

## 細分課題9

### 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

旭川医科大学生物学教室

美 甘 和 哉

上 口 勇次郎

舟 木 賢 治

#### ま え が き

数的染色体異常の大部分は配偶子形成期あるいは初期卵割期に起こる。したがって、その生成原・生成機序の解明には発生初期における染色体研究が極めて重要である。しかし、この分野の従来の研究には、実験動物の選定、実験条件の設定、染色体標本作製技術等、研究の基礎となる部分での重大な欠陥が目立つ。我々はこれらの諸点に厳密な検討・改良を加えたうえで、母体の加齢に伴う卵子のエイジングと染色体不分離誘発機序について新しい知見を得たことはすでに昨年度の報告で述べた。

現在、数的染色体異常生成原としての可能性が問題になっているものには、卵子のエイジングのほかに抗腫瘍薬、経口避妊薬、排卵誘発剤、重金属（有機水銀、カドミウム etc.）等の化学物質や放射線などがあげられるが、厳密な実験条件のもとで再検討を必要とすることは前述した通りである。我々は実験動物としてチャイニーズハムスターを選び、各成熟分裂期又は卵割期で生じる異常の種類・頻度、あるいは卵子及び精子に由来する異常の種類・頻度を正確に把握し得るような実験系を確立し、種々の環境変異原の染色体に及ぼす作用を適確に評価することを企てている。

#### 研 究 目 的

上述の諸点をふまえ、以下の三点について染色体不分離誘発機序の検討を行った。

1) 母体の加齢と染色体異常：昨年度までの研究で、老齡母獸の第1, 第2成熟分裂及び卵割期でそれぞれ起こる染色体不分離頻度はいずれも生殖適齡母獸の場合より有意に高いことを認めたが、今年度はさらに例数を増して統計的精度を高める。

2) 誘発排卵と染色体異常：ヒトでは誘発排卵による妊娠で起こる自然流産児に染色体異常が多いという報告があり、ウサギ、マウスの動物実験でも同様の報告があるが、いまだ十分な結論が得られていない。また、染色体異常誘発要因を検討する動物実験で、多数の検体を得る目的でしばしば誘発排卵が行われており、処理そのものの異常誘発能が問題となっている。そこで誘発排卵処理後の卵管卵を用いて第1成熟分裂期に染色体不分離が誘発されるか否かを検討する。

3) 受精卵の染色体異常：染色体異常のうち卵子に起因して生じる異常と精子に起因する異常をそれぞれ正確に把握する目的で、1細胞期の雌雄両前核の融合が起こる前の時期に染色体標本作製を行い、両前核に由来する核板を区別して分析できる方法を確立する。

## 研 究 方 法

実験動物には、室温  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $50 \sim 60\%$ 、照明  $5:00-19:00$  の安定した最適条件下で繁殖育成されたチャイニーズハムスターを使用した。実験は以下の方法で行われ、染色体標本作製には本研究室で開発された漸進固定空気乾燥法が用いられた。

1) 母体の加齢：生後5~8ヶ月(対照群)、16~19ヶ月(老齡群)の雌を用い、膣垢検査により確認された正常4日周期で排卵された卵子、または受精卵のみを使用し、母体の加齢以外の染色体異常生成原の混入を排除した。

2) 誘発排卵：発情期の午後2時に  $\text{PMS } 0.1 \text{ IU/g BW}$  を腹腔内に注射し、48時間後、 $\text{HCG } 0.2 \text{ IU/g BW}$  を同様に投与した。さらに20時間後、排卵された卵管卵を輸卵管膨大部より、排卵に至らなかった卵巢卵を成熟未排卵濾胞よりそれぞれ採取した。

3) 1細胞期胚の標本作製：第1卵割中期に至る約2時間前(排卵後23時間)に  $10 \mu\text{g/g BW}$  コルヒチンを腹腔内注射し、4時間後に輸卵管の貫流によ

り採卵する。分裂中期に達していない卵(×80倍で核小体が観察される)はさらに0.04  $\mu\text{g}/\text{ml}$  コルセミドを含むMEM培地で培養を続行する。分裂中期卵は通常通り染色体標本作製を行う。低張処理は40%牛胎児血清で1時間がよい。

## 研 究 結 果

1) 母体の加齢と染色体不分離誘発：今年度は2細胞期の染色体分析のデータに新たに対照群19頭137卵, 老齢群11頭61卵の分析結果が加えられ, 老齢群計296卵中異数性(18例, 6.1%), モザイク(9例, 3.1%)のいずれも対照群(計407卵中各々11例, 2.7%及び3例, 0.7%)に比べて有意に増加しており, 昨年度の結果が再確認された(表1)。

2) 誘発排卵と染色体異常：誘発排卵処理を受けた個体中, 11卵以上排卵した41頭について第2成熟分裂中期染色体分析を行った(表2)。採卵された卵管卵831卵中, 783卵(94.2%)を分析した結果, 異数性は26例(3.3%)で対照群の1.4%(447卵中6卵)に比べて有意に増加していた( $P < 0.05$ )。一方, 染色体断片, 倍数性など他の染色体異常の出現頻度には対照群との間に差がなかった。実験群にみられる異数性には染色体数の極端に多い, あるいは少ない異常が多く含まれることが特徴である。また, 誘発排卵処理によって成熟させた濾胞の中には未排卵のまま終わるものが数多く認められるが(実験群: 全成熟濾胞数の24.4%, 対照群: 4.8%), これらの成熟未排卵濾胞から採取した卵巣卵では異数性出現頻度はさらに増加し, 244卵中16卵(6.6%)であった。

3) 受精卵の染色体異常：1細胞(第1卵割中期)の染色体標本作製法を改良して分析率を高めた。30頭の母獣から採卵した215卵中, 未受精卵3(1.4%), 前核期卵3(1.4%), 及び2細胞期卵6(2.8%)を除いた203卵(94.4%)について染色体分析が行われ, そのうち核型分析できたものは197卵(97.0%)の高率であった。

1細胞期の数的異常出現頻度は分析総数197卵中, 高数性7(3.6%), 低数性4(2.0%), 一倍性1(0.5%), 三倍性5(2.5%), 計17(8.6%)であった(表3)。これらを2細胞期の場合と比較するといずれの異常も

1細胞期の方が高い。すなわち、生じた染色体異常胚の一部はすでに第2卵割中期までの間に死亡し、あるいは発生が停止・遅延することがうかがわれる。

1細胞期の適当な時期を選べば、卵子由来の染色体の凝縮が精子由来のものより早いことを利用して核板の由来を判定することが可能である。197卵中、卵子及び精子由来の核板が分離して標本作製されたものは137卵でそのうち染色体の長さにより由来が判定できたものは約70%であった。異数体11例中、卵子のゲノムの異常5例、精子のゲノムの異常1例、両方のゲノムに異常のあるもの1例で、卵子側の異常がはるかに高かった。残りの4例は正確な判定は困難であった。コルヒチン処理により長時間分裂中期に留められた卵では染色体の短縮化が著しく、核板の由来の判定が困難な場合が多いので、コルヒチンの処理時間を短縮して分析率を上げることができる。

従来、哺乳類の一次性比についてはほとんど知見が得られていないが、今回の研究で、この動物の受精卵の性はXY70例に対してXX114例(性比0.61)で、雌に偏っているという結果が得られた。また、2細胞胚399卵の分析結果でも性比は0.81で、同様の偏りが見られている。

## 考 察

母体の加齢は第1、第2成熟分裂期及び卵割期の何れの時期でも染色体不分離を誘発することが第2卵母細胞及び2細胞胚の染色体分析から明らかにされた。今後、1細胞期でも同様の調査を行い、卵子の第1及び第2成熟分裂期、さらに精子由来の異常の頻度をより詳細に調査し、マーカー染色体を用いたヒトのダウン症の余剰染色体の由来の調査結果等と比較・検討する必要がある。

誘発排卵により卵管卵及び卵巣卵に異数性卵子が有意に増加することが明らかになったが、このことがホルモンの卵子への直接作用の結果か、あるいは卵巣内において本来排卵されないような不良卵が処理によって成熟・排卵したものであるのかは今後さらに検討しなければならない。また、今回は第1成熟分裂の不分離頻度の調査のみであったから、さらに第2成熟分裂、卵割に対する影響も調査する必要がある。

第2卵母細胞期、2細胞期に続いて1細胞期でも成功率・信頼度の高い標本作製法を開発し、第1・第2成熟分裂期、卵割期のすべての時期で異常の種類・

頻度をより正確に把握できるようになった。しかし、卵子由来と精子由来の核板を区別できるのは分析総数の約半数であるから、さらに成功率の高い技法に改良する必要がある。今回、標本作製技術の開発とともに、母体の生理的条件と密接に関連する卵子のエイジング、誘発排卵の染色体に及ぼす影響が明らかにされたことも、環境変異原の検討のための実験系を確立するうえで重要な知見となっている。

## 要 約

- 1) 母体の加齢は第1・第2成熟分裂及び卵割期の何れでも染色体不分離を誘発する。
- 2) 誘発排卵後の卵管卵及び成熟未排卵濾胞内の卵巣卵(第2成熟分裂中期)で異数性卵子が有意に増加する。
- 3) 受精卵(1細胞期)で成功率・信頼度の高い染色体標本作製法を開発した(分析率: 97.0%)。さらに、分析卵数の約半数で卵子に由来する核板と精子に由来する核板を区別、同定することができた。

## 文 献

### I. 著書・論文

- 1) 美甘和哉(1978): 染色体異常発生要因. 染色体異常 —ヒトの細胞遺伝学— . 朝倉書店. pp.195-224
- 2) 美甘和哉(1978): 生殖細胞のエイジング. 代謝, 15:607-615
- 3) 美甘和哉: 放射線の卵巣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報文集 (印刷中)
- 4) 美甘和哉: 哺乳動物の初期発生. 染色体研究法. 理工学社 (印刷中)
- 5) 美甘和哉・舟木賢治: 実験動物叢書II. 実験動物の飼育管理と手技: チャイニーズハムスター. ソフトサイエンス社 (印刷中)
- 6) 上口勇次郎・舟木賢治・美甘和哉(1978): 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, 18:41-48

## II. 学会発表

- 1) 上口勇次郎・小出展久・美甘和哉：齧歯類受精卵における染色体異常自然発生率。第29回染色体学会。昭和53年10月。千葉。
- 2) 上口勇次郎：数的染色体異常の生成機序—配偶子形成・初期卵割レベルの研究。日本人類遺伝学会第23回総会シンポジウム。昭和53年10月。新潟。
- 3) 舟木賢治・菅原茂樹・美甘和哉：母体の加齢にともなう染色体不分離とその解析。日本人類遺伝学会第23回総会。昭和53年10月。新潟。
- 4) 菅原茂樹・舟木賢治・美甘和哉：母体の高齢化にともなう一価染色体増加と染色体不分離との関連について。日本人類遺伝学会第23回総会。昭和53年10月。新潟。
- 5) 小出展久・上口勇次郎・美甘和哉：過排卵誘発と染色体異常。日本人類遺伝学会第23回総会。昭和53年10月。新潟。
- 6) 山田隆一・芳賀宏光・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発生異常に関する基礎的研究。第26回日本産科婦人科学会北日本連合地方部会総会，第66回日本産科婦人科学会東北連合地方部会。昭和53年9月。盛岡。
- 7) 山田隆一・芳賀宏光・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発生に関する基礎的研究。第58回北海道医学大会，産科・婦人科分科会，第56回北海道産科・婦人科学会。昭和53年10月。札幌。

表 1

老齢母獣の二細胞期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						
		(平均)	(%)	正常卵 (%)	異 常 卵						計 (%)
					数 的 異 常				構造異常 (%)		
					高二倍性 (%)	低二倍性 (%)	モザイク一倍性 (%)	三倍性 (%)			
対照群 (5-8月齢)	67	482	407	378	6	5	3*	2	6	7	29
(7.2)	(84.4)	(92.9)	(1.5)	(1.2)	(0.7)	(0.5)	(1.5)	(1.7)	(7.1)		
老齢群 (16-19月齢)	53	364	296	249	8	10	9**	1	8*	11	47
(6.9)	(81.3)	(84.1)	(2.7)	(3.4)	(3.1)	(0.3)	(2.7)	(3.7)	(15.9)		

\* 構造異常を含む \* 22+24 を含む  
 異常卵の出現頻度: 有意差あり (P<0.001)  
 数的異常のみの出現頻度: 有意差あり (P<0.01)  
 構造異常のみの出現頻度: 有意差なし (0.05<P)

表 2

過排卵誘発後の卵管卵及び卵巣卵 (第二成熟分裂中期) の染色体調査

	母獣数	採卵数 (平均)	分析数 (%)	染 色 体 分 析						
				正常卵 (%)	異 常 卵				その他 (%)	計 (%)
					高一倍性 (%)	低一倍性 (%)	染色体断片 (%)	倍数体 (%)		
対照群 卵管卵	70	515	447	436	3	3	2	3	11	
(7.4)	(87.3)	(97.5)	(0.7)	(0.7)	(0.4)	(0.7)	(2.6)			
実験群 卵管卵	41	831	783	750	9	17	3	2	33	
(20.3)	(94.2)	(95.8)	(1.1)	(2.2)	(0.4)	(0.3)	(0.3)	(4.2)		
実験群 卵巣卵	41	279	244	227	7	9	1		17	
(6.8)	(87.5)	(93.0)	(2.9)	(3.7)	(0.4)	(7.0)				

異数性の出現頻度 実験群卵管卵: 対照群との間に有意差あり (P<0.05)  
 実験群卵巣卵: 対照群との間に有意差あり (P<0.001)  
 実験群卵管卵との間に有意差あり (P<0.05)

表 3

チャイニーズハムスター-卵子、初期卵割胚における数的染色体異常出現頻度

	母獣数	分析総数	染 色 体 分 析					
			正常卵 (%)	異 常 卵 (%)				
				高数性	低数性	モザイク	倍数性異常	計
第二卵母細胞 (第二成熟分裂中期)	70	447	436	3	3	—	3	9
(97.5)	(0.7)	(0.7)	(0.7)	(2.1)				
1 細胞 (第一卵割中期)	30	197	180	7	4	—	6	17
(91.4)	(3.6)	(2.0)	(3.0)	(8.6)				
2 細胞 (第二卵割中期)	67	407	378	6	5	3	8	22
(92.9)	(1.5)	(1.2)	(0.7)	(2.0)	(5.4)			

↓ **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

数的染色体異常の大部分は配偶子形成期あるいは初期卵割期に起こる。したがって、その生成原・生成機序の解明には発生初期における染色体研究が極めて重要である。しかし、この分野の従来の研究には、実験動物の選定、実験条件の設定、染色体標本作製技術等、研究の基礎となる部分での重大な欠陥が目立つ。我々はこれらの諸点に厳密な検討・改良を加えたうえで、母体の加齢に伴う卵子のエイジングと染色体不分離誘発機序について新しい知見を得たことはすでに昨年度の報告で述べた。