

環境内の特定要因に関する研究

9・1 卵子の染色体異常誘発原の研究

— 母体の加齢と染色体不分離誘発機序の解明 —

旭川医科大学生物化学教室

美 甘 和 哉

上 口 勇次郎

舟 木 賢 治

ま え が き

染色体の数的異常を生ぜしめる原因には、母体の加齢、遅延排卵・遅延受精による卵子の過熟など、卵子のエイジングがあげられるが、またステロイドホルモンや性腺刺激ホルモンの作用も問題視されている。これら母体の生理的条件と密接な関連をもつ染色体異常誘発因子を多角的に検討しておくことは、放射線・化学物質等環境変異原の染色体に及ぼす作用を適確に評価するうえで極めて重要な基礎をなすものである。

しかし、従来行われてきたこの種の研究においては、使用する実験動物の生殖生物学的特性に対する理解の不足や、卵子・初期胚の染色体標本作製法の不備など、研究の最も基本となる部分での重大な欠陥が目立ち、信頼できる報告が殆んどないといっても過言ではない。そこで、今後の研究では、①生殖生理学的研究法に適した実験動物を選択する、②成功率・信頼度の高い卵子・初期胚の染色体標本作製法を用いる、など十分な改良を行ったうえで上述の染色体異常生成原の検討・再検討を実施する必要がある。

研 究 目 的

今年の研究の一つである「母体の加齢と染色体不分離誘発機序の解明」は、前述の実験方法の改善を行ったうえで、以下1)、2)を目的として実施されたものである。

(1) 老齡母獸の卵子や初期胚では、生殖適齡期の母獸のものにおけるより染色体の数的異常が高頻度に生ずるといわれているが、この点を再検討するとともに、第1、第2成熟分裂および卵割期それぞれで起る染色体不分離の頻度を区分できるようにする。

(2) 老齡母獸の卵子の第1成熟分裂中期では、互いに分離して一価染色体を形成する染色体の頻度が高く、このような染色体異常行動が成熟分裂にあたって染色体不分離を生ずる直接的原因となるとする仮説(Henderson & Edwards, 1968)があり、最近再び論議の的となっているのでこの仮説の可否を明らかにする。

研 究 方 法

実験動物には、室温 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \sim 60\%$ 、照明 $5:00-19:00$ 時の安定した最適条件下で繁殖育成された生後 $5 \sim 8$ ヶ月(対照群)、 $16 \sim 19$ ヶ月(老齡群)の雌チャイニーズハムスターを用いた。腔垢検査により確認された正常4日周期において排卵された卵子、または受精卵のみを使用し、母体の加齡以外の染色体異常生成原の混入を排除した。

成熟分裂期及び卵割期の染色体不分離の頻度とその生成機序を調べるために、第1・第2卵母細胞及び2細胞期胚での染色体分析を行った。

第1卵母細胞は発情前期(LH放出後約3時間)に次回排卵予定の成熟濾胞より有柄針でつつき出し、染色体標本作製のために約3時間 colcemid ($0.025 \mu\text{g}/\text{ml}$) 入りの培養液で培養した。さらに、卵から濾胞細胞を取り除く前処理として、 4°C で1晩保存した。第2卵母細胞は発情期(排卵後約6時間)に卵管膨大部より採取した。2細胞期胚は妊娠2.5日(受精後58時間)に卵管貫流により採取し、colcemid ($0.18 \mu\text{g}/\text{ml}$) 入りの培養液で約6~7時間培養した。これらの採取した卵はそれぞれトリプシン処理・低張処理を施した後、本研究室で開発した漸進固定空気乾燥法(Kamiguchi, et al'76)により染色体標本作製した。

研 究 結 果

対照群70頭、老齡群77頭から得られた第2卵母細胞それぞれ515個、

5, 20個について染色体分析を行った結果, 第1成熟分裂期の不分離頻度は各々1.4%, 4.1%で老齡群で有意に高かった(表1)。また, 対照群48頭, 老齡群42頭から得られた2細胞期胚345個, 303個についても, 同様に, 老齡群で有意に高い不分離頻度が得られた(対照群2.5%, 老齡群8.9%)。モザイクを除いた異数体に示される第1・第2成熟分裂期の不分離頻度だけみても各々2.5%, 6.5%で老齡群で高く, 統計的に有意差があった(表2)。モザイクは老齡群でのみ認められた。母体の高齡化に伴う卵子の加齡は, 成熟分裂期だけでなく, 卵割期においても染色体不分離を誘発することを示している。

また表3に示されるように, 卵子の不分離頻度は第1成熟分裂期で4.1%と最も高く, 第2成熟分裂期と第1卵割期では2細胞期胚の染色体分析結果からいずれも2.4%とほぼ等しいことが明らかとなった。しかし, 第2成熟分裂期の不分離頻度の中には精子由来の可能性も含まれると考えられ, 実際にはこの値よりも低くなるものと推定される。

一方, Henderson & Edwardsの仮説の可否を明らかにするために第1成熟分裂中期染色体調査を行ない, 第2成熟分裂中期染色体分析結果と比較検討した。まず形態的特徴が明瞭なチャイニーズハムスターの染色体をA, B, Cの3群に分け, 一価染色体と不分離染色体の頻度を3群の間で比較した結果, 一価染色体がC群(8.7%)でしかみられなかったのに対し, 染色体不分離はA群(0.28%), B群(0.61%), C群(0.38%)の何れの群でも生じていて, しかもB群で最も高い頻度を示した。また第2卵割中期の染色体調査でもA群(0.49%), B群(0.57%), C群(0.32%)とほぼ同様の傾向がみられた。この結果は明らかにHendersonらの仮説を否定するものである。

考 察

流産胎児や新生児の細胞遺伝学的研究により, 母体の高齡化が染色体異常を増加させることが明らかにされている。しかし, 卵子形成期・初期卵割期で染色体不分離がどのような割合で生じているか, また個々の染色体についてみると不分離の頻度はどうなっているのか, などの点については全く不明のままで

あった。このような問題を解明するには個々の染色体を識別することが必要であり、当然、成熟分裂期・初期卵割期の染色体分析が高い成功率で行われなければならない。

これらの点を考慮して、個々の染色体の形態的特徴が明瞭なチャイニーズハムスターを用い、第1・第2卵母細胞および2細胞期胚における効率の高い染色体分析を可能にしたことにより、生成直後の染色体異常を殆んどもれなく検出し得たことは、従来の研究では達し得なかった成果である。

今回の研究は、一部で調査例数が十分とはいえないが、明らかにし得た点を整理すると、以下の通りである。

(1) 母体の加齢は、第1、第2成熟分裂、および卵割期の何れの時期でも染色体不分離を誘発する。

(2) 不分離の起る割合は、第1成熟分裂で最も高く、ついで卵割期、第2成熟分裂の順であり、従来、第2分裂で最も高いと考えられてきたことは必ずしも正しくない。

(3) 染色体不分離はすべての染色体で起り得るもので、特定の染色体で特に多発する傾向はみられない。

(4) 老齢個体の卵子の第1成熟分裂で頻繁にみられるいわゆる一価染色体形成と染色体不分離とは直接的な関係はない。

ここに報告した卵子・初期胚を用いる研究で示された方法は、その成果から明らかな通り、種々の環境変異原の染色体異常誘発能の決定・評価に極めて有効であるだけでなく、個々の変異原について、その染色体異常生成機序まで明らかにする手掛りを提供するものである。現在、この研究グループでは同じ方法を用いて、以下の課題の検討が進行中であり、次年度以降も継続する予定である。

- (1) 遅延排卵による染色体不分離誘発機序の検討。
- (2) 妊娠・授乳による生理的排卵抑制の卵子染色体に及ぼす影響の検討。
- (3) 経口避妊薬による人為的排卵抑制の卵子染色体に及ぼす影響の検討。
- (4) 性腺刺激ホルモン等による誘発排卵の卵子染色体に及ぼす影響の検討。
- (5) 種々の発育段階の卵巣卵染色体に及ぼす放射線の影響の検討。

要 約

チャイニーズハムスターの老齡母獣と生殖適齡母獣を用いて、第1・第2成熟分裂および第1卵割のいずれの分裂においても前者の群で染色体不分離が有意に増加することを確認し、同時に、加齡による卵子の染色体異常誘発機序の検討を行った。

発 表

I 著書・論文

- 1) 美甘和哉 (1977), 卵子の aging と先天異常, 北海道医学雑誌, 52巻: 226-232.
- 2) 美甘和哉 (1977), 哺乳類卵子および未着床胚の染色体観察と分析, 臨床婦人科産科, 31巻: 1137-1141.
- 3) 美甘和哉, 染色体異常発生要因, 「染色体異常 — ヒトの細胞遺伝学 —」分担執筆, 朝倉書店, (印刷中)
- 4) 美甘和哉, 生殖細胞のエイジング — 染色体異常の発生機構 — 代謝15巻, (印刷中)
- 5) Kamiguchi, Y., Funaki, K., and Mikamo, K. (1977). A new technique for chromosome preparation of the murine oocytes. Jap. J. Human Genet. 22: 179-181.
- 6) Kamiguchi, Y., Funaki, K., and Mikamo, K. (1977). Chromosomal anomalies caused by intrafollicular overripeness in the early zygotes. Jap. J. Human Genet. 22: 182-183.
- 7) 上口勇次郎・舟木賢治・美甘和哉, 齧歯類卵子および未着床胚の染色体標本作製法, 先天異常 18巻, (印刷中)

II 学会発表

- 1) 美甘和哉, 放射線の卵巢照射は染色体不分離を誘発するか, 第9回放医研シンポジウム—発癌と遺伝障害— 昭和52年12月・千葉。
- 2) 上口勇次郎・舟木賢治・須田稔・美甘和哉, チャイニーズハムスターの排卵時刻及び後分娩排卵の有無について, 日本実験動物研究会第12回研究発

表会，昭和52年8月，西宮。

3) 舟木賢治・上口勇次郎・美甘和哉，チャイニーズハムスターの排卵，着床，出産の経年的変化，日本実験動物研究会第12回研究発表会，昭和52年8月，西宮。

4) 芳賀宏光・山田隆一・清水哲也・上口勇次郎・舟木賢治・美甘和哉，経口避妊薬の催奇性に関する発生学的・細胞遺伝学的研究，第25回日本産科婦人科学会北日本連合地方部会，特別講演 昭和52年9月，札幌。

5) 芳賀宏光・山田隆一・清水哲也・上口勇次郎・舟木賢治・美甘和哉，排卵抑制後の回復周期における卵および胎仔の異常について・第20回日本不妊学会北海道地方部会，昭和53年1月，札幌。

6) 上口勇次郎・舟木賢治・小出展久・美甘和哉，遅延排卵と発生・染色体異常・第20回日本不妊学会北海道地方部会，昭和53年1月，札幌。

7) 舟木賢治・上口勇次郎・菅原茂樹・美甘和哉，母体の加齢と染色体異常の生成機序について，第20回日本不妊学会北海道地方部会，昭和53年1月札幌。

表1 老齡母獣の第二卵母細胞における染色体異常(チャイニーズハムスター)

	母獣数	採卵数	分析総数 (%)	染 色 体 分 析					計 (%)
				正常卵 (%)	異 常 卵			計 (%)	
					高一倍性 (%)	低一倍性 (%)	染色体 断片 (%)		
対 照 群 (5-8 月齡)	70	515	447 (86.8)	439 (98.2)	3 (0.7)	3 (0.7)	2 (0.4)	8 (1.8)	
老 齡 個 体 群 (16-19 月齡)	77	520	438 (84.2)	418 (95.4)	8 (1.8)	10 (2.3)	1 (0.2)	1 (0.2)	20 (4.6)

異常卵の出現頻度:有意差あり(P<0.02)

異数性のみ出現頻度:有意差あり(P<0.02)

表2 老齡母獣の二細胞胚における染色体異常(チャイニーズハムスター)

	母獣数	採卵数	分析総数 (%)	染 色 体 分 析					計 (%)	
				正常卵 (%)	異 常 卵			計 (%)		
					高二倍性 (%)	低二倍性 (%)	モザイク (%)			一倍性 (%)
対 照 群 (5-8 月齡)	48	345	284 (82.3)	272 (95.8)	4 (1.4)	3 (1.1)	1 (0.3)	4 (1.4)	12 (4.2)	
老 齡 個 体 群 (16-19 月齡)	42	303	248 (81.8)	219 (88.3)	8 (3.2)	8 (3.2)	6 (2.4)	1 (0.4)	6 (2.4)	29 (11.7)

異常卵の出現頻度:有意差あり(P<0.01)

異数性のみ出現頻度:有意差あり(P<0.01)

表3 老齡母獣の卵子の成熟分裂期および第一卵割期における染色体不分離頻度

	分析総数	不分離回数 (%)
第一成熟分裂期	438	18 (4.1)
第一および第二 成熟分裂期	248	16 (6.5)
第一卵割期	248	6 (2.4)

↓ **検索用テキスト** OCR(光学的文字認識)ソフト使用 ↓
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります

まえがき

染色体の数的異常を生ぜしめる原因には、母体の加齢、遅延排卵・遅延受精による卵子の過熟など、卵子のエイジングがあげられるが、またステロイドホルモンや性腺刺激ホルモンの作用も問題視されている。これら母体の生理的条件と密接な関連をもつ染色体異常誘発因子を多角的に検討しておくことは、放射線・化学物質等環境変異原の染色体に及ぼす作用を適確に評価するうえで極めて重要な基礎をなすものである。