 ± 0.13**
TMG + 2.0 Gy	20	36	15.72*	38	19.69*	8	4.15*	147	76.17*	7.35*	4.76	1.19 ± 0.13	1.12 ± 0.15
2.0 Gy + TMG	20	19	8.09	187	86.57*	6	2.78	23	10.65*	1.15*	1.53	1.02 ± 0.17**	0.97 ± 0.09**

M: Male, F: Female

*Significant difference against control by Wilcoxon of nonparametric test, Significant at a 1% probability level.

**Significant difference against control at a 1% probability level by use of student's t-test.

6:00までライトコントロールした。室温は、 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度は、60~65%である。飼料(CA-1, 日本CLEA(株))および水(tap water)は、自由摂取させた。

3. 交配方法

雌マウスのsexual excitement period(発情期)にあるものを膈の肉眼的な観察により選別し、AM 6:00~AM 9:00までの3時間のみ、雄マウスと交配させ、妊娠させた。AM 9:00にvaginal plug(膈栓)を観察し、妊娠を確認した。plugが確認されたマウスは、AM 8:00に受精(conception)したものとし、その時期を妊娠0日0:00時として受精卵の胎齢を起算した。

照射方法は、受精成立、8日後の妊娠マウスを照射ゲージに入れ、線量率0.35Gy/minで2.0Gy全身照射を行った。TMGの投与方法は、受精成立8日後の妊娠マウスにTMG600mg/kg(生理食塩水1.5cc)を腹部投与した。本研究においてshamコントロールは、TMGのみを腹部投与した群である。

TMGは生体における代謝がビタミンEに比べて非常に早いので、この処理は放射線照射5分前に行った⁹⁾。

4. 個体レベルの胎児影響の観察指標

a. 観察項目

胎児影響の観察は、胎齢18日目に母獣を頸椎脱臼により屠殺した。屠殺後開腹し、各妊娠マウスを観察した。着床率を算定するために黄体数を数え、さらに死亡胎児と生存胎児を区別した。生存胎児は、 37°C の生理的食塩水を満たしてシャーレに取り出し、実体顕微鏡の下で外表奇形の発生状況および性別を区分した。

胎児体重は、一匹ずつLibor FB-330D(Shimadzu)を用いて計測し、胎児体重0.8g以下の胎児は極小胎児として扱った。

b. 子宮内死亡(胎児死亡)の分類

胎児死亡は、着床前死亡(preimplantation death)、胚死亡(embryonic death)および胎児死亡(fetal death)と三つに分類した。着床前死亡は、受精後0~4.5日までの死亡で、卵巣の黄体数(胚卵数)と、着床胎児(生存胎児、着床痕、胎盤遺残、吸収胚、浸軟胎児の合計)から求めることができる。胚死亡(embryonic death)は、受精後4.5~13.5日までの死で、着床痕、胎盤遺残および吸収胚として観察されるものである。胎児死亡(fetal death)は、受精後14~18日までの死亡で

あり、浸軟胎児として観察されるものである。

骨格奇形は、Jacobsen方法に従って行った¹⁰⁾。

細胞レベルの実験は、受精成立、8日後の妊娠マウスに放射線照射を行い、6時間後に母体マウスを頸椎脱臼させ、母体マウスから、胚胎を取り出した。取り出した胚胎は、組織固定法により、固定液に1時間つけ固定させ、固定後、Apotag抗体による抗体染色やHE染色法に従って行った。

c. 統計学上の分析

個体レベルの影響である着床前期死亡、胚死亡、胎児死亡、外表奇形などは、母獣によって発生率が大きく異なるので、個々の母獣間の差を小さくするために母獣ごとの平均発生率を求め、それをもとに算定した。したがって、統計処理にはノンパラメトリックなWilcoxon検定を用いて分析した。また、胎児体重については、正規分布に従うため、t検定を行った¹¹⁾。

d. 細胞レベルの影響に対する統計学的分析

核濃縮細胞(pyknotic cell)と細胞自滅(apoptosis)に対する統計学的検定は、Wilcoxon検定を用いた¹²⁾。

結 果

1. 胎児の個体レベルにおける放射線影響

a. Preimplantation death

着床前死亡率の結果をTable 1およびFig. 1に示す。

2.0Gy群とコントロール群の着床前死亡率の間には統計学的な有意差が認められた($p < 0.01$)。コントロール群の着床前死亡率が3.9%に対して、他の照射群ではそれぞれsham コントロール群16.9%、2.0Gy群11.9%、TMG + 2.0Gy群15.7%、2.0Gy + TMG群8.1%であった。しかし、2.0Gy照射後にTMGを投与した場合、コントロール群に対して統計学的な有意差が認められなかった。着床前死亡は、放射線照射時期と異なるため、この因果関係はなく、実験の誤差範囲と考えられる。また、着床痕が早い代謝により、吸収され、着床前死亡と判断されたと思われる。

b. Embryonic death

着床痕、胎盤遺残、吸収胚を胚死亡として扱った。胚死亡は、受精後4.5~13.5日までに起こった死亡である¹⁾。

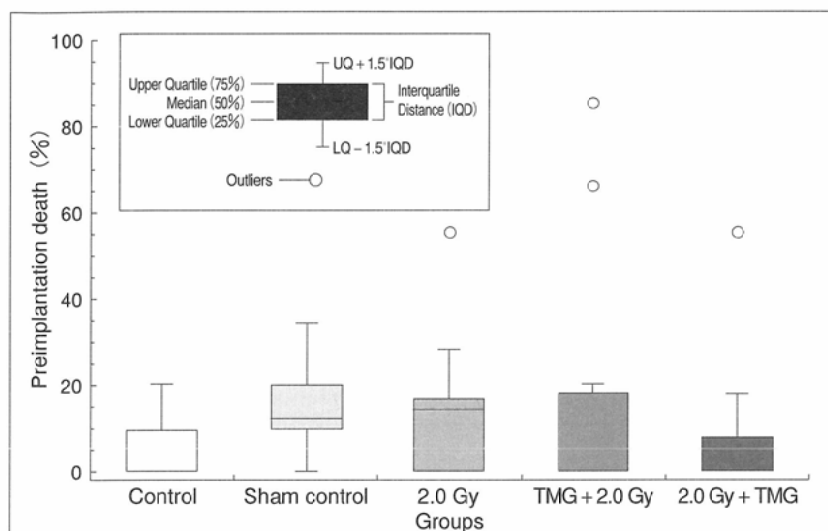


Fig. 1 Preimplantation death of ICR mice irradiated in the period of organogenesis. The 2.0 Gy group showed a statistically significant difference ($p < 0.01$) from the control groups by Wilcoxon test.

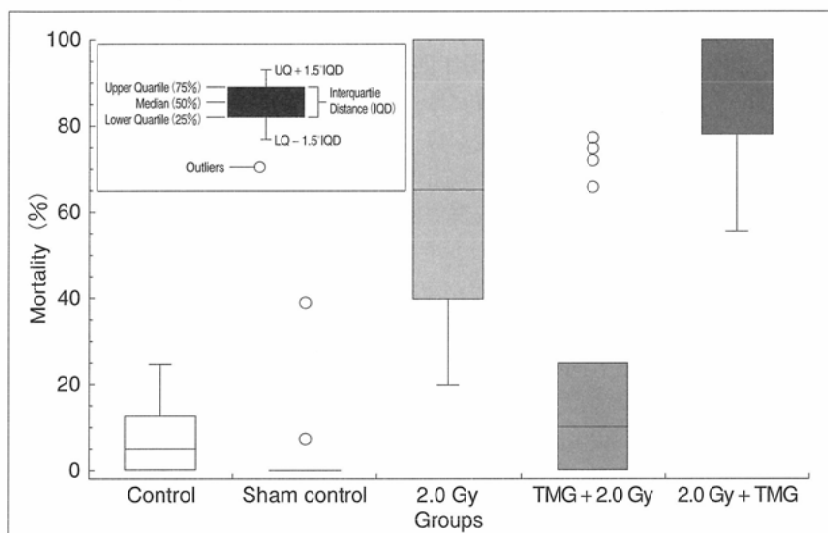


Fig. 2 Embryonic death of ICR mice irradiated in the period of organogenesis. The 2 Gy and 2 Gy + TMG group showed statistically significant differences ($p < 0.001$) in comparison with the control and sham control groups by Wilcoxon test.

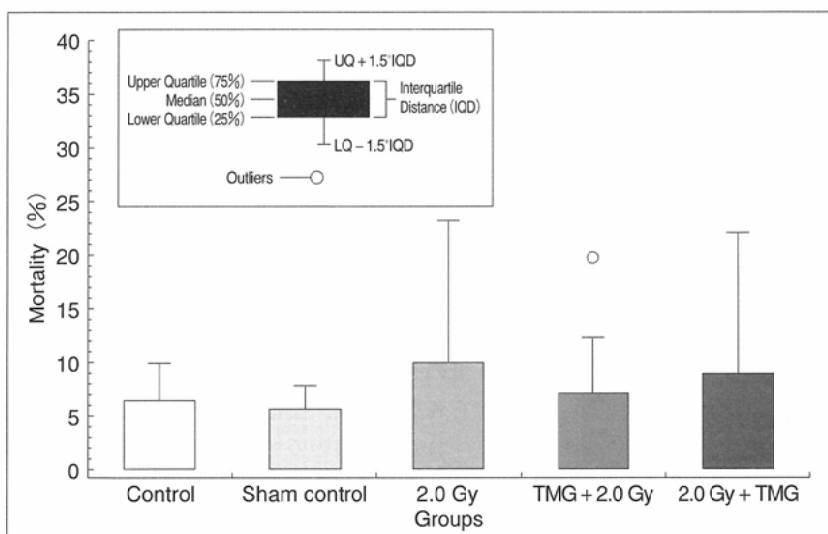


Fig. 3 Fetal death of ICR mice irradiated in the period of organogenesis. The 2.0 Gy and 2.0 Gy + TMG group did not show a statistically significant difference ($p = 0.07$) from the control and sham control groups by Wilcoxon test.

胚死亡率の結果をTable 1およびFig. 2に示す。

コントロール群の胚死亡率が5.7%に対して、shamコントロール群とTMG + 2.0Gy群はそれぞれ2.9%, 19.7%であり、sham コントロール群とTMG + 2.0Gy群の胚死亡率とコントロール群の胚死亡率の間には統計学的な有意差は認められなかった。しかし、2.0Gy群と2.0Gy + TMG群の胚死亡率はそれぞれ62.3%, 86.6%であり、2.0Gy群と2.0Gy + TMG群の胚死亡率とコントロール群の胚死亡率の間には統計学的な有意差が認められた($p < 0.001$)。したがって、TMGを投与しなければ、2.0Gy以上の照射では、着床した半数以上の胚が死亡することが分かった。

c. fetal death

胎児死亡率の結果をTable 1およびFig. 3に示す。

コントロール群の胎児死亡率は1.6%で、shamコントロール群2.9%, 2.0Gy群5.1%, TMG + 2.0Gy群4.2%, 2.0Gy + TMG群2.8%であった。コントロール群の胎児死亡率と各照射群の胎児死亡率の間には統計学的な有意差は認められなかった。したがって、TMGを用いても2.0Gy以上の照射では、コントロール群に対して有意な差が認められないことが分かった。その理由の一つとして、胚死亡の発生率が非常に高かったために、胎児死亡に差がでなかったと考えられる。

d. 外表奇形(malformation)

外表奇形の発生数をTable 2およびFig. 4に示す。

各照射群に誘発された外表奇形の種類は、外脳症、口蓋裂、胸部破裂、開眼、腹壁破裂、尾の異常、などである。

外表奇形の発生頻度は、コントロール群1.0%, shamコントロール群0.4%, 2.0Gy群57.1%, TMG + 2.0Gy群35.4%, 2.0Gy + TMG群56.5%である。

コントロール群では、外表奇形が認められなかったがしかし、shamコントロール群では、尾の異常が1匹のみ認められた。コントロール群の外表奇形発生率とshamコントロール群の外表奇形発生率の間には統計学的な有意差は認められなかった。

2.0Gy群の奇形の発生頻度(57.1%)は、コントロール群とshamコントロール群の発生頻度(0.62%)に比べ、統計学的な有意差が認

Table 2 Numbers of fetuses bearing external malformations in mice irradiated at 192 hpc during organogenesis

Types of malformation	Control	Sham Control	2.0 Gy	TMG + 2.0 Gy	2.0 Gy + TMG
Exencephaly	-	-	9*	30*	1
Hydrocephaly	-	-	3*	1	3*
Cleft palate	-	-	2	1	1
Open eye	-	-	-	4*	-
Anophthalmia	-	-	2	14*	2
Abdominal-hernia	-	-	1	-	-
Anomalies of tail	-	-	22*	2	6*
Polymelia	-	1	-	-	-
Total number of malformations	0	1	39	25	13
Frequency of malformations (%)	0	0.62	55.71	17	56.52
Total number of dams	20	20	20	20	20
Total number of live fetuses	294	259	70	147	23

*Difference from the control and sham control group is statistically significant ($P < 0.01$)

められた ($p < 0.001$). TMG + 2.0Gy群の奇形発生率(35.4%)もコントロール群のそれに比べ、統計学的な有意差が認められた。2.0Gy + TMG群の奇形発生率(56.5%)は、コントロール群のそれに対して統計学的な有意差が認められた。以上の結果から、胎児の外表奇形については、コントロール群とshamコントロール群に対し、すべての照射群において統計学的な有意差が認められた。しかし、奇形発生率からみると2.0Gy群と2.0Gy + TMG群では最も高かったが、TMG + 2.0Gy群では2/3以下に減少が認められた。死亡のなかには奇形をもったために死亡した例が多いので、奇形の影響と各死亡の影響は切り離して考えてはならない。

e. 骨格奇形

骨格奇形の発生数をTable 3およびFig. 5に示す。

各照射群に誘発された骨格奇形の種類は、頭蓋骨欠損、頭蓋有窓症、上顎骨欠損、鎖骨未骨化、胸骨両(分節)骨化、胸骨未骨化、胸骨異常、肋骨不完全骨化、肋骨融合、過剰肋骨、胸椎異常、腰椎異常、尾骨欠損である。骨格奇形の発生頻度は、コントロール群0.1%、shamコントロール

群0%、2.0Gy群47.1%、TMG + 2.0Gy群13.6%、2.0Gy + TMG群43.5%である。

コントロール群に発生した骨格奇形は、肋骨不完全骨化2匹、過剰肋骨1匹、尾骨欠損1匹であるのに対し、shamコントロール群には、骨格奇形は発生しなかった。2.0Gy群では、発生頻度も47.1%と高く、コントロール群の骨格奇形発生率との間に統計学的な有意差が認められた ($p < 0.01$)。

TMG + 2.0Gy群では、2.0Gy群の発生頻度に比べて低かったが、これもコントロール群の骨格奇形発生率との間に統計学的な有意差が認められた ($p < 0.01$)。

2.0Gy + TMG群での発生頻度は43.5%と比較的高く、これも同様にコントロール群の骨格奇形発生率との間に統計学的な有意差が認められた ($p < 0.05$)。

以上の結果から、胎児の骨格奇形については、コントロール群とshamコントロール群に対し、全ての照射群において統計学的な有意差が認められた。しかし、TMGを2.0Gy照射前に投与することで骨格奇形の発生率を抑えることがわかった。

f. 胎児体重(fetal body weight)

各照射群の胎児の平均体重は、胎児体重を一匹ずつ量り、母獣ごとの平均を求めたうえで各照射群の雄雌別の平均値を求めた。各照射群の胎児体重をTable 1およびFig. 6に示す。

胎齢18日の胎児体重において、コントロール群とshamコントロール群の体重に対し、2.0Gy群と2.0Gy + TMG群のそれでは雄雌の両方とも胎児体重減少の有意差が認められた ($p < 0.001$)。しかし、コントロール群とshamコントロール群の体重に対し、TMG + 2.0Gy群のそれでは胎児体重減少に有意な差は認められなかった。また、雄雌比を比べると、いずれの群においても雌の胎児体重が雄の胎児体重よりも約0.05g程度少なかった。

2. 胚の細胞レベルにおける放射線影響

a. 核濃縮細胞(pyknosis)

受精8日後に2.0Gy放射線照射した場合の

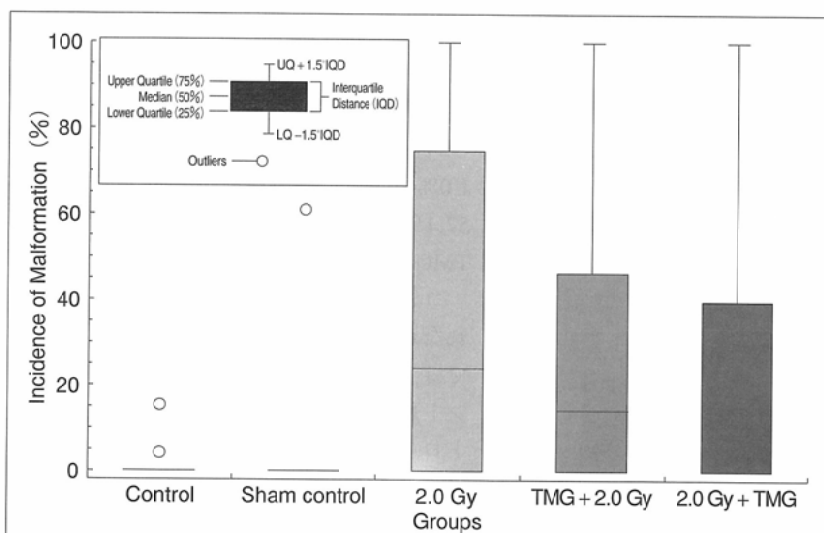


Fig. 4 Incidence of malformations in ICR mice irradiated in the period of organogenesis. Irradiation groups showed statistically significant differences ($p < 0.001$) from other dose groups by Wilcoxon test.

Table 3 Numbers of fetuses bearing skeletal anomalies in mice irradiated at 192 hpc during organogenesis

Types of malformation	Control	Sham Control	2.0 Gy	TMG + 2.0 Gy	2.0 Gy + TMG
Acrania	-	-	7*	15*	3*
Craniofenestria	-	-	1	-	-
Absent maxilla	-	-	-	1	-
Unossified clavicle	-	-	-	1	-
Bipartite ossification of sternebral	-	-	9*	-	1
Unossified sternebra	-	-	4*	-	-
Misshapen sternebra	-	-	2	-	1
Incomplete ossification of rib	-	-	-	2	-
Fused rib	2	-	2	-	-
Full supernumerary rib	-	-	-	1	-
Malpositioned thoacic vertebra	1	-	3*	-	1
Malpositioned lumbar vertebra	-	-	2	-	-
Absent caudal centrum	1	-	3	-	4
Total number of skeletal anomalies	4	0	33	20	10
Frequency of skeletal anomalies (%)	0.13	0	30.98	10.22	19.75
Total number of dams	20	20	20	20	20
Total number of live fetuses	294	259	70	147	23

*Difference from the control and sham control group is statistically significant ($p < 0.05$).

胚に対する核濃縮細胞(pyknotic cell)平均をFig. 7に示す。コントロール群と各照射群ごとの有意差検定にはWilcoxon検定を用いた。

観察の結果、コントロール群のpyknosisとshamコントロール群のpyknosisとの間には統計学的な有意差は認められなかったが、コントロール群のpyknosisと2.0Gy群のpyknosisの間には統計学的な有意差が認められた($p < 0.001$)。同様に2.0Gy + TMG群のpyknosisとの間にも有意差が認められた($p < 0.001$)。しかし、コントロール群のpyknosisに対して、TMG + 2.0Gy群のpyknosisには統計学的な有意差は認められなかった。したがって、TMGにはpyknosisを抑える効果があることが明らかにされた。また、micronuclei divisionに関してはコントロール群には存在しなかったが、他の

照射群にはわずかながら存在が認められた。

b. Apoptosisの影響

受精8日後に放射線照射した場合、各処置群のapoptosisの発生数をFig. 8に示す。apoptosisの発生数は、コントロール群とshamコントロール群に比べ、2.0Gy放射線照射群($p < 0.001$)と2.0Gy + TMG群($p < 0.01$)で高く認められ、TMG + 2.0Gy群では($p = 0.07$)有意差が認められなかった。2Gy + TMG群では($p < 0.01$)であった。したがって、apoptosisの発生数に対しても放射線照射前TMG投与による放射線防護効果が明らかにされた。また、2.0Gy放射線単独照射群に比べてTMG投与後に2.0Gy放射線した群においてはapoptosisの発生数が1/4にも減少が認められた。また、2.0Gy放射線照射後、TMGを投与した群においても減少が認められた。したがって、個体レベルの影響と同様にApoptosis発生数においても放射線防護効果が認められた。

c. 小核(Mmicronuclei)の影響

受精8日後の胚に処置した場合、micronucleiの数の発生数をFig. 9に示す。Mmicronucleiの発生数は、コントロール群とshamコントロール群に比べ、2.0Gy放射線照射群($p < 0.01$)と2.0Gy + TMG群($P < 0.01$)では最も高く誘発し、TMG + 2.0Gy群では($P < 0.05$)少なかった。したがって、micronucleiの発生数に対しても放射線照射前TMG投与による放射線防護効果が明らかにされた。また、2.0Gy放射線単独照射群に比べてTMG投与後に2.0Gy放射線した群においてはmicronucleiの発生数が1/2にも減少が認められた。しかし、2.0Gy放射線照射後、TMGを投

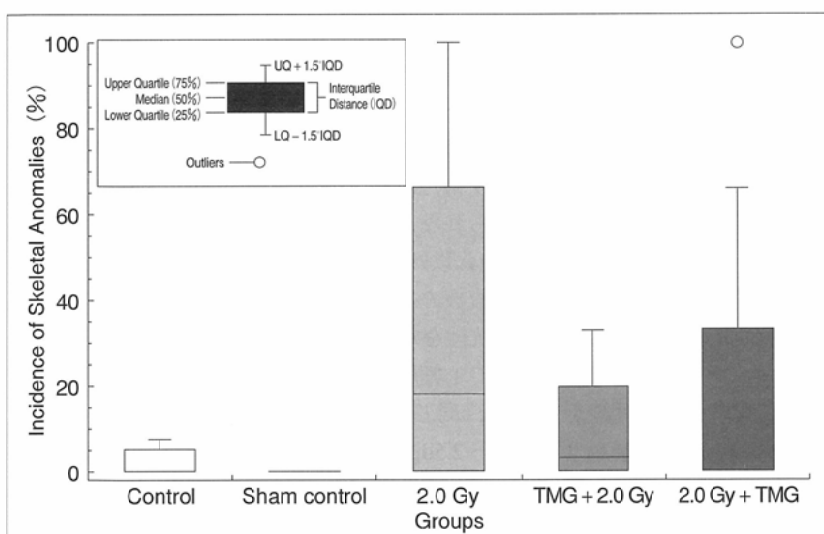


Fig. 5 Skeletal anomalies of ICR mice irradiated in the period of organogenesis. The radiation and TMG plus radiation groups showed statistically significant differences ($p < 0.001$) from other dose groups by Wilcoxon test.

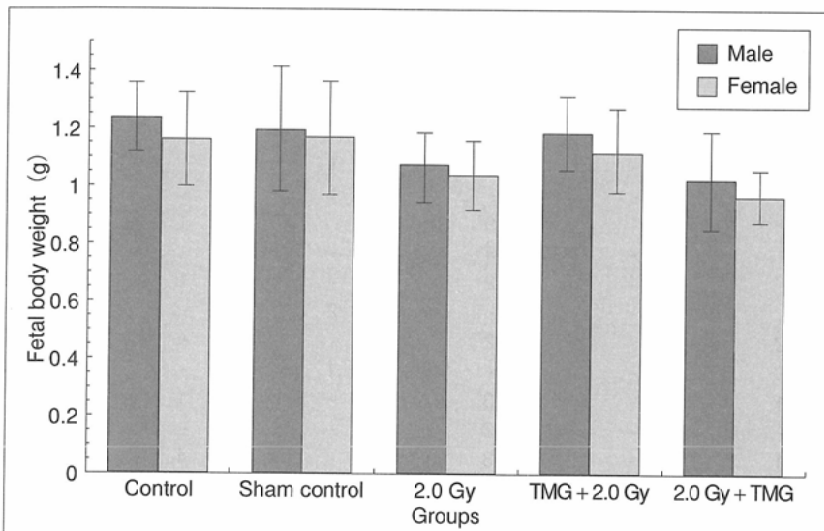


Fig. 6 Fetal body weight of ICR mice irradiated in the period of organogenesis. The 2.0 Gy and 2.0 Gy + TMG groups showed statistically significant differences ($p < 0.05$) from the control and sham control groups by t-test.

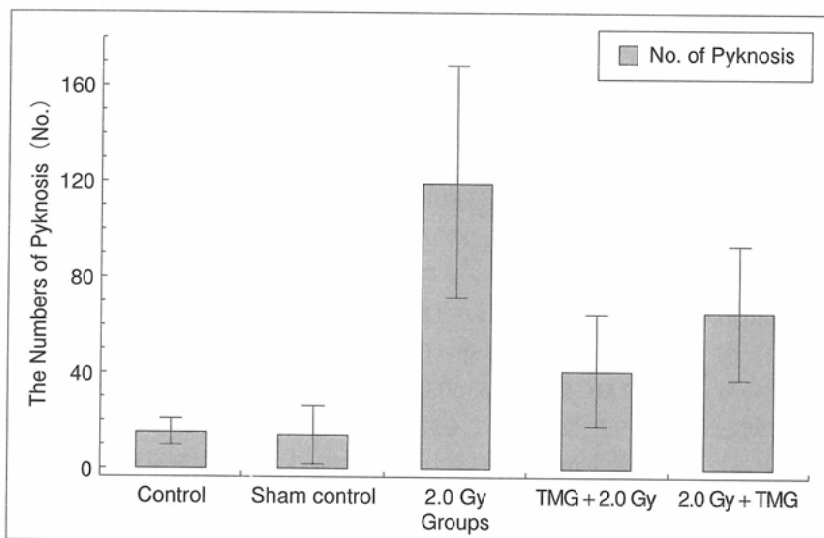


Fig. 7 Pyknosis of mice embryos irradiated in the period of organogenesis. The radiation, TMG + 2.0 Gy, and 2.0 Gy + TMG groups showed statistically significant differences ($p < 0.001$) from other treatment groups by Wilcoxon test.

与しても放射線防護効果は、全く認められなかった。したがって、Micronucleiの数の発生数に対しては、TMG投与後に2.0Gy放射線した群にのみ放射線防護効果が認められた。

考 察

ビタミンEと放射線についてはin vitro, in vivoの多くの報告があるが、臨床的あるいは疫学的報告は少ない。わずかに骨髄移植や脳腫瘍に対する放射線治療の副作用予防のために試験的に使用された臨床報告があるのみである^{(13),(14)}。放射線照射により、生体内には活性酸素・フリーラジカルが生じ、脂質、蛋白質、核酸に酸化的な損傷を与え、種々の組織障害を引き起こすことが知られている^{(15)–(17)}。実際に、X線やγ線を照射したときの脂質過酸化やDNA損傷が、ビタミンEの処置により抑制できたという報告がある^{(1),(18),(19)}。しかし、一方

でビタミンEには防御効果がなかったという報告も存在する^{(20)–(22)}。近年、種々の疾病や老化に活性酸素、フリーラジカルによる酸化傷害が深くかかわっていることが明らかにされ⁽²³⁾、抗酸化物によるその防止が注目されており、天然抗酸化物質、合成抗酸化物質に関する研究が盛んに行われている⁽²⁴⁾。α-Tocは生体中に高濃度存在し、かつ酸素ラジカルを速やかに補足して脂質の酸化を抑制することが知られており、ビタミンEおよびその誘導体について多くの研究が行われている⁽²⁵⁾。TMGもMuraseらの実験により、水相に生成されたラジカルに対して効率的な抗酸化剤であることが示された⁽⁸⁾。したがって、本研究の結果からも、TMGは身体のなかで発生した活性酸素を消去してくれるradical scavengerとしての役割も果たしていると考えられる。また、放射線防護剤の一つとして、システアミン(MEA: cysteamine hydrochloride)がある⁽²⁶⁾。致死線量に対してMEAをX線照射5分前に投与した場合、コントロール群に比べ、細胞の生存率が上昇したという報告がある⁽²⁷⁾。しかし、X線照射後の投与では、防護効果がみられず、効力の持続時間も数十分程度に過ぎないので⁽²⁸⁾、慢性的被曝や不慮の被ばくに対しての効果は期待できないと考えられる。これはα-Tocも同様である。本研究でも2.0Gy + TMG群では防護効果がみられず、同様の結果が得られた。MEAはLETの大きい中性子線やα線に対して効果は小さい⁽²⁶⁾。

1. 器官形成期の放射線照射によるTMGの個体レベルの胎児影響に関する考察

a. 着床前死亡

着床前死亡(着床率)に対する放射線感受性は、受精2時間後に放射線照射した群が最も感受性が高く、次は、受精48時間後で、受精72時間と96時間後の群では感受性の大きな違いは認められなかった⁽²⁷⁾。受精2時間後の受精卵は、1細胞期で、それ以外の照射時期は多細胞期である。先行研究によると複数の細胞で構成された胚の方が着床前胚死亡に対し、抵抗性を示した⁽²⁸⁾。Mullerらは、Heiligenbergerマウスを用いて1細胞期と32~64細胞期の種々の時期に放射線を照射し、同じ現象を観察している⁽²⁸⁾。Russell and Russellは、0.5~2.5dpc(days post conception)における胚は、3.5~4.5dpcの胚よりも胚死亡に対する感受性が高いことを認めている^{(1),(2)}。また、72hpcまでは高い感受性を示すが、96hpc以降は比較的抵抗性を示したことを報告している。Pampferらも、1細胞期(2hpc)に0.25~2Gyを照射し、着床

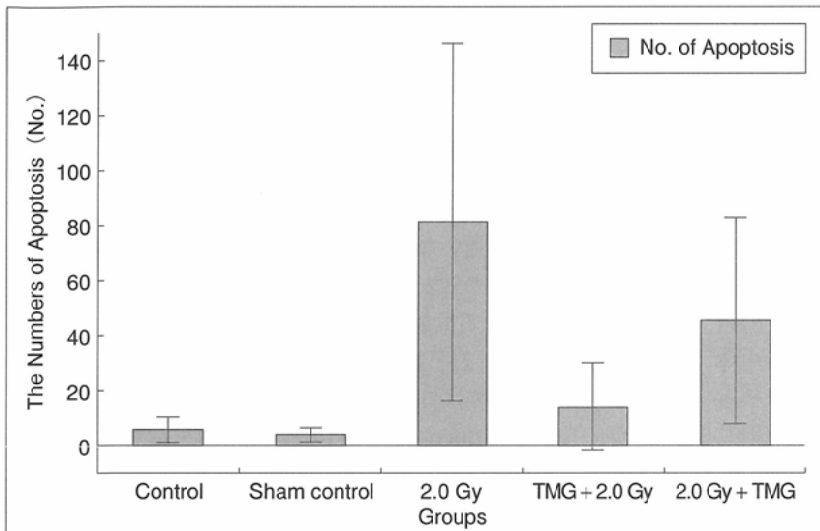


Fig. 8 Apoptotic cells of mice embryos irradiated in the period of organogenesis. The radiation, TMG + 2.0 Gy, and 2.0 Gy + TMG groups showed statistically significant ($p < 0.001$) differences from other treatment groups by Wilcoxon test.

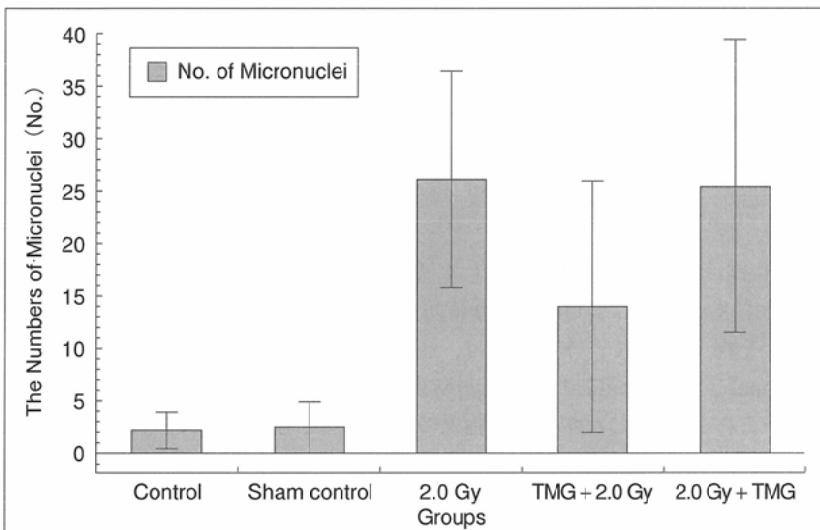


Fig. 9 Micronuclei of mice embryos irradiated in the period of organogenesis. The radiation, TMG + 2.0 Gy, and 2.0 Gy + TMG groups showed statistically significant differences ($p < 0.001$) from other treatment groups by Wilcoxon test.

前死亡(着床率)に対して明らかに線量依存性を観ている²⁹⁾。しかし、Pampferらは、着床前死亡率に際して、litter effectを考えず、コントロール群の着床数から照射群の着床数を差し引いた値を着床前死亡率としている。

Russellらは、着床前死亡のLD₅₀は、1~16細胞期までは、1.5Gy \geq としている。また、64細胞期までは、3.3Gy程度としている^{1),2)}。しきい線量とLD₅₀とを直接比較することはできないが、線量反応関係から判断して、着床前死亡に対しては本研究で用いたICRマウスが若干感受性が高い。

本研究で行った受精192時間後は、胚死亡(吸収胚)が起こる時期である。したがって、着床前胚死亡に対しては直接死亡の因果関係はないと考えられる。しかし、コントロール群に比べて放射線単独照射群においては若干有意差が認められた。これらについては、着床痕として現れた死亡が早期吸収のために観察されなかったため、着床前死亡とみ

なされたのである。

b. 胚死亡

着床痕、胎盤遺残、吸収胚として観察されたものを着床後の胚死亡として扱った。これは、4.5~13.5日までに起こった死亡と考えられる²⁸⁾。

胚死亡に対する感受性は、器官形成期の照射群が最も高い³⁰⁾。

Ohzuらは、雄CDA/MKマウスと雌dd/MKマウスのF1を用いて、実験を行った結果、コントロール群と比べ、照射群の方が胚死亡は、増加したが、着床前期の間には、有意差が認められなかったと報告している³¹⁾。

MurakamiとKameyamaは、受精後、8日目のマウスに0.5Gyを照射し、胚死亡を観察している。また、1Gyの照射においては20~30%の胚死亡が認められたと報告している³²⁾。

Jacobsenは、受精後、7日目のマウスに0.05~1Gyを照射し、胚死亡の線量-効果関係を検討し、直線関係を明確にした¹⁰⁾。

コントロール群とshamコントロール群に比べ、2.0Gy群($P < 0.05$)と2.0Gy+TMG群($P < 0.05$)では統計学的な有意差が認められた。しかし、コントロール群とshamコントロール群に比べて、TMG+2.0Gy群では統計学的な有意差が認められなかった。したがって、胚死亡率に対しては、放射線照射前TMG投与による放射線防護効果が明らかにされた。また、2.0Gy放射線単独照射群に比べてTMG投与後に2.0Gy放射線した群においては胚死亡率が1/3にも減少が認められた。しかし、2.0Gy放射線照射後、TMGを投与しても放射線防護

効果は、全く認められなかった。また、Duvalらは、ビタミンE(DL- α -トコフェロール)を用いて、フリーラジカルを調べたが、pheomelaninのphotoirradiationによって明らかに抗酸化剤の効果があると報告している³³⁾。Kitazawaらは、電子常磁性共鳴信号群系を使ってascorbateラジカルを測ることによって、UVの光によってのマウス皮膚ホモジェネートでのアスコルビン酸の酸化作用の機構は調査された。ビタミンE(α -トコフェロールあるいは α -トコトリエノール)に対して、短連鎖同族体(2, 5, 7, 8の-tetramethyl-6-ヒドロキシクロマン-2-カルボン酸[trolox]と2, 2, 5, 7, 8の-pentamethyl-6-hydroxychromane[PMC])がascorbate酸化作用を速めた。ascorbate, troloxとPMCの類似の親水性はそれで急速にascorbateを使い果たすなどの相互作用が起こった。dihydropyridone酸がビタミンE同族体で同時に加えられたとき、より速いascorbateの酸化作用は妨げられた。これら

の実験結果は、マウスの皮膚ホモジェネートでのUV照射によって引き起こされたascorbate酸化作用が反動的であるよりむしろphotoactivatedな核反応によって起こされた酸素ラジカル反応であることを示唆する³⁴⁾。これらと同様に本研究においてもTMGを放射線照射前に処置による放射線防護作用は、放射線化学作用(10⁻⁵秒)によるradical scavenger防止作用と酸化防止作用であると考えられる^{26),36),37)}。また、放射線照射により、生体内には活性酸素・フリーラジカルが生じ、脂質、蛋白質、核酸に酸化的な損傷を与え、種々の組織障害を引き起こすことが知られており¹⁵⁾⁻¹⁷⁾、それら生体成分の酸化的な損傷は、ビタミンEなどの抗酸化物質によって防御可能と考えられている。実際に、X線やγ線を照射したときの脂質過酸化やDNA損傷が、ビタミンEの処置により抑制できたという報告がある^{18),19)}。本研究においても、胚に対して同様の結果が得られた。したがって、TMGには放射線防護効果があると考えられる。

c. 外表奇形

奇形の定義についてBrentは、正常な成長や発生過程の間で生物が修復することのできないすべての永久的な欠陥を奇形と示唆している³⁸⁾。また、Jacobsenによると奇形の特徴的様相子宮内発育の過程で造られるものと顕微鏡的、解剖学的性質のものとしている¹⁰⁾。

着床前の放射線照射による奇形に関してはFisherらの報告があり、48hpcにX線を照射し、尾の異常、血腫、腹壁破裂、骨格異常のようなさまざまな奇形をみている³⁹⁾。また、Mullerらは、Heiligenbergerマウスを用いて、1細胞と32~64細胞期にX線を照射し、外脳症、腹壁破裂、脳ヘルニア、水頭症などを観察した²⁸⁾。また、Pampferらは、Heiligenbergerマウスの1hpcに照射し、腹壁破裂、無脳症、膈ヘルニアなどをみており、これがHeiligenbergerマウスに特異的な現象であるかどうかについて問題を提起している²⁹⁾。

また、Ohzuらは、10hpcと34hpcに0.05~0.25Gyを照射し、外脳症と多趾を観察している³¹⁾。また、放射線による器官形成期の奇形の影響は、時期特性がある⁴⁰⁾。先行研究で、ICRマウスを用いて器官形成期に照射した場合の奇形発生のしきい線量は、1.4Gyである⁴¹⁾。PampferらとMullerらは、放射線防護の観点から1細胞においては、しきい線量が存在しないが、多細胞においてはしきい線量が存在すると仮定している^{28),29),42)}。

先行研究により、放射線によるマウスの胎生7.5~10.5日の間では奇形誘発に対する感受性が最も高いことが明らかにされた⁴⁰⁾。また、これらの研究によって口蓋裂は胚形成途上での口蓋架の遅延であると考えられる。

Jacobsenによると胎生7.5日に0.05~1Gy照射し、頭部、顎、口の奇形誘発を観察している¹⁰⁾。Murakamiらによると胎生9日目に2Gy照射し、外脳症、口蓋裂などの奇形を認めている⁴³⁾。

放射線被曝の場合、奇形(外脳症)のしきい線量は、0.5~1.5Gyの間であり、胚死亡のしきい線量は1.5~2.5Gyの間である⁴⁰⁾。外脳症、尾の異常(短縮/屈曲)および無眼球症とは

もに欠損型の奇形であり、各器官の原基の細胞死が奇形発生に関係している。胚死亡も標的臓器・組織がいずれの臓器・組織であるかは不明確であるが細胞死が基になっていると考えられる。しきい線量の違いは、奇形および死亡に関係する標的線量の感受性の違い、奇形発生の原因となる原基を構成するcriticalな細胞数および胚死亡の場合のcriticalな細胞の数の違いなどが関係していると考えられる³⁰⁾。本研究の外表奇形発生率に対しては、放射線照射前TMG投与による放射線防護効果が明らかにされた。また、2.0Gy放射線単独照射群に比べてTMG投与後に2.0Gy放射線した群においては外表奇形発生率が1/3にも減少が認められた。しかし、2.0Gy放射線照射後、TMGを投与しても放射線防護効果は、全く認められなかった。

本研究の結果により、TMGが放射線直接効果(フリーラジカル防止)が認められた。しかし、2Gy放射線照射後、TMGを投与しても放射線防護効果が認められず、TMGは、損傷を受けた細胞の修復には、関与しないことが分かった⁴⁴⁾⁻⁴⁶⁾。

Miyazakiらは、ハムスター胎児細胞を用いてγ線照射によるビタミンEのHラジカルおよびOHラジカル防止作用を検討した結果、細胞死に対して放射線防護効果を明らかにした⁴⁷⁾。また、Watanabeらは、ハムスターの胚胎細胞を用いて放射線照射後、細胞損傷に対してビタミンEの効果を調べた結果、γ線によって引き起こされたDNA一本鎖切断と染色体異常を著しく低減したと報告している。これらの効果は、OHラジカル防止効果であるとしている⁴⁸⁾。したがって、本研究では、胚死亡率と同様に放射線化学作用によるradical scavenger防止作用と抗酸化効果が明らかにされた。したがって、胎児の安全問題を考える際に、TMGが放射線防護作用することを考慮する必要のあることを本実験結果は示唆している⁴⁹⁾⁻⁵¹⁾。

2. その他の影響

胎児体重は、放射線などの影響を把握するための指標として重要であることが多くの研究者によって指摘されている。本研究による胎児体重減少の影響は、放射線単独照射群と2.0Gy放射線照射後、TMGを投与群のみ体重減少が認められた。先行研究によると器官形成期に1.5Gy以上の照射群において体重減少が認められた⁵²⁾。器官形成期の照射群に対する胎児体重の減少に対しては、特定の臓器・組織ではなく、全身の臓器・組織の発達遅延が関係し、正常の臓器・組織の重量に比例して体重減少が起こったと考えられる⁵³⁾。また、器官形成期における胎児体重減少の放射線の影響は、直接的な影響だけではなく、間接的な子宮環境による影響、あるいは胚発生段階が正常に機能しなかったことも考えられる。Skrebらも胎生5日目のラットに1.5Gy照射し、有意な体重減少を認めている⁵⁴⁾。一方、Konermannらは、着床前期(0~5日)のマウスに0.4~0.8Gy照射し、胎児体重の減少は認められなかったとしている⁵⁵⁾。しかし、胎児体重についても胚死亡と奇形の影響と同じくTMGによる放射線防護効果が明らかにされた。

3. 器官形成期の放射線照射によるTMGの胎児の骨格奇形影響に関する考察

骨格奇形発生率に対してもコントロール群とshamコントロール群に比べ、放射線照射前TMG投与による放射線防護効果が明らかにされた。また、2.0Gy放射線単独照射群に比べてTMG投与後に2.0Gy放射線した群においては骨格奇形発生率が1/3にも減少が認められた。また、2.0Gy放射線照射後、TMGを投与した群においても若干減少が認められた。

放射線単独照射による骨格奇形発生率に対して多くの研究がなされた。Russell and Russellは、マウスで骨格奇形を生じる発生期間は胎生6.5~13.5日にわたっていると報告している。また、それぞれの異常は、それ自身固有の最大感受性を示す時期があるとしている。効果のみられる最も低い線量では、各種の障害に対する感受性の期間はわずか1日または2日であるとしている。また、ほとんどの奇形が線量を増加することによって奇形誘発の期間も長くなると報告している^{11),2)}。

Murakamiらによると、妊娠8~13日のCF1マウスとddYマウスに2Gy照射し、脊椎の異常に二つの感受性期が存在することを認めた⁴³⁾。

Jacobsenは、受精後、7.5日目のマウスに0.05~1Gyを照射し、0.05~0.2Gyの間に骨格奇形のしきい線量があるとされている。また、線量-効果関係を検討し、直線関係を明確にした¹⁰⁾。

本研究では、2.0Gy放射線照射の結果、胚死亡、胎児死亡、奇形の発生率が高かった。しかし、放射線照射直後にTMG注射した群に対しては胎児死亡と奇形において放射線防護効果を示した。これらの理由は、TMGを注射することにより、ラジカル防止作用によるものと考えられる。したがって、外表奇形率と同様に骨格奇形においても放射線防護効果が認められた。本研究と同様にWatanabeらは、ハムスター胚胎に γ 線を照射して、染色体およびDNA損傷に対する放射線防護効果を調べた。したがって、放射線によるPLD(potentially lethal damage)とSLD(sublethal damage)を低減したと考えられる⁴⁸⁾。しかし、放射線照射直後にTMG注射した群では胎児体重と胚死亡については放射線防護効果を示さなかった。Umegakiらは、低線量のX線照射を行い、マウスの骨髓細胞中の染色体の損傷に対するビタミンEの効果を調べた結果、放射線防護効果を認めた²²⁾。これらと同様に本研究においても放射線照射前にTMG注射することにより、ラジカルが除去されることが明らかにされた。しかし、本研究では、TMG注射する時期によって効果の有無があることが明らかにされた。放射線防護剤として着目した、TMGは、ビタミンとして注目され、人体にあまり有害ではなく、副作用の心配もないことから、将来的な実用化に向けて検討されるべきだと考えられる^{49),56),57)}。このような結果が得られた理由として、前述したように、胚に対する放射線防護効果が認められたために、外表奇形や骨格奇形においても同様に正常な胎児が出現できたと考えられる。したがって、X線や γ 線を照射したときの脂質過酸化や

DNA損傷が、ビタミンEの処置により抑制できたという報告^{18),19)}と同様に、本研究においても放射線防護効果が認められた。しかし、投与量や投与時期の条件を換え、更なる検討が必要だと考えられる。

4. 器官形成期の放射線照射によるTMGの胚細胞影響の量的な特徴

a. pyknosis(核濃縮細胞)の影響

pyknotic cellの発生数に対しても放射線照射前TMG投与による放射線防護効果が明らかにされた。また、2Gy放射線単独照射群に比べてTMG投与後に2Gy放射線した群においてはpyknotic cellの発生数が1/3にも減少が認められた。また、2Gy放射線照射後、TMGを投与した群においても減少が認められた。したがって、apoptosis発生数と同様にpyknotic cell発生数においても放射線防護効果が認められた。

本研究の結果、胚を構成する細胞数の減少は、pyknosisによる細胞数の減少だけでは説明できない。観察時点の細胞数の減少は、細胞周期の延長やpyknosis以外の細胞死、例えばnecrosisも関係しているものと考えられる。今後は、細胞の種類別のpyknosisやpyknosis以外の細胞死についての系統的な研究が必要とされる^{58),59)}。

b. apoptosisの影響

apoptosisの発生数に対しても放射線照射前TMG投与による放射線防護効果が明らかにされた。したがって、個体レベルの影響と同様にapoptosis発生数においても放射線防護効果が認められた。本研究の胚死亡、外表奇形および骨格奇形の結果、細胞レベルのapoptosisの実験の結果においても同様な結果が得られたので、各死亡に対しては臓器および組織が放射線により、 D_0 が高かったため、apoptosisの細胞死によるものと考えられる⁶⁰⁾。

c. micronuclei(小核)の影響

micronucleiの発生数に対しても放射線照射前TMG投与による放射線防護効果が明らかにされた。また、2Gy放射線単独照射群に比べてTMG投与後に2Gy放射線した群においてはmicronucleiの発生数が1/2にも減少が認められた。しかし、2Gy放射線照射後、TMGを投与しても放射線防護効果は、全く認められなかった。したがって、micronucleiの数の発生数に対しては、TMG投与後に2Gy放射線した群にのみ放射線防護効果が認められた⁶¹⁾。以上の細胞レベル実験の結果と個体レベルの結果の相関関係が明らかにされたので、放射線による損傷は、生体内に活性酸素のラジカルによって核酸、脂質、蛋白質の酸化的損傷によるビタミンEの抑制作用によるものと考えられる^{19),61)}。

本研究での受精192時間後の胚に照射した場合の奇形については、多様の奇形が誘発されている。この時期の奇形は、単一細胞ではなく複数の器官形成細胞の障害が関係しているのではないかと予想されるので、もし複数の細胞が関係した結果奇形が発生するとすればこの時期の奇形は確定的影響に区分され、しきい線量が存在することになる。これらのことにより、本研究では、胚死亡率と同様に放射線化学作用によるradical scavenger防止作用と抗酸化効果が

明らかにされた。したがって、奇形発生がある臓器および組織細胞の放射線のradical scavengerによるTMGの酸化効果を防止することにより、放射線防護することを本実験結果は示唆している^{54),62)}。

結 論

1. 着床前死亡と胚死亡

着床前死亡においてshamコントロール群とTMG + 2.0Gy群の胚死亡率とコントロール群の胚死亡率との間には統計学的な有意差は認められなかった。胚死亡率については2.0Gy群に比べ、2.0Gy + TMG群では胚死亡率が明らかに減少が認められた($p < 0.001$)。したがって、TMGには胚死亡に対する放射線防護効果があることが明らかとなった。

2. 外表奇形と骨格奇形

コントロール群とshamコントロール群に対し、全ての照射群において統計学的な有意差が認められた。しかし、奇形発生率からみると2.0Gy群と2.0Gy + TMG群では最も高かったが、TMG + 2.0Gy群では2/3以下に減少が認められた。また、骨格奇形についても奇形と同様の結果が得られた。

3. 胎児体重

コントロール群とshamコントロール群の体重に対し、2.0Gy群では雄雌の両方とも胎児体重減少の有意差が認められた($p < 0.001$)。しかし、コントロール群とshamコントロール群の体重に対し、TMG + 2.0Gy群では体重減少に有意な差は認められなかった。したがって、TMGには胎児体重減少に対する放射線防護効果があることが明らかにされた。

4. 核濃縮細胞(pyknosis), apoptosis, 小核(micronuclei)

細胞レベルについてもコントロール群とTMG + 2.0Gy群との間に統計学的な有意差は認められなかったが、他の各照射群では、コントロール群のそれに対して統計学的な有意差が認められた($p < 0.05$)。本研究の結果、TMG投与により、放射線照射に対して胚死亡、奇形発生そして胎児体重の放射線防護効果が明らかにされた。

謝辞

本研究の実験材料(TMG)を提供して下さった(株)シーシーアイ(株)村瀬博宣博士に厚く御礼申し上げます。

また、本稿の修正などについてご指導いただいた大分看護科学大学の草間朋子学長ならびに甲斐倫明教授に感謝いたします。さらに実験をお手伝いしてくれた三徳屋匠君にも感謝します。

文 献

- Russell LB, Russell WL: The effects of radiation on the preimplantation stages of the mouse embryo. *Anat Res* 108: 521, 1950
- Russell LB, Russell WL: An analysis of the changing radiation response of the developing mouse embryo. *J Cell Physiol* 43: 103-149, 1954
- Brent RL, Bolden BT: The indirect effect of irradiation on embryonic development. The contribution of ovarian irradiation, uterine irradiation, oviduct irradiation and zygote irradiation to fetal mortality and growth retardation in the rat. *Radiat Res* 30: 759-773, 1967
- Brent RL, Bolden BT: Indirect effect of irradiation on embryonic development. Lethal effects of maternal irradiation on first day of gestation in the rat. *Proc Soc Exptl Biol Med* 125: 709-712, 1967
- ICRP Publication (26): Recommendation of the international commission on radiological protection. *Annals of the ICRP* 1, 1977
- UNSCEAR: Ionizing radiation: Sources and effect. UNSCEAR 1986 Report to the general assembly with annexes United Nation, 1-89, 1977
- Welsch F: Pharmacokinetics in developmental toxicology: 2-methoxyethanol as a prototype chemical for teratogenicity studies at different stages of gestation. *CIIT. Activities* 15, 1, 1995
- Murase H, Moon JH, Yamauchi R, et al: Antioxidant activity of a novel vitamin E derivative, 2-(α -D-glucopyranosyl)methyl-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-6-ol. *Free Radical Biology & Medicine* 24: 217-225, 1998
- Murase H, Yamauchi R, Kato K, et al: Synthesis of a novel vitamin E derivative, 2-(α -D-glucopyranosyl)methyl-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-6-ol, by α -glucosidase-catalyzed transglycosylation. *Lipids* 32: 73-78, 1997
- Jacobsen L: Low dose embryonic X-irradiation in mice and some seasonal effects in the prenatal period. *Radiat Res* 25: 611-625, 1965
- Wilson J G: General principles and etiology. *Handbook Teratology Volume 1: Plenum Press*, 1979
- Wilson J G: Mechanisms and pathogenesis. *Handbook Teratology Volume 2: Plenum Press*, 1979
- Landner C: Prevention of the side effect of treatment of a radiation to the marrow transplantation. *Cancer Chemother Pharmacol* 25: 210-212, 1989
- Philipov P: Prevention of a side effect of treatment of a radiation against the brain tumor. *Zentralblatt fuer Neurochirurgie* 51: 45-46, 1990
- Riley PA: Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 65: 27-33, 1994
- Hall E J: Radiobiology for the radiologist. 12-73, 1994, J B Lippincott co. Philadelphia
- Freeman BA, Crapo JD: Biology of Disease. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412-426, 1982
- Konings AWT, Damen J, Trieling WB: Protection of liposomal lipid against radiation induced oxidative damage. *Int J Radiat Biol* 35: 343-350, 1979
- Sarma L, Kesaavan PC: Protective effects of vitamin C and E against γ -ray-induced chromosomal damage in mouse. *Int J Radiat Biol* 63: 759-764, 1993
- Odagiri Y, Karube T, Hatyama H, et al: Modification of the clastogenic activity of X-ray and 6-mercaptopurine in mice by prefeeding with vitamin C and E. *J Nutr* 122: 1553-1558, 1992
- El-Nahas SM, Mattar FE, Mohamed AA: Radioprotective effect of vitamin C and E. *Mutat Res* 301: 143-147, 1993
- Umegaki K, Itoh T, Ichikawa T: Effect of vitamin E on chromo-

- somal damage in bone marrow cells of mice having received low dose of X-ray irradiation. *Internat J Vit Nutr Res* 64: 249-252, 1994
- 23) Sies H: *Oxidative Stress, Oxidants and Antioxidants*, 115-127, 1991, Academic. Press London and New York
 - 24) 二木鋭雄, 島崎弘幸, 美濃 真 編: 抗酸化物質・フリーラジカルと生体防御. 1994, 学会出版センター, 東京
 - 25) Gotoh N, Noguchi N, Tsuchiya J, et al: Inhibition of oxidation of Low Density lipoprotein by vitamin E and related compounds. *Free Rad Res* 24: 123-134, 1996
 - 26) Herve A, Bacq ZM: Effect of cyanide on the lethal dose of X-rays. *Compt Rend Soc Biol* 143: 881-883, 1949
 - 27) Gu YH, Kai M, Kusama T: The embryonic and fetal effects in ICR mice irradiated in the various stages of the preimplantation period. *Radiat Res* 147: 735-740, 1997
 - 28) Muller WU, Streffer C, Pampfer S: The question of threshold doses for radiation damage: malformations induced by radiation exposure of unicellular or multicellular preimplantation stages of the mouse. *Radiat Environ Biophys* 33: 63-68, 1994
 - 29) Pampfer S, Streffer C: Prenatal death and malformation after irradiation of mouse zygotes with neutrons or X-rays. *Teratology* 37: 599-607, 1988
 - 30) Gu YH, Hasegawa T, Kusama T: The combined effects of Radiation and Ultrasound on ICR mouse embryos during Organogenesis stage. *Res Rep Suzuka Uni Med Sci Press* 5. No.1: 41-59, 1998
 - 31) Ohzu E, Makino S: Some abnormalities produced by low dose X-irradiations in early mouse embryos. *Proc Jap Acad* 40: 670-673, 1964
 - 32) Murakami U, Kameyama Y: Effects of low dose X-radiation on the mouse embryo. *AMAJ Diseases Children* 96: 272-277, 1958
 - 33) Duval C, Poelman MC: Effect of vitamin E and derivatives on free radicals generated by photoirradiated pheomelanin. *J Pharm Sci Jan* 84: 107-109, 1995
 - 34) Kitazawa M, Podda M, Thiele J, et al: Interactions between vitamin E homologues and ascorbate free radicals in murine skin homogenates irradiated with ultraviolet light. *Photochem Photobiol* Feb 65: 355-365, 1995
 - 35) Wayner DD, Burton GW, Ingold KU: The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta*, 924: 408-419, 1987
 - 36) Arad ID, Dgani Y, Eyal FG: Vitamin E and vitamin C plasma levels in premature infants following supplementation of vitamin C. *Int J Vitam Nutr Res* 55: 395-397, 1985
 - 37) Constantinescu A, Han D, Packer L: Vitamin E recycling in human erythrocyte membranes. *J Biol Chem* May 25, 268: 10906-10913, 1983
 - 38) Brent RL, Franklin JB: Uterine vascular clamping. A new procedure for the study of congenital malformations. *Science* 132: 89-91, 1960
 - 39) Fisher DL, Smithberg M: In vitro and in vivo X-irradiation of preimplantation mouse embryos. *Teratology* 7: 57-64, 1973
 - 40) Gu YH, Kusama T: Embryonic effects of radiation on ICR mice depending developmental stages. *J Kor Radi Tech* 18: 91-95, 1995
 - 41) Kusama T, Gu, YH: Combined effects of radiation and ultrasound on embryonic development in ICR mice. *J Radiat Res* 33: 67, 1992
 - 42) Muller WU, Streffer C: Lethal and teratogenic effects after exposure to X-rays at various times of early murine gestation. *Teratology* 42: 643-650, 1990
 - 43) Murakami U, Kameyama Y, Majima A: Radiation malformations belonging to the cyclopia-arrynencephalia-otocephalia group in the mouse fetus. *J Embryol Exptl Morphol* 10: 64-74, 1962
 - 44) Rana K, Sood A, Malhotra N: Radioprotection of chick thymus by vitamin E. *Indian J Exp Biol*, 31: 847-849, 1993
 - 45) Chernykh VP, Abramova LP, Boriak LI, et al: Radioprotective effect of a new pharmaceutical "glucosuccine". *Vopr Med Khim* 41: 28-30, 1995
 - 46) O'Connor MK, Malone JF, Moriarty M, Mulgrew SA: Radioprotective effect of vitamin C observed in Chinese hamster ovary cells. *Br J Radiol* 50: 587-591, 1995
 - 47) Miyazaki T, Hayakawa Y, Suzuki K, Suzuki M et al: Radioprotective effects of dimethyl sulfoxide in golden hamster embryo cells exposed to gamma rays at 77 K. I. Radical formation as studied by electron spin resonance. *Radiat Res* 124: 66-72, 1990
 - 48) Watanabe M, Suzuki M, Suzuki K, et al: Radioprotective effects of dimethyl sulfoxide in golden hamster embryo cells exposed to gamma rays at 77 K. II. Protection from lethal, chromosomal, and DNA damage. *Radiat Res* 124: 73-78, 1990
 - 49) Herve A, Bacq ZM: Thiocyanate, tocopherol, and X-rays. *Compt Rend Soc Biol* 143: 1158-1159, 1949
 - 50) Bacq ZM, Herve A: Protection of mice against a lethal dose of X-rays by cyanide, azide, and malononitrile. *Brit J Radiol* 24: 617-621, 1951
 - 51) Haley TJ, McCulloh EF, McCormick WG: Influence of water-soluble vitamin E on survival time in irradiated mice. *Science* 119: 126-127, 1954
 - 52) Ershoff BH, Steers CW: Antioxidants and survival time of mice exposed to multiple sublethal doses of X-irradiation. *Proc Soc Exptl Biol Med* 104: 274-276, 1960
 - 53) 具 然和: ICRマウスの胎児に対する放射線と超音波の共同効果に関する実験的検討. 東京大学医学部修士論文: 25-46, 1991
 - 54) Skreb N: Weight of rat embryos after X-ray irradiation. *Experientia* 19: 263-264, 1950
 - 55) Konermann G: Die wirkung fraktionierter rontgenbestrahlung waehrend der blastogenese, Organogenese und fetal periode auf die fruhe postnatale entwicklung der maus. *Strahlentherapie* 140: 561-572, 1970
 - 56) Kaluszyner A, Czerniak P, Bergmann ED: Thiazolidines and aminoalkyl thiosulfuric acids as protecting agents against ionizing radiation. *Radiat Res* 14: 23-28, 1961
 - 57) Petkau A, Chelack WS, Pleskach SD, et al: Radioprotection of mice by superoxide dismutase. *Biochem Biochys Res Commun* 65: 886-893, 1972
 - 58) Fonck K, Konings AW: The effect of vitamin E on cellular survival after X irradiation of lymphoma cells. *Br J Radiol* 51: 832-833, 1978
 - 59) Sakamoto K, Sakka M: Reduced effect of irradiation on normal and malignant cells irradiated in vivo in mice pretreated with vitamin E. *Br J Radiol* 46: 538-540, 1973
 - 60) Wang W, Yan M, Becker D, et al: The influence of hydration on the absolute yields of primary free radicals in gamma-irradiated DNA at 77 K. II. Individual radical yields. *Radiat Res* 137: 2-10, 1994
 - 61) Heddle JA, Carrano AV: The DNA content of micronuclei induced in bone marrow by gamma-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. *Mutation Research* 44: 63-69, 1977
 - 62) Konings AW, Damen J: Protection of liposomal lipid against radiation induced oxidative damage. *Int. J Radiat Biol* 35: 343-350, 1979