

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：14302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K03141

研究課題名(和文)動物体内の多様な細胞動態を観察する教材の開発 組織内の細胞死や増殖細胞の観察

研究課題名(英文)Development the experiments to observe the cell dynamics in animal bodies  
-Observations of cell death and proliferation-

研究代表者

梶原 裕二(Kajiwara, Yuji)

京都教育大学・教育学部・教授

研究者番号：10281114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,400,000円

研究成果の概要(和文)：放射線科学リテラシーの教育は、医学・工学における放射線の積極的な利用の観点から重要である。しかし、放射線の実験は霧箱の利用など物理分野に限られ、分裂細胞が放射線に脆弱であるという生物影響を知る実験はない。これまで、哺乳類の代替として、動物愛護管理法に関わらない両生類の増殖細胞の検出法を報告した。そこで、高等学校で実施できる両生類の増殖細胞に対するX線の影響を調べる実験を検討した。

マウスの小腸上皮では、1GyX線照射で分裂細胞が消失するが、カエル幼生の小腸では、2GyX線照射で分裂細胞は存在した。カエルの分裂細胞は放射線耐性があり、X線の生物影響を理解する実験材料としてはカエルは難しい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線の学習は、工学や医学分野での積極的な利用と共に、エネルギー問題や地球温暖化など社会的要因から、推進が望まれる。学校で扱う実験は、霧箱など取り扱い易さから物理分野がほとんどで、生物分野はほとんどない。そこで、哺乳類マウス代替として、カエル幼生を用いて分裂細胞が放射線に脆弱であることを理解する実験を検討した。知見のあるマウスでは、小腸上皮細胞の増殖は1Gy X線で消失するが、カエル幼生では2Gy X線でも残存し、カエルはマウスに比べ放射線に耐性があることがわかった。放射線の生物影響を理解する実験はほとんどなく、マウス小腸上皮の増殖細胞がX線に脆弱であることを理解する導入として利用できる。

研究成果の概要(英文)：In high schools, education of radiation science literacy is important from the broad usages of radiation in medicine and engineering. The experiments to know of radiation are limited to the physical and chemical fields, such as the simple cloud chamber. There are few experiments to know the biological effects of radiation, such as cell divisions are vulnerable to radiation. We have reported a simple method for detection proliferation cells in amphibian. Using this method, we observed the effects of X-ray irradiation on proliferating cell in amphibians larvae, *Xenopus laevis*. In mice the cell divisions in the small intestinal epithelium almost disappeared by irradiation of 1 Gy of X-ray. But, in frog larvae, the cell divisions in the small intestine were still present after 2 Gy irradiation of X-ray. Thus, cell divisions in small intestine of frogs were more resistant to irradiation than those in the mouse. The use of frogs was difficult to understand the effects of X-ray.

研究分野：科学教育

キーワード：分裂細胞 小腸上皮細胞 カエル幼生 X線 プロモデオキシウリジン 哺乳類代替実験

## 1. 研究開発当初の背景

(1) 動物の体内では適切な場所における細胞分裂のみならず、自発的な細胞死も生じる。このような動物の動的な細胞動態を観察する実験教材を開発する。高等学校で利用できる動物として両生類・カエルの使用、また通常の理科室に備えられている機器を使用する。

(2) 細胞分裂や細胞死は放射線によって影響される。細胞分裂はS期やM期が放射線によって阻害され、細胞死が生じる。放射線で顕著になった動物体内の細胞動態を観察する教材とする。近年充実が求められる生物分野の放射線リテラシーの教材とする。

## 2. 研究の目的

現代社会において、放射線は医学や工学で広く利用されることを反映し、2008年9月の中学校理科の学習指導要領で扱われるようになった<sup>1)</sup>。高校物理分野でも、放射線の内容が取り扱われている<sup>7)</sup>。また、2011年3月に起こった福島第一原発の厳しい事故以来、放射線の生物に対する影響が重大な社会問題となり、放射線科学教育の必要性、放射線科学リテラシー涵養教育の充実が重要な課題となっている。この状況を踏まえ、例えば放射線の飛跡を視覚化する簡単な霧箱を用いた実験や、放射線検出器を用いて鉱物から出る放射線を測定する実験が中学校第3学年の教科書や高校物理の教科書で記載される<sup>1)</sup>。また、簡単な霧箱や放射線測定器は理科教材機器として市販されている。しかし、これらのほとんどが物理化学分野の実験や教材である<sup>1) 7)</sup>。

一方、医学分野でガンを放射線で治療する医療行為は広く知られている。この背景として、細胞分裂において、細胞周期のDNA合成期(S期)と細胞分裂期(M期)が放射線に対して感受性が高いという生命現象がある<sup>8)</sup>。ガン細胞の増殖を放射線によって抑え、死滅させることを目的とするが、反面、ヒト組織の正常な代謝として、毛嚢、小腸、血液など日常活発に細胞分裂を行なっている組織もあり、副作用が問題となる。放射線の電離作用により、DNA鎖切断、活性酸素による分子の酸化など、様々な影響が生物にもたらされ、さらに、増殖細胞が放射線に影響を受けることは放射線防護の観点からは重要である<sup>8)</sup>。しかし、学校において、生物分野の放射線の影響を理解する教材はほとんどない。その理由として、動物の細胞・組織を扱う実験の難しさ、適切な実験動物、学校でも実施できる簡便な増殖細胞の検出実験の難しさがあった。

これらの困難さに対して、動物組織の作成法として、適切な試料の保持体と凍結包埋剤を利用した簡易凍結徒手切片法を開発した。固定された試料から、数時間で動物の組織標本を作成することができ、この手法を用いて高等学校や大学初期課程で実施できるいくつかの実験を開発した<sup>2)-5)</sup>。

さらに、動物愛護管理法の改正で、本来、マウスなど哺乳類や羊膜類を実験動物として使用するためには、組織内に動物委員会が設置されるなど、種々の規制があり、生命系大学においては可能であるが、一般の高等学校や大学初期課程では、マウスなど哺乳類を用いた実

験を簡単には実施できない。そこで、哺乳類の代替動物として、魚類や両生類を用いた組織実験を考案し、哺乳類と同等の実験系であることを示した<sup>4)5)</sup>。加えて、DNAを構成するヌクレオチドの一つチミジンの相同体であるプロモデオキシウリジン(BrdU)を用いた増殖細胞の検出実験は、通常マウスを用いて実施される。マウスの代替動物として、魚類・両生類においてBrdUを用いた実験法が適用できるかを検討した結果、魚類・両生類でも、マウスと同様の増殖細胞の検出が可能であった<sup>6)</sup>。この実験をもとに、マウスの代替動物としてアフリカツメガエルを用いて、X線の分裂細胞への影響を検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験動物

アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)は通常の方法で、産卵・発生させ、後肢が成長した変態中の幼生(st.53-st.57)を用いた(図1)。

#### (2) X線照射と分裂細胞の標識

アフリカツメガエル幼生6匹を3匹の対照群(無照射群)と3匹のX線照射群とした。X線照射は小動物X線撮影用の軟X線照射装置(SOFTEX M-150WS)を用いた。アフリカツメガエル幼生を小容器に入れ、装置内に入れた。照射条件は140kV・5mAの出力で、照射率は22.42 R/minとし、2Gy(照射時間8分56秒)照射した。2GyのX線照射は幼生の生存には影響しない。照射群、対照群共に、幼生の分裂細胞を次のように標識した<sup>6)</sup>。

5-Bromo-2'-deoxy-Uridine(BrdU; SIGMA-AIDRICH社)を用いて分裂細胞を標識した。アフリカツメガエルでは、BrdUを純水に10mg/mlの濃度で溶解し、幼生には0.05ml(0.5mg/幼生)腹腔内投与した。さらに、幼生の飼育水に0.5mg/mlの濃度でBrdUを溶解し、48時間飼育し、経口投与した(48時間BrdU標識)。

BrdU標識標識の終了時、カエル幼生は飼育水を25%エタノールとし麻酔死させた。100%エタノールで固定・保存した後、ブアン氏固定液で24時間再固定し、薄切作業に適した組織の硬さを得た。実体顕微鏡下で、腹壁を開腹したのち、渦巻状の小腸の下にある胃を目印として、胃から続く小腸の部分を取り出した。

#### (3) 簡易凍結徒手切片法による組織切片の作成

動物の組織切片の作成方法は次の通りである。中央に穴を開け、20%エタノールで保存したブロックリー髓を保持体とした。支持体の穴に、凍結包埋剤(OCTコンパウンド、サクラファインテックジャパン)を入れ、試料を挿入した。ブロックリー保持体と内部の凍結包埋剤を冷凍庫(-80℃)で冷却したアルミ板を挟み、冷却、固化させた。保持体と試料をカミソリの刃(フェザー製)を用いて、徒手切片により標本を作製した。薄切された切片をシャーレ中の生理食塩水に取り、凍結包埋剤を溶解した。切片をスライドグラスに取り、抗BrdU抗体による免疫染色で核内のBrdUを検出した。染色後、水性包埋剤(Mount-Quick; DAIDO SANGYO Co.)で封入、カバーガラスをかけた。カバーガラスの周囲を透明マニキュアで密封し、長期保存の標本とした。生物顕微鏡(55i-55IF-15-3; ニコン)で観察し、顕微鏡用デジタルカメラ(Moticam1080; 島津理科)で写真撮影を行った。

#### (4) BrdU検出法

BrdU の検出は BrdU 染色キットを用いた (BrdU *In-Situ* Detection Kit; BD-Bioscience 社). スライドガラスの水を乾燥させ, 組織薄片をスライドガラスに密着させた. 1%トリプシン液(リン酸緩衝液(PBS))を滴下, 3 分間(32 )タンパク質分解処理して, 核内 DNA を露出させた. 緩衝液(キット溶液 A)で 3 分間, 3 回洗浄した. 抗体は 1 本鎖 BrdU に反応するため, 試料を乾熱滅菌器内 10 分間(89 )熱処理し, 1 本鎖 DNA に解離した. 20 分間室温に放置冷却, PBS で 3 分間 3 回洗浄した. ビオチン化 BrdU 抗体を滴下し, 湿室内で湿度を保ちながら 90 分間反応させた. PBS で 2 分間 3 回洗浄した. ストレプト・アビジン-HRP(ホースラディッシュスーパーオキシダーゼ酵素)を滴下し, 湿室内で 30 分間反応させた. PBS で 2 分間 3 回洗浄した. DAB(ジアミノベンチジン)クロモゲン基質溶液を滴下し, 5 分間発色させた. リン酸緩衝液で 2 分間 3 回洗浄し, 反応を停止した<sup>6)</sup>.

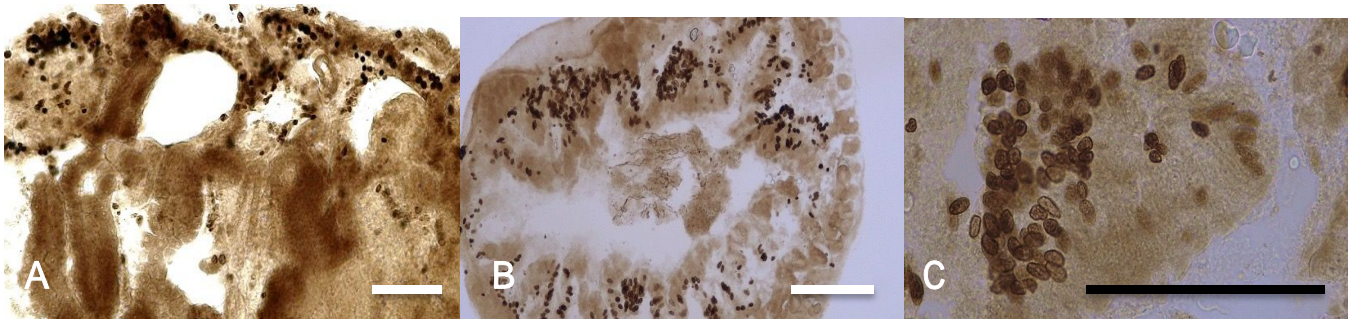


図 1 BrdU を用いて 48 時間、分裂細胞を標識したアフリカツメガエル変態中の幼生小腸の組織像 (A; X 線未照射の対照群). 多数の黒く染まった核が小腸組織内に散在する。分裂細胞が多数存在する場所 (図の上方) と、あまり存在しない場所 (図の下方) が混在する。2Gy の X 線を照射し、BrdU を用いて 48 時間、分裂細胞を標識したアフリカツメガエル変態中の幼生小腸の組織像 (B; X 線照射群)。対照群と同じように、多数の黒く染まった核が小腸組織内に散在し、X 線照射により細胞分裂が阻害されていない。X 線照射群の組織の拡大したもの(C)。多数の核が黒く染色されていることがわかる。それらの核は、楕円形の整った形をしており、核の形状に乱れは観察されない。また、周辺の組織構造の乱れも観察されず、2Gy の X 線照射により、核や組織の形態に変化は見られない。スケールは 100  $\mu$ m。

#### 4. 研究成果

アフリカツメガエル変態中の幼生小腸の分裂細胞を 48 時間 BrdU で標識した組織像を示す(図 1)。変態中の幼生小腸において、BrdU 陽性として検出される分裂細胞は小腸組織内に広く分散して存在する。この分布様式は子ガエルの小腸と同様であるが<sup>6)</sup>、分裂細胞の数は変態中の幼生の方が多い。おそらく、変態により食性が草食性から雑食性へと変るため、小腸の発達と細胞の置き換わりが生じているものと思われる。マウスの小腸では、分裂細胞が柔毛基部のクリプト周辺に局在し<sup>9)</sup>、子ガエル<sup>6)</sup>や変態中の幼生(図 1A)の小腸では分裂細胞が分散して存在し、それらの分布様式とは大きく異なっていた。

X 線 2Gy 照射後、分裂細胞を 48 時間 BrdU で標識した組織像を示す(図 1BC)。BrdU 陽性として検出さ

れる分裂細胞は、未照射の幼生(図 1A)と同様、小腸組織内に広く分布し、消失しなかった。マウスの小腸上皮細胞では、柔毛基部クリプトに局在する分裂細胞はX線1Gy照射すると、ほとんど消失する<sup>9)</sup>。しかし、アフリカツメガエル幼生の小腸では、2倍の照射量にもかかわらず、分裂細胞が無処理の幼生の組織と同じように、分裂細胞が存在した。その理由として、アフリカツメガエルなど両生類の小腸の分裂細胞は、マウスの小腸分裂細胞に比べ、放射線に対して耐性があることが考えられる。他の理由として、マウスでは小腸上皮幹細胞から細胞分裂が盛んな細胞が生じ、常に、柔毛基部で細胞分裂をしており、X線によって細胞分裂を停止する。一方、両生類の小腸では、細胞分裂を起こす細胞が広く散在し、X線が照射された時に安定した状態(細胞周期のG1期G2期)にいた細胞がX線照射後に分裂をした可能性も考えられる。

組織による放射線の感受性の比較として、高い感受性を持つリンパ組織、造血組織、生殖腺、腸上皮、胎児、水晶体があり、やや高い感受性を持つ口腔粘膜、毛根細胞、膀胱上皮、食道上皮、皮膚上皮、一方、低い感受性を持つ筋肉、神経、結合組織がある<sup>8)</sup>。このように、放射線に対して小腸上皮は影響を受けやすい。その原因として小腸上皮細胞の活発な細胞分裂の抑制がある。この現象を理解する実験系として、マウス小腸の柔毛基部に存在する分裂細胞にX線を照射すると細胞分裂が停止する実験は適したものである。医学的な観点から、がん細胞の放射線照射や抗がん剤による細胞分裂の抑制を利用するが、この仕組みを理解する実験系としても適している。しかし、哺乳類のマウスは、動物愛護管理法から、適切な施設、管理組織、熟練した実験者が不可欠で、羊膜類に属する哺乳類、爬虫類、鳥類は、学校で容易に扱えるものではない。このような実験に対する制限の多い羊膜類とは違い、両生類や魚類は実験材料として学校でも扱いやすい。また、BrdUを用いた分裂細胞の検出実験も特殊な実験器具を必要とせず、学校でも実施可能である<sup>6)</sup>。しかしながら、本報告で小腸の細胞分裂が放射線に対して高い感受性を持つ実験系としては、両生類は使用しにくいことがわかった。

本研究は、科学研究費補助金(課題番号19K03141)の援助を受けて実施した。

#### <引用文献>

- 1) 有馬朗人ら編(2019) 新版理科の世界3 pp.278-290. 大日本図書.
- 2) 梶原裕二・八十田茂希(2011) 「凍結包埋剤を用いた簡便な徒手切片法による動物組織とニワトリ胚の観察」. 『生物教育』52: pp. 112-120.
- 3) 梶原裕二・山崎康平(2012) 「簡易凍結徒手切片法を用いた身近な魚類と両生類の解剖・組織実習」. 『京都教育大学紀要』121: pp. 43-51.
- 4) 梶原裕二(2016) 「簡易凍結徒手切片法を用いた組織観察による多様な動物の構造と系統を学ぶ実験」. 『京都教育大学紀要』129: pp. 1-13.
- 5) 梶原裕二(2017) 「簡易凍結徒手切片法により生物の体を調べる」. 『生物の科学遺伝』71巻(5号): pp. 466-471.
- 6) 梶原裕二(2016) 「哺乳類代替動物としてアフリカツメガエルを用いた分裂細胞の検出実験」. 『京都教育大学紀要』133: pp. 35-41.
- 7) 國友正和ら編(2017) 改訂版物理 pp.364-394. 数研出版.
- 8) 武田 健・太田 茂編(2008) ベーシック薬学教科書12(環境) pp.106-130. 化学同人.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 梶原裕二	4. 巻 75(2)
2. 論文標題 多様な草本植物の葉や花の組織を観察する工夫	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物の科学遺伝	6. 最初と最後の頁 170-176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松山 莉奈, 梶原 裕二	4. 巻 23
2. 論文標題 脊索の重要性を理解する実験教材の開発-脊椎動物幼生の体を支える脊索-	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 フォーラム理科教育	6. 最初と最後の頁 27-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梶原裕二
2. 発表標題 カエル幼生小腸の分裂細胞へのX線の影響-生物分野の放射線科学リテラシーの充実3-
3. 学会等名 第71回日本理科教育学会全国大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梶原裕二
2. 発表標題 カエルを用いたX線の細胞分裂への影響・照射線量の検討-生物分野の放射線科学リテラシーの充実2-
3. 学会等名 日本理科教育学会第70回全国大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梶原裕二
2. 発表標題 X線の細胞分裂への影響を調べる教材の検討ー生物分野の放射線科学リテラシーの充実ー
3. 学会等名 第69回日本理科教育学会全国大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 半本秀博 編集	4. 発行年 2020年
2. 出版社 株式会社エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 386
3. 書名 実践生物実験ガイドブック	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------