在胎期のベンゼン暴露による仔ねずみの発育 および造血機能の変化

Changes in Growth and Haematopoietic Functions in Mice, Mothers of
which had been injected with Benzene during Gestation Period

東京大学医学部保健学科人類生態学教室

岩 永 理 美 子・鈴 木 継 美

東京大学医学部公衆衛生学教室

小 泉 明

Rimiko Iwanaga and Tsuguyoshi Suzuki

*Department of Human Ecology School of Health Sciences
Faculty of Medicine, Tokyo University, Tokyo*

Akira Koizumi

Department of Public Health Faculty of Medicine, Tokyo University, Tokyo

New-born from the mother mouse or rat, which had been injected with benzene during gestation period, has been reported to have a higher susceptibility to benzene or aminopterin than that from a non-treated mother.

The present authors' objective is to study whether or not the varied time interval between the day of conception and injection of benzene into mice changes the susceptibility to benzene.

Female mice at 6, 9 and 12 days after conception were injected with a dosage of 4ml/kg of benzene, and a control group was not injected.

The body weight of the mother mouse just before delivery, percentages of new-born mice vitality at time of birth and after, patterns of occurring death within a week after the birth differed in the 6th day injection group from other groups.

The new-born mice at 10 weeks of age were injected 5 times with a dosage of 0.1ml/kg. Consequently, there were marked differences in the leucocyte count, hemoglobin content, body weight and weights of the thymus and the spleen between 9th, 12th day injection groups and the control group.

はじめに

生体の生涯を通して、生体はその環境とのかかわりあいの中で、多様な外的因子と接触する。その中に、個体の発育、生長の最も初期段階での環境の外的因子の影響による個体差が存在する。すなわち、遺伝的なものとは別に、受精卵の分化過程が外的因子に影響をうけ、発生障害、機能障害が生ずる。

本論文においては、在胎期間中の胎仔の環境に加えられた化学物質の影響を扱う。

この領域の研究は、近年特にサリドマイド服用による

奇形発生を契機に、風疹症候群、胎児性水俣病、医療用放射線および原爆被爆による水頭症などを中心に、embryo-fetopathyとしてとりあげられている¹⁾。embryo-fetopathyの原因となる化学物質として、コーチゾン、トリパンブルー、アミノプテリンなどが知られている。

本実験では、アミノプテリンと同じく造血機能を障害することが明らかにされているベンゼンを用いた。

すでに、在胎期および生後のベンゼン暴露の影響に関して、以下に述べるごとき研究がなされており、それらの研究に沿った考え方にもとづいて本実験を行なった。

小泉・鈴木²⁾は、白ネズミの妊娠前および妊娠中に、

アミノプテリンを負荷し、出生後の仔ハツカネズミのベンゼンに対する感受性をみている。その結果、アミノプテリンを投与された雌から生まれた仔ハツカネズミでは、無処置のグループから生まれた仔ハツカネズミにくらべ、ベンゼン投与後、特に明らかな白血球の減少がみられ、しかもコバルトグリーンボール投与による白血球増加も少なかった。ここでみられた反応の違いは、骨髓機能の変化に原因するものであろうと報告されている。

光田⁹⁾によれば、妊娠9日目のハツカネズミに、背部皮下注射によるベンゼン 2ml/kg・4ml/kg 1回投与を行なうと、妊娠中の体重増加には変化がないにもかかわらず、4ml/kg 投与群では、生まれた仔ハツカネズミの生長が遅れた。しかし、白血球数、色素量、胸腺重量、胸腺細胞数ではベンゼン投与群と、無処置群で差がないことから、仔ハツカネズミの生長のおくれは、母乳分泌の質的量的変化によるものであろうと報告されている。

光田の実験を追試し、さらに仔ハツカネズミの造血機能に関する検討を加えた小泉⁴⁾の報告によれば、生後10週の子ハツカネズミの白血球数は、在胎期ベンゼン投与 0, 2.0ml/kg, 4.0ml/kg 3群間に有意の差がある。また、コバルトグリーンボール投与に対する血液所見の変化は、白血球数、好中球数、リンパ球数いずれにおいても在胎期ベンゼン暴露群が、それぞれの増加において劣っていた。その後の、0.1ml/kg ベンゼン5回投与において、色素量、白血球数、好中球数、リンパ球数いずれにおいても、在胎期ベンゼン暴露群の減少が顕著であった。以上のことから、在胎期にベンゼン暴露をうけたハツカネズミは、骨髓、リンパ組織の白血球産生機能が低下し、その機能の変化の残存が、生後のベンゼン暴露に対する感受性を大にする一要因となっていると結論している。

本実験では以上の所見をさらに進展させるべく、妊娠ハツカネズミへのベンゼン暴露を異なる三時点で行ない暴露をうけた妊娠時期の相異による、その仔ハツカネズミへの影響のちがいについて検討した。

対象と方法

生後8週の ddD 雌ハツカネズミを個別に飼育して、生後10週以降の発情期を調べた上、同じく生後10週の ddD 雄ハツカネズミと交尾させた。陰栓発見をもって妊娠成立と判断し、その日を妊娠0日目とした。

このようにして妊娠成立と判断されたハツカネズミ26匹を得た。これらを、妊娠6日目ベンゼン投与群7匹、妊娠9日目ベンゼン投与群5匹、妊娠12日目ベンゼン投与群7匹、および対照群7匹の各群に分けた（以下それ

ぞれ、6日目群、9日目群、12日目群、対照群と略称する）。

ベンゼンは、等量のオリーブ油で稀釈し、4ml/kg の量を背部皮下に注射した。対照群は無処置とした。

体重測定は、出産まで毎日1回、時刻を決めて行なった。

毎日の体重測定の際、出産の有無を確認した。出生仔数は、その時生きた状態で発見された仔数と死亡した状態で発見された仔数の和とした。

仔ハツカネズミの体重は、生後7日目から59日目までの期間、数日おきに測定した。生後7日目、10日目は腹ごとにまとめて、また生後14日目からは、1匹ずつ測定した。

生後4週目よりは、仔ハツカネズミを母ハツカネズミから離し、また腹ごとに雌雄をわけて飼育した。

飼育環境は、母、仔ハツカネズミとも、温度23~25℃湿度40~60%に調節された飼育専用室である。

飼料としては、動物実験中央研究所製繁殖用固型飼料を使用した。なお、仔ハツカネズミには、生後3週目より、母乳とともに、実中研製乳児用固型飼料を与えたが生後4週目からは母ハツカネズミと同様に、繁殖用固型飼料のみとした。

次に生後70日目の仔ハツカネズミに対し、雄については、6日目群9匹中より4匹、9日目群9匹中より4匹、12日目群13匹中より7匹ならびに対照群10匹中より6匹をえらび、また雌については、6日目群の全数3匹、9日目群の全数9匹、12日目群の全数7匹、および対照群の全数15匹に対してベンゼン投与を行なった。なお雄の残りに対してはベンゼン投与を行なわなかった。

このときのベンゼン投与は、オリーブ油で50倍に稀釈したものの 0.1ml/kg を背部皮下に、1日1回、連続5日間注射によっておこなった。さらに、初回のベンゼン投与直前と最終回の投与後48時間目の時点において、尾静脈血液を用いて白血球数、色素量を測定した。白血球数は試験管法⁵⁾を用い、チュルク液で稀釈し、算定板に入れ顕微鏡下で算定した。色素量は、シアンメトヘモグロビン法⁶⁾によった。なお投与期間中、毎日体重を測定した。以上の各処置のあと、頸脱白法⁷⁾により屠殺し、副腎、胸腺、脾臓、腎臓、肝臓、睪丸の各臓器重量を、直示天秤を用いて、1mg 単位で測定した。

結 果

I 妊娠成立から出産までの期間に妊娠ハツカネズミにみられた変化

妊娠期間中における体重変化を、表1に示した。妊娠

表1 妊娠期間中の体重変化

		mating	just before delivery	just before del. —mat.	just after delivery	number of new-born mice ★
control	1	28.0	51.5	23.5	39.0	7
	2	27.0	47.0	20.0	34.0	6
	3	27.0	55.5	28.5	37.5	9
	4	28.0	46.5	18.5	37.0	7
	5	26.5	53.0	26.5	35.0	8
	6	25.5	46.5	21.0	33.0	6
	7	26.0	52.0	26.0	34.5	8
	$\bar{x}$	26.9	50.3	23.4	35.7	7.3
6th day	1	26.0	48.0	20.0	32.5	8
	2	24.5	38.5	14.0	27.0	3
	3	25.5	47.0	21.5	37.0	7
	4	26.0				
	5	25.5	39.0	13.5	29.5	5
	6	28.5	47.0	18.5	32.0	6
	7	25.0	45.5	20.5	31.0	7
	$\bar{x}$	25.9	44.2	18.3	31.5	6.0
9th day	1	27.0	41.0	14.0	30.5	1
	2	25.0	48.5	23.5	32.0	10
	3	26.5	53.5	27.0	33.0	10
	4	27.5	47.5	20.0	36.0	6
	5	25.5	42.0	16.5	31.5	5
	$\bar{x}$	26.3	46.5	20.2	32.6	6.4
12th day	1	24.0	49.5	25.5	32.0	10
	2	28.0	48.0	20.0	40.5	6
	3	26.5	56.0	29.5	36.0	12
	4	25.0	50.0	25.0	34.0	10
	5	26.5	49.5	23.0	33.5	8
	6	26.5	39.5	13.0	25.5	11
	7	27.5	50.0	22.5	34.5	10
	$\bar{x}$	26.3	48.9	22.6	33.7	9.6

★ alive + dead

表2 各実験群ごとの妊娠数と出生数

	number of mother mice			number of new-born mice	
	mating	delivery	all youngs died within 7 days after birth	0 day ★	7th day
control	7	7 ** (0)	1 *** (0)	51	39
6th day	7	6 (4)	3 (3)	36	17
9th day	5	5 (1)	1 (0)	32	29
12th day	7	7 (0)	3 (0)	67	31

★ alive + dead

★★ decrease of body weight more than 1g during pregnancy

★★★ ★★ of 3rd column

成立時において各群間に差はないが、出産直前の体重の平均値は、6日目群が対照群に比べ少ない ($P < 0.05$)。出産直後の体重では、各群間に差はない。

妊娠、出産状況は表2に示すごとくである。妊娠中、出血の認められたものは、6日目群と12日目群においてそれぞれ1匹ずつあり、その仔は生後1日目にすべてが死亡した。なお、出産後の母ハツカネズミの死亡は、12日目群の1匹のみにみられた。

出産直後発見された仔の数において、1腹あたりの仔数の平均値をみると、各群と対照群の間に差は認められない。

II 仔ハツカネズミの生存と生長

表3に、生下時における生存数と死亡数を腹ごとに示した。

生きた状態で発見された仔数と死んだ状態で発見された仔数との割合については、 χ^2 検定によって群間の有意差が示された。対照群に比べて、6日目・12日目群の生存数の割合は明らかに低い ($P < 0.025$ および $P < 0.01$)。

その後の生存状況を図1に示した。6日目群では、生後8日目までの死亡が他の群と異なった様相を示している。

表3 生下時の生存数と死亡数

	number of new-born mice	alive	dead
control	1	7	6
	2	6	6
	3	9	9
	4	7	6
	5	8	8
	6	6	5
	7	8	7
	$\bar{x}$	7.3	6.7
6th day	1	8	8
	2	3	2
	3	7	7
	4		
	5	5	2
	6	6	2
	7	7	5
	$\bar{x}$	6.0	4.3
9th day	1	1	0
	2	10	10
	3	10	10
	4	6	6
	5	5	5
	$\bar{x}$	6.4	6.2
12th day	1	10	9
	2	6	6
	3	12	9
	4	10	10
	5	8	8
	6	11	6
	7	10	0
	$\bar{x}$	9.6	6.9

とくに生後3日以内に出生仔すべての死亡をみた6日目群母ハツカネズミ3匹は、妊娠期間中に、明らかな一

図1 仔ハツカネズミの腹毎生存数

図2 仔ハツカネズミの体重変化

過性の体重減少を示したものである。

図2に、仔ハツカネズミの生後7日目から59日目における発育状況を示した。各群の体重の平均値には、有意の差は認められない。

III ベンゼン5回投与による仔ハツカネズミの体重および血液所見の変化

図3にベンゼン5回投与期間中の体重変化を示した。

ベンゼン投与前(生後70日目)の体重は、雄の各群間および雌の各群間において有意の差はない。

ベンゼン5回投与後の9日目群の雄は、同じくベンゼンを投与された他群の雄に比し、明らかに低い体重を示した($P < 0.01$)。無処置群の雄およびベンゼン投与を受けた雌においては、各群間の差はみとめられない。

図4は、仔ハツカネズミのベンゼン投与前後の血液所見である。

投与前の白血球数についてみると、雄では各群間に差はみられないが、雌では、対照群に比べ、9、12日目群が有意に低い値であり($P < 0.05$)、6日目群は高い値であった($P < 0.01$)。

5回投与後の白血球数については、雌雄とも各群間に差は認められないが、ベンゼン投与前と5回投与後の、各個体ごとの白血球数の差をとると、雄においては群間に差がなく、雌においては、対照群とくらべると、9、12日目群ではより小さな減少がみられた($P < 0.05$)。

図3 ベンゼン投与期間中の体重変化

ベンゼン投与前の血色素量については、雌雄とも各群間に差を認められない(図4)。

しかし、ベンゼン投与後の血色素量は雌において、対照群に比べ、12日目群が明らかに低く($P < 0.01$)、6日目群は差がない(図4)。

またベンゼン投与前後の血色素量の差は、雌雄とも各群間に差を認められない。

IV 仔ハツカネズミの臓器重量

図5～6に各臓器重量を示した。出生後ベンゼン投与を受けた雄において、副腎、腎臓、肝臓、睪丸の重量は各群間に差はなく、同じく出生後ベンゼン投与を受けた雌においては脾臓、腎臓、肝臓について同様に群間の差はない。臓器重量で群間に差を認めたのは胸腺で、雌雄

図4 ベンゼン投与前後の白血球数・血色素量

図5 仔ハツカネズミの臓器重量

いずれも、対照群に対し、9、12日目群が明らかに低い値を示した(雄 $P < 0.01$ 、雌 $P < 0.05$)。また雄でのみ、12日目群の脾臓重量が対照群に比べ、明らかに低かった($P < 0.05$)。なお、雄ベンゼン無投与群では、各臓器と

考 察

上述の実験において、妊娠ハツカネズミにみられたベンゼン投与後の体重の減少、性器出血、生後0日目の仔ハツカネズミの生存率の低さは、この実験におけるベンゼン投与量 4ml/kg が、妊娠ハツカネズミにとって、かなり烈しい侵襲となったことを示唆している。ことに、投与をおこなった妊娠の日数の違いによって、反応に差があることが興味ある点である。すなわち、出産直前の母ハツカネズミの体重、仔の生存率、出生後の仔の死亡からみた場合に、6日目にベンゼン投与を受けた群は、9日目あるいは12日目にベンゼン投与を受けた群と明らかに異なっている。

ハツカネズミの受精後6日目の胚は着床完了した胚盤胞に、受精9日目は胎盤形成期および器官形成初期に、受精12日目は器官形成後期に相当すると^{7)~9)}報告されているが、胎盤形成前の状態である6日目群の反応が、他の2群と異なっていることは、ベンゼン投与の胎仔に対する影響を考える上で、胎盤の果たしている役割を重視すべきことを示唆するものといえよう。

また、生まれて生存した仔ハツカネズミの体重を指標としてみたとき、その生長には各群間の差がない。この結果は、小泉⁴⁾の結果と一致する。この報告の範囲では、生下時体重、あるいは、胎内での发育に関する違いは検討しえない。そのためには出生直後の死亡、死産、親による仔の摂食などの因子を除いた実験が必要となる。

同様に、形態的奇形発生の問題についても、本実験の範囲では何も論じられない。本実験の場合には生存した仔には奇形は発見できなかったが、渡辺¹⁰⁾によると、ベンゼンを妊娠13、14日目に 3ml/kg 1回投与で、口蓋裂奇形の発生が認められている。この種の奇形をもつ仔の場合、当然生後の生存率は低下すると考えられるが、本実験で、群としてみると、12日目群の生存率が6日目群と同様に低率であったことは、そのためであったかもしれない。

生後10週目の雌についてベンゼン投与前において、すでに白血球数の少ないものがみられた(9日目、12日目群)。また、ベンゼン5回投与後において、雌に色素量の少ないものがみられた(12日目群)が、小泉⁴⁾の実験でも同様な所見が報告されている。しかし、この小泉の実験においては、雌雄を区別していないので、本実験の結果をそのまま対比させることはできない。いずれにせよ、受精9日目以後、胎内でベンゼン暴露を受けたハツカネズミの造血組織に、なんらかの障害がおり、成

図6 仔ハツカネズミの臓器重量

も群間の差は認められなかった。

臓器重量を体重比にして比較した結果についても、そのまの重量の場合と同様の差異が認められたにすぎなかった。

熟後までその影響が残るのではないかと考えられる。なおその際、雌雄間において感受性の違いがありうると考えておくことが妥当であろう。

ところで、胎仔に対するベンゼンの侵襲の機転については、いくつかの問題が考えられる。第一に胎盤形成前の侵襲と形成後の侵襲の差異の問題があり、ついで、胎盤形成後については、ベンゼンないしベンゼン代謝物が胎盤をとおり、胎仔体内へ直接入り障害をおこしたのか、あるいは、胎盤など胎仔保護、栄養器管の、ベンゼンあるいはベンゼン代謝物による障害により二次的におきたのか、あるいはその両者の相互作用によるものなのかといった問題がある。

ベンゼンが脂溶性で、分子量が小さいこと、またハツカネズミは血液絨毛胎盤¹¹⁾であることから、ベンゼンそのものが、胎盤を通過することは可能と思われる。しかしベンゼン代謝物については、必ずしも胎盤通過の可能性があると言い切れない。さらに妊娠の進行とともに、ベンゼン代謝の様相が変わる可能性もある。まだ现阶段では、ベンゼンの侵襲機転について結論をくだすことはできない。

臓器重量については、光田⁹⁾、小泉⁴⁾らの実験では、各群間に差が認められなかったと報告されているが、本実験では、ベンゼン投与した雌雄ともに胸腺重量の低いものがみられ(雌雄とも9、12日目群)、ベンゼン投与した雄のみに、脾臓重量の低いもの(12日目群)、体重の低いもの(9日目群)がみられた。

ベンゼン暴露により、胸腺および脾臓重量の低値をみた例は、他にも報告されている^{12),13)}。

以上のことから、生後のベンゼン暴露に対する反応の様相は、在胎期にベンゼン暴露を受けたものと受けなかったもの、また受けたものの中では、暴露を受けた時期、すなわち妊娠日数により明らかに異なるといえるであろう。

ま と め

生後10週の ddD 雌ハツカネズミに、ベンゼン 4ml/kg を妊娠6日目、9日目、12日目に投与し、無処置群と比較した。

生まれた仔ハツカネズミの生存、生長を観察し、また仔の成熟後、ベンゼン 0.1ml/kg 5回投与することによって、暴露された在胎時期の相異による、その後のベンゼン暴露に対する感受性の相異を、白血球数、血色素量、体重、臓器重量を指標として検討した。

1. 妊娠成立から出産までの妊娠ハツカネズミにおける変化については、出産直前の体重において、6日目群

が対照群にくらべて少ない。

2. 仔ハツカネズミの生存と生長を生下時およびその後の生存率についてみると、対照群に比べ、6日目、12日目群が明らかに低い。また生後8日目までの6日目群の死亡のおこり方が他の群と比べ、異なっており、出産のあった6匹中3匹において生後3日目までに仔のすべてが死亡した。

3. 生後10週目からのベンゼン投与による仔ハツカネズミの体重および血液所見の変化では、ベンゼン投与後の体重は、雄の9日目群(ベンゼン投与群)が他群に比し、明らかに少ない値を示し、血液所見では、ベンゼン投与前、雌の9、12日目群の白血球数が対照群に比べ低く、6日目群が高い値を示したが、ベンゼン投与後では白血球数は雌雄とも差をみず、血色素量では、雌の12日目群が対照群に比し明らかに低かった。

4. 仔ハツカネズミの臓器重量では、雌雄(ベンゼン投与群)とも、9、12日目群の胸腺重量が、対照群に比し、明らかに低い値を示している。また雄12日目群(ベンゼン投与群)の脾臓重量が対照群に比し明らかに低い。

以上の各所見により、在胎期ベンゼン暴露の有無による、生後のベンゼンに対する反応の差が存在することが再び確認され、さらに、ハツカネズミの出産、仔ハツカネズミの生存状況ならびに出生後のベンゼン暴露に対する反応が在胎中のベンゼン暴露時期の相異により異なることが見出された。

本実験にあたって御指導下さいました東大公衆衛生学教室勝沼晴雄教授、ならびに東大公衆衛生学教室、東大保健学科人類生態学教室の諸先生方に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 村上氏広: Embryopathy と Fetopathy, 医学のあゆみ, 72, 238-245 (1970).
- 2) Koizumi, A. and Suzuki, T.: A Preliminary Report on The Influence of Benzene to The Blood in Rats Congenitally Affected by Aminopterin, Japan. J. Exp. Med., 32, 231-236 (1962).
- 3) 光田栄子: 胎生期薬物投与が生後の發育におよぼす影響に関する実験的研究, お茶の水女子大学卒業論文 (1965).
- 4) 小泉明, 鈴木継美, 竹本泰一郎, 岩永理美子: 出生後の骨髓機能に与える在胎時ベンゼン暴露の影響, 第36回日本衛生学会総会口演発表 (1966).
- 5) 勝沼晴雄, 西川濱八, 小泉明: 公衆衛生集団検診法,

- P. 73-74, 88-91, 医歯薬出版, 東京 (1960).
- 6) Univ. Federation Animal Welfare : 動物の安楽致死法, P. 15, 東大出版会, 東京 (1968).
- 7) Snell, G. D. : Biology of the Laboratory Mouse, Dover Publications inc. New York.
- 8) 亀山義郎: マウスを使った実験, 遺伝, 66-71 (1968).
- 9) 平岩馨邦: シロネズミの発生・解剖・組織, 中山書店, 東京 (1958).
- 10) 渡辺蔵一: 私信. 胎生期ベンゼン投与による奇形発生に関して
- 11) 安藤畫一: 臨床医のための人体発生学. P. 115-125, 杏林書院, 東京 (1960).
- 12) Suzuki, T., Takada, M., Tachi, T. and Koizumi, A. : Thymic Response to Benzene, Toluene and Trichloroethylene in Mice, Ind. Health., 2, 71-79 (1964).
- 13) 鈴木経美, 竹本泰一郎, 深山智代: ベンゾール中毒における蛋白栄養の役割についての実験的検討, 日衛誌, 20, 377-382 (1966).

(受付1970年10月7日)