

## 腸障害を指標とした環境要因複合効果の定量的研究

Combined effects of environmental factors on mouse intestine

代表研究者 東邦大学医学部教授 代谷次夫  
Prof., School of Medicine, Toho Univ.  
Tsugio SHIROYA

協同研究者 東京大学アイソトープ総合センター助教授 井尻憲一  
Assoc. Prof., Radioisotope Center, Tokyo Univ.  
Kenichi IJIRI

In the small intestine, the proliferative unit is a structure called 'crypt' where stem cells are situated. We have studied the combined effects of chemicals and radiations on these stem cells in the crypts, especially on their reproductive death and acute death (apoptosis).

1) HU (hydroxyurea) was singly administered intraperitoneally to mice (C57BL/6), and the time-course of the appearance of regenerating foci (microcolony) were examined. HU, given 10 mg/mouse, could not reduce crypt survival at all. A single administration of gamma-rays was also performed, and the time-course changes in crypt survival were studied.

2) HU and gamma-rays were given almost at the same time. HU was given at the dose of 10 mg/mouse, and gamma-ray doses ranging between 10-16 Gy were used (HU+ $\gamma$ -ray). When compared with ( $\gamma$ -ray alone) data, the (HU+ $\gamma$ -ray) data showed a further decrease in the crypt survival, though (HU alone) did not decrease survival at all. Combination of ACT (actinomycin D) and gamma-rays also showed a similar relationship.

3) Combined effects of ADR (adriamycin) and gamma-rays were studied. A single injection of ADR, or a single administration of gamma-rays reduced crypt survival. When they were given at the same time, it was found they act additively.

4) VCR (vincristine) and gamma-rays were given either at the same time (VCR+ $\gamma$ -ray) or 6 h apart (VCR+6 h+ $\gamma$ -ray). These two types of administration showed a difference in time for the regeneration process of crypt structure. The cell position analysis for acute cell death (apoptosis) could explain the difference.

### 研究目的

環境には多くの化学的、物理的要因が存在し、生体には絶えず複数の要因が同時に、あるいはある時間において影響を及ぼしている。したがって環境汚染の影響を理解するには、これら要因の複合効果の機構解明が必要である。

哺乳類の小腸上皮は構成細胞が絶えず再生して、その機能を維持しており、放射線や化学物質に敏感な系の一つである。その増殖単位であるクリプトという構造には幹細胞 (stem cell) が存在し、小腸上皮のすべての細胞群の大もととなっている。マウス小腸クリプトにおける幹細胞の細胞

死 (増殖死および急性死) を指標として複合効果を捉え、その機構を調べることが本研究の目的である。

### 研究経過

A. クリプト生存率を指標とした複合効果 (同時投与)

1. 単独投与によるクリプト幹細胞の増殖死  
複合効果の実験条件設定の目的で、まず単独投与の時間経過を調べた。単独投与後、時間を追って小腸断面におけるクリプトを数えた。ヒドロキシウレア (hydroxyurea; HU) をマウス (C57BL/6) に1匹当たり 10 mg の量で腹腔内投与した。

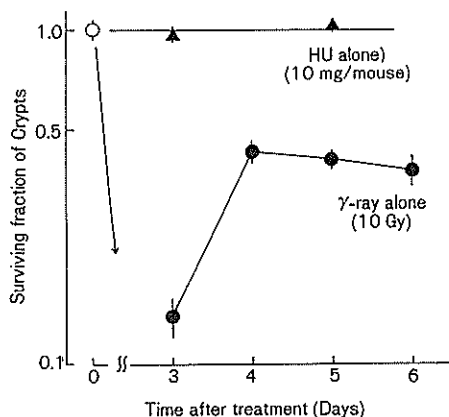


図1. ヒドロキシウレア (HU) の単独投与とガンマ線の単独照射によるクリプトの生存率の時間経過。

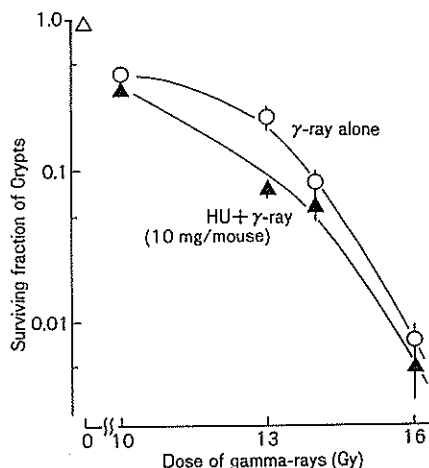


図2. ヒドロキシウレア (HU) とガンマ線 (γ-ray) の複合効果, およびガンマ線単独照射の線量-生存率曲線の比較. 横軸はガンマ線の線量 (Gy).

投与後3日, 5日でクリプト生存率に全く減少はなかった (図1)。また, ガンマ線の単独照射の時間経過から, 以下の複合効果の実験では, 4日でクリプト生存率を調べることに決定した。

## 2. HU とガンマ線の複合効果

HU 10 mg をマウスに腹腔内投与し, 投与後20分以内にガンマ線照射を終了した。ガンマ線線量としては10-16 Gyを用い, 照射後4日におけるガンマ線の線量-クリプト生存率曲線を得た (HU+γ-ray)。HUの代わりに生理食塩水 0.2 ml を投与し, 同様にガンマ線照射を行いクリプト生存率を求めた (γ-ray 単独)。上記1.のようにHU 単独では全くクリプト数が減少しなかったが, HU+γ-ray ではγ-ray 単独に比べて, さらなる減少が各ガンマ線線量において認められた (図2)。

## 3. ガンマ線と ACT の複合効果

同様な方法で, アクチノマイシン D (actinomycin D; ACT) とガンマ線との同時投与による複合効果を調べた。まず, ACTのみではクリプト生存率は無投与群と変わりなく, ACTもHUと同じく, 単独ではクリプト幹細胞群を消失できないことがわかった。ガンマ線単独の投与でクリプト生存率は低下するが, 本来単独では影響のないACTとの複合投与 (同時投与) で, 生存率は一段と低下した。つまり, ガンマ線による細胞

致死効果がACTの存在で修飾され, より効果的にクリプト幹細胞を死亡させることが判明した。これは加算的ではなく, HUの場合と同じく修飾的な効果である。

## 4. ガンマ線と ADR の複合効果

上記2.や3.の結果から, HUやACTと, ガンマ線とでは標的細胞集団は異なっていると考えられる。そこで, ガンマ線と類似作用があると考えられるアドリアマイシン (adriamycin; ADR) とガンマ線の複合効果を調べた。まず, ADRをマウス当たり0.2~0.6 mg 腹腔内投与し, クリプト生存率を調べた (ADR 単独)。同様にADR投与後20分以内にガンマ線10 Gyの全身照射を終了し, クリプト生存率を調べた (γ-ray + ADR)。ADRもガンマ線 (上記2.) も単独でクリプト数を減少させる。投与したADRの量に対してクリプト生存率 (対数目盛) を表すと, ADR 単独は一定の傾きをもつ直線になった。同様にADR量に対してクリプト生存率を表すと, γ-ray + ADRも同様な傾きの直線となった (図3)。二直線はほぼ平行であり, その間隔はγ-ray (10 Gy) 単独によって減少したクリプト分に相当する。このことは, ガンマ線とADRは全く単純な加算として働くことを示している。

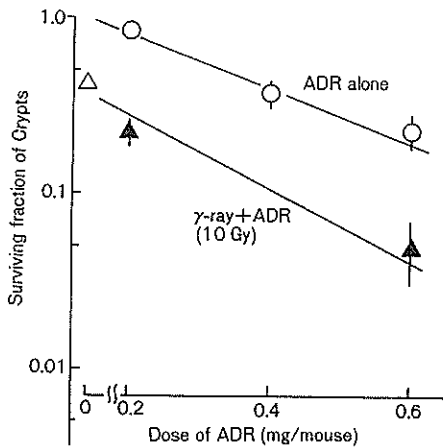


図3. ガンマ線(γ-ray)とアドリアマイシン(ADR)の複合効果, およびアドリアマイシン単独投与の線量-生存率曲線の比較. 横軸はアドリアマイシンの投与量.

#### B. クリプト回復過程および急性細胞死を指標とした複合効果 (時間的複合効果)

ガンマ線の効果を修飾するHUと似通った作用をもつ物質として, 分裂阻害剤ビンクリスチン(VCR)がある。そこでガンマ線, VCRを用い, その投与間隔による複合効果を調べた。

##### 1. 単独投与

ガンマ線(9 Gy)照射後, クリプトの細胞数(クリプト縦断面当たりでカウントした細胞数)は一旦急激に減少するが, やがて細胞数は回復し始め, 数日後には逆に過剰(オーバーシュート)となり, 照射後5日ごろには元の細胞数に戻る(Ijiri and Potten, 1984)。VCRを単独投与し, クリプトの回復過程を追った結果は大まかには似た過程であるが, ガンマ線(5 Gy)とVCR(0.01 mg/mouse)ではオーバーシュートの時期および回復パターンが微妙に違っていた。ガンマ線照射では2.5日後に, そしてVCR投与では投与直後の減少からの立ち上がりより急で, 2日後には既にオーバーシュートしてしまっていた。この違いは, クリプト内では急性細胞死の出現する位置がガンマ線照射とVCRでは違うという以下のデータから説明できる。

マウス小腸断面の組織切片を作製し, クリプト縦断面において, その底部より上方に向かって細

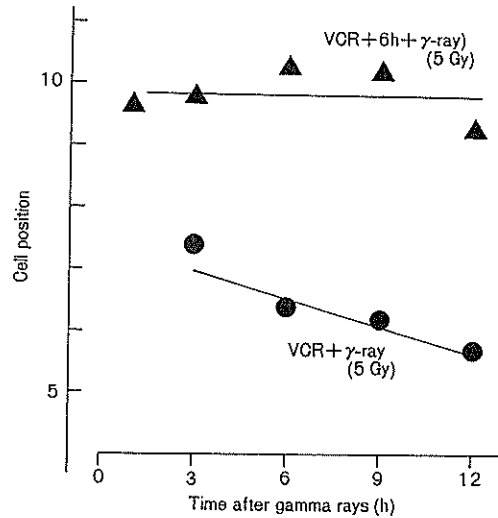


図4. クリプト内の細胞死出現位置 (cell position, 縦軸) に及ぼすビンクリスチン(VCR)とガンマ線による時間的複合効果の影響. 横軸はガンマ線照射後の時間経過を示す.

胞に1から順に番号 (cell position) をつける。各処理を行った後, クリプト縦断面において, 急性細胞死の出現する位置を記録した。結果は, ガンマ線はクリプトの比較的底部に近い位置, つまり cell position 5-6 付近, VCR投与は cell position 9-10 付近に細胞死のピークがみられた(Ijiri and Potten, 1987)。一般に, 最も分裂を盛んにする位置が, この cell position 9-10 である。VCR処理により, この部分の細胞群が死亡し, その細胞死がシグナルとなり (あるいは, そこに細胞が存在しないことがシグナルとなり), 周りの細胞が盛んに分裂を開始し, クリプトの回復が起こり, 照射後2日でオーバーシュートを示す。ガンマ線照射の場合は, 比較的底部に近い位置で細胞死そしてそのシグナルによる分裂が起こる。しかし, 一般にこの位置では分裂周期は長く, 分裂頻度も低い。この分だけクリプトの回復過程に時間がかかる。このような理由で, オーバーシュートは少し遅れ, 2.5日後に起こると考えられる。

##### 2. 時間的複合効果

VCRとガンマ線(5 Gy)を同時投与した場合(VCR+γ-ray)と, VCR投与後6時間して同じ線量のガンマ線を照射した場合(VCR+6h+γ-ray)

とでは、クリプトの細胞数の回復パターンが違う。前者（同時投与）では回復過程が遅く、オーバーシュートは2.5日でおこるのに対し、後者（VCR+6h+ $\gamma$ -ray）では回復は早く、2日にオーバーシュートがみられる。つまり、同時投与（VCR+ $\gamma$ -ray）だとクリプト細胞数の回復過程がガンマ線を単独投与した場合と類似しており、時間間隔をおいた複合投与（VCR+6h+ $\gamma$ -ray）だとVCR単独投与の場合と類似している。

この現象を解析するために、急性細胞死がクリプトに出現する位置でもって二つの投与法を比較してみた。各々の処理を行った後、クリプト縦断面において急性細胞死の出現する位置を記録し、その最もよく出現するピーク位置を求めた。同時投与（VCR+ $\gamma$ -ray）では細胞死は比較的低い位置（cell position 5-6）に出現する。これは、ガンマ線単独の場合に細胞死が出現する位置と類似している。一方、時間的複合投与（VCR+6h+ $\gamma$ -ray）ではcell position 9-10に細胞死を生じた（図4）。これはVCRを単独投与した場合の細胞死出現のピーク位置と一致している。

このように、複合投与の投与間隔によって影響がガンマ線タイプになったり、VCRタイプになったりする。そして、これは細胞死の出現位置から説明できることが分かった。

#### 今後の課題と発展

これまでに同時投与と時間的複合投与について研究したが、時間的複合効果はまだまだ分からないことが多く、今後の重要な研究課題である。トリチウム水によるベータ線照射の影響や発癌剤による影響およびそれらの複合効果の研究も手掛け、成果を得ているが、今後も研究を続けて行く。

#### 発表論文

- 1) Ijiri, K. and Shiroya, T.: Tritium-induced cell death in the intestinal epithelium of the mouse. In 'Proceedings of the Second Workshop on Tritium Radiobiology and Health

- Physics' (H. Matsudaira et al., eds.). NIRS, Chiba, NIRS-M-52, pp. 233-245 (1985).
- 2) Ijiri, K., Morikawa, N. and Shiroya, T.: Cell death induced by tritiated water in mouse intestine studied in a new tritium safety clean cabinet. *Radiat. Prot. Dosim.*, **16**, 169-172 (1986).
- 3) Ijiri, K. and Potten, C. S.: Radiation-hypersensitive cells in small intestinal crypts; their relationships to clonogenic cells. *Br. J. Cancer*, **53**, Suppl. VII, 20-22 (1986).
- 4) Ijiri, K. and Potten, C. S.: Further studies on the response of intestinal crypt of different hierarchical status to eighteen different cytotoxic agents. *Br. J. Cancer*, **55**, 113-123 (1987).
- 5) Ijiri, K. and Potten, C. S.: Cell death in cell hierarchies in adult mammalian tissues. In 'Perspectives on Mammalian Cell Death' (C. S. Potten, ed.) Chapter 13, Oxford Univ. Press, pp. 326-356 (1987).
- 6) Ijiri, K. and Potten, C. S.: Circadian rhythms in the incidence of apoptotic cells and number of clonogenic cells in intestinal crypts after radiation using normal and reversed light conditions. *Int. J. Radiat. Biol.*, **53**, 717-727 (1988).
- 7) Ijiri, K.: Cell death induced in mouse intestine by tritiated water, tritiated thymidine and gamma rays. In 'Proceedings of the Third Japan-US Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics' (S. Okada, ed.). Inst. Plasma Physics, Nagoya Univ., IPPJ-REV-3, pp. 217-222 (1989).
- 8) Morikawa, N., Ijiri, K., Shiroya, T., Okada, S., Nakamura, N., Ohno M. and Nogawa, N.: Safe-handling of tritiated water—hood, monitoring and inventory—. In 'Proceedings of the Third Japan-US Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics' (S. Okada, ed.). Inst. Plasma Physics, Nagoya Univ., IPPJ-REV-3, pp. 129-136 (1989).
- 9) Ijiri, K.: Apoptosis (cell death) induced in mouse bowel by 1,2-dimethylhydrazine methylazoxymethanol acetate, and  $\gamma$ -rays. *Cancer Res.*, **49**, 6342-6346 (1989).
- 10) 江口星雄・小佐古敏荘・井尻憲一・田野茂光・嶋 昭絃・代谷次夫: 実効半減期可変型 $\gamma$ 線照射装置とその線量分布特性. *Radioisotopes*, **37**, 568-571 (1988).