

---

## 放射線および化学物質の生殖細胞への曝露による子孫でのがん 奇形の発生と発生機構の研究

Induction of heritable tumors and anomalies in mice after parental exposure to radiation and chemicals

代表研究者	大阪大学医学部教授 Prof., Faculty of Medicine, Osaka Univ. Taisei NOMURA	野村大成
協同研究者	大阪大学医学部技官 Specialist, Faculty of Medicine, Osaka Univ. Haruko Ryo	梁治子
	佐保女子短大助教授 Assoc. Prof., Saho Womens Coll. Hiroko GOROH	後藤博子
	大阪大学医学部大学院生 Student, Faculty of Medicine, Osaka Univ. HIROO NAKAJIMA	中島裕夫

In order to know whether or not genetic changes in germ cells can induce tumors and malformations in the progeny produced from these cells, measurements have been made of dominant lethals, translocations, malformations, and tumors after parental exposure to X-rays and chemicals.

1. Significant numbers of tumors and anomalies were induced in  $F_1$  offspring after parental exposure of ICR mice to X-rays. The incidence of tumors (lung tumors, leukemias, ovarian tumors, etc.) in the offspring increased with increasing doses of X-rays. Postmeiotic stages were about twice as sensitive as gonial stages for tumor induction. Mature oocytes were resistant to low doses of X-rays up to 108 rad, but very sensitive to higher doses. Younger oocytes (8 to 21 days before ovulation) were more sensitive to X-rays for tumor induction in the offspring.

2. Parental treatment of ICR mice with urethane also induced significant numbers of tumors and anomalies in  $F_1$  offspring. Gonial stage was less sensitive than postmeiotic stages of male germ cells.

3. Tumors were induced in the offspring after paternal treatment of ICR mice with 4-nitroquinoline 1 oxide, but dominant lethals were not induced by 4-nitroquinoline 1-oxide and urethane.

4. Paternal exposure of different strains of mice (LT and N5) to X-rays similarly induced significant numbers of tumors (lung tumors, leukemias, etc.) in  $F_1$  offspring, indicating that our findings are not limited to the specific strain of mice.

5. Germ-line mutations causing lung tumors inherited to the next generations as a dominant trait with 40% penetrance.

---

### 研究目的

我々をとりまく環境には、無数の汚染物質が存在し、その生物毒性は種々の実験方法で検出さ

れ、人体に直接作用した時の危険性を警告している。もし、これらの物質に曝露された両親から生まれた子供にがんや奇形が発生するとしたら、し

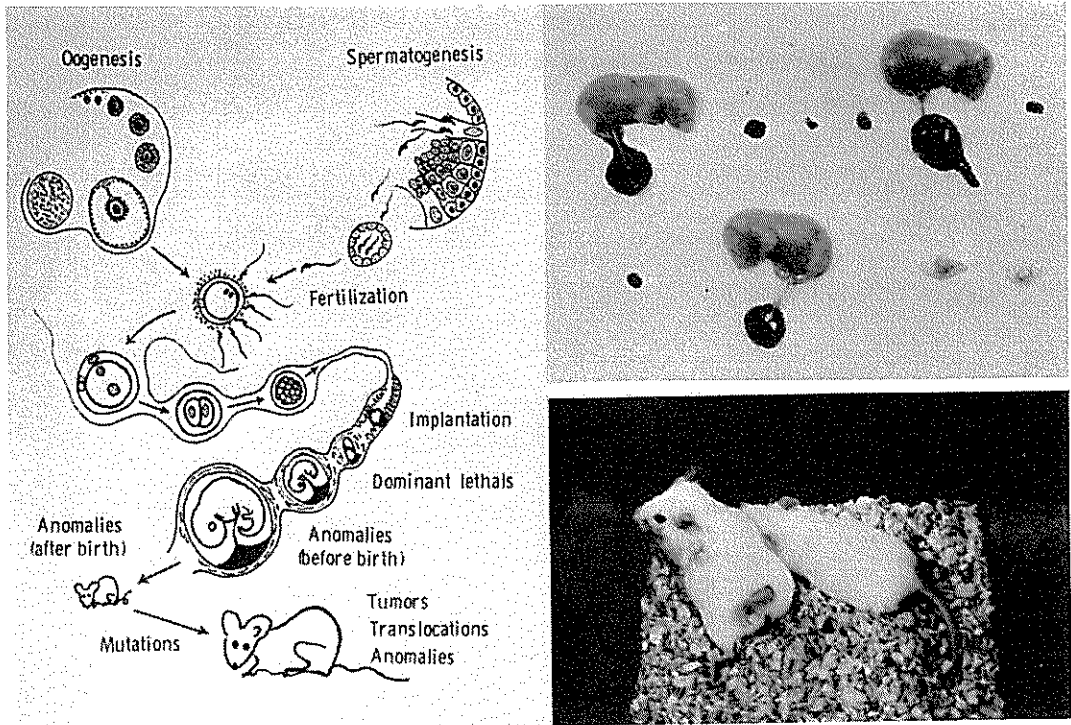


図 1. 実験方法と原理.

かも、それが子孫代々に伝わるとしたらどうであろう。放射線やいくつかの化学物質により、子孫に突然の変異を誘発することはよく研究されているのだが、がんや奇形については「まさか」と思われたためか、全く研究されなかった。代表研究者は、15年間にわたり、2万匹以上のマウスを使い、X線を雄または雌親にあてると、子孫にがんや奇形が高率に誘発されることを確認し、その疑いのあることを示した。環境有毒要因が生殖細胞に作用した時に、子孫にがん、奇形等の障害を誘発するとしたら、人類の未来にとって重要な問題となる。したがって、本研究では作用原として、放射線とともに数種の環境汚染物質を選び、(1) 精細胞、卵細胞の差と量効果、(2) 生殖細胞発生段階での差、(3) がん、奇形誘発因子の遺伝性およびそれを修飾する因子の3点に焦点をしばり、3年計画で実験を行ない、これらを明らかにすることを目的とする。

## 研究経過・成果

### 1. がん突然変異

#### (1) はじめに

ヒトに対する放射線や化学変異原の遺伝的影響の程度はヒトの疫学的資料では決定的証拠がないため、マウスの生殖細胞に放射線を与えたときの突然変異の頻度から推定されている。その推定のほとんどは、Russellによる毛色素に関する特定の遺伝子座での劣性変異の放射線による誘発の資料に基づいている。最近、野村は、がん好発の特性が被曝マウスの次代に現われ、それが優性に遺伝することを発見した。この優性の発がん性突然変異は、著しく高い頻度で生じるのが大きな特色である。

#### (2) 方法と原理

雄または、雌のマウスに、X線または化学変異原を作用させた後に、一定の間隔をおいて正常マウスと交配した。一定の間隔をおくことに、重要な意味がある。照射あるいは注射してすぐ交配す

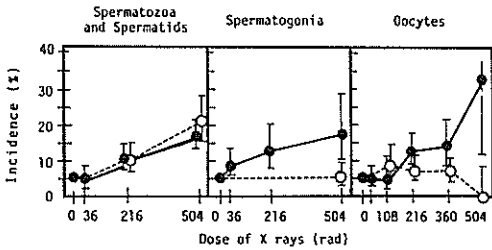


図 2. 父または母 ICR マウスへの X 線照射による F<sub>1</sub> での腫瘍発生. 実線は急照射 (72 rad/min) を, 破線は分割照射 (36 rad, 2 時間間隔) を示す.

ると精子期または卵細胞の成熟期が作用を受けたことになり, 雄マウスへの作用後交配までの間隔が長くなるほど, 精子細胞期, 精原細胞期の被曝ということになる (図 1)。

これら放射線又は化学変異原の作用を受けた性細胞に由来する次代の子について, 腫瘍が発生するかどうかを調べる。

### (3) 性細胞の発生段階での感受性の違い

雄 ICR マウスの成熟精子期 (交配の 1~7 日前), 精子細胞期 (交配の 15~21 日前) および精原細胞期 (交配の 64 日以上前) に X 線を照射し, 非照射の雌マウスと交配した。F<sub>1</sub> を生後 8 カ月で屠殺し, 腫瘍を検出した。その結果を, 図 2 に示した。誘発された腫瘍の約 90% は肺腫瘍であり, 他に卵巢腫瘍, リンパ性白血病などが発生している。照射線量としては, 成熟精子期, 精子細胞期および精原細胞期に 36, 216, または 504 rad の X 線を照射した。F<sub>1</sub> での腫瘍発生率は, 図 2 のように成熟精子期, および精子細胞期に照射した場合は, 直線的に増加し, 504 rad では約 30% の高値を示した。精原細胞期に照射した場合は, 精子期, 精子細胞期ほど, きれいな線量効果曲線は示さなかったが, F<sub>1</sub> の肺腫瘍発生率は線量とともに上昇している。しかし, 発生率は減数分裂終了後の精細胞の約 1/2 であり, 低い感受性を示した。

卵細胞に関しては, 排卵よりさかのぼること 4 週間以上たって正常雄と交配しても子供はできない。そこで, 排卵前 1~7 日の卵細胞に X 線を 36, 108, 216, 360, および 504 rad 照射した。

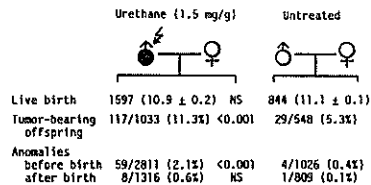


図 3. 父 ICR マウスへのウレタン投与による F<sub>1</sub> での奇形, 腫瘍発生.

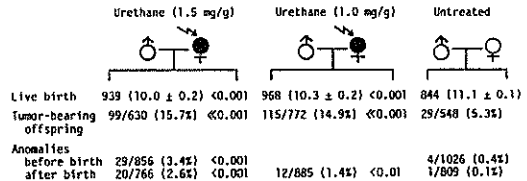


図 4. 母 ICR マウスへのウレタン投与による F<sub>1</sub> での奇形, 腫瘍発生.

F<sub>1</sub> での腫瘍発生率は図 2 に示したように 108 rad まで非照射の場合と差がなく, 成熟卵は X 線に対し, 抵抗性を示している。しかし, 200 rad を越えると急激に, 腫瘍発生率は上昇した。卵細胞はすべて低線量の X 線に抵抗性を示すのかというと, そうでもない。雌マウスに一定量 (216 rad) の X 線を急照射し, いろんな間隔で正常雄と交配してみた。もっと若い卵細胞 (排卵前 8~28 日) に照射すると, 極めて高頻度に, F<sub>1</sub> に腫瘍を誘発することがわかった。化学物質でも同じ結果が得られた。図 3, 4 に示したごとく, ウレタン (ethyl carbamate) をオスまたはメス ICR マウスに注射した場合にも F<sub>1</sub> に有意に高率に腫瘍が誘発された。

### (4) 性細胞の傷の修復能

F<sub>1</sub> での腫瘍発生を基準にして考えると, 精原細胞と成熟卵は何となく X 線に対し抵抗性を示しているようである。これはなぜなのかを知るために, X 線を少量ずつ分割して照射してみた。すなわち, 36 rad 照射して, 2 時間やすみ, また 36 rad 照射することを繰り返した。その結果は, 図 2 の破線に示した通りで, 1 回照射の場合の実線と比較してほしい。精子期, 精子細胞期では, 分割照射しても, 1 回照射の場合と腫瘍発生率に差はない。しかし, 精原細胞と成熟卵に分割照射した場合は, F<sub>1</sub> には腫瘍は誘発されなかった。すな

わち精原細胞, および成熟卵は, 少量の傷なら治してしまふことができるのと考えるのが妥当である。

劣性突然変異の放射線誘発に関しては, アメリカ・オークリッジ国立研究所の Russell らによる膨大な資料がある。また Ehling による優性遺伝の特性を示す骨格異常突然変異の研究もある。これらの突然変異とここで述べた「F<sub>1</sub>で腫瘍を発生する原因」の放射線による起こり方を比較してみる。

表 1 に示す通り性細胞の時期による発生感受性の差, および発生頻度に及ぼす分割効果の有無をみても「F<sub>1</sub>で腫瘍を発生する原因」と突然変異は, 極めて似ていることがわかる。以上の結果は, F<sub>1</sub>に腫瘍の発生をもたらした性細胞の変化は, 突然変異そのものであることを強く示唆している。では, どのようにそれを証明したらよいのだろうか。

(5) 肺腫瘍好発の特性は遺伝する

まず, 精子細胞期に X 線 504 rad を 1 回照射し, 正常雄と交配し, F<sub>1</sub> を作成する。F<sub>1</sub> には当然ながら高率に腫瘍が発生する。F<sub>1</sub> を屠殺する前

表 1. マウスでの放射線誘発腫瘍突然変異と通常  
の突然変異の比較.

	腫瘍	突然変異*
感受性		
精子と精子細胞	++++	++++
精原細胞	++	++
卵細胞	++++	+++
分割効果		
精子と精子細胞	-	-
精原細胞	+	+
卵細胞	+	+

\* 特定座位および優性骨格突然変異

表 2. X 線, 4NQO, およびウレタンにより, 次世代に誘発された肺腫瘍の遺伝性.

親 (F <sub>1</sub> ) の性質	次世代 (F <sub>2</sub> ) での肺腫瘍発生率 (%)		
	X 線	4NQO	Urethane
+ × -	15/76 (19.7)*	7/28 (25.0)**	4/19 (21.2)
- × -	4/69 (5.8)	5/103 (4.9)	9/113 (8.2)

\* P < 0.05. \*\* P < 0.01.

に, 無作為に雄, 雌を交配し, 前もって F<sub>2</sub> を作っておく。F<sub>2</sub> 作成後, その親である F<sub>1</sub> を解剖し肺腫瘍を持つかどうか調べた。F<sub>2</sub> をも解剖してみると, 親 (F<sub>1</sub>) のいずれかが肺腫瘍を持っている場合は, F<sub>2</sub> に高率に肺腫瘍が発生しているが, 親 (F<sub>1</sub>) のいずれもが肺腫瘍を持っていない場合は, F<sub>2</sub> の肺腫瘍の頻度は低く, 非照射の場合と有意の差がない (図 5)。これは, X 線のかわりにウレタンや 4NQO (4-nitroquinoline-1-oxide) を用いた時と同じ結果となった (表 2)。また, F<sub>2</sub> オスを正常なマウスと交配し, F<sub>3</sub> を観察した場合も, F<sub>2</sub> が肺腫瘍を持っている場合のみ, 有意に高率に (22.7%) 肺腫瘍が発生した。以上の結果から, 約 40% の浸透率で優性に遺伝していることがわかった。

本実験では, 肺腫瘍の遺伝性を検定したが, それには, 二つの理由がある。まず第 1 に, F<sub>1</sub> に誘発された腫瘍の 90% が肺腫瘍であり, 他のまれな腫瘍では, 数的にとても遺伝解析ができなかったこと。次に, マウス肺腫瘍はウィルス由来性およびホルモン依存性ではないとされ, 遺伝的な解析が容易であることである。

最近別の系統のマウスを使って実験をしてみたところ, 今度は白血病好発の特性を示す優性突然

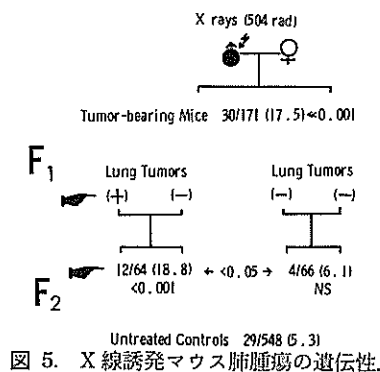


図 5. X 線誘発マウス肺腫瘍の遺伝性.

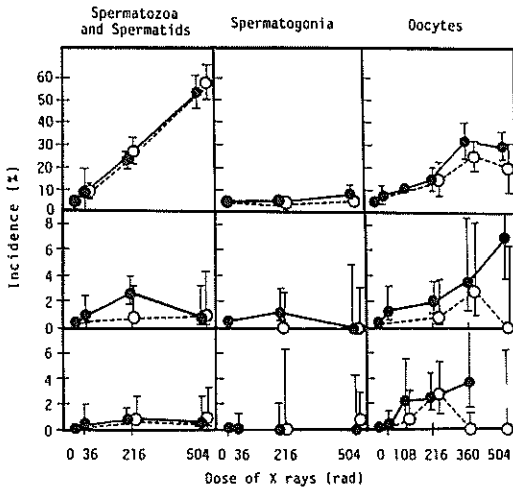


図 6. 父または母 ICR マウスへの X 線照射による F<sub>1</sub> での優性致死と奇形発生。  
 上段: 優性致死, 中段: 出生前奇形, 下段: 出生後奇形

変異が X 線を照射したマウスの性細胞に高頻度で起った。

## 2. 次世代での奇形

### (1) はじめに

病気の中で、何がいちばん怖いですかと母親にたずねると、奇形とがんという答えがいちばん多い。最近の国連レポートによると、少しでも遺伝的要因の関与している疾病が全疾病の 10.7% を占め、そのうち 40% 以上が先天異常である。

本節では、胎仔期に作用を受けたために起こる奇形ではなくて、放射線や化学変異原に曝露されたマウスの次世代に、親への曝露が原因で奇形が起こるといふ実験的証拠を示す。

### (2) 親の因果が子に伝わるか

発生異常という言葉で示されるように奇形は、個体発生過程の何処かで異常が起こったため、正常と異なった形態を示す結果に至ったものである。したがって、器官原基形成期（いわゆる奇形の危険期）に放射線や化学物質を作用させることにより高率に奇形を誘発することができる。では、父または母親が、放射線や化学物質の曝露を受けた時、子供に奇形が発生するであろうか。子供に奇形を誘発することができるなら、性細胞に起こったなんらかの変化が、次世代に伝わって、

奇形を造ったことになる。しかし、これは突然変異と同じ現象であるから、奇形検出のために膨大な数のマウスを必要とすると思われていた。しかし研究とは、やってみなくてはわからぬもので、あらゆる奇形を調べることにより、わずかの数のマウスで実験が可能となった。

### (3) 親マウスへの放射線照射による F<sub>1</sub> での奇形発生

図 6 に、精子および精子細胞期、精原細胞期、成熟卵期に、X 線を急照射あるいは分割照射した場合の F<sub>1</sub> での奇形（出産前および出産後）の線量効果曲線を示しておいた。誘発される奇形は、致死的なものとして口蓋破裂、小人症、外脳症、腹壁破裂など、生存可能なものとして、眼瞼開存、曲尾、小人症などがある。

奇形の場合は、精子、精子細胞期照射では、216 rad までは、照射線量とともに F<sub>1</sub> での奇形発生率は上昇しているが、504 rad 照射では、発生率の有意の上昇はみられない。この時期に大量照射すると図 6 に示すごとく、60% 近くの F<sub>1</sub> が死亡（優性致死）している。そのために生存 F<sub>1</sub> 中の奇形の発生率が見掛け上、下ったものと思われる。優性致死に近い変異が精細胞に生じ奇形誘発の原因となっているのかもしれない。精原細胞期照射により、F<sub>1</sub> に奇形が発生しにくいことは、これによっても説明できる。

精細胞照射と異なり、卵細胞照射により高率に F<sub>1</sub> に奇形が誘発され、線量効果も観察された（図 6）。奇形の発生率は、出生前に検出した方が、出生後に調べた場合より、はるかに高い。これは前述したように、誘発される奇形の大半は致死的なもので、出生直後に死亡してしまうからである。出生前に検出された奇形の倍加線量は、精子および精子細胞照射で約 12 rad、精気細胞では 27 rad、卵細胞照射では 19 rad である。

化学変異原では図 3, 4 に示すようにウレタンによっても F<sub>1</sub> に奇形が誘発されている。

この X 線による奇形誘発の結果を発表したところ、イギリスの著名な遺伝学者 M. F. Lyon 女史が、たいへん興味を持ち、まったく同じ方法で、まったく同一の X 線線量で、異なった系統のマ

表3. N5 父マウスへの X 線照射 (504 rad) による F<sub>1</sub> での腫瘍発生.

照射時期	腫瘍をもったマウス (%)	肺腫瘍 (%)	白血病 (%)
精原細胞	76/229 (33.2)*	48/229 (21.0)	9/229 (3.9)*
対照	56/244 (23.0)	35/244 (14.3)	1/244 (0.4)

\*  $P < 0.05$ .

表4. LT 父マウスへの X 線照射 (504 rad) による F<sub>1</sub> での腫瘍発生.

照射時期	腫瘍をもったマウス (%)	肺腫瘍 (%)
精子・精子細胞	16/75 (21.3)*	12/75 (16.0)*
対照	37/411 (9.0)	22/411 (5.4)

\*  $P < 0.01$ .

ウスを用い追試を行なった。その結果は、ICR マウスで行なった実験結果と一致した。このことにより、次世代での発がんの結果と合わせて、国連レポート (Nomura's finding) となった。しかし、次世代の発がんについては、まだ、欧米での追試は成功していない。

#### (4) 奇形の遺伝性

生殖細胞に放射線を作用させることにより、F<sub>1</sub> に誘発された奇形であるから、通常の突然変異のように、さらに次の世代にも遺伝していくかどうか非常に興味もたれる。しかし、誘発される奇形の大半が致死的なものであること、また生存可能な奇形でも、小人症などは、不妊の場合が多く、遺伝性を調べられる例は限られていた。生存可能な奇形のうち、最も多い奇形である尾の奇形と眼瞼開存についてかなりの例数を調べることができた。尾の奇形は、極めて不規則で、遺伝する場合としない場合が混在していた。眼瞼開存は、低い浸透率で遺伝することがわかった。このように次世代に現れる奇形は、通常の突然変異と同じように性細胞に変異原を作用させて誘発されるにもかかわらず不規則、かつ、不確実な遺伝性を示している。

#### 今後の課題

マウス個体に放射線を当てたときの肺腫瘍の発生の初発変化が体細胞の優性突然変異であるとすれば、その頻度はここで述べた「肺腫瘍を F<sub>1</sub> に発

生させる優性突然変異」の精子における誘発頻度とかなりよく一致する。しかし、このことは、肺腫瘍を好発する優性突然変異がなぜ普通の突然変異より著しく高いのかという疑問を残す。この点に関しては、一応の説明をすることができるが、未解決の問題が残っていることも認めねばならない。

しかし、最近、ICR 以外の 2 系統のマウスでも優性の発がん性突然変異を性細胞に誘発するのに成功したので、この現象は、一般的に起こるものと思われる (表 3, 4)。そうすると、この高頻度で起こる性細胞の突然変異は、放射線および環境有害物質のヒトへの危険度推定には極めて重要な問題を提供すると同時に、高感度遺伝障害検出法としての意味を持つことになる。

一方、次世代に誘発される奇形は、遺伝性が不明確であるにもかかわらず、重要な発見として、遺伝学者より評価されているのは、二つの理由がある。先ず第 1 に、奇形が、突然変異と同じように、放射線などにより次世代に誘発されることがわかったこと、そして、もう一つは、その頻度が高く、しかも短期に検出可能であり、数少ない遺伝障害の検出系の一つとして利用できることが挙げられる。

#### 発表論文

- 1) Nomura, T., Shibata, K., and Hata, S.: A Method to Detect Tumors and Presumed Somatic Mutations in Mice. *Cancer Letters*, 18, 131-135 (1983).
- 2) Nomura, T.: Comparative Inhibiting Effects of Methylxanthines on Urethan-induced Tumors, Malformations, and Presumed Somatic Mutations in Mice. *Cancer Res.*, 43, 1342-1346 (1983).
- 3) Nomura, T.: X-ray Induced Germ-line Mutation Leading to Tumors: Its Manifestation in Mice Given Urethane Post-natally. *Mutation Res.*, 121, 59-65 (1983).

- 4) Nomura, T., Enomoto, T., Shibata, K., Kanzaki, T., Tanaka, H., Hata, S., Kimura, S., Kusafuka, T., Sobue, K., Miyamoto, S., Nakano, H. and Gotho, H.: Antiteratogenic Effects of Tumor Inhibitors, Caffeine, Antipain, and Retinoic Acid in Mice. *Cancer Res.*, **43**, 5156-5162 (1983).
- 5) Nomura, T.: Induction of Persistent Hypersensitivity by *In Utero* X-radiation to Lung Tumorigenesis in Mice. *Environmental Mutagenesis*, **6**, 33-40 (1984).
- 6) Nomura, T., Isa, Y., Kurokawa, N., Kanzaki, T., Tanaka, H., Tada, E., and Sakamoto, Y.: Enhancement Effects of Barbitol on the Teratogenicity of Aminopyrine. *Toxicology*, **29**, 281-291 (1984).
- 7) Nomura, T., Kurokawa, N., Isa, Y., Sakamoto, Y., Kondo, S., and Endo, H.: Induction of Lymphoreticular Neoplasia and Malformations by Prenatal Treatment with 1,3-di(4-sulfamoylphenyl)-triazene in Mice. *Carcinogenesis*, **5**, 571-575 (1984).
- 8) Nomura, T., Kimura, S., Kanzaki, T., Tanaka, H., Shibata, K., Nakajima, H., Isa, Y., Kurokawa, N., Hatanaka, T., Kinuta, M., Masada, K., and Sakamoto, Y.: Induction of Tumors and Malformations in Mice after Prenatal Treatment with Some Antibiotic Drugs. *Med. J. Osaka Univ.*, **35**, 13-17 (1984).
- 9) Nomura, T.: Quantitative Studies on Mutagenesis, Teratogenesis and Carcinogenesis in Mice. In *Problems of Threshold in Chemical Mutagenesis* (Eds. Tazima, Y., Kondo, S., and Kuroda, Y.) pp. 27-34, The Environmental Mutagen Society of Japan, Shizuka, 1984.
- 10) Nomura, T.: High Sensitivity of Fertilized Eggs to Radiation and Chemicals in Mice; Comparison with that of Germ Cells and Embryos at Organogenesis. *Cong. Anomalies*, **24**, 329-337 (1984).
- 11) Nomura, T.: Further Studies on X-ray and Chemically Induced Germ-line Alterations Causing Tumors and Malformations in Mice. In *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals* (Ed. Ramel, C.), pp. 13-20, Alan R. Liss, New York, 1986.
- 12) 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, 「環境と人体Ⅱ, 環境変異原」(中馬一郎, 近藤宗平, 武部啓編) pp. 137-152, 東大出版会, 1983.
- 13) 野村大成: ウレタンによる体細胞突然変異と発癌, トキシコロジーフォーラム, **6**, 206-213 (1983).
- 14) 野村大成: 癌突然変異——癌の子供に教えられた泥臭い研究——, *Oncologia*, **9**, 68-77 (1984).
- 15) 野村大成: マウス突然変異の線量効果とリスク推定, 「放射線による遺伝的損傷とリスク——その生物学的アプローチ」 pp. 263-275, 科学技術庁放医研, 1984.
- 16) 野村大成: 発癌研究と実験動物, 「実験動物学への招待」(川俣順一編) pp. 167-174, 蟹書房, 1984.
- 17) 野村大成: 発癌因子の垂直伝達, 日本臨床, **42**, 1947-1955 (1984).
- 18) 野村大成: 発癌過程の垂直伝達, 「新しい発癌のメカニズムと評価」(林 祐造, 黒木登志夫編) pp. 218-225, サイアンスフォーラム社, 1984.
- 19) 柴田桂子, 野村大成: マウス初期胚の放射線高感受性, 放射線生物研究, **19**, 145-156 (1984).
- 20) 野村大成, 榎本隆之: 受精直後の卵発生障害と環境因子, 産婦人科の世界, **37**, 45-51 (1985).
- 21) 塩田浩平, 野村大成, 御子柴克彦: 座談会: 発生分化とその異常——細胞から個体へ, 実験医学, **3**, 15-27 (1985).
- 22) 野村大成: 奇形の継世代的伝達, 実験医学, **3**, 50-54 (1985).
- 23) 野村大成: 遺伝性変異をもった好発癌性マウス, 「癌'85」 「代謝特集号」, pp. 175-180, 1985.
- 24) 野村大成, 中島裕夫: マウス突然変異の研究, 放射線科学, **28**, 231-236 (1985).
- 25) 近藤宗平, 野村大成, 福永昭広, 梁 治子: 個体発生期の X 線被ばくによる体細胞突然変異と細胞交代型修復, 放射線生物研究, **20**, 243-257 (1985).
- 26) 野村大成: 個体発生期の DNA 損傷と発がん, 病態生理, **4**, 957-961 (1985).