

タマミジンコ(*Moina macrocopa* Straus)の複眼形成 に対する超音波とX線の影響 I —個眼レンズの形態異常と定量化の試み—

淵側祐一¹・福堀順敏²・土井田幸郎¹

¹滋賀医科大学生物学教室

²滋賀医科大学R I 研究センター

要 約

タマミジンコの複眼形成へのX線と超音波の影響を20Gy、0.5W/cm² 60秒の場合に限って調べたところ、超音波はX線と同様に異常をおこすことがわかった。

異常は個眼の数ではなく、個眼レンズの形態の異常としてあらわれた。

個眼レンズの形態異常は、X線および超音波ともに、タマミジンコの個体発生の初期における照射で、大きくあらわれた。

X線と超音波の影響を定量的に比較した。

序

超音波はX線に比べて生物体に対する影響がないか無視しうるほど小さいという理由から、生体から情報をえる方法の一つとしてX線に代って医学の診断の面で広範に利用される様になってきている。このような超音波の通信的利用とは別に、温熱的利用も含めて、超音波のもつエネルギーを治療面に用いる機会も増大してきている。そのような状況から超音波の生物医学的影響を調べることは安全性の観点から重要であり、多くの研究が進められており、総説も出版されている^{1,2)}。

われわれは、臨床的に利用される範囲の超音波の生物作用を調べることを目的として研究を行ってきた。その結果、超音波の細胞破壊の影響は著しく大きい、生残した細胞での遺伝学的障害はX線に比べて極めて小さいことを報告した^{3,4)}。

細胞の機械的破壊が比較的弱い出力の超音波の短時間照射でおこることは、発生初期の個体への超音波照射が被照射個体のその後の器官形成や個体発生に著しい影響を与えることが予想されるので、われわれはタマミジンコを用いて超音波の個体発生におよぼす影響を調べた。

本報では、X線の催奇性をポジティブコントロールとして、ミジンコの複眼形成におよぼす超音波の影響を調べたので報告する。

材料と方法

タマミジンコは市販の越冬卵を孵化させ、以後室温で長期間継代飼育してきた。継代には1日以上室温に放置した水道水を用いた。実験は20°Cの恒温槽内で行った。この条件下ではタマミジンコは卵胎生で単為発生的に増殖し、生まれる仔はすべて雌である。タマミジンコの飼育法と生活環の詳細については別に報告した⁵⁾が、以下に簡単に記す。

20°Cの飼育条件下でタマミジンコはほぼ2日毎に産仔をする。その経過は、次のとおりである。前回の産仔直後、卵巣より育房中に移された卵細胞は直ちに発生を開始し、游泳できる状態にまで成長したあと親の体外に游出する。その直後親は脱皮し、その後卵巣内の卵細胞は再び育房中に移され、次の発生を始める。2日後親は再び産仔と脱皮を行う。

X線と超音波の照射条件：

X線照射には日立メディコ社製MBR-1520Rを用いた。照射条件は150KV、20mA、2.0 mmAl、線量率は3.4Gy/分で、20Gy照射した。X線照射は、タマミジンコを6 cm径のペトリ皿 (Falcon 3002) に入れて行った。超音波はOG技研社製ES-1を用いた。照射条件は1 MHz、0.5W/cm²の連続波で行った。照射はミジンコを2 mlの水とともに短試験管 (Corning 25200) に入れ、水槽に浸し、30rpmで回転させながら60秒照射した。

ミジンコの照射と試料の調製：

実験の手順は図1に示した。実験には少なくとも1回以上産仔したミジンコを用いた。理由は、少なくとも1回以上産仔したあとのミジンコはすべて育房内に仔ミジンコをもつからである。産仔後、いろいろな時間経過したミジンコの親集団にX線もしくは超音波を照射したあと、12時間毎に60時間まで、游泳している仔ミジンコを集め、2.5%グルタルアルデヒド (GA) で固定し、複眼観察の試料とした。このことは照射後0から12時間の間に採集されたミジンコは産仔0から12時間前に照射され

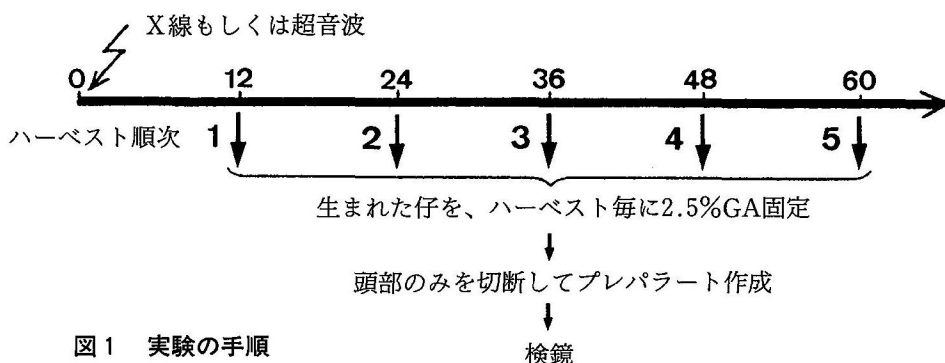


図1 実験の手順

たこととなり、照射後48-60時間に採集されたミジンコは産仔48-60時間前に照射されたことになる。すなわち後者は、卵巣から育房に移った直後、発生の極めて早い時期に照射されたことになる。

複眼の観察：

1日以上GAで固定したミジンコをスライドグラス上にとり出し、実体顕微鏡下で頭部を切断し、一部のものは0.5N NaOHで1分間処理したあと、水で封入し、生物顕微鏡を用いて観察した。

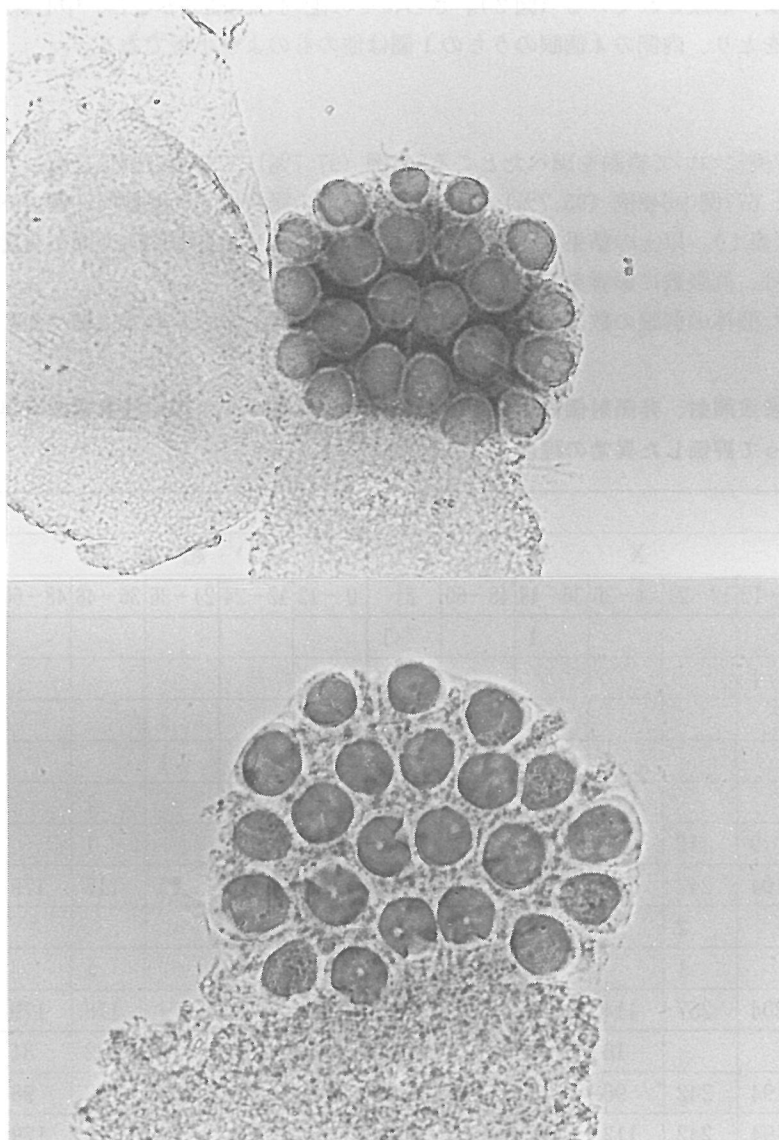


図2 タマミジンコの正常眼

2.5%GAで1日以上固定。頭部のみを切断し(上)、0.5N NaOHで1分間処理(下)後水で封入。

結 果

正常な複眼：

複眼は卵の発生の段階で頭頂部に最初 2 個の原基として形成され始めることは黒色の色素の沈着によってわかるが、その後 1 つに合体するので、游出した時期のタマミジンコは 1 個の複眼をもち、それは 22 個の個眼より形成されている（図 2）。さらにその配列を詳細にみると、中心線から外側へ 4、4、3 個の配列をとり、内側の 4 個眼のうちの 1 個は他のものより小型である。

照射群：

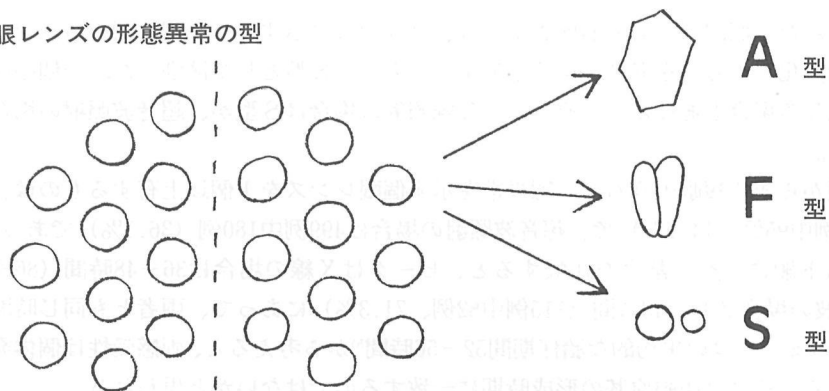
非照射個体 577 例について複眼を調べたところ 564 例（97.7%）で 22 個の個眼を有した。これに対し X 線の場合は、677 例中 648 例（95.7%）で、超音波照射の場合は、508 例中 499 例（98.2%）で正常数の 22 を示した（表 1）。以上の結果は、個眼の数については、照射と非照射の間に有意差はなく、本実験の照射量では、個眼数に影響を与えることはなかった。

一方、照射した個体の個眼の数は正常数の 22 であっても、その個眼レンズに種々の程度の形態の異

表 1 X 線、超音波照射、非照射個体における個眼の数、個眼レンズの形態異常の有無および表 2 の基準によって評価した異常の程度

| ハーベスト | | 照 射 | | | | | | | | | | | | 非照射 |
|--------------------------------------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-----|-----|
| | | X 線 | | | | | | 超 音 波 | | | | | | |
| の期間(時間) | | 0-12 | 12-24 | 24-36 | 36-48 | 48-60 | 計 | 0-12 | 12-24 | 24-36 | 36-48 | 48-60 | 計 | |
| 個 眼 の 数 | 0 | | | | 1 | | 1 | | | | | | | |
| | 12 | 1 | | | | | 1 | | | | | | | |
| | 16 | | | | | | | | | 1 | | | 1 | |
| | 19 | | | | | | | 2 | | 1 | | | 3 | |
| | 20 | | | | | | | | | | 1 | | 1 | 2 |
| | 21 | 9 | 12 | 2 | | | 23 | | 1 | | 1 | | 2 | 11 |
| | 22 | 194 | 242 | 112 | 86 | 14 | 648 | 58 | 75 | 72 | 115 | 179 | 499 | 564 |
| | 23 | | 2 | | 1 | | 3 | | 1 | | | | 1 | |
| | 24 | | 1 | | | | 1 | | | | 1 | | 1 | |
| | 計 | 204 | 257 | 114 | 88 | 14 | 677 | 60 | 77 | 74 | 118 | 179 | 508 | 577 |
| 個 眼 レ ン ズ の 異 常 | 有 | | | 16 | 72 | 7 | 95 | | 1 | 16 | 82 | 81 | 180 | |
| | 無 | 194 | 242 | 96 | 14 | 7 | 553 | 58 | 74 | 56 | 33 | 98 | 319 | 577 |
| | 計 | 194 | 242 | 112 | 86 | 14 | 648 | 58 | 75 | 72 | 115 | 179 | 499 | 577 |
| 異 常 の 程 度 | I 度 | | | 16 | 63 | 6 | 85 | | 1 | 8 | 28 | 44 | 81 | |
| | II 度 | | | | 8 | 1 | 9 | | | 7 | 30 | 24 | 61 | |
| | III 度 | | | | 1 | | 1 | | | 1 | 24 | 13 | 38 | |
| | 計 | | | 16 | 72 | 7 | 95 | | 1 | 16 | 82 | 81 | 180 | |

(a) 個眼レンズの形態異常の型



(b)

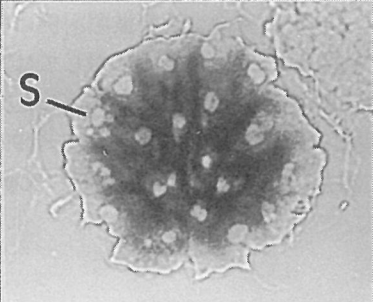
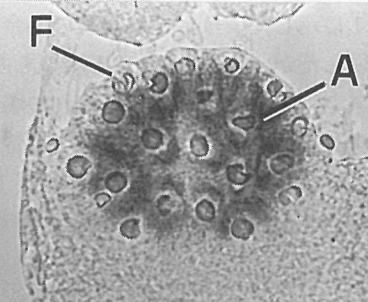
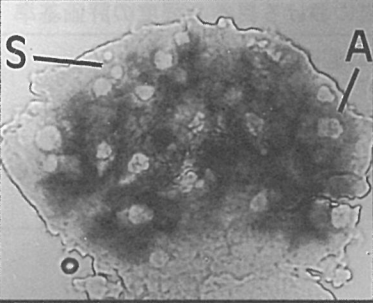
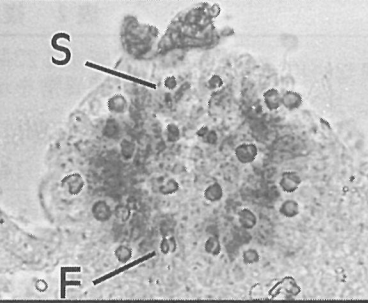
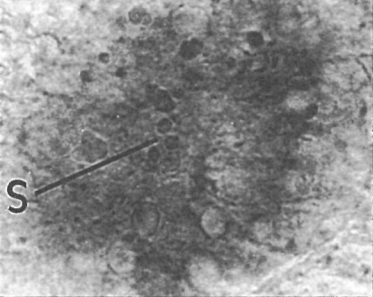
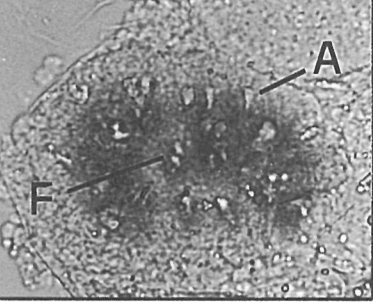
| | | X線照射 | 超音波照射 |
|-------|-------|---|--|
| 異常の程度 | I 度 |  |  |
| | II 度 |  |  |
| | III 度 |  |  |

図3 個眼レンズの形態異常の型(a)とその例(b)

(b)ではさらに表2の基準によって異常の程度を分けた。

常が認められた。個眼レンズの形態異常には、図3(a)に示すような型が認められた。角ばったものをA型、細片化したものをF型、丸く小型化したものをS型として区別した。一個の複眼の中で、異なる型が混じる場合もあったが、総じて、X線照射の場合はS型が、超音波照射の場合はF型の異常が目立った。

22の個眼から成る複眼のうち、形態異常を示す個眼レンズを1個以上有するものは、X線照射の場合は、648例中95例(14.7%)で、超音波照射の場合は499例中180例(36.1%)であった(表1)。

ハーベスト順に、その割合を比較すると、ピークはX線の場合は36-48時間(86例中72例、83.7%)、超音波の場合は36-48時間(115例中82例、71.3%)にあって、両者とも同じ時間帯に認められるので、タマジシンの平均的な胎仔期間52-56時間⁵⁾から考えると、両感受性は個体発生の初期にあって、おそらくそれは複眼原基の形成時期に一致するのではないと思われる。

本実験では個眼の数には著しい変化が認められなかったが、個眼レンズの形態にはさまざまな程度の異常が認められたので、その程度を定量的に示す方法として表2のような基準をつくり、観察した複眼それぞれについて異常の程度を評価した(表1、図3(b))。

表1に示したように、本実験の場合、より重い異常は超音波照射例に多くみられた。そこで表2の基準にしたがい、複眼ごとにI度のものに対しては1点、II度に対しては2.75点、III度に対しては4.625点を与え、X線、超音波それぞれの場合の総得点数を計測し、観察した複眼の総数で割った。X線照射の場合は0.177(114.4/648)、超音波照射の場合は0.851(424.5/499)となった。

これによって本実験では、超音波(1MHz、0.5W/cm²、60秒)は、X線(20Gy)より4.81倍(0.851/0.177)強い影響を与えると評価し得た。

表2 複眼における異常の程度の評価基準

| 異常の程度 | 複眼を構成する22個の個眼レンズの中で形態異常を示したものの数 | 中央値 | 得点 $\left(\frac{\text{中央値}}{\text{正常個眼数}} \right)$ の相対比 |
|-------|---------------------------------|------|--|
| I度 | 7個以下 | 4 | 1 |
| II度 | 8-14個 | 11 | 2.75 |
| III度 | 15個以上 | 18.5 | 4.625 |

論 議

超音波の医学面への利用の拡大とともに、出力や処理時間が増大し、その生物学的影響を知ることが、安全利用の面から重要である。したがって、X線や薬剤に対する影響調査と同じように、超音波の遺伝的影響^{3,7)}や発生学的影響^{9,10)}について多くの研究がなされてきている。

超音波の生物作用を定量的に調べるためにミジンコを用いる系を開発し、生存日数、産仔回数、1回当たり産仔数、生涯産仔数などについて調べた⁶⁾。本研究では、複眼を形成する個眼数を指標として超音波の個体発生におよぼす影響を調べた。

枝角目の複眼を構成する個眼の数については22であることがすでに報告されているが¹⁷⁾、実験的にその発生を調べた研究はない。Kaji¹¹⁾やMichinomae¹²⁾らは、キイロショウジョウバエを用いて棒眼系統の複眼構成個眼数を、アミドを分子中に含む化合物で処理し変化させうることを報告し、また棒眼原基と正常眼原基とを比較して、細胞死のおこる位置、量、時間を調べ報告した。しかし、個眼その

ものの異常にはふれていない。われわれは超音波を照射して個眼形成の異常を調べたが、本実験に関する限り、個眼数の著しい変化はみられず、むしろ個眼の形態異常が多くみられた。そしてその異常は個眼原基形成期の照射で高いことを示した。この結果は、おそらく個々の個眼を構成する細胞群の一部の破壊によってひきおこされるものと思われる。

X線作用と比較した時、DNAの切断¹³⁾、突然変異^{3,14,15)}、姉妹染色分体切断⁸⁾、malignant transformation¹⁶⁾のような遺伝的影響は超音波の作用としてあまりみられないが、細胞破壊のような個体レベル内にとどまる影響は著しい。超音波の生物に対する作用機構として、熱、キャビテーション、ラジカル形成の3つが主因として考えられているが、温度をコントロールした条件下では、ラジカルの影響に比してキャビテーションによる機械的破壊効果がはかるに大きいことを示すものと考えられた。

本研究の一部は、文部省科学研究費（一般研究(B) 05454609）の援助をうけて行った。

参考文献

1. Nyborg, W.L. & Ziskin, M.C. (ed.), *Biological Effects of Ultrasound*, Churchill Livingstone, N.Y., 1985.
2. NCRP Report No.113, *Exposure Criteria for Medical Diagnostic Ultrasound: I. Criteria based on thermal mechanisms*, NCRP, Bethesda, MD, 1992.
3. Doida, Y., Miller, M.W., Cox, C. & Church, C.C., *Ultrasound in Med. & Biol.*, **16**, 699-705, 1990.
4. Doida, Y., Brayman, A.A. & Miller, M.W., *J. Ultrasound Med.*, **11**, 413-417, 1992.
5. 刈側祐一, 土井田幸郎, 滋賀医科大学基礎学研究, **4**, 13-20, 1993.
6. Doida, Y., Fuchikawa, Y. & Fukuhori, N., *J. Radiat. Res.*, **34**, 407, 1993.
7. Kaufman, G.E., *Ultrasound in Med. & Biol.*, **11**, 497-501, 1985.
8. Miller, M.W., *Ultrasound in Med. & Biol.*, **11**, 561-570, 1985.
9. O'Brien, W.D. Jr., *J. Ultrasound Med.*, **2**, 1-8, 1983.
10. Child, S.Z. & Carstensen, E.L., *Ultrasound in Med. & Biol.*, **8**, 311-312, 1982.
11. Kaji, S., *Mem. Kōnan Univ. Sci. Ser.*, **4**, 1-18, 1960.
12. Michinomae, M., *Japan. J. Genetics*, **51**, 315-326, 1976.
13. Miller, D.L., Thomas, R.M. & Frazier, M.E., *Ultrasound in Med. & Biol.*, **17**, 401-406, 1991.
14. Lyon, M.F. & Simpson, G.M., *Brit. J. Radiol.*, **47**, 712-722, 1974.
15. Doida, Y., Brayman, A.A. & Miller, M.W., *Ultrasound in Med. & Biol.*, **18**, 465-469, 1992.
16. Harrison, G.H. & Balcer-Kubiczek, E.K., *Ultrasound in Med. & Biol.*, **17**, 627-632, 1991.
17. Duke - Elder, S., *System of Ophthalmology: Vol.1 The Eye in Evolution*, Henry Kimpton, London, 1958.