

高分圧酸素の催奇性および染色体異常誘発性について

湯 佐 祚 子*

はじめに

酸素毒性については臨床的に Paul Bert 効果, Lorrain-Smith 効果がよく知られ, また未熟児における retrolental fibroplasia, 溶血性貧血などが問題となっている。病理変化は肺, 眼のみならず他の組織への影響が考えられ, 動物実験では他の広範囲組織においても病理変化が明かになっている。Nuclear structure level の変化は *in vitro* のみならず *in vivo* でも報告され, 対象も microorganism, 植物から高等動物にわたっている¹⁾。

一方, genetic effect として突然変異および染色体異常誘発性が植物において報告されており²⁾³⁾, より高等動物での変化が予想されるが報告を見ていない。また, 催奇性については hamster での報告を見るのみである⁴⁾。よって高分圧酸素の催奇性および染色体におよぼす影響を見るため, マウスを対象として高気圧酸素 (以下 OHP) 条件下で実験を行い検討した。

1. 方法

実験に先だち, 対象の 6~12 週齢, ICR 系マウスの急性酸素中毒に対する LD₅₀ を各群 10 匹として OHP の条件を変化させ求めた。すなわち 100% O₂ 吸入, 絶対気圧 (ATA : O₂) を 2~5, OHP 中の時間を 1~4 時間に変化させて求めた。実験を行った高気圧酸素環境は, マウスを収容したケージを密閉し, 100% O₂ を給湿器を通して流入口より入れ, 対側の流出口より出し, ケージ内 O₂ 濃度が一定になるよ

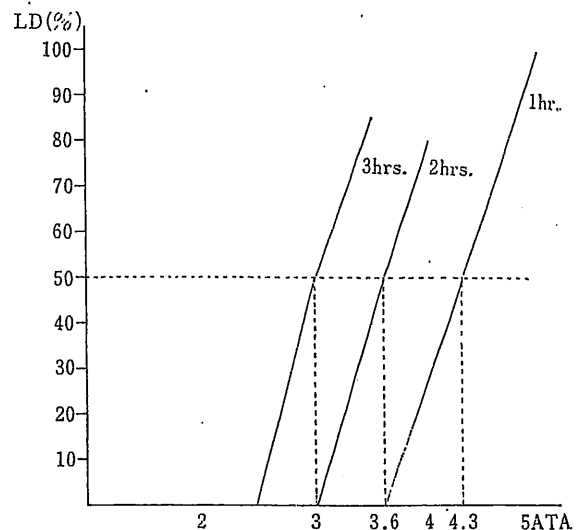


図 1 Effect of OHP (100% O₂) on LD in mouse

うに O₂ 流量を定めたのちこのケージを第二種高気圧タンク⁵⁾ 内に入れ空気加圧を行って設備した。LD₅₀ は図 1 に示すごとくであり, 5 ATA : O₂ では 1 時間で LD₁₀₀ となり, 2 ATA : O₂ では 4 時間後も全マウスに異常がなかった。以下の実験は LD₀ と考えられる条件下で行った。

実験 (1) : 雌マウスを 4 群にわけ, 膣栓発見日を妊娠 0 日と起算し, 妊娠 7 または 8 日目に 2 ATA : O₂, 1 時間の OHP に 2 群を, 他の 2 群は妊娠 5 または 8 日目に 2.5 ATA : O₂, 2 時間の OHP に各群 1 回暴露した。

実験 (2) : 雌マウス 6 群で 3 群はおのおの 2, 3 または 3.5 ATA : O₂, 1 時間の OHP に, 他の 3 群は同気圧で空気吸入 1 時間を妊娠 0 日より 8 日目まで連日 1 日 1 回施行した。

以上の実験 (1), (2) 対象マウスより出生した新生仔の外表奇形, 出生数, 流産を含む 4

* 琉球大学保健学部附属病院麻酔科

表1 Effect of OHP (100% O₂) on gestation in mouse
Newborn mortality and congenital malformation

Condition of OHP	Day of Gestation Treated	Mother (No.)		Newborn (No.)		Death Rate(%)	Newborn(No.) Malformed
		Treated	Surviving	Birth	Surviving		
Control		58	58	633	602	4.9	0
2.0 ATA, 1 hr.	7	3	3	31	29	6.5	0
	8	4	4	49	45	8.2	0
2.5 ATA, 2 hr.	5	3	3	26	26	—	1
	8	4	4	42	40	4.8	7

週までの死亡数および発育の観察を行い、われわれの飼育室での対照群と比較した。また実験(2)の連日暴露群での新生仔について、骨髄細胞の染色検査を骨髄2時間培養法で行った(培養液はTC-199 80%と仔牛血清20%にコルセミド—deacetylmethyl colchicine—0.2 μg/mlを加え、pH 7.2に調製したものを使用し、37°Cで2時間培養)。

実験(3)：8週齢雄マウス4群で、1群を対照とし、他群をおのおの2, 3および4 ATA:O₂, 1時間のOHPに1回暴露し、22時間後にコルセミド1mg/kgを腹腔内に注射し、24時間後に大腿骨骨髄細胞を採取し染色体検査を行った。

染色体標本は培養後、遠沈(1,000rpm, 5分間)、低張液処理、Carnoy固定液処理を行ったのち空気乾燥法で作成し、磷酸緩衝液pH 6.4でギムザ染色を行った。

染色体異常の分析はよく展開した染色体の顕微鏡写真を作成し、数的異常を分析し、これを参考にしながら構造的異常の分析を行った。特に構造的異常は顕微鏡下で判定を行い、染色体型の切断およびギャップ(chromosome-type breaks and gaps)および染色分体型の切断およびギャップ(chromatid-type breaks and gaps)を記録した。有意差はχ²-testにて判定した。

2. 結果

実験(1)の結果は表1に示すごとくであった。新生仔の死亡率は各群ともわれわれの飼育室で出生する新生仔の死亡率4.9%に較べ有意差はなかったが、2.5 ATA:O₂, 2時間の

OHP暴露群に臍帯ヘルニア、尾椎異常の奇形が発現した。また発育遅延は飼育室内で出生する新生仔に較べ、OHPを行ったマウスより出生する新生仔に多く見られた。

実験(2)の結果は表2に示すごとくであった。同上の奇形が100% O₂吸入群にのみ発現し、死亡率も対照率および同気圧空気吸入群より高率となった。新生仔骨髄細胞の染色体検査では表2下方に示すごとく、3 ATA:O₂群1匹に数的異常を見たが他はすべて40で正常であり、構造異常も見られなかった。

実験(3)の結果は表3に示すごとくであった。各群150細胞の検査において染色体異常を持つ細胞の発現頻度は、3 ATA:O₂群、4 ATA:O₂群で有意に増加した。また染色体型異常はOHPの圧上昇とともに増加し、主にgapの増加であった。染色分体型異常は3 ATA:O₂群でbreakが有意の増加を示した。しかし他の交換型の異常は観察されなかった(図2)。

3. 考案

Genetic effectとしての高気圧酸素の催奇性については、Ferm⁴⁾が妊娠初期(6~8日目)のgolden hamsterを4 ATA:O₂, 2時間のOHPに暴露した時に重症congenital malformation(umbilical hernia, exencephaly, hare-lip, spina bifida, peculiar hypoplasia of the lower extremities)の発現があったと報告しているが、このOHP条件はhamsterに急性酸素中毒を起させる条件である。今回の実験(1)(2)では急性酸素中毒の発現をみない条件であるが、妊娠初期

表 2 Effect of OHP (1 hr.) on gestation in mouse
Newborn mortality and congenital malformation

Day of Gestation Treated	Condition of OHP		Mother (No.)		Newborn (No.)		Death Rate(%)	Newborn(No.) Malformed
	ATA		Treated	Surviving	Birth	Surviving		
Control			58	58	633	602	4.9	0
0~8	Air	2.0	2	2	29	24	17.2	0
	〃	3.0	4	4	49	44	10.2	0
	〃	3.5	3	3	31	28	9.7	0
	100% O ₂	2.0	7	7	58	39	32.8	1
	〃	3.0	4	4	33	28	15.2	3
	〃	3.5	3	3	24	20	16.7	2

Cytogenetic analysis of newborn mouse

Day of Gestation Treated	Condition of OHP		No. of Mouse Used	No. of Newborn Analyzed	No. of Cell Studied	Numerical Cell Distribution		
						≤39	40	41≤
Control			8	50	1,321	0	50	0
0~8	Air	2.0	2	24	420	0	24	0
	〃	3.0	4	20	352	0	20	0
	〃	3.5	3	24	446	0	24	0
	100% O ₂	2.0	7	34	651	0	34	0
	〃	3.0	3	28	590	1	27	0
	〃	3.5	3	20	383	0	20	0

表 3 Effect of OHP on chromosome of mouse bone marrow (100% O₂, 1 hr.)

ATA	No. of Cell Studied	Cell with Aberration		No. of Aberration per Cell			
		No.	%	Chromosome-type		Chromatid-type	
				Break	Gap	Break	Gap
Control	150	2	1.3	0	0	0.007	0.013
2.0	150	4	2.7	0	0.007	0.007	0.020
3.0	150	12	8.0*	0	0.027	0.047*	0.053
4.0	150	10	6.7*	0.007	0.053	0.033	0.027

5 mice were used in each group

* significant at $p < 0.05$

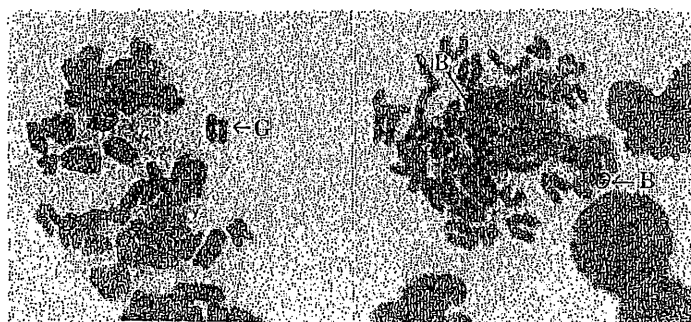


図 2 実験 (3) でみられた cell with aberration (G=Gap, B=Break)

の OHP で軽度ではあるが外表奇形が発現し、OHP の催奇性を示唆していると考え。OHP の催奇性については、高分圧酸素の作用、すなわち maternal hyperoxia による組織酸素分圧上昇およびこれに伴う生理的、生化学的変化による作用と、hyperbaric 条件下では圧による影響が考えられる。今回の妊娠初期連続 OHP 暴露実験(2)で空気吸入群に比し O₂ 吸入群にのみ奇形が出現していることや、高分圧酸素条件下(1 ATA: O₂)では chicken embryo の発育が抑制されると Allen⁶⁾ らが報告していることから、高分圧酸素による影響と考える。しかし空気加圧の場合でも新生仔に発育遅延が見られ、空気加圧でも酸素分圧は上昇するとはいえ、加圧の影響も加味されていると思われる。

染色体については Conger²⁾ らが plant *Tradescantia* (dry pollen grains, microspores) で染色体異常が酸素分圧上昇に比例して増加すると報告している。また Fenn⁷⁾ らは *E. coli* において 6~10 ATA: O₂, 16 時間の OHP 下で mutation の増加することを、Berg³⁾ らは barley seed で高分圧酸素下(500, 1, 250, 2, 000 mmHg)で mutation と chromosome aberration が酸素分圧上昇とともに増加すると報告している。

In vitro (組織培養)においては 1 ATA: 95% O₂ が cell division の抑制や、DNA, RNA および蛋白合成の阻害を起すことを Brosemer⁸⁾ らは AH cell において、Rueckert⁹⁾ らは HeLa cell において示し、また Drew¹⁰⁾ らも HeLa S3 cell で DNA 合成阻害を報告している。これら 1 ATA: O₂ 条件下のみでなく Wittner¹¹⁾ らは 720~4,500 mmHg の高分圧酸素条件下の HeLa cell において ribosomal RNA 合成阻害があると報告している。これら in vitro 実験のみならず in vivo においても mitosis の抑制があることを Perrins¹²⁾ らは pig rectal mucosa においてみているし、Grave¹³⁾ らは 1 ATA: 70~80% O₂ 条件下で DNA, RNA および蛋白合成阻害を newborn rat の脳でみている。

これら報告はいずれも Grave らの報告以外 radiation 効果との類似性をあげている。DNA, RNA は染色体構成成分であり、放射線による染色体異常はよく知られ、成因は DNA 鎖への直接作用を主としていることから¹⁴⁾¹⁵⁾、染色体異常の成因として染色体構造 DNA 鎖に対する損傷が考えられている。また放射線により DNA に break を生ぜしめ、酸素を加えると DNA break の増加があるとの報告や¹⁶⁾¹⁷⁾、酸素の存在により細胞破壊の放射線量が少くなるとも報告され¹⁸⁾、高分圧酸素による free radical 形成が原因と推察されている。また Gerschman¹⁹⁾ らも酸素中毒と放射線の類似性として染色体異常誘発性をあげている。しかし、高分圧酸素の高等動物 in vivo での染色体異常の報告は見あたらない。今回の実験(3)でマウス骨髄細胞の染色体異常が 3, 4 ATA: O₂ で有意の増加を示したことは、酸素分圧の測定を行っていないので高分圧酸素の程度は明かではないが、in vivo でも高分圧酸素が染色体に対し影響をおよぼすことを示唆していると考え。

細胞 level での変化は、短時間では reversible⁸⁾¹¹⁾²⁰⁾ であるとの報告や、今回の実験での染色体異常は主に gap と break であり他の交換型の異常は見られず、また新生仔の染色体には変化をみていない。しかし染色体異常誘発性、突然変異性、催奇性は互に関連性があるとされていることから²¹⁾²²⁾、染色体異常からの突然変異および催奇性も推察される。

今回の実験は妊娠初期および短期暴露実験であり、2 ATA: O₂ では催奇性および染色体異常に有意の変化を認めなかったが、胎児染色体の影響、より長期暴露などの検討が必要であろう。また Almeida²³⁾ が条件は不明であるが、male rat で高分圧酸素により testicular atrophy と spermatogenesis に異常があったと報告し、反対に Brenk²⁴⁾ らは 3~5 ATA: O₂ 条件で急性酸素中毒を起しても testis には変化がなく、OHP 暴露雄マウスと非暴露雌マウスよりの offspring には異常がなかったとする報告もあり、雄マウスを介しての genetic

effect の検討も必要と思われる。

4. 結 語

高分圧酸素の催奇性および染色体におよぼす影響を見るため、ICR 系 6~12 週齢マウスを対象とし、高気圧酸素 (OHP) 条件下で実験を行い、つぎの結果をえた。

1) 1 回暴露実験では 2.5 ATA : O₂, 2 時間の OHP 下に妊娠 8 日目暴露群の新生仔に、臍帯ヘルニア、尾椎異常の発現があった。

2) 妊娠初期 (0~8 日間) 連続暴露実験では 2, 3 および 3.5 ATA : O₂, 1 時間の OHP 群に同様の奇形の発生を見た。しかし同気圧空気吸入群には発生を見なかった。

3) 連続暴露妊娠マウスよりの新生仔の骨髄細胞染色体検査では、有意の染色体異常は観察されなかった。

4) 3 および 4 ATA : O₂, 1 時間の OHP に 1 回暴露した雄マウス骨髄細胞染色体検査で、染色体異常 (gap, break) が有意に増加した。

以上より高分圧酸素の催奇性および *in vivo* での染色体異常誘発性が示唆された。

稿を終えるにあたり本実験に協力いただいた大山了己、坦花脩技官に感謝いたします。

本論文の要旨は第 25 回日本麻酔学会総会、第 12 回日本高気圧環境医学会総会において発表した。

参考文献

- 1) Balentine JC: Experimental Pathology of Oxygen toxicity, Oxygen and physiological function. Edited by Jöbbsis FF. Texas, Professional Information Library, 1976, p311~378
- 2) Conger AD, Fairchild LM: Breakage of chromosomes by oxygen. Proc Nat Acad Sci USA 38: 289, 1952
- 3) Berg CC, Nilan RA, Konzak CF: The effect of pressure and seed water content on the mutagenic action of oxygen in barley seeds. Mutat Res 2: 263, 1965
- 4) Ferm VH: Teratogenic effects of hyperbaric oxygen. Proc Soc Exp Biol Med 116: 975, 1964

- 5) 榎原欣作, 小西信一郎, 湯佐祚子, 菅原修二: 琉球大学保健学部附属病院に新設された高気圧酸素治療装置について. 医器誌 44: 140, 1974
- 6) Allen SC: A comparison of the effects of nitrogen lack and hyperoxia on the vascular development of the chick embryo. Aerospace Med 34: 897, 1963
- 7) Fenn WO, Gerschman R, Gilbert DL, Terwilliger DE, Cothran FV: Mutagenic effects of high oxygen tensions on Escherichia coli. Proc Nat Acad Sci USA 43: 1027, 1957
- 8) Brosemer RW, Rutter WJ: The effect of oxygen tension on the growth and metabolism of a mammalian cell. Exp Cell Res 25: 101, 1961
- 9) Rueckert RR, Mueller GC: Effect of oxygen tension on HeLa cell growth. Cancer Res 20: 944, 1960
- 10) Drew RM, Painter RB, Feinendegen LE: Oxygen inhibition of nucleic acid synthesis in HeLa S3 cells. Exp Cell Res 36: 297, 1964
- 11) Wittner M, Rosenbaum RM: Inhibition and reversal of intranuclear RNA synthesis by hyperatmospheric oxygen. J Appl Physiol 33: 820, 1972
- 12) Perrins DJD, Wiernik G: The toxic effects of hyperbaric oxygen on the pigs rectal mucosa. 5th International Hyperbaric Conference. Edited by Trapp WG, et al. Canada, Simon Fraser University, Burnaby 2, B. C. 1974, p 27~36
- 13) Grave GD, Kennedy C, Sokoloff L: Impairment of growth and development of the rat brain by hyperoxia at atmospheric pressure. J Neurochem 19: 187, 1972
- 14) 佐々木正夫: 放射線による染色体異常. 東京医学 82: 208, 1974
- 15) 上代 淑ほか: 遺伝生化学. 東京, 医学書院, 1970, p 205~225
- 16) Roots R, Smith KC: On the nature of the oxygen effect on X-ray-induced DNA single-strand breaks in mammalian cells. Int J Radiat Biol 26: 467, 1974

- 17) Lennartz M, Coquerelle T, Bopp A, Hagen U: Oxygen-effect on strand breaks and specific end-groups in DNA of irradiated thymocytes. *Int J Radiat Biol* 27: 577, 1975
- 18) Bonura T, Town CD, Smith KC, Kaplan HS: The influence of oxygen on the yield of DNA double-strand breaks in X-irradiated *Escherichia coli* K-12. *Radiat Res* 63: 567, 1975
- 19) Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO: Oxygen poisoning and X-irradiation: A mechanism in common. *Science* 119: 623, 1954
- 20) Northway WH Jr, Rezeaul, Petriceks R, Bensch KG: Oxygen toxicity in the newborn lung: Reversal of inhibition of DNA synthesis in the mouse. *Pediatrics* 57: 41, 1976
- 21) 古沢康雄：環境因子と催奇形性—放射線の影響を中心として—。東京医学 82: 254, 1974
- 22) 小泉 明, 土橋ゆり子, 橋 定功, 津田佳世子, 森本兼麿：化学物質による染色体異常について。東京医学 82: 232, 1974
- 23) Almeida AO de: Recherches sur l'action-toxique de hautes pressions d'oxygene. *C R Soc Biol* 116: 1225, 1934
- 24) Breuk HAS van den, Jamieson D: Hyperbaric oxygen and testicular damage and fertility. *Experientia* 23: 302, 1967
(1978, 6 受)

ABSTRACT

Teratogenic and Chromosomal Effects of Increased Oxygen Tension in the Mouse

Toshiko YUSA

*Department of Anesthesiology, University
of the Ryukyus College of Health
Sciences Hospital, Okinawa, 902*

The effects of increased oxygen tension (oxygenation under high pressure) on the early stage of gestation in the mouse and the chromosomal aberration in the mouse bone marrow were studied.

Method: After determining LD₅₀ in the mouse (ICR, 6-12 week ages) to increased oxygen tension ranging 2-5 ATA: O₂ and 1-4 hrs, following experiments were performed at the condition of LD₀. 1) Four groups of pregnant mice were exposed once to 2 ATA: O₂ over 1 hr. or 2.5 ATA: O₂ over 2 hrs. on 5th or 7th and 8th gestation day. 2) Six groups were exposed to 2, 3 or 3.5 ATA with O₂ or Air over 1 hr. during first 8 gestation days daily. After above treatments, offsprings were observed for mortality and gross malformations, and also cytogenic changes in newborns were analysed. 3) Four groups of male mice were exposed to 2-4 ATA: O₂ over 1 hr. followed by chromosomal analysis after 24 hrs. in bone marrow cells.

Results: 1) minor gross malformations (umbilical hernia and abnormality of coccyges) in newborns were noted in groups tested under 2.5 ATA: O₂ over 2 hrs. at 8th gestation day (7/24) and 2-3.5 ATA: O₂ over 1 hr. during first 8 gestation days (6/115). 2) No chromosomal aberration was noted in newborns, but significant increases of chromosomal breaks and gaps were noted in male mice bone marrow tested under 3 and 4 ATA: O₂ over 1 hr.

These findings would seem to indicate the genetic effect of increased oxygen tension in vivo.