

# 化学変異原物質の遺伝毒性に関する研究

—とくに雄マウス生殖細胞に対する影響—

[1986]

加 藤 基 恵



# 化学変異原物質の遺伝毒性に関する研究

——とくに雄マウス生殖細胞に対する影響——

— 1 9 8 6 —

加藤基恵



## 目 次

緒言	1
第1章 マウス1細胞期胚の染色体標本作製法の改良	7
1.1. 無処置マウスにおける実験	9
1.1.1. 材料と方法	10
1.1.2. 結果	15
1.1.3. 考察	20
1.1.4. 小括	24
1.2. 化学変異原物質の雄マウス投与における実験	24
1.2.1. 材料と方法	25
1.2.2. 結果	30
1.2.3. 考察	41
1.2.4. 小括	45
第2章 優性致死突然変異に関する検討	46
2.1. 着床前後の胚発生への影響	47
2.1.1. 材料と方法	47
2.1.2. 結果	49
2.2. 優性致死試験	53
2.2.1. 材料と方法	54
2.2.2. 結果	54
2.3. 考察	65
2.4. 小括	69
第3章 遺伝性転座に関する検討	71
3.1. 妊孕性への影響	72



3.1.1.	材料と方法	73
3.1.2.	結果	73
3.2.	遺伝性転座個体精巢の組織学的所見	75
3.2.1.	材料と方法	75
3.2.2.	結果	76
3.3.	転座染色体の観察	76
3.3.1.	材料と方法	79
3.3.2.	結果	80
3.4.	考察	84
3.5.	小括	87
第4章	精巢ならびに精子に及ぼす影響	89
4.1.	処理当代個体精巢への組織学的影響	90
4.1.1.	材料と方法	91
4.1.2.	結果	91
4.2.	精子形態および機能への影響	99
4.2.1.	材料と方法	100
4.2.2.	結果	100
4.3.	不定期DNA合成について	102
4.3.1.	材料と方法	103
4.3.2.	結果	104
4.4.	考察	107
4.5.	小括	112
第5章	射出精液を介した化学物質の雌体内への搬入について	113
5.1.	射出精液中のDSDPの検出	113
5.1.1.	材料と方法	114



5.1.2. 結果	116
5.2. D S D P の雌個体への生物学的影響	116
5.2.1. 材料と方法	116
5.2.2. 結果	118
5.3. D S D P を雄に投与した場合の優性致死作用	118
5.3.1. 材料と方法	119
5.3.2. 結果	119
5.4. 交尾直後の雌腹腔内への D S D P 投与による優性致死作用	121
5.4.1. 材料と方法	121
5.4.2. 結果	121
5.5. 雄への D S D P が 1 細胞期胚の染色体に及ぼす影響	125
5.5.1. 材料と方法	125
5.5.2. 結果	125
5.6. D S D P の雄マウス投与による卵割への影響	125
5.6.1. 材料と方法	127
5.6.2. 結果	127
5.7. D S D P 投与の精子形態への影響	127
5.7.1. 材料と方法	129
5.7.2. 結果	129
5.8. 考察	129
5.9. 小括	131
第 6 章 総合考察	133
第 7 章 結論	143
謝辞	145







## 緒 言

我々の周囲には生命の本体であるDNAに障害を与える放射線や化学物質などの環境変異原物質が多数存在している。それらの環境変異原物質が体細胞に突然変異を生じさせた場合は、癌や奇形などを誘発し、一方、生殖細胞に突然変異を誘発した場合はヒトに見られるような常染色体優性、常染色体劣性、伴性優性、伴性劣性遺伝病などのメンデル性の単純遺伝病、多因子遺伝病および染色体異常などの遺伝的障害を子孫において引き起こす可能性が考えられる。ある遺伝的障害は世代を経るに従って集団中に拡散し、究極的には集団全体の問題となる可能性もある。

化学物質による突然変異作用はマスタードガスをショウジョウバエに作用させたAuerbachとRobsonの実験により、明らかになった(1947)。その後サリドマイドによるアザラシ症が世界各地に発生して、化学物質の安全性に関して調査を行う必要性が強く要望されるようになってきた。特に最近、発がん物質は短期検出法により検出された突然変異原物質と相関性が高いことが明らかとなり、突然変異に対する認識が高くなってきた。今日では遺伝物質でおこる変化を全て突然変異とよんでいる。突然変異の原因となる化学物質としては、工業生産関連その他の各種排出物、医薬品、食品添加物、農薬、化粧品などのなかに含まれるさまざまなものが考えられる。

環境変異原研究の目的の一つにはヒトにおける遺伝的障害の事前評価がある。かかる事前評価にあたり、膨大な数の環境化学物質の中から遺伝的障害を誘発する物質を検出するために、サルモネラ菌、酵母、アカパンカビ、カイコ、哺乳動物の培養細胞などを用いた数多くの検出法が考案されてきた。これは突然変異のおこるターゲットがウィルスからヒ



トにいたるまで共通のDNAであるためである。しかし、環境変異原物質の突然変異原性を検出する目的は、ヒトの生殖細胞のDNAに変化を誘発する可能性を明らかにする点にある。ヒトに対する遺伝的障害を問題とする場合は、実態に立脚した条件を考慮して、それらに近接させる必要があり、化学物質が生体内に取り込まれる際の制限、体内での代謝活性化や失活化、細胞内への透過性やDNA障害の修復などの問題を考慮する必要がある。哺乳動物の雄個体に化学物質を投与すると、血液—精巣関門（Setchellら，1967，1969）によって化学物質の生殖細胞への接触は防がれるが、場合によって生殖細胞に到達することもある。さらに生殖細胞は減数分裂という体細胞と異なる複雑な分裂様式をとる。減数分裂過程においては、染色体の構造も複雑に変化すると同時にそれぞれの発育段階の生殖細胞は生理・生化学的にも変動する。哺乳動物に対する環境変異原の遺伝的障害の特異性を明らかにすることはヒトへの外挿に際して重要な情報を提供してくれるものと考えられる。以上の点を考えた場合、突然変異のおこるターゲットがウィルスからヒトに至るまで変わらないとしても、やはり哺乳動物の生殖細胞を用いた検出系が必要である。遺伝的障害の検出系としては、一世代の期間が短く、繁殖性が良く、個体レベルで大量にしかも手軽に使用できる哺乳動物が望ましい。従って、ウシ、ウマ、ブタ、イヌを検出系として用いることは困難である。マウスは系統が確立されており、遺伝的障害の検出系として適している。

遺伝的障害は多種多様で、単一の検出法で全ての遺伝的障害を検出することは不可能に近い。遺伝的障害は一般に遺伝子と染色体レベルの2種類に大別される。遺伝子突然変異には塩基置換、塩基削除、挿入、主鎖切断などがあり、一方、染色体異常には数的および形態的变化がある。

マウス生殖細胞の遺伝子突然変異の検出系としては主に特定座位試験が採用されている(W.L.Russell, 1951; Searle, 1984)。染色体異常の検出系としては優性致死試験(Batman, 1966; Röhrborn, 1970)や遺伝性転座試験(Falconer ら, 1952)が知られている。

優性致死試験は他の哺乳動物を用いた検出系に比べミュータント系の動物を必要とせず比較的簡単で所要期間も短く、また判定も簡単なことから遺伝毒性試験の領域で重要視されている。優性致死突然変異 (dominant lethal mutations) とは、精子または卵子どちらか一方の配偶子のDNAに障害が生じた場合、ヘテロ接合型の卵が発生の途中で死亡してしまう現象をいい、結果的に優性致死試験では流産が測定の対象となっている。化学変異原物質による優性致死突然変異はX線照射の場合(Ehling, 1971)と異なり、全ての精子形成過程に誘発されるわけではなく、化学変異原物質の化学的特性により優性致死突然変異を生じる時期が異なることが報告されている(Ehling ら, 1968; Ehling, 1977)。また、優性致死突然変異の原因は受精後の初期胚に検出される数的あるいは構造的な染色体異常が原因であろうと考えられている(L.B.Russel, 1962)。哺乳動物の優性致死誘発機序に関し、優性致死が配偶子の障害によるものであることを直接証明したのはBrewenら(1975)であった。Brewenらは methyl methanesulfonate (MMS) を雄マウスに投与し、交配させ、1細胞期胚の染色体を観察した結果、染色体異常の誘発時期と精子形成過程における優性致死誘発時期とが一致したことを報告している。また、MatterとJaegar(1975)、Hitotumachi とKikuchi(1977) およびBürki とSheridan(1978)はtriethylenemelamine(TEM) を雄マウスに投与し、交配して得られた4細胞期胚から胚盤胞の初期胚について染色体や胚の発生を調査した結果、染色体異常、卵割遅延、小核形成などが観察され、



それらの誘発時期は優性致死作用の見られる時期と一致することを報告している。しかし、MMSやTEMは減数分裂後の精子細胞や精子に対して優性致死を誘発する化学変異原物質であり、減数分裂前の精原細胞や精母細胞に作用して誘発する優性致死の誘発機序、また優性致死試験で観察される着床前と着床後の初期死胚の差異などの機序については明らかでない。さらに投与時の雄生殖細胞の組織学的あるいはDNAレベルの影響と優性致死との関係についても明らかでない。

遺伝性転座試験は親の生殖細胞から誘発された交換型の染色体異常が原因で子孫に転座ヘテロ個体が検出されるかどうかを観察する系である。実際に次世代のF<sub>1</sub> 個体を用いて行うので遺伝的障害の検出系として重要視されているが、実験の規模が大きく簡便ではない。転座ヘテロ個体の不妊現象は、転座ヘテロ個体の雄生殖細胞から染色体構成の不調和な配偶子が減数分裂時において50%の確立で生じるため、正常な雌個体と交配した場合、接合型の半数は死胚となり結果的に半不妊になるためと考えられている(L.B.Russell, 1962)。この転座ヘテロ個体の誘発は、放射線照射による場合だけでなく、優性致死突然変異を誘発する種々の化学変異原物質を雄マウスに投与した場合においても次世代のF<sub>1</sub> に高頻度に検出されることが報告されはじめている(Generosoら, 1980)。また、優性致死突然変異作用のある化学変異原物質がすべて次世代のF<sub>1</sub> に高頻度の転座ヘテロ個体を誘発するとは限らないことも報告されている(Generoso ら, 1979a)。優性致死突然変異と転座ヘテロ個体との関連性をみる上においても、化学変異原物質の雄マウス投与による1細胞期胚の染色体異常の誘発所見等について検討する必要性がある。

以上の優性致死試験と遺伝性転座試験は生殖細胞において誘発されたDNA障害を染色体レベルの異常として検出する系である。しかし、生



殖細胞の染色体を直接観察している系ではない。とくに減数分裂後の雄生殖細胞に誘発されたDNA障害を染色体異常として観察するには、受精後の1回のDNA合成期を経過した第1卵割期の染色体の観察においてのみ可能である。幸いマウスの1細胞期胚の染色体は第1卵割以前において精子および卵子由来の染色体の融合はなく、また卵子由来の染色体の凝縮の程度は精子由来の染色体よりも先行するので、精子由来と卵子由来の染色体の識別が可能である (Donahue, 1972b)。しかし、これまで化学変異原物質の雄生殖細胞に対するDNA障害を1細胞期胚の染色体分析で検出した報告例は少ない。このことは従来の初期胚染色体標本作製法は、技術的にまた結果の評価においても問題があるためと考えられる。

染色体異常の誘発機序に関し、体細胞の染色体に対する放射線と化学変異原物質の作用は異なる。放射線を細胞周期のG<sub>1</sub>期に作用させた場合はおもに染色体型異常が誘発され、化学変異原物質を作用させた場合はおもに染色分体型が誘発されることが知られている (Bender ら, 1974)。一方、生殖細胞の精子細胞や精子は体細胞の細胞周期のG<sub>1</sub>に相当する。精子細胞や精子にMMSを作用させ、1細胞期胚の染色体分析を行った結果、おもに染色分体型の異常が観察され (Brewenら, 1975)、TEMを作用させた場合は染色体型の異常が検出された (BurkiとSheridan, 1978) という報告がある。化学変異原物質による生殖細胞の染色体異常誘発機序についてさらに検討する必要性がある。

以上の問題点を解決するために、今回の研究においては、おもに精原細胞や精母細胞に対して優性致死作用を示すmitomycin C (Ehling, 1971) とprocarbazine hydrochloride (Ehling, 1974)、おもに精子細胞と精子に対して優性致死作用を示すmethyl methanesulfonate (Ehling

ら、1968)、cyclophosphamide(Brittinger, 1966) およびtrimethylphosphate (Lorke とMachemer, 1975)、おもに精子のみに対して優性致死作用を示すnitrogen mustard-N-oxide hydrochloride (Ehling, 1974)、すべての生殖細胞に対して優性致死作用を示す isopropyl methanesulfonate (Ehling, 1972) のアルキル化剤を用いた。

今回の研究ではまず雄生殖細胞に誘発されたDNA障害を1細胞期胚の染色体検査によって検出する目的で、マウス1細胞期胚の染色体標本作製法についての基礎的研究を行い、従来のTarkowski 法(1966)の改良・開発を行った。次に上記の既知のアルキル化剤を雄マウスの腹腔内に投与し、投与時における雄生殖細胞あるいは受精後の1細胞期胚から次世代のF<sub>1</sub> 個体に亘る種々の障害を分析し、且つそれらの障害が1細胞期胚で検出される染色体異常とどのような関連性があるかを検討した。さらに1細胞期胚の染色体分析は環境変異原物質による優性致死あるいは次世代における転座ヘテロ個体の誘発頻度を予測できる簡便な検出系になるかどうかを検討することを目的とした。

## 第1章 マウス1細胞期胚の染色体標本作製法の改良

高等動物の発生は一個の精子と一個の卵子が合体した1細胞期胚から始まる。精子形成過程における減数分裂、卵子形成過程における減数分裂と排卵、受精という選択・淘汰機構の網を通り抜け選ばれてきた精子あるいは卵子のDNAに障害が生じていた場合、そのDNA障害を有した1細胞期胚は発生の途中、致死に至らなければ次世代への体細胞のみならず生殖細胞へと分化発生し、DNA障害は伝達されていく。従って、1細胞期胚以降に伝達されていく染色体レベルの遺伝的障害は、1細胞期胚の染色体分析により検出される可能性が考えられる。

哺乳動物を用いた遺伝毒性試験においては、化学物質のDNAに対する影響を評価するために、一般に化学物質を雄個体に投与する。また、雄生殖細胞のDNA障害を染色体レベルで検出するには、受精後の第1卵割期の精子由来の染色体の観察において可能である (Donahue, 1972b)。優性致死誘発機序に関し、L.B. Russell (1962) は初期胚における数的あるいは構造的な染色体異常が優性致死を引き起こすという仮説を提案し、また Brewen ら (1975) は methyl methanesulfonate (MMS) を雄マウスに投与し、1細胞期胚の染色体分析を行い、優性致死は1細胞期胚の染色体異常が原因であることを初めて証明した。MMS による優性致死作用は、おもに減数分裂後の精子細胞や精子に対してみられるが、その他、減数分裂前の精原細胞や精母細胞、また精子形成過程全般に対して優性致死作用を示す化学変異原物質がある。これらの各種の化学変異原物質により誘発される優性致死はすべて1細胞期胚の染色体異常によるものなのかどうか、また優性致死試験において特に減数分裂前と後に作用し誘発される着床前の胚の損失は同じ1細胞期胚の染色体異常に起因して



いるものなのか明らかでない。また最近、優性致死作用を示す化学変異原物質の雄マウス投与により、次世代のF<sub>1</sub>において転座ヘテロ個体が検出され、その転座ヘテロ個体の誘発頻度は化学変異原物質の種類により異なることが報告されている(Generoso ら, 1980)。特に *isopropyl methanesulfonate* (iPMS) の雄マウス投与では、高頻度の優性致死作用を誘発するにもかかわらず、次世代のF<sub>1</sub>における転座ヘテロ個体の誘発頻度は、非常に低いことが報告されている(Generosoら, 1979a)。また化学変異原物質による転座ヘテロ個体の誘発は1細胞期胚の染色体分析で観察されるどのような種類の染色体異常に関係しているのか全く明らかでない。染色体異常の誘発機序に関し、一般に体細胞の細胞周期のG<sub>1</sub>期に化学変異原物質を作用させた場合は、おもに染色分体型の異常が誘発されることが知られている(Bender, 1974)が、雄生殖細胞に作用させた場合、1細胞期胚においてどのような種類の染色体異常が観察されるのかについても詳細な報告がない。

以上の問題点を明らかにするため、雄生殖細胞に対して異なった優性致死作用を示す各種の化学変異原物質を雄マウスに投与し、1細胞期胚の染色体分析と優性致死試験を同一条件下で同時に行ったが、この章では、とりあえず1細胞期胚の染色体分析に限定して重点的に検討した。

1細胞期胚の染色体分析を行うにあたり、1細胞期胚の染色体標本作製の技術的な問題がある。従来、哺乳動物の初期胚の染色体標本作製法にはTarkowskiの方法(1966)が用いられてきた。しかし、この方法による標本は、染色体の低数性の出現頻度が高く(Donahue, 1972a; Luthardt, 1976)、標本作製時の染色体の流出が問題となっている。また、この標本作製法は1胚ずつ1枚のスライドグラス上に微量の低張液とともに移し、固定液を滴下し固定するので、1枚のスライドグラスに1胚のみ

しか標本作製ができず、操作が煩雑で時間がかかる。従って一度に多数の胚の標本作製は不可能である。さらに排卵は排卵誘発剤により行われているが、安全性評価の研究においては排卵誘発剤の前処理による影響 (TakagiとSasaki, 1976; MaudlinとFraser, 1977) や、また投与した化学物質との相互作用をできるだけさける観点から自然排卵が望ましいと思われる。最近、染色体分析の可能な標本作製の成功率が高い方法が、チャイニーズハムスターの初期胚を用いて開発されている (上口ら, 1978)。しかし、この方法もやや標本作製の操作が煩雑で、一度に多数の胚の標本作製が不可能である。

そこで今回の研究においては、まず排卵誘発剤を使用せず、*in vivo* の条件下で第1卵割期の1細胞期胚を効率よく採集する目的で、排卵時刻と第1卵割時刻について検討した。また、それらに基づいて、胚の固定が簡単でしかも標本作製時の染色体の流出がなく、1枚のスライドグラスに6～12個の胚の標本作製ができ、一度に多数の胚の染色体標本作製可能な方法について改良・開発を試みた。

### 1.1. 無処置マウスにおける実験

哺乳動物の排卵は、交尾排卵 (copulation ovulation) によるものとマウスのような自然排卵 (spontaneous ovulation) とに分類される。自然排卵動物の排卵は性周期と密接な関係があり、マウスのような不完全性周期 (incomplete estrous cycle) の動物では、24時間を周期とする明暗交代のリズムが性周期を制御し、人工的に昼夜を逆転すると性周期に伴う全ての現象が新しい時間帯へと移動することが知られている (江藤ら, 1964)。この特性を利用し、性周期を支配することにより、排卵

時刻を任意に設定できる。今回の実験では、排卵時刻を限定し、*in vivo* において染色体像が観察される1細胞期胚を回収するため、照明時間を18:00 から翌朝10:00 に昼夜逆転した明期と暗期(LD)が16:8の飼育条件下で、BDF<sub>1</sub>マウスにおける排卵時刻と第1卵割時刻について調査し、1細胞期胚の染色体標本作製のため、交尾マウスへのコルヒチン(紡錘糸形成阻害剤)投与時刻および1細胞期胚の採集時刻について検討した。さらに染色体標本作製において、一度に40~50個の1細胞期胚を固定し、また1枚のスライドグラスに6~12個の1細胞期胚の標本作製ができ、しかも、染色体の流出を防ぐため、水を含ませた固定液を用いてスライドグラス上に胚とともに移した固定液が拡散しないように改良し、一度に多数の1細胞期胚の染色体標本作製を可能にした。この改良・開発した方法により標本作製した結果について検討した。

#### 1.1.1. 材料と方法

##### 1.1.1.1. 動物と飼育条件

今回の実験に用いたマウスは6週齢の性成熟(sexual maturation)に達した雌雄マウスを静岡県実験動物農業共同組合から購入し、購入後さらに3週間の順化期間を経た9週齢のものを実験に用いた。

マウスの系統は、遺伝的に純粋な近交系を用いることが望ましいし、さらに無処置群において着床前の受精卵の損失(preimplantation loss)

や着床後の胎仔死亡(postimplantation loss)は少なく、且つ排卵数が安定した系統が好ましい。これらの条件を満足するものとして近交系やクローズド・コロニーにより近交系間のF<sub>1</sub>のSlc-BDF<sub>1</sub>(C57BL/2 X DBA/2)が適していることが報告されている(渋谷ら, 1976)。従って



今回の研究全般にわたりSlc-BDF<sub>1</sub>を用いた。

飼育条件はSPF 動物舎で、温度 $23 \pm 1$  °C、湿度 $50 \pm 5$  %、換気回数は時間あたり10回以上、明暗サイクルは明期と暗期 (L:D)が16:8 (18:00 点灯、翌朝 10:00消灯)のSPF 動物舎で、飼育ケージは木製チップを入れたTPX 樹脂製 (チャールスリバー社)を用い、1週間に1回ケージ交換をした。原則として10:00 ~18:00 の消灯中の動物室内の作業は一切行わなかった。雄マウスはケージ当たり1匹で飼育し、交配は雄マウスの入ったケージに雌マウスを入れ同居させた。交配した雌マウスは3匹飼とした。飼料はマウス繁殖用固形飼料CMF (オリエンタル酵母工業株式会社)を、飲料水としては水道水を自由に摂取させた。

#### 1.1.1.2. 排卵時刻の検討方法

暗期直前の10:00 前に雄マウスの入ったケージに雌マウスを入れて同居させ、16:00 に懐中電灯で膣栓を観察した。膣栓が確認された雌マウスは暗期終了時の18:00 を0時間とし、その前後1時間おき [1時間前 (-1 hr), 0時間 (0 hr)、1時間後 (+1 hr)] に頸椎脱臼により屠殺した。屠殺後、雌マウスの卵巣、卵管、子宮の一部を牛胎仔血清 (GIBCO社) が20%含まれるEagle のMEM培地 (日水製薬株式会社) 中に摘出し、卵管のみを眼科用ハサミで切り出し、別の培地中に移した。そして卵管膨大部の前後を切除し、卵管膨大部の片側をピンセットで固定し、先を曲げた有柄針で卵塊をしごきだした。卵塊は顆粒層細胞 (granulosa layer cell) を除去するため0.25%トリプシン溶液 (三光純薬株式会社) 中に移し、2~3分間処理後、MEM培地中で2回洗浄し、卵数を調べた。

#### 1.1.1.3. 第1卵割時刻の検討方法

暗期直前の10:00 前に雄マウスの入ったケージに雌マウスを入れて同居させ、暗期終了後の18:00 直後に膣栓を観察した。膣栓が観察された雌マウスは排卵時刻の18:30 を0時間とし、排卵後 15.5、16.5、17.5、18.5 時間目に頸椎脱臼により屠殺し、卵管、卵巢、子宮の一部を摘出し、眼科用ハサミで卵管膨大部の前後を切断した。卵管膨大部の片側をピンセットで固定し、先を曲げた有柄針で卵管膨大部から1細胞期胚および2細胞期胚をしごきだし、1細胞期胚および2細胞期胚の数を観察した。

#### 1.1.1.4. 1細胞期胚の染色体標本作製方法

i) 1細胞期胚の採卵： 膣栓が確認された雌マウスは暗期終了15時間目(9:00)にコルヒチン(最終濃度が0.5 mg/ml になるよう注射用生理食塩液で溶解、) 3 mg/kg を腹腔内に投与した。暗期終了後18時間目(12:00)に頸椎脱臼により屠殺し、卵巢、卵管、子宮の一部を摘出し、眼科用ハサミで卵管膨大部の前後を切断した。卵管膨大部の片側をピンセットで固定し、先を曲げた有柄針で卵管膨大部から1細胞期胚をしごき出した。不受精卵が混在し顆粒層細胞が観察される場合には、0.25%トリプシン溶液で2～3分間処理し、顆粒層細胞を除去した。

ii) 低張処理： 深型3穴ホログラスに低張液(最終濃度が40%になるように蒸留水で希釈した牛胎仔血清)を入れ、すでに培地中に採集されている1細胞期胚を実体顕微鏡下でマウスピースに接続したガラスピペットを用いて吸引し、1個体から採集した8～12個前後の1細胞期胚を低張液中に移し、室温で19～15分間低張処理した。

iii) 固定： 深型3穴ホログラスを固定液で満たし、その深型

3 穴ホローガラスの底に低張液を0.15 ml 注入し、その注入した低張液の中に低張処理した8 ~12個の1細胞期胚を低張液とともに移し、室温で5分間固定した。1細胞期胚は徐々に白濁し固定された。次に別の深型3穴ホローガラスに固定液を入れ、その中に白濁し固定された1細胞期胚を移し、数秒間1細胞期胚が透明がかかるまで再固定した。尚、固定液はメチルアルコール：氷酢酸：蒸留水 = 3 : 1 : 4 の割合に混合したものである。氷酢酸の濃度は染色体標本作製時の室温、湿度に応じて適宜その調製比率を変更した。例えば晴天の時は氷酢酸の量をややすくなくにした。

iv) スライドガラス上への1細胞期胚の移行： 1細胞期胚が再固定されている深型3穴ホローガラス中の1細胞期胚1個を固定液とともにガラスピペットに吸入し、この1細胞期胚を裏面に試料を載せる目印として直径5mm前後の円を描いておいたスライドガラス上の所定の位置に固定液とともに1個ずつ素早く移した。この場合あい固定液はスライドガラス上の所定の場所に水滴様の状態として留まり、拡散・移動は認められない。スライドガラス上に移す固定液の量は裏に描いておいた円内におさまる程度とする。尚、再固定液に1細胞期胚を移した後、30秒以内にスライドガラス上への1細胞期胚の移行を終了しないと、再固定液の中で1細胞期胚が破壊し易くなる。また、この染色体標本作製成績の良否はスライドガラスの準備如何にかかっており、そのためスライドガラスは洗剤で洗浄した後、1枚ずつ十分に水洗し、使用直前まで恒温器（50℃）で乾燥させた。使用直前に恒温器からスライドガラスを取り出し、メチルアルコールをしみこませたキムワイプ S-200（十条キンバリー株式会社）でスライドガラスの表面を一回拭いた。このように準備されたスライドガラス上に固定液を一滴おいて、固定液が拡散・移動



せず、所定の場所に水滴状態として留まるかどうかを確認し、固定液が高く盛り上がった場合、あるいは流れ出すようなスライドガラスは洗浄が不十分であると判断した。

v) 1細胞期胚の定位置への移動： 1細胞期胚をスライドガラス上に移し、約2分後に1枚のスライドガラス上の全ての1細胞期胚がそれぞれの固定液の円内においてスライドガラスのフロスト部側になるように有柄針で移動させた。再固定液からスライドガラス上に移した直後の1細胞期胚は固定液中で活発に動いているので、1細胞期胚がスライドガラス上に静止した時点で有柄針を用い一定の方向に移動したほうがよい。尚、スライドガラス上に1細胞期胚を移した後、5分間以上経過した後には有柄針で移動すると1細胞期胚は破壊し易くなる。

vi) 乾燥-I： スライドガラス上の1細胞期胚の位置が固定液の円内において上方にくるようにするため、スライドガラスのフロスト部側が高くなるようにヘマトクリット管上にスライドガラスを配列した。実体顕微鏡下で時々観察しながら、固定液の周囲が乾燥しはじめるまで放置した。

vii) 乾燥-II： 固定液の周囲が乾燥開始したスライドガラスは40℃の保温器のプレート上で固定液が完全に消失するまで乾燥させた。尚、保温器のプレートはやや傾斜させておき、固定液の円内の1細胞期胚の位置が上方になるようにスライドガラスを置き乾燥させた。

viii) 染色： ギムザ染色液（メルク社）を6%になるように磷酸緩衝液（M/15, pH6.8, ヤトロン株式会社）で希釈した溶液中で3分間染色した。

ix) 水洗・乾燥・封入： 染色を終了したスライドガラスは蒸留水で数秒間すすぎ、室温で一晩乾燥させ、スライドガラス上にオイキッ

ト（高橋技研硝子株式会社）を3滴落としカバーガラスをかけて封入した。

x) 鏡検： 固定液の乾燥の跡を示すリング状の小円が薄青く染色されるので、その円内の染色体を観察した。染色体は流出せずしかも小円内で観察される。染色体は数的異常と構造異常について分析した。

### 1.1.2. 結果

#### 1.1.2.1. 排卵時刻

今回の実験では、卵管膨大部に最低1個の卵が観察された時刻をそのマウスの排卵時刻とした。結果はTable 1 に示した。BDF<sub>1</sub>マウスの排卵数は+1 hrの欄に見られるように9.8 個前後であった。-1 hrで排卵が観察された個体は認められず、0 hrでは10匹のうち7 匹が排卵し、7 匹のうち9 個近くの卵が排卵していない個体は2 匹であった。+1 hrでは全ての個体において排卵が終了していた。

#### 1.1.2.2. 第1卵割時刻

排卵後 15.5、16.5、17.5 および18.5時間目の胚の発生段階をTable 2 に示した。排卵後15.5時間目では0 %、16.5時間目では28%、17.5時間目では31%、18.5時間目では94%が2細胞期胚に卵割していた。

#### 1.1.2.3. 1細胞期胚の染色体標本作製

今回の研究で改良・開発したマウス1細胞期胚染色体標本作製法による結果をPhoto.1 およびTable 3 に要約した。Photo.1 に示したようにマウスの1細胞期胚の染色体は精子由来と卵子由来の染色体の融合はなく、また卵子由来の染色体の凝縮の程度は精子由来の染色体よりも先

Table 1.  
Ovulation time of BDF<sub>1</sub> female mice maintained for synchroni-  
zation at least 3 weeks under the reverse dark-light conditions  
(dark period, 10:00-18:00)

Time of embryo collection (hours after the end of dark period)	Number of females used	Number of females with ovulation	Number of embryos collected from the ampulla of oviduct (average $\pm$ S.D.)
- 1 h	9	0	0 (0.0 $\pm$ 0.0)
0 h	10	7	52 (7.2 $\pm$ 4.1)
+ 1 h	10	10	98 (9.8 $\pm$ 0.8)



Table 2.  
First cleavage time after ovulation in BDF<sub>1</sub> female mice maintained under the reverse of dark-light condition (dark period, 10:00-18:00).

Time after ovulation (hr)	Number of female	Number of embryos collected		Number of 2- cell embryos (%)
		total	2-cell	
15.5	5	9.2±1.1	9.2±1.1	0 ( 0%)
16.5	5	9.4±1.1	6.8±2.9	13 (28%)
17.5	5	9.0±1.2	6.2±2.9	14 (31%)
18.5	5	9.8±0.8	0.6±1.3	46 (94%)

TABLE 3.  
Successful chromosome specimen preparation in the control group.

Females mated	Embryos collected (per female)	Embryos at the metaphase (% embryos collected)	Embryos karyotyped (% embryos of the metaphase)	Numerical chromosome aberrations			Structural chromosome aberrations (% embryos karyotyped)
				2n-1	2n+1	3n	
62	496 (8.0)	418 (84.3)	357 (85.4)	2	1	5	7 (2.0)

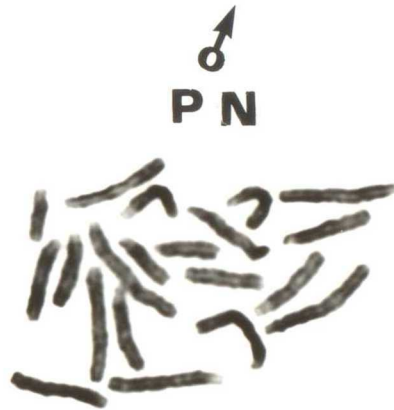


Photo. 1. Normal chromosome set at the 1-cell stage of a mouse embryo. Paternal and maternal chromosome sets can be distinguished from each other by difference in chromosome condensation.



行し、両者の染色体の識別は可能であった。またTable 3 に示したように、膣栓が確認された雌マウス62個体から1細胞期胚が496個採集され、1個体当たり平均8個であった。採集された496個のうち、418個が染色体像を有した1細胞期胚で、染色体分析が可能であったものは357個で、85%の成功率であった。分析を行うことができなかった139個の内訳は、分裂間期で染色体像が観察されなかった1細胞期胚(50個, 36%)、分裂して2細胞期にのもの(18個, 12.9%)、標本作製中に紛失した1細胞期胚(5個, 3.6%)、染色体が重なり分析不可能な1細胞期胚(55個, 39.6%)、染色体が拡散してしまった1細胞期胚(11個, 7.9%)などであった。

染色体異常は数的異常と構造異常とに分類され、観察可能であった357個の1細胞期胚のうち $2n-1$ の低数性(hypoploidy)の1細胞期胚が2個、 $2n+1$ の高数性(hyperploidy)の1細胞期胚が1個観察された。また分裂間期の1細胞期胚でまだ染色体異常として観察できなかったが前核の形態の差異(Rugh, 1968)により多精子侵入(polyspermy)と判定される $3n$ の倍数体(polyploidy)の1細胞期胚が491個中5個観察された。構造異常については、357個中、染色分体型のギャップが2個、染色分体型の切断が5個観察された。

### 1.1.3. 考察

排卵時刻の結果(Table 1)から、今回の実験条件下での排卵は主として暗期終了後の18:00 から19:00 の間におこることが推察された。それゆえ以後、排卵時刻と記述した場合は18:30 を意味する。

コルヒチンの投与時刻については、コルヒチンの他の器官への影響も

考えられるので第1卵割開始直前がよいと考えられる。しかし、排卵後15.5時間目では2細胞期胚への発生は観察されていないが、すでに紡錘系形成が開始されている可能性が考えられる。従って、*in vivo*での1細胞期胚染色体標本作製においては紡錘系形成が開始していないことが推察される排卵後14.5時間目に、腔栓が確認された雌個体の腹腔内にコルヒチンを投与し、排卵後18.5時間目に1細胞期胚を卵管膨大部より採集することにより、染色体像が観察される1細胞期胚を効率よく回収できうことが推察された。しかし、コルヒチン投与によって分裂中期の1細胞期胚の状態で長時間放置しておく、と、染色体が凝縮しすぎて構造異常の分析および精子、卵子由来の染色体の識別が困難になる。さらに、配偶子合体(syngamy)前で染色体がまだ凝縮してない状態の1細胞期胚をできるだけ多く採集する必要がある。従って、排卵後17.5時間目に採集することがよいと推定された。しかし、雄個体に変異原物質を投与し、交尾後1細胞期胚の染色体分析を行う場合は投与物質のため第1卵割時刻の遅延が予測されるので、あらかじめそれぞれの化学変異原物質投与による第1卵割時刻を調べる必要があると思われる。

1細胞期胚の染色体分析において、分析を行うことができなかったもののなかには、分裂間期の1細胞期胚が多数観察された。これについては実体顕微鏡下で仁が消失するまで1細胞期胚をCO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養すれば染色体像が観察できると思われた。また標本作製中の1細胞期胚の紛失などの失敗は、標本作製の練習によりさらに成功率が高くなるものと思われた。

これまでマウス1細胞期胚の染色体標本作製の報告例は少なく、特に標本作製の結果において、採集された胚の数や低数性の出現頻度を明確に記述した報告は非常に少ない。Donahue (1972a) とLuthardt (1976)

の報告ではマウス 1 細胞期胚の染色体分析において、採集された胚の数と低数性の出現頻度の記載があり、また標本作製法は従来の Tarkowski 法を用いていたのでこれらの結果と今回の実験の結果とを比較し、Table 4 に示した。Table 4 から明らかなように Tarkowski 法は成功率が低く、また低数性の染色体の出現頻度が高い。低数性の出現頻度が高いことに関し、Donahue や Luthardt も認めているように、標本作製中の固定時における染色体の流出が原因と考えられる。Tarkowski 法はマウスの第 1 卵母細胞から胚盤胞の初期胚の染色体標本作製用に開発された方法であり、第 1 卵割以後の胚の染色体標本作製する場合は、排卵誘発剤により排卵させ、コルセミドを投与した雌マウスから採集した胚を 1 % クエン酸ソーダで 5 ～ 15 分間低張処理する。低張した胚を低張液とともにスライドグラス上に移し、アルコール：酢酸 = 3 : 1 の固定液を胚の上から滴下し、風乾する方法である。この Tarkowski 法と比較すると、ここに改良・開発されたマウス 1 細胞期胚染色体標本作製法は、排卵誘発剤を使用せず、明暗時間を調節することにより実験に適した排卵時刻や第 1 卵割時刻を自由に設定でき、効率よく第 1 卵割期の染色体像を有した 1 細胞期胚を採集できる。また標本作製過程で、1 細胞期胚を含む固定液をスライドグラス上に滴下しても固定液は拡散することなく乾燥するので、染色体の流出を防ぐことができる。さらに固定処理は簡単でしかも 1 枚のスライドグラス上に 6 ～ 12 個の 1 細胞期胚の標本が作製できる。これらの点から、従来の Tarkowski 法に比較して、信頼度、成功率、さらに簡便性の点で優れたマウス 1 細胞期胚染色体標本作製法であると考察される。なお、この方法は他の哺乳動物の初期胚の染色体標本作製にも適用できると考えられる。



Table 4.  
Successful chromosome slide preparation of 1-cell stage embryos.

Reference	Number of embryos		
	collected	karyotyped	with hypoploidy
Donahue (1972)	4885	338 ( 7%)	178
Luthardt (1976)	482	126 (26%)	21
The present study	496	375 (72%)	2

#### 1.1.4. 小括

マウス 1 細胞期胚染色体標本作製を改良・開発するに当たり、まず染色体像が観察される 1 細胞期胚を効率よく採集するため LD 16:8 の照明条件下で BDF<sub>1</sub> マウスを飼育し、排卵時刻、第 1 卵割時刻を推察し、コルヒチン投与および 1 細胞期胚の採集時刻を検討した。排卵時刻は暗期終了後の 18:30、また第 1 卵割は排卵 16.5 時間以後より開始されたので、コルヒチン投与は排卵 14.5 時間目、また 1 細胞期胚の採集は排卵 17.5 時間目が最適であると結論された。また今回の実験で改良・開発したマウス 1 細胞期胚染色体標本作製法は低数性が少なく、信頼度、成功率、簡便性の点で優れた方法であることが証明された。

#### 1.2. 化学変異原物質の雄マウス投与における実験

マウス 1 細胞期胚の染色体分析は雄生殖細胞に生じた DNA 障害を直接染色体異常として観察できる利点がある。今回の研究においては、主に減数分裂前の精原細胞や精母細胞に対して優性致死作用を示す mitomycin C と procarbazine hydrochloride、減数分裂後の精子細胞や精子に対して優性致死作用を示す methyl methanesulfonate、cyclophosphamide、trimethylphosphate および nitrogen mustard-N-oxide hydrochloride、また全ての生殖細胞に対して優性致死作用を示す isopropyl methanesulfonate のアルキル化剤を雄マウスに投与し、種々の化学変異原物質は各段階の生殖細胞に対してどのようなこれらの染色体異常をど

の程度誘発するのかを検討するため、1細胞期胚の染色体分析を行った。

#### 1.2.1. 材料と方法

実験に用いた化学変異原物質はTable 5 に列挙した7種類で、それぞれの化学変異原物質は投与直前にTable 6 に示した溶媒で調製した。それぞれの化学変異原物質の投与量は最大耐量に近くしかも交尾能力に支障をきたさない濃度を用いた。また、化学変異原物質と比較検討する目的でX線を用いた。X線の照射は診療用の装置 (Nelac 1004, NEC Co. Japan) を用い線源から80 cm の距離 (200 rad/min) で500 rad を照射した。

動物室の消灯直前に、雄マウスの腹腔内にそれぞれの化学変異原物質を投与し、投与直後より雌マウスと同居させ、1週間に雄1匹に対して1～2匹の雌マウスと交配させた。各種の化学変異原物質の投与後の交配期間はTable 7 に表示した。また投与後の日数と交配期間および精子形成過程との関係は Oakberg (1956a, 1956b) およびOakberg とDiminno (1960) の報告を参考にしてTable 8 に示した。暗期終了後の18:00 に膣栓を確認し、膣栓が確認された雌マウスは3匹ずつ別のケージに移し飼育した。膣栓が確認されなかった雌マウスは消灯直前まで別居させ、消灯直前にまた同一の雄マウスと同居させ、4～5日間膣栓が確認されるまで交配を繰り返した。膣栓が確認された雌マウスから1細胞期胚を採集し、1.1.1.の方法に従って染色体標本を作製した。染色体の観察は精子由来の染色体の構造異常について行った。また、卵は排卵時に第1極体を放出し、第2減数分裂の状態で受精を待ち、受精後に第2極体を放出する。従って不受精卵においては第2減数分裂時の染色体が観察さ



Table 5  
List of chemical compounds used in the experiments

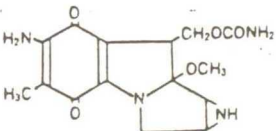
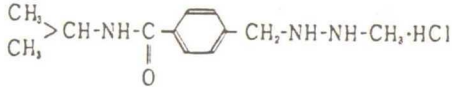
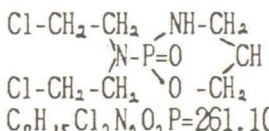
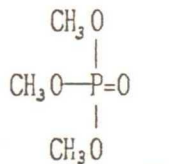
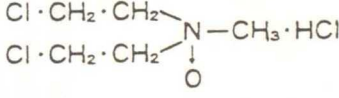
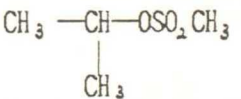
Compound (Abbreviation)	Source	Commercial name	Structural formula and Molecular weight	References of dominan letha test
Mitomycin C (MC)	Kyowa Hakko Co., LTD.	Mitomycin kyowa s	 $C_8H_{18}N_4O_5=334.33$	Ehling (1971)
Procarbazine hydrochloride (Procarbazine)	Nippon Roche K.K.	Natulan	 $C_{12}H_{17}N_3 \cdot HCl=257.76$	Ehling (1974)
Methyl methane- sulfonate (MMS)	Eastman Kodak Co., LTD.		$CH_3-O-SO_2-CH_3$ $CH_3SO_2OCH_3=110.13$	Ehling et al. (1968)
Cyclo- phosphamide (CPA)	Sigma Chemical Co., LTD.	Cytosan	 $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P=261.10$	Brittinger (1966)
Trimethyl- phosphate (TMP)	Wako Pure Chemical Industries, LTD.		 $(CH_3O)_3PO=140.08$	Lorke and Machemer (1975)
Nitrogen mustard-N- oxide hydro- chloride (HN2-O)	Yoshitomi Pharmaceutical Co., LTD.	Nitromin	 $C_5H_{11}ONCl_2 \cdot HCl=208.52$	Ehling (1974)
iso-Propyl methane- sulfonate (iPMS)	Eastman Kodak Co., LTD.		 $CH_3SO_3(CH_3)_2=138.19$	Ehling et al. (1972)

Table 6.  
Chemical compounds and their solvents

Compound	MC	Procarbazine	MMS	CPA	TMP	HN2-O	iPMS
Solvent	Hanks	D.W.	Hanks	Saline	Saline	Saline	Hanks

Hanks: Hank's balanced salt solution.  
Saline: Physiological sodium chloride solution.  
D.W.: Distilled water.

Table 7.

Experimental conditions for chemically-induced chromosomal aberrations in the 1-cell embryos and dominant lethal test

Chemical	Chemical dose* (mg/kg)	Mating period after treatment (days)
Cont.(D.W.)	0	1-41
PC	800	0-41
	400	12-19
	200	12-19
Cont.(Hanks)	0	0-42
MC	5	0-42
Cont.(Hanks)	0	0-42
MMS	100	0-42
Cont.(Saline)	0	0-41
CPA	240	0-41
	120	4-7, 16-19
	60	4-7, 16-19
Cont.(Saline)	0	0-41
TMP	3000	0-41
	1500	4-10
	750	4-10
Cont.(Saline)	0	0-19
HN2-O	100	0-19
	50	0-6
	25	0-6
Cont.(Hanks)	0	0-39
iPMS	200	0-39

\* All chemicals were dissolved in each solvent and injected intraperitoneally (i.p.) in amount of 20 ml/kg.



Table 8.  
The period untill the formation of mature sperm from the time of the treatment on various spermatogenic cell stages

Spermatogenic cell stage at treatment	Days
Epididymal sperm	1-7
Testicular sperm and late spermatid	8-14
Early spermatids	15-21
Spermatocytes	22-28
Spermatocytes	29-35
Spermatogonia	36-42

れるので、第2減数分裂の染色体像（染色分体が開いて40本の蛇行した染色体として観察される）の有無を観察し、不受受精卵の頻度も求めた。

### 1.2.2. 結果

化学変異原物質またはX線を雄生殖細胞に処置し、1細胞期胚の染色体分析を行った結果、精子由来の染色体において染色体異常が観察された（Photo. 2）。各々の化学変異原物質投与による雄生殖細胞の染色体異常の誘発頻度および観察された構造異常の種類を分析し、その結果をTable 9～16に示し、またFig. 1に要約した。1細胞期胚の染色体分析で、第2減数分裂中期（M-II期）の染色体が認められた卵は不受受精卵と判定し、その頻度も求め、Fig. 1に示した。各種の化学変異原物質は精子細胞あるいは精子に対して顕著な染色体異常を誘発し、その染色体異常誘発頻度は生殖細胞の発生しつつある段階によって以下に記したように顕著に変動することが明らかになった。即ち精子細胞のX線に対する染色体異常誘発頻度は精子のそれに比較して高かった（Table 9）。MCの染色体異常誘発作用は前期精子細胞から後期精子細胞にかけて低下し、精子に至って作用が殆どみられなくなった（Table 11）。PCの染色体異常誘発作用はMCの作用と類似するが精子に対しても作用が認められた（Table 10）。

MMS（Table 12）、CPA（Table 13）、およびTMP（Table 14）は生殖細胞に対する作用が類似しており、前期精子細胞から精子において最大に達した。HN2-Oは他の化学変異原物質と比較して染色体異常の誘発頻度は後期精子細胞から精子にかけて極端に増加し、投与直後の精管内の精子に対して染色体異常誘発作用が最も高く現れる特徴が



**a**



**b**



**c**



**d**

Photo. 2. Chromosome aberrations detected in paternal chromosome sets at the 1-cell stage after treatment of postmeiotic stage of male mice with chemical mutagens. (a) Normal chromosome. (b-d) Paternal chromosome sets showing structural aberrations such as breaks, fragments, dicentric and rings.



Table 9.  
Chromosome aberrations detected in paternal chromosome sets of l-cell stages after X-irradiation in male mice

Dose (rad)	Matings post-exposure (days)	Number of embryos examined	Number of embryos with chromosome aberrations	Frequencies and types of chromosome aberrations										Per cent of unfertilized eggs (% of eggs collected)
				Chromatid-types					Chromosome-types					
				Gaps or Breaks	Frag-ments	Tri-radials	Quadri-radials	Exchanges	Gaps or Breaks	Frag-ments	Longs*	Rings		
Control		312	2 ( 0.6)	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0.0	
	0-2	102	31 (30.4)	4	2	1	0	2	21	4	2	7.6		
	3-6	259	69 (26.6)	15	1	0	1	12	51	3	3	3.9		
	7-10	148	45 (30.4)	15	2	0	0	10	31	9	0	0.0		
500	11-14	247	124 (50.2)	22	3	2	1	22	167	32	14	0.0		
	15-18	203	130 (64.0)	21	7	1	3	19	141	26	10	4.2		
	19-22	148	93 (62.8)	12	11	0	0	7	94	29	6	6.3		
	23-26	9	5 (55.6)	0	0	0	0	1	2	2	0	91.9		
	27-42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100.0		

\* Monocentric or polycentric translocation chromosomes.

Table 10.  
Chromosome aberrations detected in paternal chromosome sets of 1-cell stages after treatment with PC in male mice

Dose (mg/kg)	Matings post-injection (days)	Number of embryos examined	Number of embryos with chromosome aberrations (% of embryos examined)	Number of chromosome aberrations	Frequencies and types of chromosome aberrations							Per cent of unfertilized eggs (% of eggs collected)	
					Chromatid-types				Chromosome-types				
					Gaps or Breaks	Frag-ments	Tri-radials	Exchanges	Gaps or Breaks	Frag-ments	Exchanges		
Control		148	1 ( 0.7)	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0.0
	0-3	53	5 ( 9.4)	5	5	0	0	0	0	0	0	0	5.7
	4-7	118	35 (29.7)	67	31	10	0	1	2	21	2	0	0.0
	8-11	105	64 (61.0)	94	48	1	8	12	10	14	1	0	9.9
800	12-15	95	58 (61.1)	101	52	1	7	11	12	18	0	0	15.6
	16-19	60	52 (86.7)	108	66	0	6	19	6	11	0	0	37.5
	20-23	20	18 (90.0)	42	18	0	2	7	3	12	0	0	78.7
	24-27	5	3 (60.0)	6	4	0	0	0	0	2	0	0	96.5
	28-41	0	0 ( 0.0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99.6
400	12-15	93	54 (58.1)	88	60	1	5	13	3	6	0	0	4.4
	16-19	62	27 (43.5)	35	30	0	0	2	0	3	0	0	0.0
200	12-15	100	6 ( 6.0)	6	5	0	0	1	0	0	0	0	0.0
	16-19	122	8 ( 6.6)	8	5	1	0	0	0	2	0	0	3.5

\* Monocentric or polycentric translocation chromosomes.

Table 11.

Chromosome aberrations detected in paternal chromosome sets of 1-cell stages after treatment with MC in male mice

Dose (mg/kg)	Matings post- injection (days)	Number of embryos examined	Number of embryos with chromosome aberrations (% of embryos examined)	Number of chromosome aberrations	Frequencies and types of chromosome aberrations										Per cent of unfertilized eggs (% of eggs collected)
					Chromatid-types					Chromosome-types					
					Gaps or Breaks	Frag- ments	Tri- radials	Quadri- radials	Exchanges	Gaps or Breaks	Frag- ments	Longs*	Rings	Exchanges	
Control		299	2 ( 0.7)	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0.0	
	0- 2	72	0 ( 0.0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	
	3- 6	53	0 ( 0.0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	
	7-10	73	3 ( 4.1)	3	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0.0	
	11-14	77	16 (20.8)	30	5	0	7	9	9	8	1	0	0	0.0	
	15-18	97	30 (30.9)	53	12	0	8	20	20	8	5	0	0	4.1	
5	19-22	35	4 (11.4)	8	1	0	2	2	2	1	2	0	0	56.9	
	23-26	24	2 ( 8.3)	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	66.7	
	27-30	15	1 ( 6.7)	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	62.3	
	31-34	1	0 ( 0.0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99.0	
	35-38	8	0 ( 0.0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	93.4	
	39-42	0	0 ( 0.0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.0	

\* Monocentric or polycentric translocation chromosomes.



Table 12.  
Chromosome aberrations detected in paternal chromosome sets of 1-cell stages after treatment with MMS in male mice

Dose (mg/kg)	Matings post- injection (days)	Number of embryos examined	Number of embryos with chromosome aberrations (% of embryos examined)	Number of chromosome aberrations	Frequencies and types of chromosome aberrations										Per cent of unfertilized eggs (% of eggs collected)
					Chromatid-types					Exchanges					
					Gaps or Breaks	Frag- ments	Tri- radials	Quadri- radials	Gaps or Breaks	Frag- ments	Exchanges	Chromosome-types	Exchanges		
Control		106	1 ( 0.9)	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
100	0-2	42	28 ( 66.7)	131	1	14	1	0	4	85	22	4			0.0
	3-6	96	92 ( 95.8)	835	9	120	4	1	21	571	71	38			0.0
	7-10	122	122 (100.0)	1005	14	157	0	1	16	663	101	47			0.0
	11-14	57	37 ( 64.9)	159	4	27	1	0	6	100	18	3			0.0
	15-18	99	32 ( 32.3)	78	5	3	1	2	5	48	10	4			0.0
	19-22	73	0 ( 0.0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0.0
	23-26	60	2 ( 3.3)	2	0	0	0	0	1	1	0	0			0.0
	27-30	69	1 ( 1.4)	1	0	0	0	0	0	1	0	0			0.0
	31-34	69	0 ( 0.0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0.0
	35-38	85	2 ( 2.4)	2	0	0	0	0	0	2	0	0			0.0
	39-42	20	2 ( 10.0)	2	0	0	0	0	1	1	0	0			0.0

\* Monocentric or polycentric translocation chromosomes.

Table 13.  
Chromosome aberrations detected in paternal chromosome sets of 1-cell stages after treatment with CPA in male mice

Dose Matings (mg/kg) post- injection (days)	Number of embryos examined	Number of embryos with chromosome aberrations (% of embryos examined)	Number of chromosome aberrations	Frequencies and types of chromosome aberrations								Per cent of unfertilized eggs (% of eggs collected)	
				Chromatid-types				Chromosome-types					
				Gaps or Breaks	Frag- ments	Tri- radials	Quadri- radials	Gaps or Breaks	Frag- ments	Longs*	Rings		
Control	312	2 ( 0.6)	2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0.0
0- 3	158	85 (53.8)	192	9	15	6	5	11	117	19	10	0.0	
4- 7	106	64 (60.4)	130	4	7	0	0	3	93	19	4	0.0	
8-11	108	72 (66.7)	169	3	22	2	0	5	105	26	6	0.0	
12-15	77	41 (53.2)	94	6	6	0	0	8	53	17	4	0.0	
16-19	142	61 (43.0)	106	7	5	1	0	6	66	15	6	0.0	
20-23	130	7 ( 5.4)	7	3	0	0	0	0	3	1	0	0.0	
24-27	174	5 ( 2.9)	5	1	0	0	0	1	3	0	0	0.0	
28-31	113	4 ( 3.5)	4	1	0	0	0	1	2	0	0	3.8	
32-35	89	2 ( 2.2)	2	2	0	0	0	0	0	0	0	3.9	
36-41	123	5 ( 4.1)	5	1	1	0	0	0	3	0	0	12.4	
120 4- 7	106	38 (35.8)	76	3	7	0	0	0	46	18	2	0.0	
15-19	119	27 (22.7)	38	1	3	0	0	0	23	5	6	0.0	
60 4- 7	93	16 (17.2)	25	1	1	0	1	1	16	5	0	0.0	
16-19	117	7 ( 6.0)	7	2	0	0	0	1	4	0	0	0.0	

\* Monocentric or polycentric translocation chromosomes.

Table 14.

Chromosome aberrations detected in paternal chromosome sets of 1-cell stages after treatment with TMP in male mice

Dose (mg/kg) post-injection (days)	Number of embryos examined	Number of embryos with chromosome aberrations (% of embryos examined)	Number of chromosome aberrations	Frequencies and types of chromosome aberrations							Per cent of unfertilized eggs (% of eggs collected)	
				Chromatid-types			Exchanges		Chromosome-types			
				Gaps or Breaks	Frag-ments	Tri-radials	Quadri-radials	Gaps or Breaks	Frag-ments	Longs*		Rings
Control	94	0 ( 0.0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
0-3	77	52 ( 67.5)	183	5	15	0	0	5	122	33	3	2.6
4-7	84	84 (100.0)	575	15	65	10	0	4	374	91	16	6.8
8-11	96	93 ( 96.9)	873	13	138	3	1	4	500	183	31	5.4
12-15	63	54 ( 85.7)	277	11	30	1	1	1	185	33	15	0.0
16-19	124	30 ( 24.2)	96	4	14	1	1	1	55	14	6	5.2
20-23	92	5 ( 5.4)	9	0	0	0	0	1	6	2	0	10.6
24-27	111	2 ( 1.8)	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0.0
28-31	100	3 ( 3.0)	3	2	0	0	0	0	1	0	0	9.3
32-35	57	0 ( 0.0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.4
36-39	73	2 ( 2.7)	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0.0
40-41	47	0 ( 0.0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
1500	99	63 ( 63.6)	108	7	5	0	0	2	71	22	1	7.8
8-10	77	44 ( 57.1)	85	9	7	0	0	4	54	11	0	0.0
750	100	5 ( 5.0)	6	1	0	0	0	0	3	2	0	1.0
8-10	98	5 ( 5.1)	7	1	0	0	0	0	4	1	1	0.0

\* Monocentric or polycentric translocation chromosomes.



Table 15.  
Chromosome aberrations detected in paternal chromosome sets of 1-cell stages after treatment with HN2-O in male mice

Dose (mg/kg) post-injection (days)	Number of embryos examined	Number of embryos with chromosome aberrations (% of embryos examined)	Number of chromosome aberrations	Frequencies and types of chromosome aberrations										Per cent of unfertilized eggs (% of eggs collected)
				Chromatid-types					Exchanges					
				Gaps or Breaks	Fragmentations	Tri-radials	Quadriradials	Gaps or Breaks	Fragmentations	Longs*	Rings			
Control	312	2 ( 0.6)	2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0.0
100	0- 3	148	126 (85.1)	592	12	88	6	1	17	357	93	18	3.3	0.0
	4- 7	53	18 (34.0)	101	2	19	1	0	4	59	10	6	0.0	
	8-11	128	9 ( 7.3)	18	3	1	0	0	0	12	1	1	0.0	
	12-15	106	12 (11.3)	14	1	0	0	0	2	8	2	1	0.0	
	16-19	97	7 ( 7.2)	9	1	0	0	1	1	5	1	0	0.0	
50	0- 3	189	122 (64.6)	401	13	42	1	4	8	262	59	12	4.7	0.0
	4- 6	79	29 (36.7)	99	5	14	1	0	7	51	16	5	0.0	
25	0- 3	157	46 (29.3)	91	5	8	0	0	2	52	18	6	0.0	1.7
	4- 6	25	6 (24.0)	12	0	1	0	0	1	9	0	1	0.0	

\* Monocentric or polycentric translocation chromosomes.

Table 16.

Chromosome aberrations detected in paternal chromosome sets of 1-cell stages after treatment with IPMS in male mice

Dose (mg/kg) post- injection (days)	Number of embryos examined	Number of embryos with chromosome aberrations (% of embryos examined)	Number of chromosome aberrations	Frequencies and types of chromosome aberrations							Per cent of unfertilized eggs (% of eggs collected)	
				Chromatid-types			Chromosome-types					
				Gaps or Breaks	Frag- ments	Exchanges	Gaps or Breaks	Frag- ments	Exchanges	Longa*		Rings
Control	216	1 (0.5)	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0
200	0-2	84	3 (3.6)	3	0	0	0	1	0	2	0	0.0
	3-6	66	5 (7.6)	5	3	0	0	0	0	2	0	0.0
	7-10	113	10 (8.8)	12	4	0	1	0	5	2	0	0.0
	11-14	119	10 (8.4)	10	2	0	0	0	1	5	2	0.0
	15-18	94	8 (8.5)	8	0	0	0	0	1	7	0	0.0
	19-22	75	6 (8.0)	7	0	0	0	0	3	4	0	0.9
	23-26	78	7 (9.0)	7	0	0	0	0	2	5	0	53.9
	27-30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	96.2
	31-35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100.0

\* Monocentric or polycentric translocation chromosomes.

CHROMOSOME ABERRATIONS AND UNFERTILIZED EGGS (%)

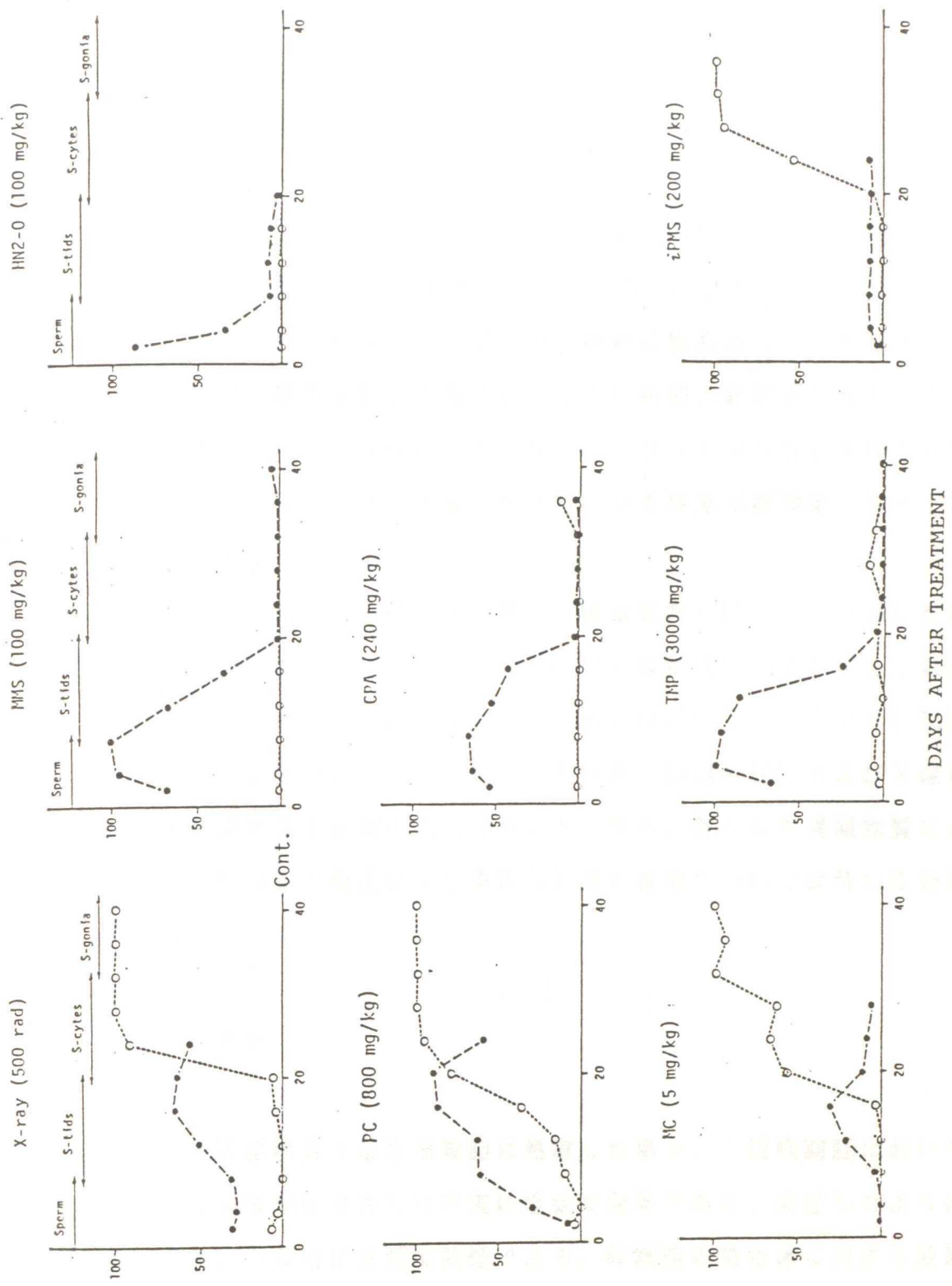


Fig. 1. Frequencies of chromosome aberrations (●---●) and unfertilized eggs (○---○) at 1-cell stage induced at spermatogenic stages after the male mice had been subjected chemical or X-ray treatment.



観察された (Table 15)。iPMS の精子細胞と精子に対する染色体異常誘発作用は低く、生殖細胞の発生に伴って顕著な変動は認められなかった (Table 16)。

減数分裂前の精原細胞あるいは精母細胞に各種の化学変異原物質を処置し、1細胞期胚の染色体分析を行った結果、2通りのケースが観察された。その1つはMMSおよびTMPを精原細胞あるいは精母細胞に処置した場合、顕著な染色体異常および不受精卵の観察されなかったものと、第2のタイプはX線、PC、MCおよびiPMSなどを精原細胞あるいは精母細胞に処置した場合のように不受精卵が高頻度に観察されたものである (Fig. 1)。

次に観察された染色体異常の種類 (構造異常) について分類した結果、PC (Table 10) およびMC (Table 11) は染色分体型異常を主に誘発し、一方、MMS (Table 12)、CPA (Table 13)、TMP (Table 14)、HN2-O (Table 15)、iPMS (Table 16) およびX線 (Table 9) は染色体型異常を主に誘発した。なお、各々の変異原物質により生じた生殖細胞の発生に伴う染色体異常の種類については特に変動は認められなかった。

### 1.2.3. 考察

化学変異原物質を雄生殖細胞に処置した場合、1細胞期胚において染色体型の異常が観察された事実は重要な発見であり、前述したように、遺伝学的にも非常に重要な問題である。体細胞の染色体に対する放射線と化学変異原物質の作用の違いは、放射線を細胞周期のどの時期に作用させても染色体異常が観察されるのに対し、化学変異原物質はいずれの

細胞周期に処置しても染色体異常の誘発には、処置される細胞が少なくとも1回以上のDNA合成期を経過する必要がある、そこに誘発される染色体異常は染色分体型であるといわれてきた(Benderら、1974)。Brewenら(1975)は、精子細胞および精子にMMSを処置し1細胞期胚において染色分体型の異常を検出し、G<sub>1</sub>期に相当する雄生殖細胞に化学変異原物質を処置した場合、1回のDNA合成期を経て出現する染色体異常は主に染色分体型であるというBenderら(1974)の仮説を支持する成績が得られた。一方、今回の研究において、マウスの精子細胞あるいは精子を化学変異原物質で処置し、受精後1回のDNA合成期を経過した1細胞期胚の染色体分析を行ったが、体細胞の場合やBrewenらの報告している結果とは一致しなかった。また、Brewenらの場合と同様にMMSを精子細胞および精子に処置し1細胞期胚の染色体分析を行ったが、今回の研究においては染色体型の異常がおもに観察されたが、この差異についての原因は明らかでない。しかし、後述のとおり、MMS投与による遺伝性転座試験においてはX線と同様に高頻度の転座ヘテロ個体が誘発され(LangとAdler, 1977)、染色分体型の異常から高頻度の転座ヘテロ個体が誘発されるとは考えられない。Brewenらの報告では、生じた異常の種類が分類されておらず、検出された異常が染色分体型か染色体型であるかが明確でない。一方、triethylenemelamineを精子細胞および精子に処置し、1細胞期胚の染色体分析を行った場合には主に染色体型の異常が観察されることが報告されている(BürkiとSheridan, 1978)。今回の研究から最終的な結論を引き出すにはまだデータは十分ではないが、体細胞と異なり、精子細胞や精子に化学変異原物質を処置した場合、体細胞へのX線処置と同様に染色体型の異常が誘発されやすく、染色分体型の異常を誘発する化学変異原物質は稀であることが推察された。

精子細胞や精子に化学変異原物質を処置し染色体異常が誘発される機構は、ヒトリンパ球細胞やショウジョウバエの精子などで観察されている貯蔵効果 (storage effect) による (Generoso ら, 1982) 可能性も考えられる。しかし、もし貯蔵効果が減数分裂後の精子形成過程に存在し、その結果、微小な DNA 傷害が DNA の二重鎖切断へと拡大されると仮定するならば、すべての化学変異原物質の投与による染色体異常の誘発頻度は PC および MC 投与の場合のように (Fig. 1)、投与後の日数とともに増加するものと考えられる。さらに構造異常の種類も投与後の日数とともに徐々に染色分体型異常から染色体型異常へと変化することが推察される。しかし、iPMS 投与では投与後の日数とともに染色体型異常の誘発頻度は増加せず、また投与後の日数とともに染色体異常の増加を示す PC および MC は染色分体型異常を誘発した。また、MMS、CPA および TMP は投与後の日数にともなう構造異常の種類別の差が認められずおもに染色体型異常を誘発した。さらに HN2-O による染色体異常の誘発頻度は投与後の日数にともなう増加せず、逆に極端に減少する傾向さえみられた。上記の実験結果から、化学変異原物質を精子細胞および精子に処置した場合の染色体型異常の誘発は貯蔵効果によるのではないかとの見解は妥当ではないように思われる。

Sega と Owens (1978, 1983) は減数分裂後の精子細胞や精巣の精子および精巣上体や精管内の精子にトリチウムでラベルした [ $^3\text{H}$ ] MMS および [ $^3\text{H}$ ] EMS を処置し、経時的に精管内の精子を回収し、精子頭部から DNA およびプロタミンを抽出し、それぞれのメチル化あるいはエチル化の程度を測定した。その結果 DNA よりもプロタミンのメチル化およびエチル化のパターンは、染色体のヒストンがプロタミンにおきかわる時期 (Bellvé ら, 1975) と一致し、その時期のプロタミンに特異



的にアルキル化が起こること、また、その時期へのEMSおよびMMS処置で、1細胞期胚における染色分体型および染色体型異常が観察されるのは、DNAよりもプロタミンのアルキル化が一本鎖および二本鎖のDNA切断へと増幅するためと考察している。また、SegaとOwens (1983)はmethyl nitrosourea (MNU) を例にとり、MNUによる優性致死作用はMMS処置の場合と異なり、染色体のヒストンがプロタミンにおきかわる時期よりもそれ以前の精子細胞にも強い優性致死作用 (Parkinら, 1973) を示すことを考察している。また、MNUの場合、ヒストンがプロタミンにおきかわる時期において、プロタミンのアルキル化は増加しないことを述べている (Segaら, 1983)。従って、すべての化学変異原物質がプロタミンをアルキル化にさすことにより染色体障害を誘発するとは限らないと結論している。今回の研究ではMMS、CPAおよびTMPに関しては後期精子細胞から初期精子細胞において染色体異常の出現頻度が増加し、染色体型の異常を誘発したことによりSegaの説が支持される。しかし、PC、HN2-OおよびiPMS投与の場合、染色体異常誘発頻度は後期精子細胞から精子において特異的に増加せず、雄生殖細胞における染色体異常はプロタミンのアルキル化とは直接結びつかないと推察された。

以上記述したように、投与された変異原物質の種類によって発生中の生殖細胞の染色体に与える異常は必ずしも同一ではなく、また従来は比較的少ないと考えられていた染色体型異常が多く誘発されること等が観察された。

いずれにしても、精子形成過程の細胞や染色体DNAに形態的、機能的変化が生じた結果と考えられ、このことは各々の化学変異原物質のDNAに対する作用機序がそれぞれ異なること、さらに傷害をうけた各細

胞の発生レベルにおけるDNAの修復機構の違い等が示唆される結果が得られた。

#### 1.2.4. 小括

各種の化学変異原物質を雄生殖細胞に処置し、その結果生じたDNA障害を有する精子が受精にあずかった場合、どのような染色体異常として観察されうるのかを検討した。染色体異常の誘発頻度は生殖細胞の発生過程の違いに伴って顕著に左右され、また化学変異原物質の種類によっても生殖細胞に対する作用が異なることが明らかになった。

iPMS、PC、MCおよびX線を精原細胞および精母細胞に処置した場合、これを交配に用いたときには不受受精卵が観察され、一方、MMS、CPA、TMP、HN2-O、iPMSおよびX線等を精子細胞および精子に処置した場合、おもに染色体型の異常が観察され、PCおよびMC処置では主に染色分体型の異常が観察された。このように化学変異原物質を精子細胞および精子に処置した場合は、体細胞の場合と異なり、染色体型の異常が誘発されやすいことが示唆された。

## 第2章 優性致死突然変異に関する検討

Bateman (1966)は化学物質安全性評価の一つの生物学的指標として優性致死法を提唱した。優性致死 (dominant lethal) または優性致死突然変異 (dominant lethal mutation) とは精子または卵子のどちらか一方の配偶子に障害が生じた場合、ヘテロ接合型の受精卵が発生の途中で死亡する現象をいう。一般に哺乳動物においては雄生殖細胞に変異原物質を処置し、無処置雌と交配し以後12~13日目の妊娠中期に開腹し、子宮に着床できなかった胚の損失 (preimplantation loss) による着床数の減少や着床後に発生が停止し胎盤遺残 (placental remnant) になった胚死 (postimplantation loss) 数の増加として観察でき、優性致死試験ではこれらの流産が測定の対象になる。優性致死突然変異は一般に受精後の初期胚に検出される数的あるいは構造的な染色体異常が原因であろうと考えられている (L.B. Russell, 1962; Bateman, 1966)。MatterとJaegar (1975)、HitotumachiとKikuchi (1977) およびBürkiとSheridan (1978) はTEMを精子細胞や精子に処置し、交配後4細胞期胚から胚盤胞の初期胚を調査し、染色体異常、卵割遅延、小核形成などを観察し、それらの発現時期は優性致死誘発時期と一致することを報告している。しかし、TEMと異なった精子形成過程に優性致死誘発作用を示す化学変異原物質や、また、化学変異原物質と異なり体細胞に対して染色体型の異常を誘発することが知られているX線を雄生殖細胞に処置した場合の着床以前の初期胚の影響については明らかでない。今回の研究においては、優性致死誘発機序を解明するため、特に着床以前の胚の損失あるいは着床後の胚死について明らかにするため、まず、着床以前の胚の発



生について検索し、次に着床後の胚の発生停止時期について調査した。また、1細胞期胚の染色体異常が優性致死の直接的な原因であるかどうかを解明するためには、1細胞期胚の染色体分析と優性致死試験を同一条件下で同時に実験する必要がある。また、精子形成過程に対してさまざまな優性致死誘発作用を示す化学変異原物質あるいは化学変異原物質の対照としてX線を用いた実験が必要である。今回の研究においては既知の優性致死誘発作用のある化学変異原物質あるいはX線を用い、第1章の1細胞期胚染色体分析と同一条件下で同時に優性致死試験を行い、1細胞期胚の染色体分析の結果と比較し、1細胞期胚の染色体分析は優性致死の結果を事前に評価できる系であるかどうかをも検討した。

## 2.1. 着床前後の胚発生への影響

精子細胞および精子を高濃度のMMSで処置した優性致死試験では、おもに着床胚の減少をひきおこし(Ehlingら,1968)、また、iPMSの高濃度処置では精子細胞から後期精子細胞に対して着床後の胚死を高い割合でひきおこす(Ehlingら,1972)ことが報告されている。そこで今回の研究においてはMMSおよびiPMSで後期精子細胞および精子を処置した。また化学変異原物質と比較するためX線で精子細胞および精子を処置した。これらの処置動物は交配させ着床以前の胚を回収し、卵割状態について観察した。また、iPMS用いて着床後の胚の発生停止時期についても調査し、さらにそれぞれの変異原物質による発生への影響と1細胞期胚の染色体異常との関連性について検討した。

### 2.1.1. 材料と方法

Table 17.  
Experimental conditions to check the cleavage stages and the position of embryos collected from female mice mated with males previously subjected to chemical or X-ray treatment.

Chemical	Chemical dose (mg/kg)	Mating period after treatment (days)	Collection time of embryos after ovulation
Cont. (Hanks)	0	6-10	
MMS	100	6-10	72 hrs.
IPMS	200	6-10	
X-ray	500 rad	1- 4 15-18	

Chemical administration: intraperitoneal injection.

Table 17に表記したように、MMS、*i*PMSおよびX線を雄マウスに投与または照射し、交配した。交配後陰栓が確認された雌個体は排卵後72時間目に卵巣、卵管、子宮をMEM培地中に摘出し、卵管膨大部、卵管狭部 (isthmus of uterine) および子宮の3部に分けた。卵管膨大部および卵管狭部中の胚は卵管を有柄針でしごき、一方、子宮中の胚は子宮卵管接合部 (uterotubal junction)にMEM培地を入れた26Gの注射針付の1mlの注射筒を挿入し、MEM培地で洗いだし、胚の回収部位を調査した。また回収した胚は1細胞期胚の染色体標本作製法 (1.1.1.) に準じて標本作製し、顕微鏡下で胚当たりの核数を計測した。

次に着床後の胚発生停止時期の観察を行った。*i*PMS 200 mg/kgを雄個体の腹腔内に投与し、投与後7～15日間処女雌マウスと交配した。妊娠後8、9、10、11日目に雌マウスを解剖し、子宮を摘出後、胚の発生停止時期について観察した。

#### 2.1.2. 結果

採集された胚は1、2、3～4、5～8、9～16(morula)、17～31(early blastocyst)、32細胞以上(blastocyst)の7つに分類し、Table 18に示した。溶媒対照群は1細胞からmorulaまでの胚は観察されず、すべての胚はearly blastocystおよびblastocystであった。MMS群では3から8細胞の胚がほとんどで、それらの胚には小核や退化した核が観察された (Photo.3)。また、early blastocyst およびblastocystはほとんど観察されなかった。*i*PMS群は対照群に比して、blastocystが著しく減少し、morulaおよびearly blastocystが増加した。特にearl



Table 18.

Cleavage stages of embryos at 72 hours after ovulation, collected from females mated with males previously subjected to chemical or X-ray treatment.

Treatment	Dose (mg/kg)	Matings post- injection (days)	Females with vaginal plug	Embryos*collected Total	Per female	% distribution of cleavage stages of embryos (according to cell number)						
						1	2	3-4	5-8	9-16 (morula)	17-31 (early blastocyst)	32 &gt;=
Control	-	6-10	14	130	9.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	16.9	83.1
MMS	100	6-10	13	105	8.1	1.0	6.0	35.2	46.7	9.5	1.0	0.0
IPMS	200	6-10	15	134	8.9	0.0	0.0	0.0	0.8	16.4	62.7	20.1
X-ray	500 rad	1-4	11	105	9.5	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	35.2	62.8
		15-18	13	112	8.6	0.0	1.8	0.0	0.9	18.8	48.2	30.3

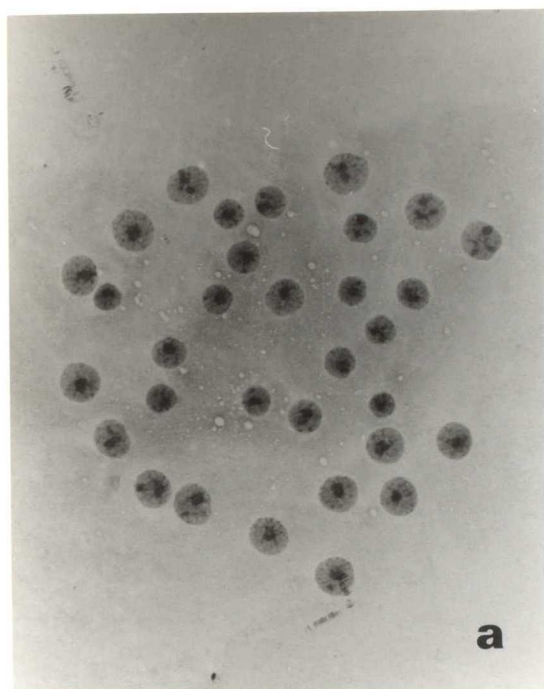


Photo. 3. Blastomere nuclei in 3-day embryo obtained from females mated with males treated 7-10 days before with 100 mg/kg of MMS. (a) Normal blastomere nuclei. (b) Abnormal blastomere nuclei.

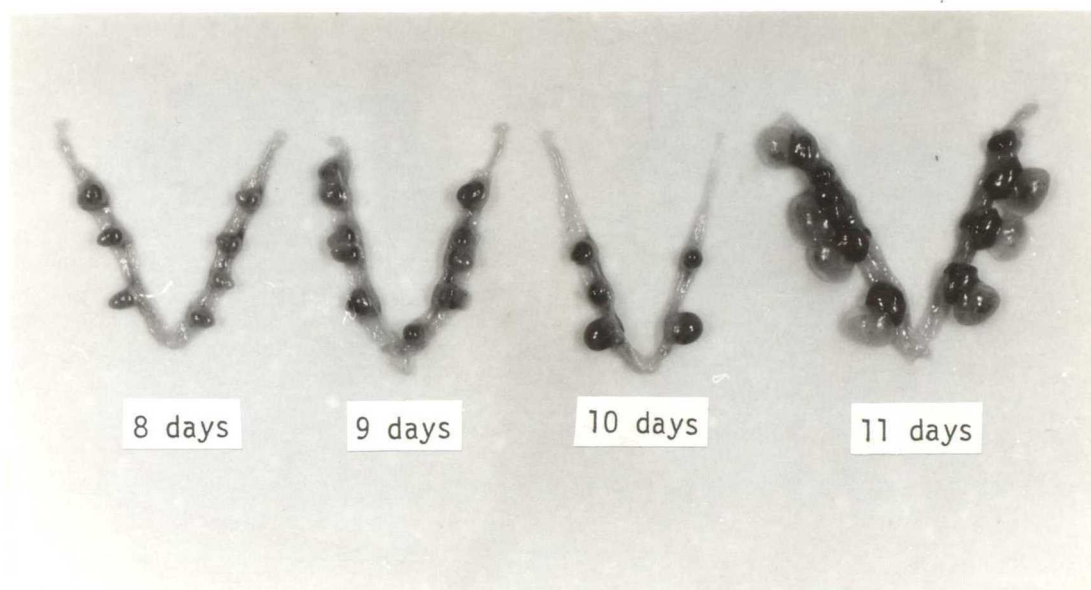


Photo. 4. Uterine content of females mated with males treated with 200 mg/kg of iPMS. Remarkable retardation of embryonic development in 10-day embryos is apparent.

y blastocystが顕著に増加した。また1～8細胞の胚はほとんど観察されなかった。一方、X線群において、照射後1～4日目に交配した場合の胚は、対照群に比べややblastocystが減少しearly blastocystが増加した。投与後15～18日目に交配した場合の胚は、投与後1～4日目に交配した場合と比べさらにblastocystが減少し、morulaおよびearly blastocystが増加した。以上のようにMMS群では顕著な胚の発生停止が観察され、iPMS群およびX線群では発生遅延が観察された。

次にiPMSによる着床後の胚の発生停止時期について検査した結果、Photo. 4に示したように、交配後10日目に顕著な発生停止が観察された。

## 2.2. 優性致死試験

一般に優性致死試験は生殖細胞に誘発されたDNA障害を胚死の有無や程度による生物学的指標で妊娠13日目前後に観察する。DNA障害を有した1細胞期胚が発生し胚死に至る過程は各種の変異原物質のDNA障害の種類により多種多様であると思われる。染色体異常を有した1細胞期胚からのみでなく染色体レベル以下の障害によっても優性致死が発現される可能性が考えられる。しかし、これまでのMMS (Brewerら, 1975) およびTEM (BürkiとSheridan, 1978)を用いた1細胞期胚の染色体分析の報告は1細胞期胚の染色体異常の誘発時期が他の報告者による優性致死試験の報告における優性致死誘発時期と一致したということ報告しているのみで、どの程度1細胞期胚の染色体異常の発現頻度と優性致死誘発頻度が一致しているのか明らかでない。今回の研究においては、種々の優性致死誘発作用を示すことが知られている既知の化学変異原物質を用いて、優性致死試験を行い、第1章(1.2.)の1細胞期



胚の染色体分析の結果と比較検討し、1細胞期胚の染色体異常が優性致死の直接的な原因になっているかどうかを明らかにした。

### 2.2.1. 材料と方法

膣栓が確認されるまでの操作はすべて第1章(1.2.1.)の1細胞期胚の染色体分析と同様に行った。膣栓が確認された雌は膣栓確認日を0日とし、妊娠13日前後に頸椎脱臼により屠殺後、卵巢、卵管、子宮を摘出し、着床数、生存胎仔数、着床後の胚死(胎盤遺残)数を調査した。それぞれの数値は交配期間の3～4日間毎に集計し、下記の式により優性致死率を求めた。

優性致死率(%) =

$$\left(1 - \frac{\text{処置群の膣栓が確認された雌当たりの生存胎仔数}}{\text{溶媒対照群の膣栓が確認された雌当たりの生存胎仔数}}\right) \times 100$$

### 2.2.2. 結果

優性致死試験においてはPhoto.5に示したように、着床後の胚死の指標となる胎盤遺残やまた着床数の減少が観察された。各種の変異原物質処置による優性致死試験の結果をTable 19～26に示し、またFig.2に要約した。PCの優性致死誘発作用(Table 20)は投与後0日目から観察され、投与後16日目まで増加し、以後90%以上の優性致死誘発作用が投与後41日目まで観察された。MCの優性致死誘発作用(Table 21)もPCの場合とはほぼ同じであったが、投与後10日目まで顕著な優性致死誘発作用が観察されず、投与後11日目から投与後31日目まで徐々に増加し、

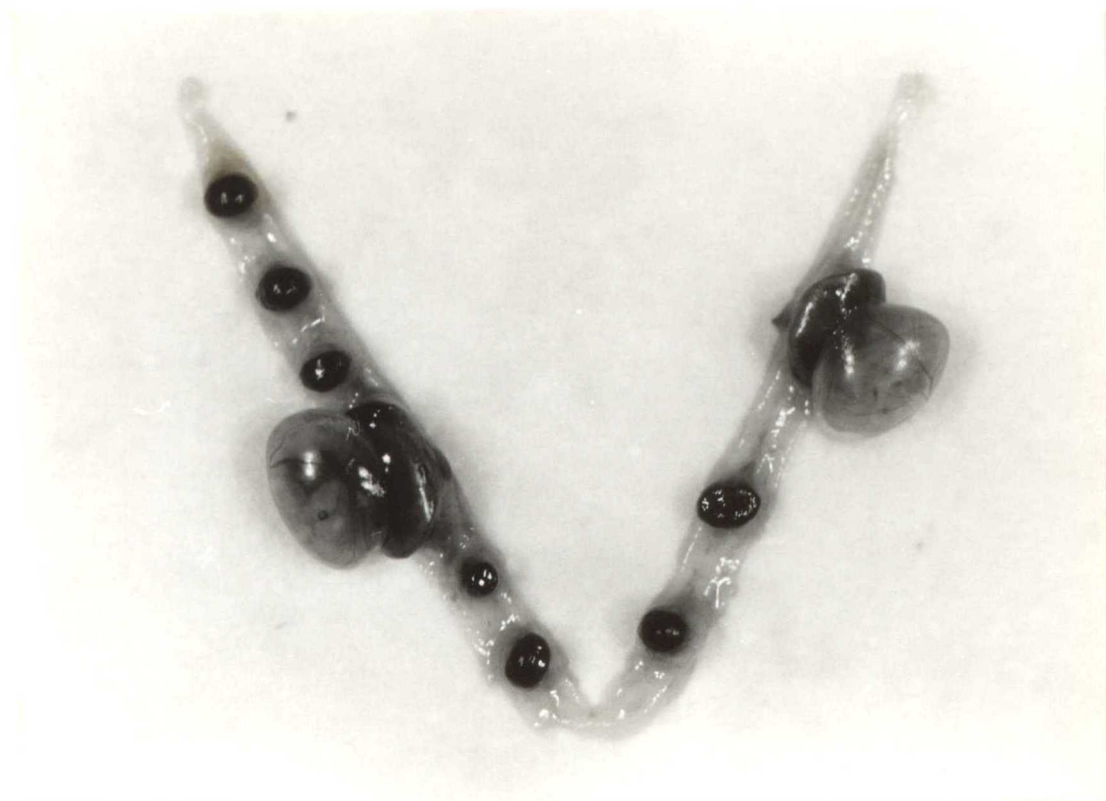


Photo. 5. Embryonic death after implantation in females mated with males treated with 200 mg/kg of iPMS.

Table 19.  
Dominant lethal test after X-irradiation in male mice

Dose (rad)	Matings post-injection (days)	Number of females mated	Number of females with implants (%)	Number of implants per female mated	Number of living embryos per female mated	Number of dead implants per female mated	Dominant lethals (%)
Control	1-42	155	145 (93.5)	9.8	9.5	0.3	-
	1-2	12	9 (75.0)	7.4	5.0	2.4	47.4
	3-6	28	25 (89.3)	9.3	6.2	3.0	34.7
	7-10	20	19 (95.0)	8.9	6.2	2.7	34.7
500	11-14	19	17 (89.5)	6.8	2.4	4.4	74.7
	15-18	29	23 (79.3)	6.7	1.4	5.3	85.3
	19-22	19	15 (78.9)	4.3	1.2	3.1	87.4
	23-26	22	7 (31.8)	2.4	1.0	1.4	89.5
	27-42	76	0 (0.0)	0.0	0.0	0.0	100.0

Table 20.  
Dominant lethal test after treatment with PC in male mice

Dose (mg/kg)	Matings post- injection (days)	Number of females mated	Number of females with implants (%)	Number of implants per female mated	Number of living embryos per female mated	Number of dead implants per female mated	Dominant lethals (%)
Control	0-41	237	202 (85.2)	9.2	8.9	0.3	-
	0-3	18	12 (66.7)	7.4	6.2	1.2	30.3
	4-7	25	23 (92.0)	8.1	6.4	1.7	28.1
	8-11	19	17 (89.5)	6.8	4.1	2.7	53.9
	12-15	19	13 (68.4)	4.4	1.8	2.6	79.8
800	16-19	24	8 (33.3)	1.7	0.5	1.2	94.4
	20-23	25	4 (16.0)	0.7	0.4	0.3	95.5
	24-27	20	2 (10.0)	0.7	0.7	0.0	92.1
	28-41	84	3 (3.6)	0.2	0.2	0.0	97.8
400	12-15	22	21 (95.5)	7.1	3.8	3.3	57.3
	16-19	17	16 (94.1)	7.7	5.2	2.5	41.6
200	12-15	19	18 (94.7)	10.0	8.7	1.3	2.2
	16-19	13	12 (92.3)	9.1	8.8	0.3	1.1



Table 21.

Dominant lethal test after treatment with MC in male mice

Dose (mg/kg)	Matings post- injection (days)	Number of females mated	Number of females with implants (%)	Number of implants per female mated	Number of living embryos per female mated	Number of dead implants per female mated	Dominant lethals (%)
Control	0-42	213	189 ( 88.7)	7.7	7.4	0.3	-
	0-2	18	15 ( 83.3)	7.6	7.2	0.3	2.7
	3-6	18	18 (100.0)	8.3	7.9	0.4	-6.8
	7-10	18	16 ( 88.9)	7.5	7.0	0.5	5.4
	11-14	17	16 ( 94.1)	7.6	5.9	1.7	20.3
	15-18	26	21 ( 80.8)	6.7	5.6	1.1	24.3
5	19-22	15	9 ( 60.0)	3.7	3.0	0.7	59.5
	23-26	20	7 ( 35.0)	1.8	1.7	0.1	77.0
	27-30	20	6 ( 30.0)	2.0	1.8	0.2	75.7
	31-34	16	1 ( 6.3)	0.1	0.1	0.0	98.7
	35-38	13	0 ( 0.0)	0.0	0.0	0.0	100.0
	39-42	17	0 ( 0.0)	0.0	0.0	0.0	100.0

Table 22.  
Dominant lethal test after treatment with MMS in male mice

Dose (mg/kg)	Matings post- injection (days)	Number of females mated	Number of females with implants (%)	Number of implants per female mated	Number of living embryos per female mated	Number of dead implants per female mated	Dominant lethals (%)
Control	0-42	174	161 ( 92.5)	8.0	7.8	0.2	-
	0- 2	21	9 ( 42.9)	7.6	3.8	3.8	76.4
	3- 6	13	1 ( 7.7)	5.0	1.0	4.0	98.9
	7-10	22	0 ( 0.0)	0.0	0.0	0.0	100.0
	11-14	10	9 ( 90.0)	5.7	3.5	2.2	55.6
	15-18	19	16 ( 84.2)	7.4	6.5	0.9	25.0
100	19-22	11	10 ( 90.9)	8.6	8.5	0.1	-6.9
	23-26	22	21 ( 95.5)	8.4	8.1	0.3	-6.9
	27-30	12	10 ( 83.3)	8.7	8.4	0.3	2.8
	31-34	19	16 ( 84.2)	8.6	8.3	0.3	2.8
	35-38	15	15 (100.0)	8.6	8.3	0.3	-15.2
	39-42	15	14 ( 93.3)	8.9	8.4	0.5	-8.3

Table 23.  
Dominant lethal test after treatment with CPA in male mice

Dose (mg/kg)	Matings post- injection (days)	Number of females mated	Number of females with implants (%)	Number of implants per female mated	Number of living embryos per female mated	Number of dead implants per female mated	Dominant lethals (%)
Control	0-41	233	202 ( 86.7)	8.8	8.4	0.4	-
240	0-3	27	22 ( 81.5)	5.2	2.2	3.0	74.0
	4-7	20	17 ( 85.0)	5.7	2.9	2.8	65.5
	8-11	20	17 ( 85.0)	5.1	1.5	3.6	82.2
	12-15	18	14 ( 77.8)	5.5	2.2	3.3	73.6
	16-19	27	26 ( 96.3)	8.0	4.7	3.3	44.1
	20-23	19	16 ( 84.2)	8.4	7.6	0.8	9.2
	24-27	25	20 ( 80.0)	8.6	8.4	0.2	-0.4
	28-31	26	23 ( 88.5)	8.8	8.6	0.2	-2.0
	32-35	20	16 ( 80.0)	8.0	7.5	0.5	10.8
	36-41	33	27 ( 81.8)	6.8	6.5	0.3	22.1
120	4-7	19	19 (100.0)	7.8	5.3	2.5	36.8
60	16-19	19	17 ( 89.5)	7.9	5.7	2.2	32.4
	4-7	19	19 (100.0)	8.4	7.2	1.2	14.2
	16-19	18	14 ( 77.8)	8.0	7.6	0.4	10.1

Table 24.  
Dominant lethal test after treatment with TMP in male mice

Dose (mg/kg)	Matings post- injection (days)	Number of females mated	Number of females with implants (%)	Number of implants per female mated	Number of living embryos per female mated	Number of dead implants per female mated	Dominant lethals (%)
Control	0-41	242	204 ( 84.2)	9.2	8.9	0.3	-
	0- 3	28	12 ( 42.9)	2.4	0.9	1.5	89.9
	4- 7	18	0 ( 0.0)	0.0	0.0	0.0	100.0
	8-11	32	1 ( 0.0)	0.1	0.0	0.1	100.0
	12-15	17	8 ( 47.1)	1.9	1.5	0.4	83.1
	16-19	33	24 ( 72.7)	7.7	7.0	0.7	21.3
	20-23	20	15 ( 75.0)	8.0	7.6	0.4	14.6
	24-27	20	19 ( 95.0)	10.4	9.9	0.5	-11.2
	28-31	29	23 ( 79.3)	8.4	8.2	0.2	7.9
	32-35	19	16 ( 84.2)	8.8	8.6	0.2	3.4
1500	36-39	32	28 ( 87.5)	9.9	9.6	0.3	-7.9
	40-41	9	9 (100.0)	11.4	11.0	0.4	-23.6
	4- 7	31	27 ( 87.1)	6.9	3.3	3.6	62.9
	8-10	14	7 ( 50.0)	3.4	0.9	2.5	89.9
750	4- 7	27	23 ( 85.2)	8.9	7.9	1.0	11.2
	8-10	17	17 (100.0)	11.0	9.3	1.7	-4.5



Table 25.  
Dominant lethal test after treatment with HN2-O in male mice

Dose (mg/kg)	Matings post- injection (days)	Number of females mated	Number of females with implants (%)	Number of implants per female mated	Number of living embryos per female mated	Number of dead implants per female mated	Dominant lethals (%)
Control	0-21	119	113 ( 95.0)	9.9	9.6	0.3	-
100	0- 3	25	9 ( 36.0)	1.8	0.7	1.1	92.5
	4- 7	15	13 ( 86.7)	6.5	4.9	1.6	49.0
	8-11	29	26 ( 89.7)	8.4	7.8	0.6	18.7
	12-15	15	14 ( 93.3)	9.4	8.1	1.3	14.8
	16-19	34	32 ( 94.1)	9.4	8.1	1.3	14.7
	20-21	5	5 (100.0)	10.6	9.8	0.8	-2.7
50	0- 3	25	13 ( 52.0)	3.2	1.3	1.9	86.6
	4- 6	13	13 (100.0)	7.0	5.3	1.7	44.4
25	0- 3	21	17 ( 81.0)	7.5	4.7	2.8	50.6
	4- 6	17	16 ( 94.1)	8.6	7.6	1.0	20.5

Table 26.  
Dominant lethal test after treatment with IPMS in male mice

Dose (mg/kg)	Matings post- injection (days)	Number of females mated	Number of females with implants (%)	Number of implants per female mated	Number of living embryos per female mated	Number of dead implants per female mated	Dominant lethals (%)
Control	0-35	76	64 ( 85.3)	9.8	9.5	0.3	-
	0-2	9	8 ( 88.9)	8.0	3.0	5.0	68.4
	3-6	8	8 (100.0)	7.8	3.1	4.7	67.4
	7-10	10	10 (100.0)	7.9	3.1	4.8	67.4
200	11-14	8	8 (100.0)	7.9	3.6	4.3	62.1
	15-18	16	16 (100.0)	7.8	3.7	4.1	61.2
	19-22	11	10 ( 90.9)	7.3	3.5	3.8	63.3
	23-26	16	12 ( 75.0)	4.5	2.2	2.3	76.9
	27-35	23	0 ( 0.0)	0.0	0.0	0.0	100.0

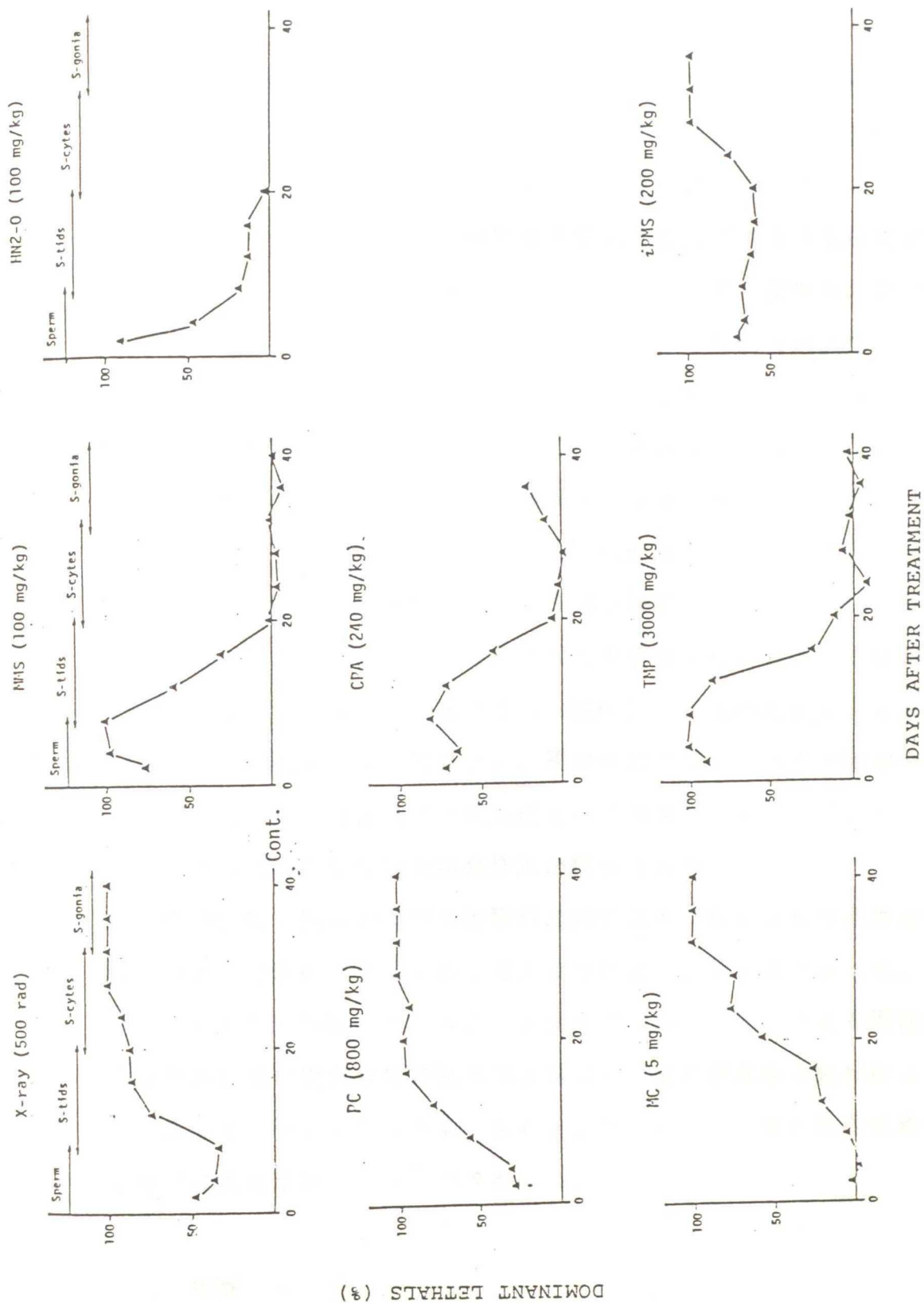


Fig. 2. Frequency of induced dominant lethals at spermatogenic stages after the male mice had been subjected chemical or X-ray treatment.

以後42日目まで100 %の優性致死誘発作用が観察された。MMSの優性致死誘発作用 (Table 22) は投与後7 ~19日の100 %の優性致死誘発作用をピークに投与後0 日目から18日目まで顕著な優性致死誘発作用が観察された。投与後19日目から42日目まで、優性致死誘発作用は観察されなかった。CPAもMMSの優性致死誘発作用と同じような優性致死誘発作用であったが、投与後36~41日においてやや高い優性致死誘発作用が観察された (Table 23)。TMPもMMSの優性致死誘発作用とはほぼ同じような優性致死誘発作用 (Table 24) が観察された。HN2-Oによる優性致死誘発作用 (Table 25) は投与直後より90%以上の高頻度の優性致死誘発作用を発現し、投与直後より徐々に投与後19日目まで減少した。iPMSの優性致死誘発作用 (Table 26) は投与直後より投与後22日目まで65%前後の優性致死誘発作用が観察され、投与後23日目から26日目まで増加し、以後35日目まで10%の優性致死誘発作用が観察された。X線照射の優性致死誘発作用 (Table 19) は照射後0 日から50%近くの優性致死誘発作用が観察され、照射後10日目まではやや減少を示し、照射後11日目から26日目では90%近くまで増加し、照射後27日目から42日目までは10%の優性致死誘発作用が観察された。

変異原物質の投与およびX線照射後20日以内に観察された優性致死誘発作用は未着床胚によるものと着床後の胚死によるものであった。しかし、iPMS (Table 26) およびX線照射 (Table 19) による優性致死誘発作用は他の優性致死誘発作用と異なり、主に着床後の胚死によるものであった。一方、投与および照射後20日以降に観察された優性致死誘発作用は未着床胚によるものであった。

## 2.3. 考察



着床前後の胚発生の観察結果 (Table 18) から、優性致死試験で着床胚の減少を主にひきおこす MMS は、8 細胞期以前で発生が大部分停止し、小核や退化した核が観察され、これらの胚は細胞死をひきおこし、優性致死試験において着床前の胚の損失を生じることが推察された。一方、着床後の胚死を主にひきおこす *i* PMS 群 (Table 26) および X 線群 (Table 19) は対照群に比べ early blastocyst が増加し、これらの胚は着床後に胚死となる可能性が示唆された。

優性致死試験の結果を Fig. 2 に要約した。各種の変異原物質の精子形成過程に対する優性致死誘発作用は大きく 3 種類に分類できた。第一は、X 線、PC および MC のような投与後の日数とともに精子、精子細胞、精母細胞、精原細胞の順に優性致死誘発作用が高くなるタイプ。第二は、MMS、CPA、TMP および HN 2-O のように精子細胞および精子の時期をピークに精母細胞の時期では優性致死誘発作用が減少するタイプ。第三は、*i* PMS のように全ての精子形成過程において優性致死誘発作用が発現するタイプであった。これらの結果は、これまでの X 線 (Ehling, 1971)、PC (Ehling, 1974)、MC (Ehling, 1971)、MMS (Ehling ら, 1968)、CPA (Brittinger, 1966)、TMP (Lorke と Machemer, 1975)、HN 2-O (Ehling, 1974) および *i* PMS (Ehling ら, 1972) の優性致死試験の報告における優性致死誘発パターンとほぼ一致した。

次に 1 細胞期胚の染色体異常が優性致死の直接の原因であるかどうかを解明するため、Fig. 3 に染色体異常を有した 1 細胞期胚の出現頻度、および 1 細胞期胚の染色体分析で観察された不受精卵の頻度と優性致死誘発頻度を図示した。Fig. 3 から明らかなように精原細胞および精母

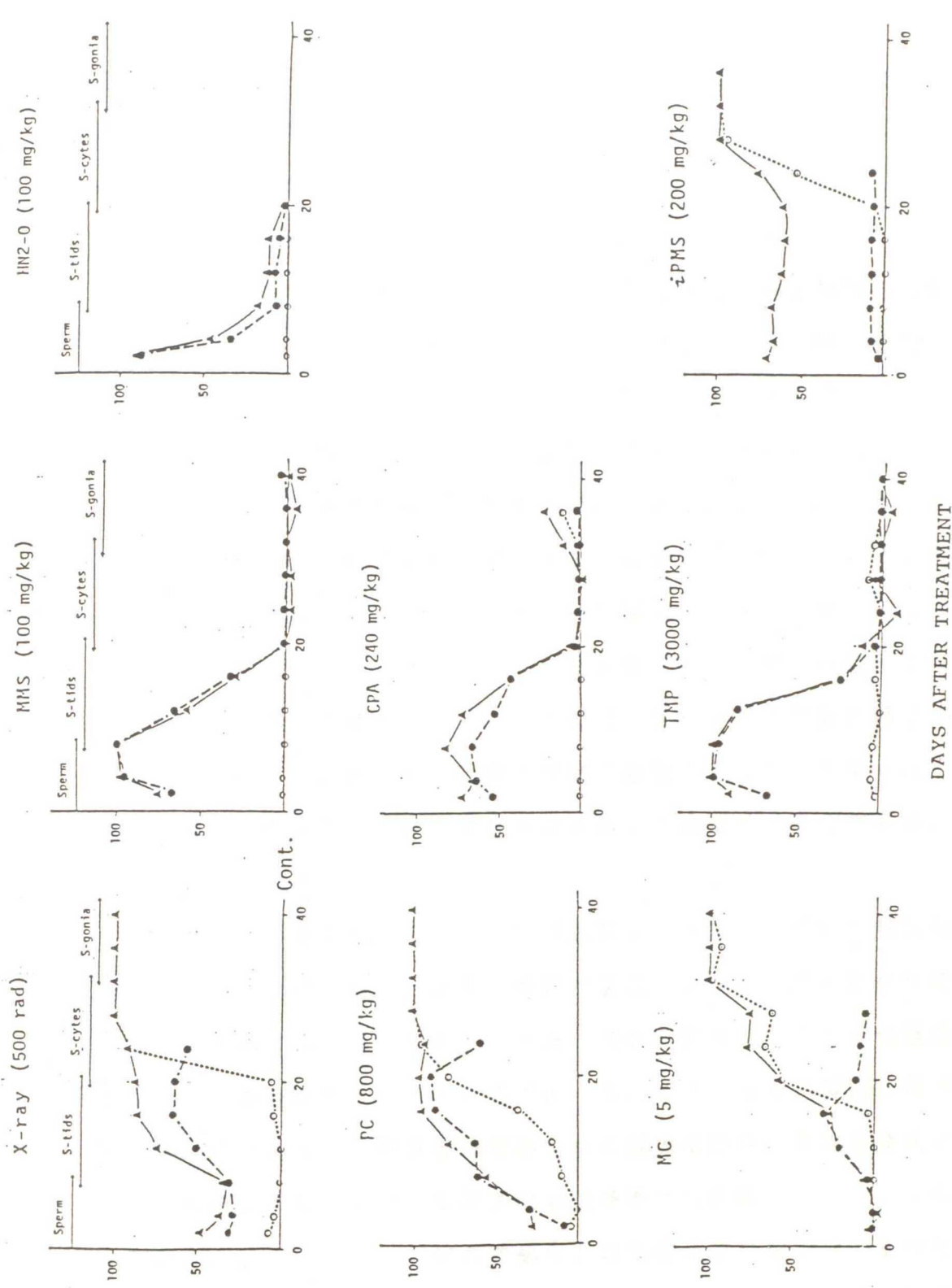


Fig. 3. Frequencies of dominant lethals (▲—▲), chromosome aberrations (●—●) at 1-cell stage and unfertilized eggs (O—O) induced at spermatogenic stages after the male mice had been subjected chemical or X-ray treatment.

細胞をX線、PC、MC、CPA、iPMSで処置した場合の優性致死誘発頻度は不受受精卵の頻度とほぼ一致し、これらの物質が両生殖細胞に作用した場合の優性致死試験で観察された着床数の減少はおもに不受受精卵によるものであることが明らかになった。またkratochvilova (1973)も精原細胞および精母細胞をMCで処置し交配させ、胚を回収した結果、不受受精卵の増加が観察されたことも報告している。一方、精子細胞および精子をPC、MC、MMS、CPA、TMPおよびHN2-Oで処置した場合、それぞれの化学変異原物質による染色体異常を保有している1細胞期胚の誘発頻度は優性致死率とほぼ一致し、また顕著な染色体異常を有した1細胞期胚は卵割が停止することから (Table 18)、優性致死試験において観察される着床以前の胚の損失は着床数の減少によるものと推察される。これらのことから化学変異原物質で精子細胞および精子を処置した場合の優性致死誘発作用は明らかに1細胞期胚の精子由来の染色体において観察される染色体異常に起因するものと考えられ、1細胞期胚の染色体異常が優性致死をひきおこす直接的な原因であることが明らかになった。

以上の結果からも明らかなように減数分裂を境にして優性致死誘発作用は2種類に分けられた。即ち、減数分裂前に発現する優性致死誘発作用は不受受精卵によるものであり、一方、減数分裂後にみられる優性致死誘発作用は染色体異常によるものであった。また、減数分裂後の精子細胞や精子のDNAに1細胞期胚でみられる顕著な染色体異常を発現するような障害を保有するような精子でも受精能には影響のないことが明らかになった。しかし、iPMSで処置した場合は染色体異常と優性致死誘発率とは必ずしも一致をみなかった。すなわちiPMSで精子細胞および精子を処置し、染色体分析と優性致死試験を行った結果、優性致死



誘発率は65.3% (Table 26) で、一方、染色体異常の誘発頻度は7.6 % (Table 16) と低く、優性致死と染色体異常の発現頻度は一致しないことが明らかになった。この *i* P M S による優性致死誘発作用の特徴は、他の化学変異原物質と異なり着床後の胚死が主であった。この現象から、*i* P M S の高濃度の優性致死誘発作用、特に着床後の胚死は1細胞期胚で観察される精子由来の染色体異常に起因するものでなく、光学顕微鏡下で観察できない微小な染色体の構造異常に起因した程度の低い卵割遅延をひきおこし (Table 18)、妊娠10日目に胚の発生停止を生じる (Photo. 4) ものと推察される。またこのような微小な染色体の構造異常は数回またはそれ以上のDNA合成サイクルを経た胚に初めて染色体異常として観察されうる可能性が考えられる (菊地ら、1982)。

## 2.4. 小括

化学変異原物質による優性致死誘発作用は1細胞期胚の染色体分析により事前評価できるかどうかを解明するため、着床以前の初期胚の発生についての検索、着床後の発生停止時期についての調査、および優性致死試験を行い、それぞれの結果について比較検討した。

雄生殖細胞を各種の変異原物質で処置し、優性致死試験を行った結果、精子形成過程の減数分裂前に作用させた場合の優性致死誘発作用は主に不受精卵によるものであり、一方、減数分裂後に発現する優性致死誘発作用は1細胞期胚で観察される染色体異常によるものであった。しかし、*i* P M S の場合は例外で、染色体異常を有する1細胞期胚の出現頻度と優性致死誘発率とは一致せず、1細胞期胚で観察される染色体異常レベル以下の微小な異常により、着床前に初期発生の卵割遅延が生じ、妊娠



10日目に胚の発生停止がみられ、着床後の胚死は1細胞期胚で観察される染色体レベルで判別できる程度の障害以下の微細な異常により高頻度に行われることが推察された。一方、顕著な染色体異常を有した1細胞期胚が発生した場合、8細胞期胚以前で細胞死をおこし、優性致死試験においては着床前の胚の損失という未着床胚現象になることが推察された。

以上のことから、大部分の化学変異原物質による優性致死誘発作用は、1細胞期胚の染色体分析により、事前評価できることが結論された。

### 第3章 遺伝性転座に関する検討

有性生殖を営む生物には様々なレベルの選択・淘汰機構がある。優性致死誘発作用も一つの選択・淘汰機構と考えられる。しかし、優性致死試験で致死に至らず生存胎仔として観察されるものの中には、次世代に伝達される遺伝性転座を保因した胎仔が存在する可能性が考えられる。実際に次世代のF<sub>1</sub>個体を観察することにより親の生殖細胞に誘発された障害が原因で子孫に転座ヘテロ個体が発現されるかどうかを調査する試験系として遺伝性転座試験がある (Leonard とAdler, 1984)。一般にX線を雄生殖細胞に処置した場合、次世代において高頻度の転座ヘテロ個体が発現される (Leonard とDeknuddt, 1968)。最近、優性致死誘発作用のある化学変異原物質で雄生殖細胞を処置した場合、転座ヘテロ個体を高頻度に発現することが報告されては始めている (Generoso ら, 1980)。

転座ヘテロ個体の発現と関係すると考えられる染色体異常には、染色分体型の相称性の交換型異常 (相称性の四放射状交換型異常) と染色体型の交換型異常 (相互転座) があり、これらの染色体異常が1細胞期胚で観察されるはずである。染色分体型の相称性の交換型異常を一個有した1細胞期胚が2細胞期胚に卵割した場合、生存可能な染色体構成を持つ2細胞期胚は50%の確立である。しかし、すでに染色体型の交換型異常である相互転座染色体を有した1細胞期胚が発生した場合は全て相互転座を有した細胞から構成される生存可能な胚へと発生し、転座ヘテロ個体として出産される。しかし、これまで化学変異原物質で体細胞を処置した場合、発現される染色体異常は主に染色分体型であり、X線で処

置した場合に観察されるような染色体型異常は発現しにくいとされてきた(Bender ら, 1974)。そのため、雄生殖細胞を化学変異原物質で処置した場合、次世代のF<sub>1</sub>において発現される転座ヘテロ個体は、1細胞期胚で観察される染色分体型の交換型異常より派生していると考えられている。しかし、今回の第1章における1細胞期胚の染色体分析の研究においては雄生殖細胞を化学変異原物質で処置し、1細胞期胚の染色体分析を行った場合、主に染色体型の異常を発現させる化学変異原物質が多く、体細胞を化学変異原物質で処置した場合と雄生殖細胞に対して処置した場合とでは染色体異常の発現作用が異なることが明らかになった。すなわち1細胞期胚の染色体型異常の発現は次世代における転座ヘテロ個体の発現と密接に関係していると考えられる。今回の研究においては、雄生殖細胞を化学変異原物質で処置した場合の次世代における高頻度の転座ヘテロ個体の誘発は1細胞期胚に発現される染色体型の交換型異常に起因していると考えられるが、これを証明するため、第1章の1細胞期胚の染色体分析で主に染色体型の異常が観察され、しかもまだ遺伝性転座試験が行われていないHN2-Oを用いて遺伝性転座試験を行った。

### 3.1. 妊孕性への影響

転座染色体は構造異常の一つで、染色体の一部が切断されて、同一染色体の異なった位置、あるいは他の染色体と癒着する現象で、非相同染色体間で相互に交換した場合を相互転座 (reciprocal translocation) という。相互転座を保有した転座ヘテロ個体の生殖細胞は減数分裂時に染色体構成が正常な配偶子、転座を持つ配偶子、欠損(deletion)あるいは重複(duplication)を示す不調和な配偶子が1 : 1 : 2の割合で分離

する(L.B.Russell, 1962)。従って、転座ヘテロ個体の雄個体と正常な雌個体とを交配すると、その1腹の産仔数は正常の半数が着床後の胚死となって観察される。これは不調和な配偶子によって受精された胚が必ず致死となるためである。このような妊孕性を示す雄個体を半不妊個体(semi sterile)といい、また全くの不妊(sterile)となる場合もある。従って遺伝性転座試験においては、妊孕性が転座ヘテロ個体の指標となっている。

今回の研究では50%の優性致死誘発率(Table 25)を示す25 mg/kgおよびその1/2の12.5 mg/kgのHN2-Oを用い、妊孕性を指標とし、遺伝性転座試験を行い、転座ヘテロ個体が高頻度に発現されるかどうかを検討した。

### 3.1.1. 材料と方法

HN2-Oを12.5 mg/kgおよび25 mg/kgそれぞれ雄マウスの腹腔内に1回投与し、投与直後より投与3日目まで、雌マウスと交配し、出産させた。出産したF<sub>1</sub>雄個体を9週齢まで飼育し、1匹の雄マウスは3匹の雌マウスと交配し、雌マウスについて膣栓を確認後、妊娠13日前後に子宮を摘出し、着床胚の有無、生存胎仔数、着床後の胚死数を調査した。各々の雌マウスの胎仔調査の結果はCarterらの方法(1955)に従って正常、半不妊、不妊個体に分類し、さらにF<sub>1</sub>雄個体の妊孕性に関する総合判定はFordら(1969)の判定基準に基づいて正常、半不妊、不妊個体に分類した。

### 3.1.2. 結果



Table 27.  
Frequency of semi-sterile and sterile males detected in  $F_1$  male offspring after  
NH2-0 treatment.

Dose (mg/kg)	Matings post- injection (days)	Treated germ cell stage	Number of $F_1$ males tested	semi- steriles	steriles	Percent of semi-steriles and steriles
Control	0-3	Spermatozoa	99	0	0	0.0 %
12.5	0-3	Spermatozoa	103	4	5	8.7 %
25.0	0-3	Spermatozoa	119	11	8	16.0 %

妊孕性試験での着床数は溶媒対照群とほとんど差異は無かったが、着床後の胚死数が溶媒対照群に比べて半数前後の半不妊雄個体と着床が全く観察されない不妊雄個体とが観察された。その結果をTable 27に示した。溶媒対照群の99匹のF<sub>1</sub>雄個体の中で半不妊および不妊を示した個体は発現されなかった。12.5 mg/kg処置群では103匹のうち4匹が半不妊個体で、8.7%の誘発率であった。25 mg/kg処置群では119匹のうち、11匹が半不妊個体、8匹が不妊個体で、16%の誘発率であった。

### 3.2. 遺伝性転座個体精巢の組織学的所見

転座ヘテロ個体は半不妊あるいは不妊を指標として選抜される。妊孕性試験において半不妊あるいは不妊と判定されたF<sub>1</sub>転座ヘテロ個体の精子形成はどのようになっているのか、特に不妊個体においては精子形成が行われていないのかどうかを検査するため、精巢の組織学的検索を行い、妊孕性との関連性について検討した。

#### 3.2.1. 材料と方法

遺伝性転座試験で半不妊および不妊と判定された雄マウスを頸椎脱臼により屠殺し、右側の精巢を摘出した。摘出した精巢はブアン (Bouin) 液で1時間固定し、精巢の両端を切り落とし、さらに1時間固定の後、70、80、90、95および100%のアルコール系列およびキシロールを通して脱水、脱アルコール、パラフィン包埋、薄切後、切片を作製した。標本作製はヘマトキシリン・エオジン二重染色法により染色した。即ち、

キシロールを通して脱パラフィンし、100、95、90、80および70%アルコール系列を通し、水道水で水洗し、ヘマトキシリンで10分間染色した。水洗後、塩酸アルコールで分別し、水洗した。エオジンで6分間染色後、水洗、70、80、95および100%アルコール系列およびクレオソート・キシロール、キシロールを通して脱水し、カナダバルサムで封入した。精巣精細管組織標本はClermont(1963)の報告に基づいて観察し、精細管内の生殖細胞の発生状態について調査した。

### 3.2.2. 結果

精巣の精細管組織標本の分析結果をTable 28に要約した。妊孕性試験で半不妊と判定された1転座ヘテロ個体の精巣を除いては肉眼的にも精巣の萎縮は観察されず、組織学的にも精子形成過程における異常は観察されなかった。不妊と判定された精巣は肉眼的にも萎縮が観察され、また組織学的にも精細管の萎縮が観察された。また不妊と判定された大部分は減数分裂前の移動期、厚糸期および合糸期の精母細胞では精子形成が阻止されていた(Photo. 6)。

### 3.3. 転座染色体の観察

減数分裂は体細胞分裂と異なり、相同染色体の対合、乗り換え、染色体数の半減がおこる。また精母細胞のM-I期の染色体像は体細胞分裂の中期像とはかなり異なり、十字型に開いた像が観察される。非相同染色体間に転座が生じるとキアズマの数とキアズマの形成される位置により移動期およびM-I期において鎖状および環状四価染色体(multiple

Table 28.  
Results of histological analysis: the latest spermatogenic stages present in the testis of semi-sterile and sterile males.

Dose (mg/kg)	Fertility	Number of males	Latest or decreasing spermatogenic stages present					
			Normal	Diakinesis	Pachytene	Zygotene	Gonia	None*
12.5	SS	4	3	1	0	0	0	0
	ST	5	0	0	0	2	2	1
25.0	SS	11	11	0	0	0	0	0
	ST	8	0	1	2	5	0	0

\*: Only sertoli cells were seen.  
SS: Semi-sterile.  
ST: Sterile.



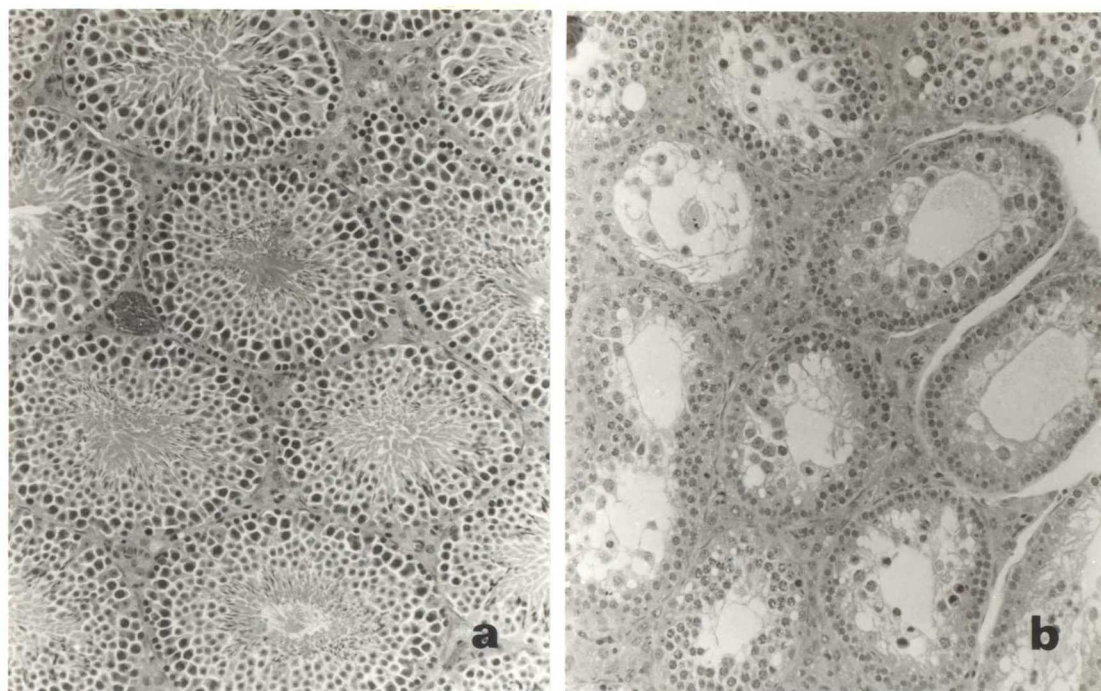


Photo. 6. Testis section of partially sterile male mice induced by HN2-O treated sperm. Sterilities were detected after the heritable translocation test. (a) Nearly normal spermatogenesis in a semi-sterile male.(b) Blockage in pathytene primary spermatocytes, cell number noted to be abnormally small at various stages in spermatogenic development.

chromosome)像が観察される。今回の研究では雄生殖細胞をHN2-Oで処置し、F<sub>1</sub>雄個体の妊孕性試験で半不妊および不妊雄個体が誘発された。これらの半不妊個体が転座ヘテロ個体であるかどうかを確認するため、半不妊個体および不妊個体の精母細胞の染色体分析を行い、鎖状および環状多価染色体などの有無について検討した。また、精母細胞の移動期および中期の染色体が観察されない不妊個体については、骨髓細胞の染色体標本作製し、転座染色体の確認を行った。

### 3.3.1. 材料と方法

精母細胞の第1分裂中期(M-I期)の染色体標本作製は以下のようにおこなった。妊孕性試験で半不妊および不妊個体と判定された雄マウスの腹腔内にコルヒチン 3 mg/kgを投与し、2 時間後頸椎脱臼により屠殺後、左側の精巣を摘出し、染色体標本をSasakiとMakino(1965)の方法に準じて作製した。即ち、精巣を切開し、組織を小型シャーレの中にとりだし、鋭利な小型ハサミで細切後、遠沈管に回収し3 mlの0.075 MのKC1溶液で20分間低張処理した。低張処理後、6 mlのカルノア液を静かに加え重層し、20分間放置した。ついで下方より静かにピペティングし、1200 r.p.m. で5 分間遠沈した。上澄を捨て、カルノア液を8 ml加えピペティングした後同一条件下で再度遠沈分離した。この操作を2 回繰り返し、最終的に1 ~3 mlの細胞浮遊液とし、それを2 ~3 滴スライドガラス上に滴下し、火炎乾燥した。火炎乾燥した標本は6 %ギムザ染色液で3 分間染色、蒸留水ですすぎ、風乾後オイキットで封入した。標本作製後、精母細胞のM-I期の染色体像を検鏡し、転座ヘテロ個体に見られる鎖状および環状の多価染色体の有無を調査した。

次に骨髓細胞の染色体のG-バンド法による標本作製は以下のように行った。すなわち妊孕性試験において不妊個体と判定された雄マウスの腹腔内に1匹当たりコルヒチン 3 mg/kgを投与した。コルヒチン投与後2時間後に頸椎脱臼により屠殺し、左右の大腿骨および下腿骨を摘出し、両骨端を切除し、3 mlの0.07 MのKCl 低張液で骨髓細胞を遠沈管に洗いだし、20分間低張処置した。以後の固定、乾燥までの操作は、さきに記述した精母細胞の染色体標本作製方法と同様に行った。かくしてできた標本はG-染色をSeabright のトリプシン法(1971)で行った。即ち、標本を0.025 %トリプシン溶液で70秒間処理し、PBS (pH 6.8)および蒸留水で水洗し、6 %ギムザ染色液で6 分間染色し、軽く水洗し、自然乾燥後オイキットで封入した。良く広がった分裂中期像を写真撮影し、Cowe 11(1984)の方法により核型分析を行い転座染色体を検出した。

### 3.3.2. 結果

HN 2-O 25 mg/kg 処理群で半不妊および不妊の雄が19個体観察されたが精母細胞の精子形成が阻害され、移動期および中期の染色体が観察されず分析不可能な個体があったため、13個体についてのみ染色体観察を行った。Table 29およびPhoto.7 に示したように、半不妊および不妊個体からは非相同染色体間の相互転座とみなされる鎖状および環状の四価染色体がおもに観察された。なお、性染色体と常染色体間の転座染色体は観察されなかった。

また、組織学的で合糸期の精子形成が阻害されていた動物番号23( Table 29) の不妊個体の骨髓細胞の染色体の核型分析を行った結果( Photo. 8) 、第18染色体の末端が切断しておりこれが第6 染色体に転座して



Table 29.  
Analysis of spermatocytes of F<sub>1</sub> semi-sterile and sterile males in which meiotic analysis was possible.

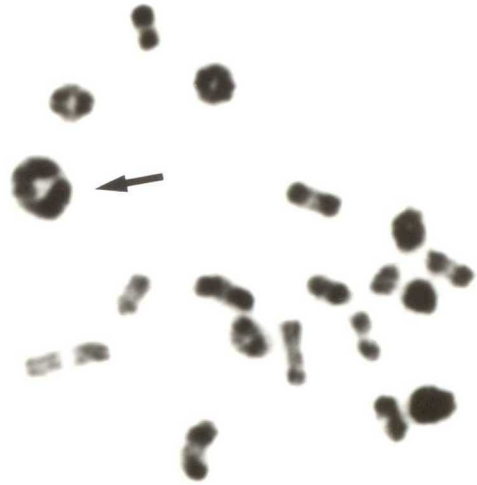
F <sub>1</sub> male Number	fertility	Number of cells analyzed	Number of cells with the following chromosome associations										
			20II	18II+ ChIV	18II+ ChIII+I	18II+ RIV	17II+ ChVI	16II+ 2ChIV	16II+ 2RIV	16II+ ChIV+RIV	16II+ RVI	19II+ X+Y	
23	ST	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
30	ST	30	3	3	-	21	-	-	-	-	-	3	
31	SS	50	2	21	1	24	-	-	-	-	-	2	
44	SS	50	1	21	-	27	1	-	-	-	-	-	
53	ST	7	-	-	-	-	-	1	2	4	-	-	
60	SS	30	5	12	3	4	1	-	1	1	-	3	
61	SS	30	8	3	-	18	-	-	-	-	-	-	
63	SS	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	
65	SS	25	-	16	-	9	-	-	-	-	-	-	
71	ST	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
73	SS	5	-	4	-	1	-	-	-	-	-	-	
75	ST	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
76	SS	21	-	4	1	12	-	-	1	-	3	-	
78	SS	14	-	7	1	6	-	-	-	-	-	-	
89	ST	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
93	ST	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
105	ST	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
109	SS	2	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	
118	SS	50	30	6	-	5	-	-	-	-	-	9	

SS: Semi-sterile, ST: Sterile.  
Ch: Chain chromosome.  
R: Ring chromosome.





**a**



**b**

Photo. 7. Abnormal meiotic configurations of the primary spermatocytes of semi-sterile males. (a and b) Single reciprocal translocations; (a) 18 bivalents and a chain of 4 chromosomes. (b) 18 bivalents and a ring of 4 chromosomes.



Photo. 8. G-banded chromosomes in the bone marrow of a sterile male produced using HN2-O treated sperm, as detected in a heritable translocation test. The translocated chromosome is situated between chromosomes 6 and 18.

した。

### 3.4. 考察

LyonとMeredith(1966)およびCacheiroら(1974)は半不妊あるいは不妊を呈するF<sub>1</sub>雄個体のM-I期の染色体分析において、環状よりも鎖状四価染色体が高頻度に観察されたことを報告している。今回の研究において、鎖状と環状四価染色体の発現頻度には差がなく、観察された染色体異常のタイプと半不妊との間には関連性がないように思われた。このように半不妊個体において鎖状あるいは環状四価染色体が観察され、それらの半不妊個体の精巢は組織学的検索(Table 28)において、減数分裂を通過し、精子発生が正常通り進行している所見が観察された。従って、このことは、相互転座を保有しているF<sub>1</sub>個体の減数分裂の過程で、安定型または不安定型の4種類の染色体構成を持つ配偶子が生じ、そのうち安定型の染色体構成を有する精子によって受精された胚は生存胎仔となり、他方、不安定型の染色体構成を有する精子によって受精された胚は着床後の胚死になると考えられる。また、妊孕性試験で、半不妊個体が観察され、半不妊個体の組織学的所見において精子形成の異常が観察されないことより、安定型の転座染色体は減数分裂という選択・淘汰機構の網を通過できうる場合もあることが確認された。半不妊個体の着床後の胚死は不安定型の染色体構成に原因があると考えられる。。

一方、不妊個体はHN2-Oの25 mg/kg処置群で8個体観察されたが、そのうち6個体は精母細胞の移動期より後の精子形成が阻害されていたために、M-I期の染色体分析は不可能であった。そこで残りの2個体について分析した。動物番号53の雄個体は4つの非相同染色体間の切断

よりなる2組の相互転座染色体を構成していた。即ち2つの鎖状、2つの環状あるいは1つの鎖状と1つの環状四価染色体が観察れる複合転座(multiple translocation)が観察された。一方、動物番号30の個体も不妊であったが、動物番号53の個体のような2組の相互転座を示す染色体は観察されず、1組の鎖状あるいは環状四価染色体が観察された。従って、非相同染色体間における2組の転座染色体が減数分裂前後の精子形成を阻害することは想定しにくく、むしろ1組の転座染色体の存在によっても減数分裂前後の精子形成を阻害することが推察された。この不妊個体における精子形成過程の厚糸期および移動期以後の精子形成の阻害は、相同染色体間の分離やキアズマの末端化が阻害されることに原因があるのではないかと推察された。さらにM-I期の染色体分析が不可能であった動物番号23( Table 29)の骨髓細胞の染色体の核型分析より転座が観察された( Photo. 8)。これらのことから、不妊個体は転座染色体に起因する事実が確認され、妊孕性試験において半不妊のみならず、不妊現象も転座ヘテロ個体の検出の指標になることが示唆された。

妊孕性試験の結果( Table 27)から、HN2-Oで精子を処置した場合、次世代のF<sub>1</sub>雄個体において転座ヘテロ個体が高頻度に発現される成績が得られた。Falconerら(1957)はHN2-Oの類似化合物であるnitrogen mustard (HN2)の遺伝性転座試験に関して報告している。この報告によると投与後9~18日目と34~41日目の間に交配し、それぞれの期間において29匹および42匹のF<sub>1</sub>雄個体を得、それぞれの群において、半不妊が1匹ずつ検出されている。この報告において転座ヘテロ個体の発現頻度が今回の実験結果に比べ低いのは、優性致死を発現しない精子細胞及び精原細胞に対して処置したためと推察される。雄生殖細胞をCPAで処置した場合、精子形成過程における転座ヘテロ個体の誘発



時期 (Sotomayor と Cumming, 1975) と優性致死の誘発時期 (Fig. 3) との間には高い正の相関関係が認められたことから、これら2つの現象は密接に関係していることが推察された。さらに精子をHN2-Oで処置した場合、1細胞期胚の染色体分析で主に染色体型の異常が観察され (Table 15)、遺伝性転座試験で高頻度に転座ヘテロ個体が誘発された。HN2-Oの1細胞期胚の染色体分析の結果 (Table 15) において、遺伝性転座試験に用いたHN2-Oの25 mg/kg処置群の投与後0～3日においては、これまで転座ヘテロ個体の誘発と関係すると考えられてきた染色分体型の交換型異常である相称性の交換型異常は全く観察されず、50および100 mg/kg 処置群においてもそれぞれ4個と1個しか観察されなかった。ところで1細胞期胚の染色体は染色分体間が開いてなく、また動原体の位置が明瞭でないので、非相称性か相称性かが判別できず、染色分体型の非相称性と相称性の交換型異常をまとめてquadriradialsとしてTable 15に集計してある。また、Table 15に観察されたquadriradials がすべて相称性の交換型異常としても、遺伝性転座試験において10%以上の転座ヘテロ個体を誘発するには、quadriradials が少なくとも10%以上観察されてくなくてはならない。一方、染色体型の交換型異常のlong (1細胞期胚の染色体は染色分体間が明瞭でないので動原体の位置が判別できず、二動原体および多動原体か判別できない。1細胞期胚の染色体分析では、染色体が転座し、正常よりも長い染色体をlongとしてTable 15に表示した) やringが高頻度に観察された。1細胞期胚の染色体分析においては相互転座染色体であるかどうか明瞭に識別できない。しかし、染色体型の交換型異常が高頻度に観察されることより、相互転座染色体も高頻度に誘発されている可能性が高い。従って、HN2-Oにより転座ヘテロ個体が次世代において高頻度に誘発されたことは、す

で1細胞期胚において相互転座染色体が効率よく形成されている可能性が推察される。Tanaka, Katoh とIwahara (1983)も、MMSを交尾直後の雌マウスに投与し、1細胞期胚の染色体型異常と転座ヘテロ個体の誘発とは相関関係があったことを報告している。以上のことから、1細胞期胚の染色体分析の結果より次世代の転座ヘテロ個体の誘発頻度を推測することができる。

### 3.5. 小括

化学変異原物質で雄生殖細胞を処置した場合の次世代における高頻度の転座ヘテロ個体の誘発は1細胞期胚で観察される染色体型の交換型異常に起因していることを証明するため、主に染色体型異常が観察されるHN2-Oによる遺伝性転座試験を行った。

精子にHN2-Oを12.5 および25 mg/kgを処置し、投与直後より3日目まで無処置雌マウスと交配し、F<sub>1</sub>雄個体を得た。得られたF<sub>1</sub>雄個体は溶媒対照群 99 個体、HN2-Oの12.5 mg/kg処置群では 103 個体、25 mg/kg処置群では 119 個体で、それぞれの雄個体に対して妊孕性試験を行った。妊孕性試験の結果、溶媒対照群で誘発された転座ヘテロ個体は0 個体(0%)、HN2-Oの 12.5 mg/kg 処置群では半不妊個体が 4個体、不妊個体が5 個体で合計9 個体(8.7%)、HN2-Oの 25 mg/kg 処置群では半不妊個体が11個体、不妊個体が8 個体で合計19 個体(16 %)であった。これらの半不妊および不妊個体の精母細胞の移動期および中期(M-I期)の染色体分析を行った結果、非相同染色体間の転座を示す鎖状および環状四価染色体などの複合染色体が観察された。またM-I期の染色体分析が不可能であった不妊個体の骨髓細胞の

染色体の核型分析からも、転座染色体が確認れた。

以上の結果から、HN 2 - O で雄生殖細胞を処置した場合、1細胞期胚の染色体分析で主に染色体型の異常が観察され、次世代のF<sub>1</sub>の雄に転座ヘテロ個体が高頻度に誘発されることが明らかになった。従って、1細胞期胚の染色体分析により、次世代の転座ヘテロ個体の誘発頻度を推測することができる。



#### 第4章 精巣ならびに精子に及ぼす影響

生物は親から受け継いだ遺伝情報を次の世代に伝達するためにいろいろな様式をとっている。有性生殖によって種の保存を行っている哺乳動物の雄生殖細胞関連器官はいろいろな器官からなっているが、なかでも精巣は精子形成とandrogen分泌との2種類の機能をつかさどる重要な器官である。精子形成は精細管内で行われ、精細管の精上皮はセルトリ細胞 (Sertoli cell) と生殖細胞 (germ cell) とに分けられる。

セルトリ細胞は生殖細胞の支持、栄養をつかさどり、また、薬物侵入の防御機構 (血液-精巣関門、Blood-Testis Barrier; Setchell, 1967, 1969) としての重要な働きを持っている。動物に薬物が投与された場合、吸収され全身循環後、精巣の毛細管から間質部 (interstitial space) に入り、精細管の外側から精細管壁を浸透して精原細胞の周囲を通してセルトリ細胞との間隙 (血液-精巣関門, Fawcett, 1970) に到達する。よって精原細胞は外部からいろいろな経路で吸収された有害物質に侵されやすい。しかし、血液-精巣関門を通過する薬物は制限され、精母細胞、精子細胞、精子とは容易に接触できない。しかし、ある種の薬物は血液-精巣関門を通過し、精母細胞、精子細胞、精子に接触することがある (奥村, 1984)。

マウスの雄生殖細胞は精原細胞から精母細胞、精子細胞を経て精子への形成に約35日間を要することが知られている (Oakberg, 1956a, 1956b)。ある種の化学変異原物質は血液-精巣関門を通過し、いずれの发育段階の生殖細胞とも接触し、優性致死などを誘発する。そして生殖細胞は処置された化学変異原物質の種類により異なった優性致死誘発作用



を示すことが知られている。しかし、化学変異原物質を雄個体に投与した場合、生殖細胞に対してどのような組織学的影響が観察されるのか、また、それぞれの生殖細胞が精子に分化した場合の精子形態異常への影響、生殖細胞のDNA傷害とその修復、配偶子の受精時における影響、及びこれらの一連の影響と1細胞期胚の染色体異常および優性致死との関連性についての詳細な報告はない。

今回の研究においては上記の点を明らかにするため、化学変異原物質を雄個体に投与し、処置当代個体の精巣における組織学的影響、精子の形態異常、不定期DNA合成について調査し、それらの結果と1細胞期胚の染色体分析の結果との関連性について検討した。

#### 4.1. 処理当代個体精巣への組織学的影響

雄マウスにMCを投与した場合、おもに減数分裂前の精原細胞および精母細胞に対して優性致死誘発作用が観察される(Ehling, 1971)。またMMSは減数分裂後の精子細胞や精子に対して優性致死誘発作用を発現する(Ehling ら, 1968)。ところが、iPMSはいずれの雄生殖細胞に対しても優性致死誘発作用が観察される(Ehling, 1972)。これらの化学変異原物質による精子形成への組織学的影響と受精および1細胞期胚の染色体異常、あるいは優性致死誘発時期との関連性等については詳細な報告はみあたらない。そこで今回の実験では異なった優性致死誘発作用を示す3種のアルキル化剤を雄マウスに投与した場合、それぞれの精管内の生殖細胞に対してどのような組織学的影響をひき起こすのか、またそれらの組織学的影響は受精および1細胞期胚の染色体異常、優性致死誘発時期とどのような関連性があるかについて検討した。

#### 4.1.1. 材料と方法

*i* P M S (150 mg/kg)、M M S (100 mg/kg) および M C (5 mg/kg) を単味で雄マウスの腹腔内に一回投与し、*i* P M S 群では投与後、1、3、6、9、10、11、12、13、20および121日目に、M M S および M C 群は投与後1、4、8、12、16、20、24、28、32、36、40および121日目に精巣を摘出した。以後の操作は第3章(3.2.1.)と同様に行った。

#### 4.1.2. 結果

溶媒対照群およびM M S 群の精巣には投与後1～40日目まで、肉眼的異常所見は観察されなかった。一方、M C 群および*i* P M S 群では投与後1～13日目までの異常所見は観察されなかったが、M C 群では投与後16～40日目に、また、*i* P M S 群では64日目に精巣は対照群の1/2程度に萎縮した。

組織学的所見をTable 30, 31およびPhoto. 9, 10に要約した。溶媒対照群およびM M S 群の精巣組織は投与後1～40日目まで何ら異常は観察されなかった。*i* P M S 群およびM C 群では、1～3日目において精原細胞の変性や減少が観察された。投与後3あるいは4日目においては、精原細胞は影響されず、投与後6日目には細糸期の精母細胞が減少しはじめ、投与後8～12日目には厚糸期(pachytene)の精母細胞が著しく減少し、細糸期(leptotene)および合糸期(zygotene)の精母細胞はほとんど観察されなかった。しかし、M C 群においては投与後12日目頃から精

Table 30.  
Histological effects on spermatogenesis after treatment with 5 mg/kg of MC in male mice.

Days after treatment	Stage of mouse spermatogenesis						
	Sperm	Spermatid	Diakinesis	Pachytene	Zygotene	Leptotene	Spermatogonia
1	-	-	-	-	-	+	++
4	-	-	-	-	-	+++	+++
8	-	-	-	-	+++	+++	+++
12	-	-	++	+++	+++	+++	++
16	-	++	+++	+++	++	++	++
20	+	+++	+++	++	++	++	+
24	++	+++	+++	++	+	+	+
28	+++	+++	+++	+	+	-	-
32	+++	+++	-	-	-	-	-
36	+++	-	-	-	-	-	-
40	++	-	-	-	-	-	-
121	-	-	-	-	-	-	-

-: Normal stage.  
+: A slightly decreasing stage.  
++: A remarkable decreasing stage.  
+++: A missing stage.

Table 31.  
Histological effects on spermatogenesis after treatment with 150 mg/kg of IPMS in male mice.

Days after treatment	Stage of mouse spermatogenesis					
	Sperm	Spermatid	Diakinesis	Pachytene	Zygotene	Leptotene Spermatogonia
1	-	-	-	-	-	++
3	-	-	-	-	-	+++
6	-	-	-	-	++	+++
9	-	-	-	++	+++	+++
10	-	-	+	++	+++	+++
11	-	-	++	++	+++	+++
12	-	-	++	+++	+++	+++
13	-	-	+++	+++	+++	+++
20	-	+++	+++	+++	+++	+++
121	+++	+++	+++	+++	+++	+++

-: Normal stage.  
+: A slightly decreasing stage.  
++: A remarkable decreasing stage.  
+++: A missing stage.



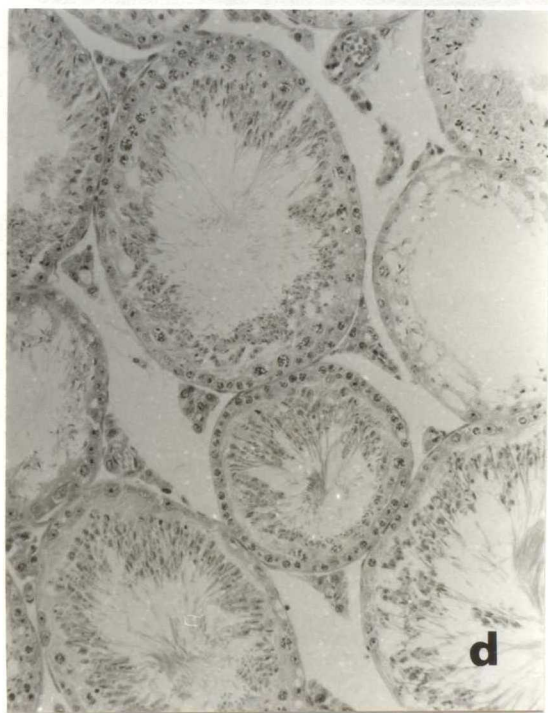
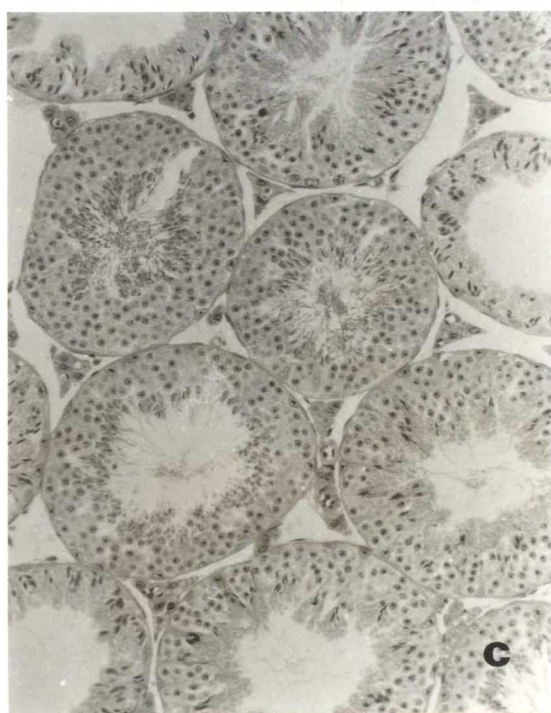
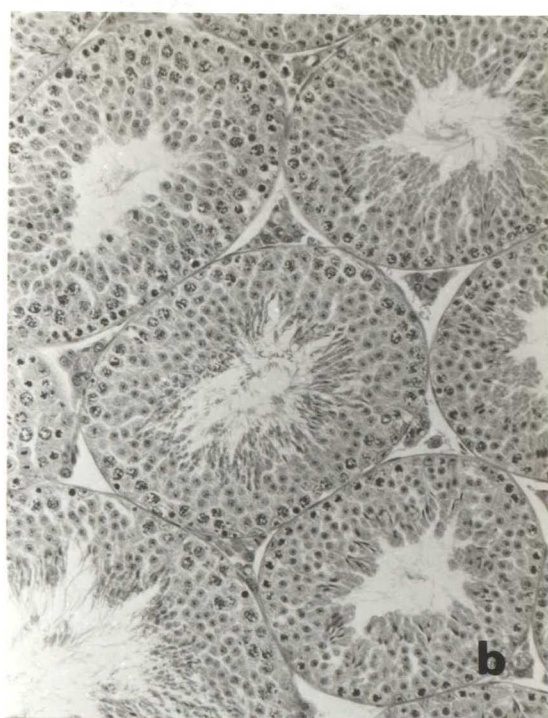
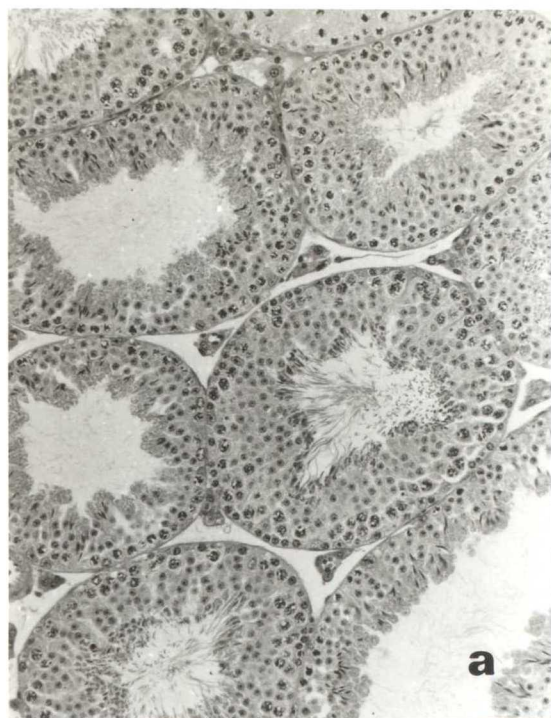


Photo. 9.

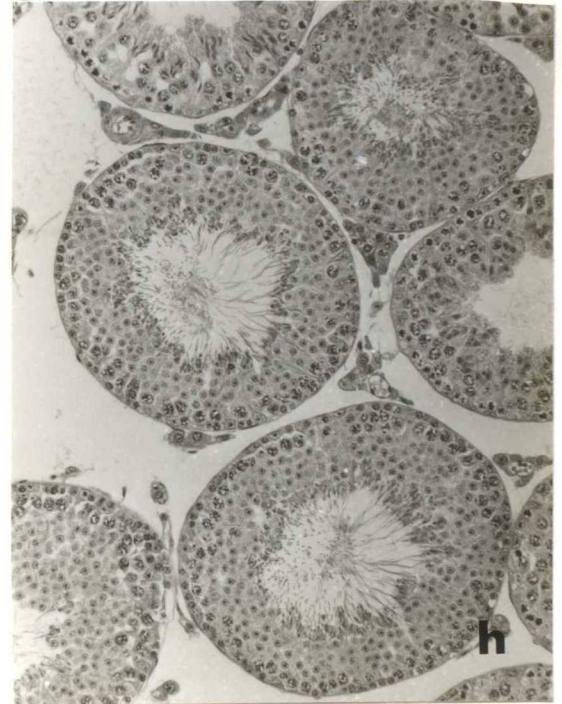
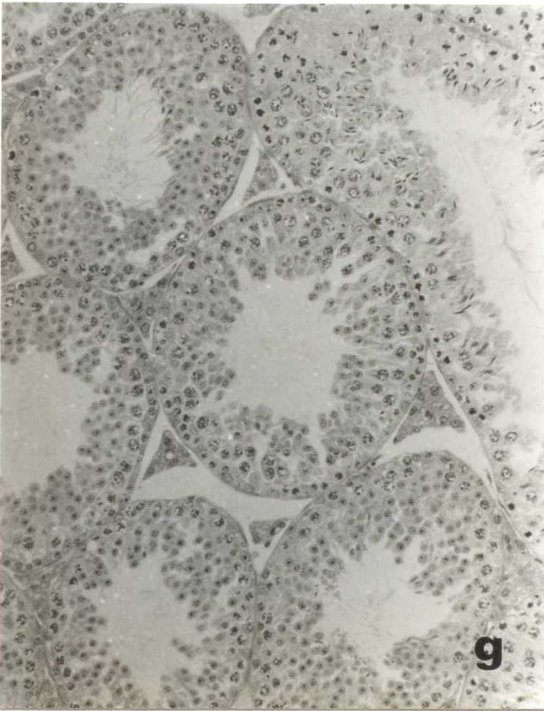
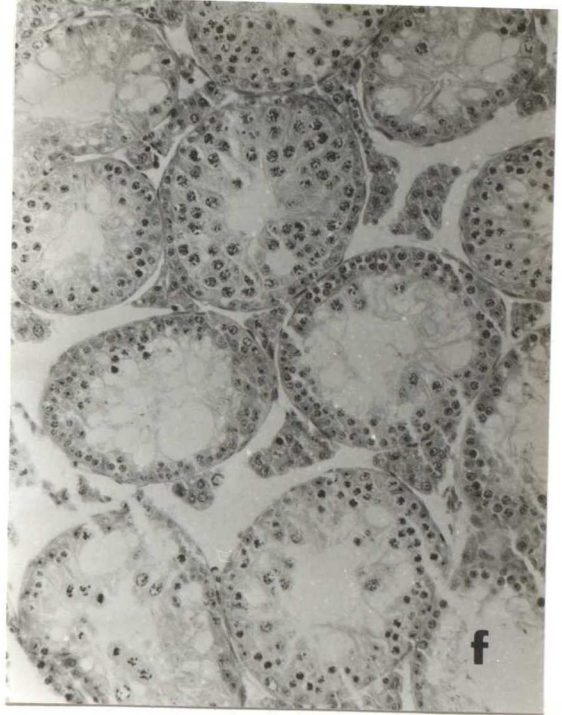
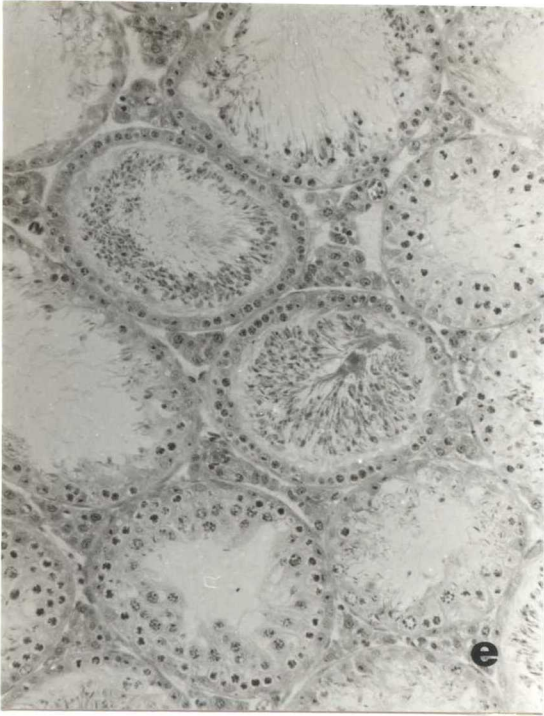


Photo. 9.



Photo. 9. Testis section at various times after treatment of male mice with 5 mg/kg of MC. (a) Control male. (b-h) MC-treated mice; damaged spermatogenic cells are indicated by arrows. (b) Necrosis and loss of spermatogonia are evident, 1 day after treatment. (c) Loss of spermatogonia and spermatocytes, 12 days after treatment. (d) Loss of spermatids can be seen but the regeneration of spermatogonia and spermatocytes occurred 20 days after treatment. (e) Loss of spermatids is apparent but not regeneration of spermatogonia or spermatocytes. (f) Loss of spermatids and spermatocytes was observed, 32 days after treatment. (g) Loss of sperm is apparent no regeneration of spermatogonia, spermatocytes and spermatids could be noted, 40 days after treatment. (h) Complete regeneration in spermatogenesis occurred 121 days after treatment.

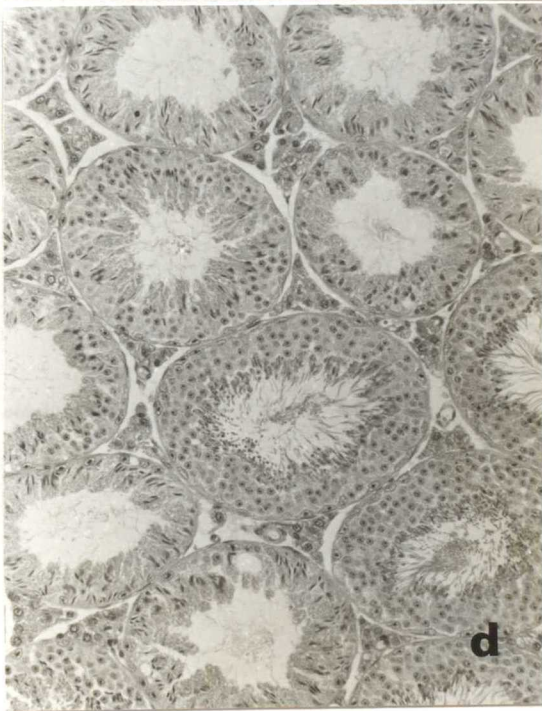
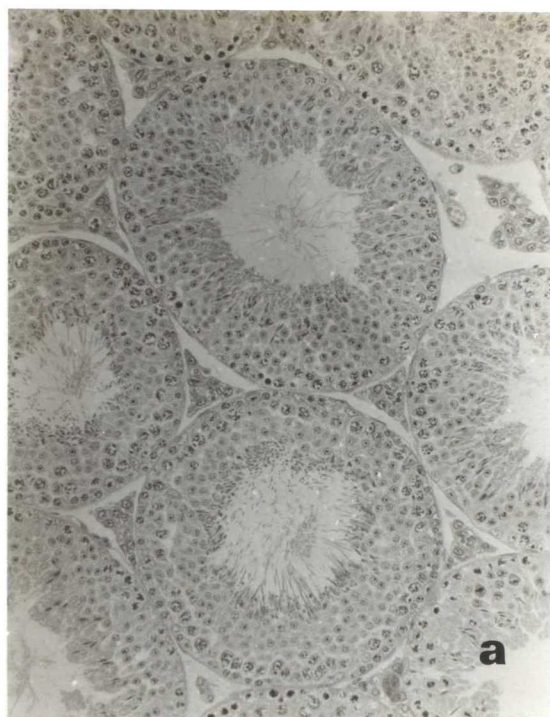


Photo. 10.



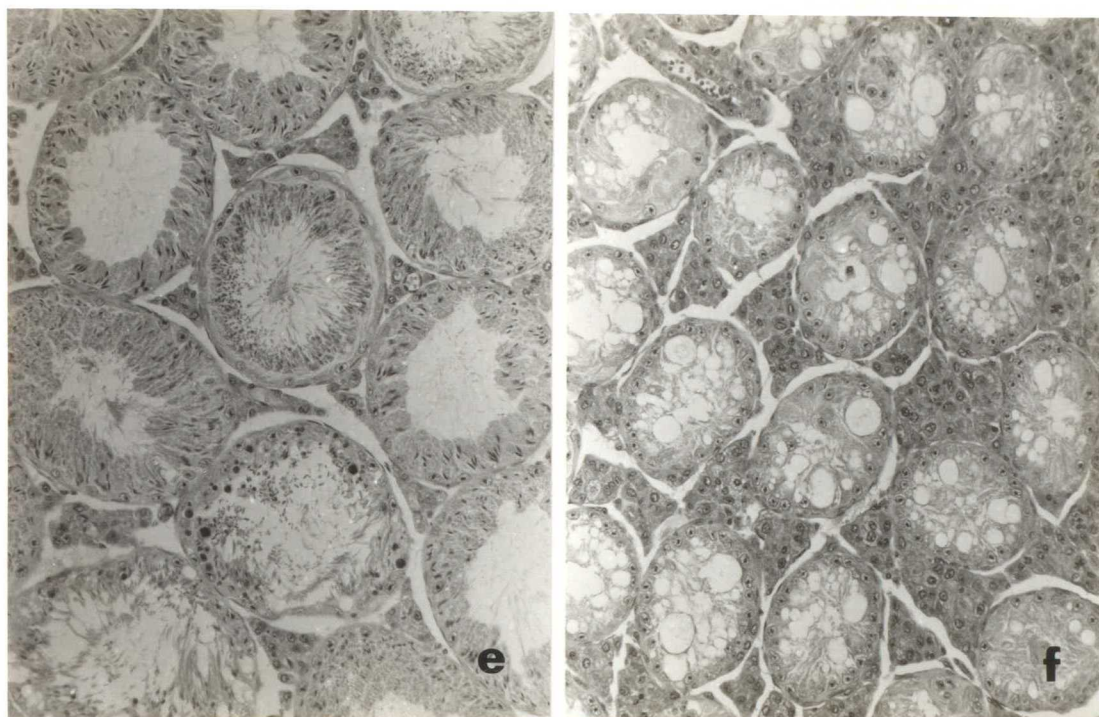


Photo. 10. Testis section at various times after treatment of male mice with 150 mg/kg of iPMS. (a) Necrosis of spermatogonia was observed, 1 day after treatment. (b) Loss of spermatogonia and early spermatocytes (leptotene and zygotene) was noted, 6 days after treatment. (c) Loss of spermatogonia and early spermatocytes (leptotene and zygotene) and decrease in both late spermatocytes (pachytene) occurred 9 days after treatment. (d) Loss of spermatogonia and spermatocytes was apparent, 13 days after treatment. (e) Loss of spermatogonia took place, 20 days after treatment (f) Nearly depleted tubules could be seen, 121 days after treatment.

原細胞が観察されはじめ、また主に精子細胞と精子が観察され、精母細胞は観察されなかった。投与後20日目のMC群では精原細胞、精母細胞の一部と精子が観察され、精子細胞は観察されなかった。さらに投与後40日目では精子はほとんど観察されなかった。しかしこれらの変化は、投与後121日目には完全に回復されていた。一方、投与後13日目の*i*PM群では精子細胞と精子のみが観察された。*i*PM投与群の121日目では生殖細胞は全て消失しセルトリ細胞のみが観察され、精細管の萎縮が認められた。

#### 4.2. 精子形態および機能への影響

X線による精子の形態異常誘発についてはBruceらにより報告され、ついで化学変異原物質による精子の形態異常の誘発(WyrobekとBruce, 1975)が報告され、精子の形態異常と遺伝的障害との関連性が問題視されるに至った。精子の形態異常が遺伝的障害と直接関係があるならば、*in vivo*での遺伝的障害の検出系として簡便でしかも有用な系になると思われる。この検出系の研究が進展し、遺伝的障害の検出系として確立されるならば、ヒトの精子を用いてヒトの遺伝的障害を直接モニタリングすることが将来可能になると考えられる。しかし、精子の形態異常と1細胞期胚の染色体異常および優性致死誘発作用との関連性については明らかでない。また無処置の場合の精子の形態異常の頻度はマウスの系統差によっても異なることが知られている(北爪ら, 1983)ので、同じ系統を用いて比較検討する必要がある。マウスの精子は頭部、頸部、中片部、尾部に分けられ、頭部はカギ状を呈し、しかも遺伝物質を梱包している。放射線に対して頭部は感受性をもち、一方、中片部および尾部の

異常は一過性で放射線の効果とはそれほど関係がないと考えられている（北爪ら，1983）。

今回の実験では雄生殖細胞に対して異なった優性致死誘発作用を示すことが知られているMC、MMS、*i*PMSおよびX線をBDF<sub>1</sub>雄マウスに投与あるいは照射し、投与後優性致死誘発作用が観察される時期に精子を回収し、精子頭部について観察した。さらに精子形態異常が1細胞期胚の染色体異常とどのような関連性があるかについて検討した。

#### 4.2.1. 材料と方法

雄マウスの腹腔内にMC（5 mg/kg）、MMS（100 mg/kg） および *i*PMS（200 mg/kg）を投与し、MC群は投与後 1、4、8、12、16、24、28、32、36および40日目に、またMMSおよび *i*PMS群は投与後9日目に頸椎脱臼により屠殺した。また、X線（500 rad）照射群は、照射後 4 および19日目に同様に屠殺した。精管摘出後、精管内の精子をMEM培地中にピンセットでしごきだし、ピペッティング後精子浮遊液を2000 r.p.m. で10分間遠沈した。遠沈後上澄を捨て、ピペッティングした精子浮遊液をスライドグラス上に一滴落として塗抹し、室温乾燥した。乾燥後蒸留水中でスライドグラスを上下させ水洗し、ヘマトキシリン液で20分間染色、水洗を行い、エオジン液で6分間染色後、水洗、乾燥を行って、封入した。マウス精子の形態異常の判定はWyrobek とBruce（1974）に基づいて、1個体のマウス当たり1000 個の精子頭部の形態異常について調査分析を行った。

#### 4.2.2. 結果



Table 32.  
Sperm-shape abnormalities after treatment of male mice with  
chemical or X-ray.

Group (dose)	Days after treatment	Number of males	Number of sperm observed	Number of abnormal sperm per 1000 sperm (Mean ± S.D.)
Control	9	5	5000	7.8 ± 1.5
MC (5 mg/kg)	1	3	3000	8.0 ± 2.0
	4	3	3000	10.0 ± 2.0
	8	3	3000	8.0 ± 3.5
	12	3	3000	9.3 ± 3.1
	16	3	3000	21.3 ± 3.1
	20	3	3000	61.0 ± 25.1
	24	3	3000	57.7 ± 20.2
	28	3	3000	66.0 ± 31.5
	32	3	3000	85.7 ± 54.3
	36	3	3000	201.0 ± 92.6
	40	3	3000	219.7 ± 62.1
MMS (100 mg/kg)	9	5	5000	7.0 ± 2.7
iPMS (200 mg/kg)	9	5	5000	8.8 ± 3.2
X-ray (500 rad)	4	5	5000	8.2 ± 2.8
	19	5	5000	16.6 ± 7.3



結果をTable 32に示した。MMS群（投与後9日目）、iPMS群（投与後9日目）およびX線群（照射後4日目）では、精子頭部の形態異常は観察されなかった。しかし、MC群では投与後16日目から投与後40日目、またX線群では照射後19日目に採取した精子において形態異常の頻度が増加した。

#### 4.3. 不定期DNA合成について

変異原物質によるDNA障害、それにつづく修復は微生物、培養哺乳動物細胞などにおいてよく研究されているが、哺乳動物の生殖細胞については検討の余地がある。雄マウス生殖細胞をEMSで処置すると不定期DNA合成（UDS）が誘発されることがSega(1974)によって最初に報告された。マウスにおいて最後のDNA合成が行われている前細糸期の精母細胞から精子までは約28日間を要し(Oakberg, 1956a, 1956b)、精巣から精巣上体、精管へと1週間で移行する。UDSの観察には変異原物質と同時にthymidine-methyl-<sup>3</sup>Hを精巣に投与し、それぞれの時期に精管より精子を回収し、取り込まれたthymidine-methyl-<sup>3</sup>Hをカウントすることにより、各精子形成時期におけるUDSの程度を測定することが可能である。化学変異原物質で雄生殖細胞を処置した場合、諸程の優性致死誘発作用が観察される。しかし、投与後日数の経過とともに優性致死誘発作用を有するMCおよびPCで処置した場合のUDSに関する報告はない。またMCおよびPCで雄生殖細胞を処置し、1細胞期胚の染色体分析を行った場合は他の化学変異原物質で処置した場合と異なり、染色分体型の異常が発現されることが第1章(1.2.)で明らかに

なった。これまでの報告においては、UDSと1細胞期胚の染色体異常との関連性については明らかでない。

今回の実験においては、UDSと1細胞期胚の染色体異常との関連性を明らかにするため、すでにUDSに関する報告があるMMSを用い、また、まだ報告のないPC、MCおよび染色体型の異常を誘発するTMPで雄生殖細胞を処置し、UDSの誘発実験を行った。

#### 4.3.1. 材料と方法

不定期DNA合成(UDS)の実験に用いたマウスは放射性同位元素実験室(RI室)で床が網製のケージを用い10匹ずつの集団で飼育した。その他の飼育条件は第1章(1.1.1.)に記述したSPF動物舎のそれと同一条件で飼育した。

雄マウス生殖細胞におけるUDSの検出はSega(1974)の方法に基づいて行った。まず、精巣へのthymidine-methyl- $^3\text{H}$  ( $[^3\text{H}]$  dT, 比活性が40~60 Ci/mmol, New England Nuclear Co.) 投与容量は30  $\mu\text{l}$  が技術的に限界であったため、化学変異原物質投与後1日目から24日目までの実験群では1精巣当たり30  $\mu\text{Ci}$  (1mlCi/1ml) をマイクロシリンジで直接精巣へ注入した。また、多量の $[^3\text{H}]$  dTが精子形成に影響を及ぼす可能性を考慮し、化学変異原物質投与後28日目より40日目までの処置群の精巣には $[^3\text{H}]$  dTを15  $\mu\text{l}$  ずつ投与した。

$[^3\text{H}]$  dTと同時に溶媒対照群としてHanks液または蒸留水を腹腔内に投与した。化学変異原物質の投与群としてMMS (100 mg/kg)、MC (5 mg/kg)、PC (800 mg/kg)およびTMP (3000 mg/kg) をそれぞれ腹腔内に投与した。MMSとMC群はそれぞれ投与後1~40日間4日毎に3個体ずつ解剖した。またPCとTMP群は投与後12、16、20およ

び24日目に3～4個体ずつ解剖した。精管摘出後、生理食塩液中に精子を採取し、ピペッティング後2000 r.p.m.で20分間遠沈し上清を取り除き、この操作を4回繰り返した。最後に0.5 mlの精子浮遊液とし、スライドガラス上に塗抹して乾燥させ標本を作製した。標本は蒸留水ですすいだ後、1晩乾燥させた。

オートラジオグラフ用乳剤 (Sakura NR-M2) は50℃に温め、使用直前に蒸留水で2倍に希釈し、50℃に保温した状態で標本をディッピング後、20日間露出し、現像処理後、乾燥した。この標本をヘマトキシリンで20分間染色、水洗、エオジンで6分間染色、水洗、乾燥し、封入した。銀粒子数の測定はMMSとMCの処置群は1個体当たり2000個の精子頭部について、またPCとTMP群は1個当たり500個の精子頭部についてそれぞれカウントし、精子当たりの銀粒子数を算出した。

#### 4.3.2. 結果

精子のオートラジオグラフによる銀粒子数のカウントの結果はTable 33 およびPhoto. 11 に示した。溶媒対照群では投与後1日目より32日目まで銀粒子数の増加は認められなかったが、投与後36および40日目において多数の銀粒子数が急激に増加し、これは精原細胞および前細糸期の精母細胞における定期DNA合成によるものと推察された。MMS群においては後期精子細胞および精子の時期に相当する投与後1から12日目までは溶媒対照群と顕著な差は認められなかったが、投与後20日目をピークに投与後16～24日目までの精母細胞から精子細胞において銀粒子数が顕著に増加した。投与後28日目の細糸期および合糸期の精母細胞の時期において、やや銀粒子数は減少したが、投与後32日目では再び増加



Table 33.  
 Unscheduled DNA synthesis at various germ-cell stages of male mice recovered from the vasa deferentia at different times after treatment with 100 mg/kg of MMS, 5 mg/kg of MC, 800 mg/kg of PC or 3000 mg/kg of TMP.

Time after treatment (days)	Number of grains per sperm*		Number of grains per sperm*		Number of grains per sperm*	
	Control	MMS	MC	Control	Proc carbazine	Control
1	0.09±0.01	0.13±0.02	0.09±0.01			
4	0.10±0.02	0.18±0.03	0.10±0.00			
8	0.08±0.01	0.13±0.06	0.07±0.03			
12	0.12±0.02	0.18±0.06	0.08±0.01	0.05±0.04	0.09±0.03	0.14±0.03
16	0.09±0.03	1.64±1.44	0.10±0.00	0.04±0.01	4.54±0.72	0.17±0.07
20	0.04±0.02	2.09±0.79	0.02±0.01	0.02±0.00	4.67±4.01	0.15±0.03
24	0.04±0.00	0.75±0.09	0.02±0.00	0.02±0.01	2.35±3.25	0.17±0.08
28	0.05±0.02	0.35±0.32	0.03±0.02			3.90±1.10
32	0.05±0.01	0.80±0.56	0.05±0.02			
36	#	#	0.03±0.01			
40	#	#	0.03±0.01			

#: Grains were not counted because of dense labelling due to scheduled uptake of [<sup>3</sup>H] dT.  
 \*: Mean±S.D.



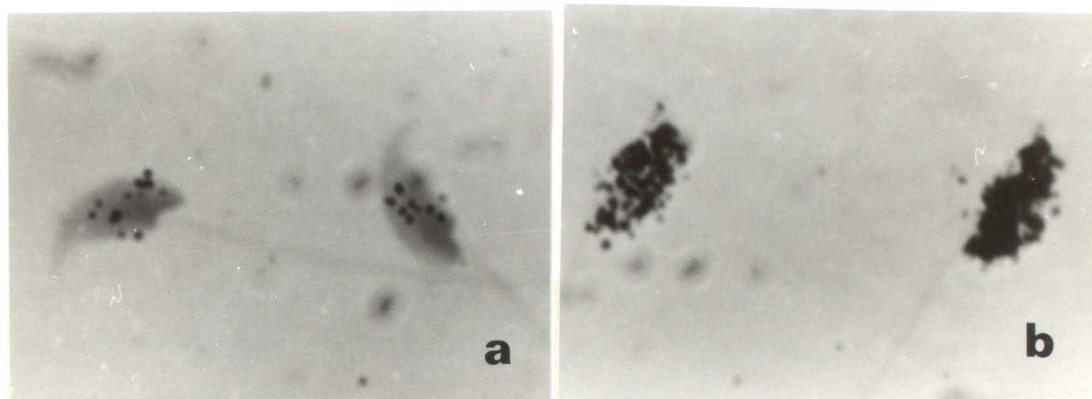


Photo. 11. Grains in sperm heads showing unscheduled and scheduled DNA synthesis in germ cells of male mice after treated with 100 mg/kg of MMS. (a) Unscheduled DNA synthesis in early spermatids was noted 20 days after MMS treatment. (b) Scheduled DNA synthesis in spermatogonia, 40 days after treatment.

し、投与後36日目と40日目の前細糸期の精母細胞および精原細胞の時期において溶媒対照群と同じく急激に銀粒子数が増加した。これらの溶媒対照群およびMMS群の結果はSega(1974)およびSegaら(1976)の報告と一致した。またPC群およびTMP群において、銀粒子数は投与後20日目をピークに投与後16から24日目まで溶媒対照群よりも顕著に増加し、細糸期の精母細胞から精子細胞の時期においてUDSが観察された。MC群では投与後1より40日目までの精子形成の全過程において、UDSも定期DNA合成も観察されなかった。

#### 4.4. 考察

組織学的所見の結果 (Table 30, 31) からMCおよびiPMSは精子形成過程のDNA合成が行われている精原細胞や全細糸期の精母細胞に作用し、細胞死および分裂阻害を誘発することが分かった。これらの時期のMC処置による細胞死は染色体異常によるものであると考えられている (ManyakとSchleiermacher, 1973; Adler, 1976)。一方、DNA合成が完了した大部分の細糸期、合糸期、厚糸期の精母細胞は分裂が進行し、精子細胞、精子へと発生していることが観察された。また、MC処置による精原細胞の分裂阻害は一過性で、精子減少症 (oligospermia) を呈するが、iPMS処置の場合は精原細胞のstem cells (type A1 spermatogonia)にも強く作用し、無精子症 (aspermia) を誘発するものと思われた。CPAによっても一時的な精原細胞の分裂阻害が組織学的に観察されている (Schleiermacher, 1970)。

MMS、MC、iPMSは精子細胞に作用して優性致死を誘発する (Ehling, 1971, 1977) にもかかわらず、組織学的所見からは異常は観

察されず、優性致死を誘発するようなDNA障害を有した精子細胞や精子の異常は組織学的所見では観察できないことが示唆された。しかし、DNA合成の進行している精原細胞の障害は観察可能であった。このように精原細胞に対して顕著な組織学的障害が観察されたのは、精原細胞が血液—精巣関門（セルトリ細胞）の外側に位置（Setchell, 1967, 1969）し、血液中に取り込まれた有害物質に接触しやすいため、精母細胞、精子細胞、精子よりも細胞死および分裂障害を引き起こしやすいものと推察された。一方、後期精母細胞へのMCおよびiPMS処置では投与後1～8日目の組織学的所見において分裂前後に変性した精母細胞は観察されず、精子細胞へと正常に発育していた。この成育した精子細胞が精子へと発生した場合、形態異常として観察される可能性が推察される。

精子の形態異常の観察結果から、MC処置の場合の精子の形態異常の誘発時期は減数分裂前の精原細胞および精母細胞の時点での細胞の形態異常誘発頻度が高く、特にDNA合成期の前細糸期の精母細胞と精原細胞において精子の形態異常の誘発頻度が高いことが示唆された。

この観察結果は、組織学的検索でのMC群で観察されたDNA合成期の前細糸期の精母細胞および精原細胞の細胞死や分裂障害の時期と一致し、精子数の減少の時期と精子の形態異常とは正の相関性のあることが示唆された。一方、MMS、iPMSおよびX線の精子処置では優性致死試験において優性致死が誘発されるが、精子の形態異常は観察されず、精子のDNA障害と精子頭部の形態異常との直接の関連性は認められなかった。すなわち精子形態異常が直接遺伝的障害の検出系となりえないことが考えられる。

精子の形態異常の生成機序については、変異原物質を投与した雄マウスとの交配の結果得られたF<sub>1</sub> 個体のなかに精子の形態異常を有した個



体が観察され (HugenholtzとBruce, 1983)、遺伝子突然変異あるいは相互転座などの染色体異常に起因していることが推察されている。しかし、精子の形態異常は飼料摂取量などの飼育条件にも関係のあることが報告されている (Komatsuら, 1982)。このように精子の形態異常の発生機構は未だ十分明らかにされていないが、異常精子におけるクロマチンの化学的性質の変化、精子形成過程におけるDNAとタンパク質との結合上における何らかの欠陥が原因ではないかと考えられている。また、精原細胞および精母細胞にMCを処置した場合、精子の形態異常の増加と1細胞期胚の染色体分析で観察された不受精卵の増加とが一致し、精子頭部の形態異常は受精能と直接関係していることが示唆された。

不定期DNA合成の有無等の実験結果 (Table 33) から、MC群による定期DNA合成が観察されなかったことは、精巣の組織学的所見 (Table 30) から明らかなように、前細糸期の精母細胞および精原細胞における細胞死および一時的な分裂阻害によるものと推察された。

今回のUDSの実験で、MMS、CPAおよびTMPで精母細胞および精子細胞を処置した場合、UDSが誘発された。また、CPA (Sotomayorら, 1978)、HN2-O (Sotomayorら, 1978)、iPMS (Segaら, 1976; Tanaka, 1979) およびX線 (Segaら, 1978) で精母細胞および精子細胞を処置した場合にもUDSが観察されることが報告されている。しかし、今回の実験ではMCで精母細胞および精子細胞を処置した場合は観察されなかった。MC処置によりUDSが観察されなかったことは、MMS、PCおよびTMPなどのアルキル化剤を処置した場合のDNA障害がUDSを指標とするような除去修復によるのに対し、MCのようなDNAとクロスリンクするDNA障害は、UDS型の修復機構では修復されないのではないかと考えられた。



今回のUDSの実験で、精子をMMSおよびMCで処置した場合、UDSは誘発されなかった。またSega(1974)もEMSで精子を処置した場合はUDSの誘発は観察されなかったことを報告している。精子におけるUDS発現の欠如はChevaillierとPhillipe(1976)がDNAポリメラーゼを精子形成過程において測定し、精子の時期にはその活性が低いことを報告していることから、精子は修復に関与する酵素や修復の場を欠いているためとも推定される。いずれにしても精子は形態的、生化学的に大きな変化を伴い受精のための機能を持った配偶子として分化していることが修復能の欠如に強く関与しているのではないかと思われる。精子形成過程におけるUDSと優性致死の誘発時期についてはMMS、CPA、TMPおよびHN2-Oによるそれぞれの処置によって、UDS能の見られない精子では優性致死誘発頻度は高く、UDSが観察された精子細胞および精母細胞では優性致死誘発頻度は低かった。この結果から、UDSは表面上は優性致死の誘発頻度を減少させるように作用していると考えられる。しかし、PCやiPMS処置およびX線照射の場合、UDS能の欠損した精子よりもUDSが観察された精子細胞において、優性致死の誘発頻度が高い傾向がみられた。また、MC処置では精母細胞、精子細胞および精子においてUDSは観察されなかったが、精子、精子細胞、精母細胞の順に優性致死誘発頻度が増加した。これらの点に関し、Sega(1979)も論じているように、精子形成過程における優性致死を含む各種の遺伝的障害の減少とUDSの誘発とは直接関連性がなく、UDSの誘発と優性致死誘発とはDNA障害レベルと染色体レベルの障害の差によるものであることが示唆された。

減数分裂前の精原細胞あるいは精母細胞を各種の化学変異原物質で処置し1細胞期胚の染色体分析を行った場合、2通りのケースが観察され

た。その1つはMMSおよびTMPで精原細胞あるいは精母細胞を処置した場合、顕著な染色体異常および不受精卵が観察されなかったものと、第2のタイプはX線、PC、MCおよびiPMSなどを精原細胞あるいは精母細胞に処置した場合のように不受精卵が高頻度に観察されたものである。前者の現象は、精原細胞や精母細胞のDNAに傷害をうけても、UDSのような修復機構により効率よく修復され、減数分裂の過程で選択・淘汰されず、受精能は保持しているものと推察された。一方、後者の原因としては、MC処置時に観察されたように、精原細胞における一時的あるいは半永久的な定期DNA合成の阻害、あるいはMCおよびiPMS処置時の精巣組織で観察されたように、精原細胞での分裂阻害により精子減少症や無精子症を生じたためと思考された。さらに、MCおよびiPMS処置時の精巣組織の障害およびMC処置での精子形態異常等は修復不可能な大きなDNA障害、あるいは精子の形態異常等を引き起こすようななんらかの障害をうけた大部分の精母細胞が減数分裂過程での選択・淘汰をそれほど受けて、精子細胞へと発生したものである。しかし、精子変態時に精子形態異常を誘発し、受精機能に障害を生じた結果、1細胞期胚の染色体分析において不受精卵が高頻度に観察されたものと推察された。また、遺伝子レベルのような微小な異常や安定性の高い相互転座などを保有した細胞は減数分裂を通過できうとも推察された。

以上のことから、精巣の組織学的所見、精子の形態異常およびUDSは1細胞期胚の染色体異常および優性致死誘発作用と密接な関係は見られず、化学変異原物質の次世代への影響の評価には適切な検出系ではないことが結論された。

#### 4.5. 小括

処置当代における精巣の精細管の組織学的影響、精子の形態異常および不定期DNA合成（UDS）の誘発程度と1細胞期胚の染色体分析の結果および優性致死誘発作用との関連性の有無について検討した。精細管内の組織学的所見では、精原細胞および前細糸期の精母細胞をMCおよびiPMSで処置した場合、一時的あるいは長期間にわたり分裂が阻害され、精細管萎縮がおこり、精子減少症や無精子症が誘発された。一方、後期精母細胞、精子細胞に化学変異原物質を処置した場合、精子形成に対する組織学的影響は観察さなかった。精子の形態異常については、精子を化学変異原物質で処置しても精子頭部の形態異常は認められなかった。またUDSに関してはMCを除き、他のMMS、TMPおよびPCは精母細胞から精子細胞におけるUDS誘発を促進した。

以上の結果から、精巣の組織学的所見で障害が観察された時期、精子の形態異常の誘発時期およびUDS誘発の時期は1細胞期胚の染色体異常および優性致死誘発時期と必ずしも正の相関傾向は見られず、精巣の組織学的所見、精子の形態異常の観察およびUDSの観察は化学変異原物質の次世代への遺伝的障害の事前評価に適切な検出系でないことが結論された。



## 第5章 射出精液を介した化学物質の雌体内への搬入について

化学変異原物質を哺乳動物の雄個体に投与し、雌個体と交配した場合、投与した化学変異原物質が精子とともに雌個体へ持ち込まれる可能性は少ないと考えられる。事実かかる問題に取り組んだ研究の報告には接していない。哺乳動物を対称とした優性致死試験は、一般的に雄個体に化学変異原物質を投与するのであるが、一方、雌にこれを投与した場合、その化学物質が母体に作用したのかあるいは卵のDNAまたは卵細胞質に作用したのかは区別しがたい (Tanaka, 1981)。Ehling(1979)は雄マウスに合成発情ホルモン剤であるdiethylstilboestrolの誘導体のfosfestrol (DSDP)を雄マウスに投与し、投与直後の精巣上体および精管内の精子に対してのみ優性致死誘発作用が観察され、その大部分は着床後の胚死であったことを報告している。優性致死試験において、投与直後の精巣上体および精管内の精子に対してのみ影響をおよぼす化学変異原物質の例は非常に稀なケースである。さらに、一般の化学変異原物質の投与では処置濃度が高くなるとともに着床胚をなくなるのに対し、DSDPはそのような傾向は認められていない。従って、DSDPの作用は遺伝的要因以外の機序による可能性も考えられる。例えば雄マウスに投与したDSDPが、射出精液とともに雌マウスに持ち込まれた後、母体に作用し、その結果、二次的に優性致死様の現象を呈するのではないかと想定された。この点を明らかにする目的で以下の実験を行った。

### 5.1. 射出精液中のDSDPの検出



D S D P はエストロゲン作用を示すので、生物学的手法により射出精液中のエストロゲン物質の検出を行った。また、対照として卵巢摘出マウスの腔内に0.008 ~125 ngのD S D Pを試験群同様4回注入、D S D Pに対する感受性曲線を作り、試験群の反応度をこれと比較した。

#### 5.1.1. 材料と方法

射出精液中のD S D Pの検出はSulman法( 大地, 1962) に準じて行った。まず、ホルモンのバイオアッセイ用として6週齢の雌マウスの卵巢を摘出し、2週間後に4日間腔垢の所見を検査し、腔垢(estrous cycle)が発情休止期像(diestrous stage)であることを確認した後、蒸留水で希釈した合成発情ホルモン( 水溶性ロバール2号, 中外製薬株式会社) を5  $\mu$ g/0.1 mlを朝夕2回皮下注射を行った。最初の皮下注射後2日目~8日目まで腔垢の検査を行い、感受性のそろった卵巢摘出マウスを作製した。

一方、D S D P (ホンバン注射剤, 杏林薬品株式会社) は注射用生理食塩液で溶解し、300 mg/kgを雄マウスの腹腔内に20 ml/kgの容量で投与し、11:00 ~16:00の間同居・交配させ、腔栓が確認された雌マウスを16:00直後に開腹し、子宮から射出精液を回収後、蒸留水で2倍に希釈した。この希釈した射出精液を朝夕2回、連続2日間、計4回卵巢摘出マウスの腔内に注入した。最初の注入より48時間後から156時間まで12時間おきに腔垢検査を行い、発情期像(estrous stage)の有無を検査し、射出精液中にD S D Pが含まれているかどうかを判定した。また、D S D Pの0.008、0.04、0.2、1、5、25および125 ngをそれぞれ朝夕2回、連続2日間、合計4回卵巢摘出マウスの腔内に注入し、その後

Table 34.  
Response test in estrous cycle after treatment with semen in  
the vagina of ovariectomized females.

Ejaculate	Matings post- injection (days)	Number of ovari- ectomized females	Number of females induced estrous
Control (0.9 % saline)	0-1	5	0
DSDP  (300 mg/kg)	0  1	20  8	17  1

連続して腔垢を検査し、卵巢摘出マウスに発情期像が観察されるかどうかを検査した。

#### 5.1.2. 結果

DSDP処置雄の射出精液を注入した場合、卵巢摘出マウスの20個体のうち17個体が発情期像を示した( Table 34) 。また、対照群として卵巢摘出マウスの腔内に非常に低濃度のDSDPすなわち0.008 ngを4回注入した場合でも発情期像が観察された。

### 5.2. DSDPの雌個体への生物学的影響

DSDPを雄マウスに投与し交配させた場合、射出精液中にDSDPが検出された。従って、DSDPが射出精液を介して雌体内に持ち込まれた場合、母体にどのような影響が観察されるのか、母体側の作用について検討した。

#### 5.2.1. 材料と方法

雄マウスにDSDPを投与し、投与直後から投与後2日目まで交配させ、排卵後20.5時間目に卵巢および子宮を剖検した。次にこの個体の卵巢および子宮の所見が正常な一般発情期( estrus) における所見と比べて、差異があるかどうかを確認するため、無処置の雄および雌マウス同志を交配させ、腔栓が認められた雌マウスを排卵時( 今回の実験条件では18:30) に開腹し、卵巢および子宮を剖検しその所見を確認した。すな



Photo. 12. Swollen uterus resulting from DSDP treatment.



わちDSDPを投与された雄マウスの精液中のDSDPの影響を調べるためである。また、雄マウスにDSDPを投与し、その雌マウスについて別に行った実験すなわち、交尾雌マウスにDSDPを投与し無処置の雄マウスを交配させ、20.5時間目の所見と比べ同様かどうかを確認した。膣栓が観察された雌マウスの腹腔内にDSDPを100 mg/kg 投与（排卵7時間前）し、卵巣および子宮を剖検した。

#### 5.2.2. 結果

雄マウスにDSDPを投与した後交配させ、排卵後20.5時間目に剖検したが卵巣および子宮は、Photo. 12に見られるように、溶媒対照群と異なり子宮が膨満し、帯白色の子宮液の貯留や卵巣のう(ovarian bursa)の膨満が観察された。これと同様の所見は、無処置の雄マウスと交配させ、膣栓が認められた雌マウスの排卵時の卵巣および子宮、あるいは交尾雌マウスの腹腔内にDSDPを投与した場合の卵巣のう、および子宮にもみられ、雄マウスにDSDPを投与した後交配させた雌マウスの排卵後20.5時間目の卵巣および子宮の剖検所見と同様であった。

#### 5.3. DSDPを雄に投与した場合の優性致死作用

一般的に優性致死試験は雄個体に化学物質を投与した場合、雄生殖細胞のDNA障害が観察できるという理論の基で行われており、射出精液を介して雌個体に化学物質が持ち込まれるためではないかと考えられている。しかし、前述したように、雄マウスにDSDPを投与し交配した場合、射出精液中にエストロゲン物質が検出され、また母体への影響が

観察され、雄個体に投与したDSDPが、射出精液を介して雌個体に持ち込まれている可能性が得られた。そこで雄マウスにDSDPを投与した場合、優性致死試験においてどのような結果が得られるかどうかについて検討した。

#### 5.3.1. 材料と方法

DSDP 300 mg/kg を雄マウスの腹腔内に投与し、投与直後より投与後39日目まで毎日雌マウスと同居させ、第2章(2.2.1.)における優性致死試験と同様な方法を用いて実験を行った。しかし、交尾雌マウスの解剖日は後述のとおり異なった日程で行った。一般にマウスの優性致死試験においては、膣栓確認日を0日とした場合、解剖は妊娠12～13日目に行う。しかし、DSDP投与の場合においては、発育遅延が観察され妊娠12日目では胎仔が小さく、生死の判別が困難であった。すなわちDSDPを投与した雄と交配し解剖した場合、妊娠16日目の胎仔は溶媒対照群の雄によって受胎した雌の妊娠13日目の胎仔の大きさに相当した。従って、DSDP投与による優性致死試験の場合における解剖は、対照群では13日目に、一方、DSDP処置群においては妊娠16日目に行った。

#### 5.3.2. 結果

優性致死試験の結果はTable 35に見られるように、妊娠率、着床数、生存胎仔数および優性致死誘発率は投与後0～15日の間では日数の経過と共に次第に減少した。一方、処置された精原細胞および精母細胞が精

Table 35.  
Dominant lethal test after treatment of male mice with DSDP.

Dose (mg/kg)	Matings post- injection (days)	Number of females mated	Number of females with implants (%)	Number of implants per female mated	Number of living embryos per female mated	Number of dead implants per female mated	Induced dominant lethals (%)
Control	0-39	188	174 ( 92.6)	9.0	8.7	0.3	-
	0- 3	40	19 ( 47.5)	2.3	1.8	0.5	79.3
	4- 7	32	11 ( 34.4)	1.7	1.6	0.1	81.6
	8-11	14	5 ( 35.7)	2.4	2.0	0.4	77.0
	12-15	17	13 ( 76.5)	5.8	5.6	0.2	35.6
	16-19	18	17 ( 94.4)	8.5	7.2	1.3	17.2
	20-23	19	19 (100.0)	8.9	8.6	0.3	1.1
	24-27	18	16 ( 88.9)	8.2	7.9	0.3	9.2
	28-31	20	17 ( 85.0)	7.7	7.6	0.1	12.6
	32-35	19	18 ( 94.7)	9.5	9.2	0.3	-5.7
300	36-39	20	18 ( 90.0)	9.5	9.2	0.3	-5.7

子レベルに達する投与後20～39日目での交配では妊娠率、着床数、生存胎仔数および着床後の胚死数の影響は観察されなかった。

#### 5.4. 交尾直後の雌腹腔内へのDSDP投与による優性致死作用

雄マウスに対し、DSDPの投与による優性致死試験において、着床前の胚の損失は射出精液を介してDSDPが、母体に持ち込まれ、そのための影響が生じたと仮定するならば、交尾直後の雌マウスにDSDPを投与することによって、同じような結果が期待できる。そこで交尾直後の雌マウスの腹腔内にDSDPを投与し優性致死試験を行った。

##### 5.4.1. 材料と方法

昼夜逆転した飼育照明条件下（18:00 点灯，翌朝10:00 消灯）で、13:00 から14:00 までの1 時間、無処置の雌雄個体を同居させ、膣栓が確認された雌マウスにDSDPを1.5、3、5、12、25及び50 mg/kgの用量で腹腔内投与し、妊娠16日前後に子宮を摘出し、着床数、生存胎仔数、着床後の胚死数を調査し、優性致死率を求めた。

##### 5.4.2. 結果

Table 36に示したように、処置濃度の増加にともない、妊娠率、着床数および生存胎仔数の顕著な減少が観察された。また、DSDP投与による優性致死誘発作用は主に着床前の胚の損失によるものであった。



Table 36.  
Dominant lethal test after treatment of female mice with DSDP.

Dose (mg/kg)	Number of females mated	Number of females with implants (%)	Number of implants per female mated	Number of living embryos per female mated	Number of dead implants per female mated	Induced dominant lethals (%)
Control	39	37 (94.9)	8.9	8.7	0.2	-
1.5	17	14 (82.4)	6.2	5.3	0.9	39.1
3.0	14	8 (57.1)	3.8	2.3	1.5	73.6
6.0	14	8 (57.1)	3.3	1.7	1.6	80.5
12.0	15	2 (13.3)	0.3	0.1	0.2	98.9
25.0	20	3 (15.0)	0.3	0.2	0.1	97.7
50.0	14	0 (0.0)	0.0	0.0	0.0	100.0



Photo. 13. Abnormal effects at paternal and maternal chromosome sets in the 1-cell stage resulting from DSDP treatment.

Table 37.  
DSDP-induced chromosome aberrations at 1-cell stage.

Matings post- injection (days)	Number of embryos collected	Number of embryos karyotyped	Number of embryos with chromosome aberrations	% of embryos with triploid	% of unfertilized embryos
Control	496	391	2	1.0	0.0
0 - 3	165	46	0	0.6	0.0
4 - 7	171	65	0	0.0	12.3
8 -11	116	17	0	0.9	23.3
12 -15	127	67	1	0.8	25.2
16 -19	181	88	0	0.0	11.0

## 5.5. 雄へのDSDPが1細胞期胚の染色体におよぼす影響

DSDPを雄個体に投与した場合の優性致死誘発作用は染色体異常によるものであるのかどうか調査するため、1細胞期胚の染色体分析を行った。

### 5.5.1. 材料と方法

DSDPを300 mg/kg 雄マウスに投与し、以下第1章(1.2.1.)と同様の方法で1細胞期胚の染色体分析を行った。

### 5.5.2. 結果

採卵時の1細胞期胚は顆粒層細胞で覆われ、また外見的に退化し始めているような形態を示す1細胞期胚であった。この1細胞期胚の染色体標本はPhoto.13に示したように、精子由来の染色体のみでなく、卵子由来の染色体および極体の核も染色性が悪く、退化傾向が示唆されるような状態であった。従って、Table 37に要約したように、全採卵数のうち染色体分析が可能な1細胞期胚の数は減少した。投与後0～19日間において1細胞期胚の染色体分析ができた胚においては顕著な染色体異常(構造異常)は観察されなかった。また、不受精卵は投与後4～19日目において低頻度に観察された。

## 5.6. DSDPの雄マウス投与による卵割への影響



Table 38.  
Cleavage stage embryos at 72 hours after ovulation, collected from females mated with males previously treated with 300 mg/kg of DSDP.

Treatment	Matings post-injection (days)	Number of embryos analysed	Position of embryos collected (%)			Distribution of embryos according to the number of blastomeres (%)				
			ampulla	isthmus	uterus	1-10	11-20	21-30	31-40	41- $\infty$
Control (0.9 % saline)	0-2	139	0	0	100	0	1	7	73	19
Fosfestrol (300 mg/kg)	0	57	40	51	9	8	4	21	67	0
	2	84	61	22	17	9	4	27	56	4

雄マウスにDSDPを投与し、交配後の1細胞期胚の採卵時において母体や胚に遺伝的障害とは異なったエストロゲン作用と思われる影響が観察された。また、DSDP投与による優性致死試験において着床胚の減少が顕著に観察された。そこで1細胞期胚が発生した場合、着床以前の初期胚に卵割遅延などの影響があるのではないかと考えられるので、初期発生への影響について検討した。

#### 5.6.1. 材料と方法

雄マウスにDSDPを300 mg/kg投与し、投与直後から投与後2日目までの間、交配させ、排卵後72時間目の卵を回収し、胚の回収部位や卵割状態について観察した。胚の採取方法および胚の標本作製は第2章(2.1.1.)と同様に行った。

#### 5.6.2. 結果

結果はTable 38に要約した。溶媒対照群において、139個の胚全てが子宮から回収され、ほとんどの胚が31細胞から40細胞の胚盤胞であった。しかし、DSDP処置群では大部分の胚が卵管膨大部および卵管狭部から回収され、ごく少数の胚が子宮から回収された。初期胚の発生状態は21~30細胞の胚が増加し、溶媒対照群に比べ、低頻度であるが卵割遅延が観察された。

### 5.7. DSDP投与の精子形態への影響

Table 39.  
Sperm-shape abnormalities induced in postmelotic stages after  
treatment with DSDP.

Group	Days after treatment	Number of males	Number of sperm observed	Number of abnormal sperm per male*
Control	1	5	5000	$7.9 \pm 1.6$
	1	5	5000	$7.8 \pm 1.9$
	4	5	5000	$7.6 \pm 3.2$
DSDP	9	5	5000	$12.4 \pm 3.3$
	17	5	5000	$9.4 \pm 5.0$
	25	5	5000	$9.2 \pm 1.3$

\*: Mean  $\pm$  S.D.

DSDPを雄マウスに投与し1細胞期胚の染色体分析を行った結果 (Table 37)、投与後0～3日目においての1細胞期胚は受精しているにもかかわらず顆粒層細胞で覆われていた。また投与後4～19日目において不受精卵が低頻度で観察された。。これらの現象は精子の機能異常に起因している可能性が考えられるので、精子の形態異常について調査を行った。

#### 5.7.1. 材料と方法

DSDPを300 mg/kg 雄マウスに投与し、投与後1、4、9、17、25日目に精子を精管より回収した。以下の操作は第4章(4.2.1.)と同様の方法で標本作製し、1個体につき1000個の精子について観察を行った。

#### 5.7.2. 結果

Table 39に結果を示した。投与後9日目にのみやや高い頻度で精子の形態異常が観察された。しかし、これは5個体のうち1個体だけが高い値を示し、他の個体は溶媒対照群と同程度であった。

#### 5.8. 考察

雄マウスの腹腔内にDSDPを投与した場合、射出精液中からDSDPが検出され、射出精液を介して雌マウスに化学物質が搬入される可能性があることが今回の研究において初めて証明された。

DSDPを雄マウスに投与し、無処置の雌マウスと交配させた場合、雌マウスの排卵後20.5時間目には卵巣のう、および子宮の膨満がみられ



た。一方、無処置の雄と雌マウスとを交配させた雌マウスの排卵時の卵巣および子宮の剖検所見はこれと同様であった。また交尾させた雌マウスの腹腔内にDSDPを投与し、排卵後20.5時間目の卵巣および子宮の剖検所見もやはり同様であった。このことより、DSDPを雄マウスに投与し交配させた雌マウスの排卵20.5時間目における母体の性周期は、まだ発情後期(metestrus)に至らず、精液とともに体内に持ち込まれたDSDPのため、発情期の状態が持続しているものと推察された。

雄マウスにDSDPを投与した場合の優性致死現象は、着床後の胚死がほとんど観察されないところから着床以前の胚の損失であった。Ehling (1979) は雄マウスにDSDPを投与した優性致死試験を行った場合、主に着床後の胚死によるものであったことを報告している。今回の実験結果とEhlingによる実験結果との相違は実験に用いたマウスの系統によってDSDPに対する感受性の違いではないかと思われる。この着床以前の胚の損失は交尾直後の雌個体にDSDPを投与した場合においても同様に観察された。また、雄個体にDSDPを300 mg/kg 投与した場合の優性致死誘発率は交尾直後の雌個体に3 mg/kg 投与した場合の優性致死誘発率と同程度であった。従って、雄個体にDSDPを投与した場合、射出精液を介してDSDPが雌個体に持ち込まれ、子宮における胚の着床障害が生じていることが推察された。

DSDPを雄に投与した場合の1細胞期胚は受精胚であるが顆粒層細胞で覆われた胚が多数観察された。この顆粒層細胞の存在は顆粒層細胞を分散さすべき受精可能な精子がDSDPの影響により減少していることも推察された。また、1細胞期胚の染色体分析においては精子由来の染色体のみならず卵子由来の染色体も退化しかけているような状態がみられたが、排卵後72時間目の胚はやや発生遅延が観察されながらも卵割

を繰り返していたことから、1細胞期胚の退化現象は一過性の現象であると推察された。また、一般に発情ホルモン(エストロゲン)を哺乳動物に投与した場合、卵管子宮端にある括約筋様構造は収縮し、受精卵の下降が阻まれることが知られており(BloomとFawcett, 1976)、またエストロゲンを交尾後の雌マウスに投与した場合、卵割遅延が観察されたという報告がある(Oettel ら, 1980) ことなどから、今回の実験で卵管膨大部や卵管胸部からの胚の回収、また卵割遅延などの現象もエストロゲン作用によるものであらうと思われる。

#### 5.9. 小括

雄個体に化学物質を投与した場合、遺伝的障害以外でも、優性致死様現象が発現されるかどうかを調査するため、雄マウスにDSDPを投与し、雌マウスと交配させた場合、射出精液を介して雌個体にエストロゲン物質が持ち込まれ、1細胞期胚の染色体異常以外の要因で優性致死現象が発現される可能性の有無について検討した。

その結果、1細胞期胚の採卵時に子宮の膨満や帯白色の子宮液の貯留や受精卵であるにもかかわらず顆粒層細胞の存在が観察された。また、1細胞期胚の染色体分析では、精子由来の染色体のみならず、卵子由来の染色体や極体の核などの染色性が悪く、退化しかけているような胚が多数観察された。なお、染色体分析が可能であった1細胞期胚においては、染色体異常は観察されなかった。さらに雄個体にDSDPを処置しても、顕著な精子の形態異常は観察されなかった。

なお、着床前の初期胚では、卵管から子宮への胚の下降阻害や卵割遅延も観察された。

雄個体にDSDPを投与した場合の優性致死試験においては、減数分裂前の生殖細胞に対する影響は認められなかった。

交尾直後の雌個体にDSDPを処置した場合、処置濃度の増加とともに優性致死誘発率が増加した。これは雄マウスにDSDPを投与した場合と同じく主に未着床胚に起因するものであった。

DSDPを投与した雄マウスの射出精液を卵巣摘出マウスの膈内に注入したところ、発情期像が誘発されたマウスが認められ、かつ射出精液中にエストロゲン様物質が検出された。

以上の結果から、雄マウスにDSDPを投与した場合、射出精液を介して雌個体にエストロゲン様物質が持ち込まれ、母体に作用し、その結果、胚に二次的な発生障害を誘発する可能性が示唆された。



## 第6章 総合考察

生命は一般に雌・雄両配偶子の合体の産物で—1細胞期胚—から始まる。従って、いずれかの両親の生殖細胞に誘発された遺伝的障害は1細胞期胚において何らかの障害として観察されうる可能性が考えられる。さいわいマウスの1細胞期胚の染色体は特異的で精子由来、卵子由来の染色体が識別できる利点がある。

今回の研究は各種の化学変異原物質を雄生殖細胞に処置した場合、F<sub>1</sub>に観察される優性致死誘発作用あるいは転座ヘテロ個体の発現が1細胞期胚で観察されうる染色体異常といかなる関連性があるかを検討し、哺乳動物における簡便な変異原検出系の確立を主な目的として実験を行ったものである。さらに1細胞期胚で観察される染色体異常の次世代への質的および量的影響について分析した。

本実験にはいるに先立って、マウス1細胞期胚の染色体標本作製法の改良について研究し、改良された方法が信頼度、成功率、簡便性の点で従来の方法よりも優れた染色体標本作製法であることを確認した。

次に化学変異原物質を雄生殖細胞に対して処置し優性致死試験を行った結果、Table 40および Fig. 2 に見られるように優性致死誘発率が精原細胞では高く、精母細胞、精子細胞、精子の順に減少するタイプ、精子細胞や精子に対して優性致死誘発率が高く、精原細胞および精母細胞に対して低いタイプ、精原細胞、精母細胞、精子細胞、精子の全ての生殖細胞に同程度の優性致死誘発作用を示すタイプに分類され、化学変異原物質の種類により優性致死誘発作用が異なることが分かった。

また、精原細胞および精母細胞に対する優性致死試験における所見と



Table 40.  
Spermatogenic response of mice to the induction of dominant  
lethals by chemical mutagens.

Response Type	Spermatogenic cell stages			
	Spermatozoa	Spermatids	Spermatocytes	Spermatogonia
I	-	+	++	+++
II	+++	++	-	-
III	++	++	+++	+++

してはおもに着床前の胚の損失であり、一方、精子細胞および精子場合は着床前の胚の損失と着床後の胚死によるものであった。また顕著な優性致死誘発作用を示す精子を化学変異原物質で処置した場合、この精子によって妊娠出産されたF<sub>1</sub>において半不妊および不妊を示す個体が高頻度に発現した。これらの半不妊および不妊雄個体は染色体分析の結果から非相同染色体間の転座によることが明らかにされた。これら優性致死および転座ヘテロ個体の誘発機構について検討した結果、以下のような諸事実が明らかになった。

不妊を対象とした優性致死試験においては減数分裂を境にして下記のように顕著な差が認められた。すなわち、精原細胞に対する処置では分裂阻害による精子減少症および無精子症となり、また障害を受けた精母細胞は發育しても精子の形態異常が増加すること、また、それら生殖細胞における優性致死誘発率と不受精卵の誘発頻度が同様な傾向を示す事から、精原細胞および精母細胞処置では主に不受精を誘発することが推察された。一方、精子細胞および精子処置による半不妊および不妊現象は染色体異常を有した胚の頻度と優性致死誘発率が一致することから、その大部分が1細胞期胚で観察される精子由来の染色体異常に起因し、染色体異常を有した胚は卵割遅延および卵割停止を引き起こし、着床後の障害が多く不妊現象を引き起こすものと推察された。

このように化学変異原物質の雄生殖細胞に対する処置による優性致死誘発作用はX線照射の場合と同じく1細胞期胚に観察された精子由来の染色体異常によるもので、1細胞期胚の染色体分析から正確な遺伝的障害の情報を得ることが可能であり、そのため動物を用いた大規模な優性致死試験に代わりうる遺伝毒性の検出系になりうるものと考えられた。

次に化学変異原物質による雄生殖細胞のDNAに及ぼす障害の一指標

として不定期DNA合成（UDS）が知られている。今回の実験および先人の報告（Sega, 1974; Sega ら, 1976; Sotomayor ら, 1978; Segay ら, 1978）に用いられた化学変異原物質のなかでMCを除いて、その他のものは全てUDS現象が精母細胞から精子細胞にわたり観察されているが、精子ではUDSがみられず（Sega, 1974; Sotomayor ら, 1978; SegaとOwens, 1978）、従って精子はUDSタイプの修復能を持たないものと考えられる。

染色体異常に起因する優性致死の場合にUDS現象が機能することにより優性致死誘発率を減少させていると考えられる場合もあるが、UDSが観察されない時期よりもUDSが観察される時期において優性致死の頻度が高い場合もある。従って、精子形成過程における優性致死および染色体異常を含む各種の遺伝的障害の減少とUDSの発現による効果とは直接関係がなく、UDSと1細胞期胚で観察される染色体異常とは別々の発現機構により、出現しているものと考えられる。

化学変異原物質が精原細胞および精母細胞に作用した場合、その雄によって生まれたF<sub>1</sub>において発現される転座ヘテロ個体の出現頻度は精子細胞および精子に対して処置した場合（Leonard とDeknudt, 1968; Sotomayor とCumming, 1975）よりも低い。この事実は変異原物質による精原細胞および精母細胞に対する処置による精子減少症や精子の形態異常により受精できないため、F<sub>1</sub>個体が得られないと考えられる。一方、精子細胞や精子に対して処置した場合、1細胞期胚で染色体異常がみられるようなDNA障害を有した雄配偶子でも受精に与かるので転座を有したF<sub>1</sub>個体が出産されやすいのかもわからない。そこで各種の変異原物質を精子細胞あるいは精子に処置し、1細胞期胚の染色体分析において主に観察された染色体異常のタイプと、そのF<sub>1</sub>における転座ヘテロ



個体の出現頻度との関係をTable 42に要約した。すなわち、染色分体型異常を主に誘発する化学変異原物質は、転座ヘテロ個体の誘発頻度が低い傾向にある。転座ヘテロ個体の誘発と関連すると考えられる染色体異常のうち交換型異常はほとんど染色分体型で (Table 41)、転座ヘテロ個体は染色分体型の相称性の交換型異常より派生したものと推察された。この相称性の交換型異常を有した1細胞期胚は卵割様式により50%の確率で生存可能な染色体構成を有する2細胞期胚 (正常な染色体構成を有する細胞と相互転座染色体を構成する細胞) に卵割し、F<sub>1</sub> として出産した場合、モザイクになることが推察された。

一方、主に染色体型異常を誘発する化学変異原物質は転座ヘテロ個体を高頻度に誘発する。観察された染色分体型の非相称性あるいは相称性の交換型異常は非常に低く (Table 41)、高頻度の転座ヘテロ個体の誘発は染色分体型の相称性の交換型異常より派生していると考えより、むしろ染色体型の交換型異常が高頻度に観察されていることより1細胞期胚において相互転座染色体がすでに効率良く形成されている可能性があるので、F<sub>1</sub> において転座ヘテロ個体が高頻度に出現してくるものと考えられた。ところで *iPMS* は染色体型異常を誘発するにもかかわらず転座ヘテロ個体の誘発頻度は低かったが (Table 42)、Generoso (1979a) は *iPMS* を精子細胞および精子に処置した場合、優性致死を高頻度に誘発するが、転座ヘテロ個体の誘発頻度は低いことを指摘している。今回の実験で *iPMS* 処置群でも優性致死が高頻度に誘発されたが、1細胞期胚の染色体異常は低頻度であった (Fig. 3)。従って、*iPMS* 処置では染色体異常が誘発されにくく、1細胞期胚で生存可能な転座染色体を形成する機会が他の化学変異原物質と比較し少ないと考えられた。なお、このような転座染色体が精子形成過程または受精後の1細胞期胚



Table 41.  
Chromosome aberrations detected in paternal chromosome sets of 1-cell stages, after the spermatids and sperm had been treated with chemical or X-ray.

Mutagen (dose)	Number of embryos examined	Number of embryos with chromosome aberrations (% of embryos examined)	Number of chromosome aberrations	Frequencies and types of chromosome aberrations						
				Chromatid-types			Exchanges			
				Gaps or Breaks	Tri- radials	Quadri- radials	Gaps or Breaks	Tri- radials	Quadri- radials	Exchanges
							ments	Breaks	ments	Longs* Rings
Control	1799	11 ( 0.6)	11	5	0	0	0	0	6	0
X-ray (500 rad)	959	399 (41.6)	680	77	15	4	5	65	411	74
										29
PMS (100 mg/kg)	416	311 (74.8)	2208	33	321	13	4	52	1467	222
										96
TMP (3000 mg/kg)	444	313 (70.5)	2004	48	262	15	3	15	1236	354
										71
CPA (240 mg/kg)	591	323 (54.7)	691	29	55	9	5	33	434	96
										30
HN2-O (100 mg/kg)	527	172 (32.6)	734	19	108	7	2	24	441	107
										26
1PMS (200 mg/kg)	476	36 ( 7.6)	38	9	0	1	1	7	18	2
										0
PC (800 mg/kg)	431	214 (49.7)	375	202	12	21	43	30	64	3
										0
MC (5 mg/kg)	372	49 (13.2)	86	18	0	13	31	17	7	0
										0

\*: Monocentric or polycentric translocation chromosomes.

Table 42.  
Relationship between chromosome aberrations and frequency of translocations of F<sub>1</sub> male offspring detected after subjecting the spermatids and sperm to chemical or X-ray treatment.

Mutagens	Treatment stage	Chromosome analysis		Translocation test		
		Dose (mg/kg)	Type of aberrations	Dose (mg/kg)	Frequency of translocations	References
X-ray	sperm	500 rad	chromosome	300 rad	5.1%	Leonard and Dekundt (1968)
	spermatids	500 rad	chromosome	300 rad	21.7%	
MMS	sperm and spermatids	100	chromosome	40	11.2%	Lang and Adler (1977)
TMP	spermatids	300	chromosome	1500	14.3%	Tezuka et al. (1985)
CPA	sperm	240	chromosome	300	17.1%	Sotomayor and Cumming (1975)
	spermatids	240	chromosome	300	40.5%	
NH2-O	sperm	100	chromosome	25	16.0%	The present study
iPMS	sperm	200	chromosome	75	2.7%	Generoso et al. (1979)
	spermatids	200	chromosome	75	0.8%	
Pro-carbazine	spermatids	800	chromatid	400	2.2%	Adler (1980)
MC	spermatids	5	chromatid	2.5	0.4%	Adler (1980)

のいかなる時期に形成されるかについて、明らかにすることは興味のあるところであるが、一般に精子細胞や精子の障害は受精後の卵内において修復されるので (Generoso ら, 1979b)、転座染色体は受精後の 1 細胞期胚の卵内で形成されるのではないかと思われる。今回の実験において 1 細胞期胚の精子由来の染色体分析で染色体型の異常が主に誘発される化学変異原物質は PC および MC のみであった。このことは細胞周期の  $G_1$  期の体細胞に化学変異原物質を処置した場合、誘発される染色体異常は一般に知られているように (Bender ら, 1974)、おもに染色分体型である。そこで、同系統のマウスを用い、骨髓細胞 (24 時間処置) と精子を TMP で処置し、観察された染色体異常の種類と頻度 (Table 4 3) について比較検討したが、骨髓細胞においては主に染色分体型の異常が観察され、雄生殖細胞においては染色体型の異常が観察された。また、転座ヘテロ個体の誘発と関係すると考えられる交換型異常については、骨髓細胞では全く観察されず、雄生殖細胞では染色体型の交換型異常が高頻度に観察された。また、染色体異常の誘発頻度は骨髓細胞よりも雄生殖細胞の方が、顕著に高かった。同様の現象は MMS 投与の場合においても報告されている (Tanaka, Katoh と Iwahara, 1981)。これらの結果から、次世代の  $F_1$  個体における遺伝的障害を評価する場合、体細胞の結果からでは推定できないことが明らかになり、環境変異原物質の遺伝的障害を評価する場合は、やはり生殖細胞を用いた試験系が必要であることが確認された。

以上の結果から、一般に優性致死誘発作用を示す化学変異原物質を精子細胞や精子に処置した場合、X 線と同様に染色体型異常が誘発されやすく、その結果、 $F_1$  において転座ヘテロ個体が高頻度に誘発されうることが示唆された。従って、1 細胞期胚の染色体分析で観察される染色

Table 43.  
Chromosome aberrations detected in spermatozoa or bone marrow cells after treatment of male mice with THP.

Dose (mg/kg)	Cells treated	Number of cells examined	Number of eggs with chromosome aberrations (% of eggs examined)	Frequencies and types of chromosome aberrations														
				Chromatid-types					Chromosome-types									
				Exchanges		Exchanges			Exchanges		Exchanges							
				Gaps or Breaks	Tri- radials	Quadril- radials	Gaps or Breaks	Tri- radials	Quadril- radials	Gaps or Breaks	Tri- radials	Quadril- radials	Gaps or Breaks	Tri- radials	Quadril- radials	Longs*	Rings	
750	Spermatozoa	100	5 ( 5.0)	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0
	Bone marrow cells	250	1 ( 0.4)	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	Spermatozoa	99	63 ( 63.6)	108	7	5	0	0	0	0	2	71	22	1				
	Bone marrow cells	250	6 ( 2.4)	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3000	Spermatozoa	84	84 (100.0)	575	15	65	10	0	0	0	4	374	91	16				
	Bone marrow cells	250	26 ( 10.4)	36	34	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0

\*: Monocentric or polycentric translocation chromosomes.



体異常の種類によりF<sub>1</sub>における転座ヘテロ個体の誘発頻度を予測することができる成績を得た。

化学変異原物質を用いて遺伝・発生学的研究を行う場合、一般に化学変異原物質は雄個体に投与される。雌個体に化学変異原物質を投与した場合、胚以外の因子に影響を与え、二次的に胚の動態に作用を及ぼしたものか、あるいは胚自体または胚のDNAに作用したものかの区別が困難で、遺伝的障害の評価が不可能になる。この点について、これまで雄個体に投与した化学物質が雌の体内に持ち込まれる可能性についての詳細な研究報告はない。DSDPを雄個体に投与し交配した場合、採卵時における母体および胚への影響、胚の発育遅延、卵管から子宮への下降障害、また胚の子宮における着床障害、射出精液中のホルモン物質の検出などの種々の実験結果が得られ、雄個体に投与したDSDPが射出精液を介して雌個体に持ち込まれることが明確に示された。従って、雄個体に化学物質を投与した場合の不妊現象は、必ずしも雄生殖細胞のDNA障害によるものと限定できないことが示唆された。特にDSDPのようなホルモン作用を有する化学物質を用いた優性致死試験の結果の評価には、射出精液を介した化学物質の雌個体への持ち込みという現象をも考慮する必要性が指摘された。

## 第7章 結論

今回の研究においては、まずマウス1細胞期胚の染色体標本作製法を改良・開発し、この改良・開発した方法を利用することによって、1細胞期胚の染色体分析が環境変異原物質により発現される優性致死誘発作用や次世代の転座ヘテロ個体の誘発頻度を事前評価できる簡便な検出系になりうるかどうかを検討することを目的として実施した。そのため化学変異原物質を雄マウスに投与することにより、受精前の配偶子あるいは受精後の1細胞期胚および障害持つ雄による次世代のF<sub>1</sub>個体にわたっての障害について明らかにするため種々の実験を行った。その結果、以下の結論が得られた。

- 1) 今回の研究において改良・開発されたマウス1細胞期胚の染色体標本作製法は、簡便であるとともに、信頼性の高い方法である。
- 2) 1細胞期胚の染色体分析は、化学物質に暴露された配偶子の受精能に対する影響も判定できる。
- 3) 優性致死試験で胎仔の認められない場合の原因について、これが不受精によるのか、染色体異常によるのか、1細胞期胚の染色体分析により判定することが可能である。
- 4) 顕著なDNA障害を有した精子でも受精は可能であり、この場合、1細胞期胚において染色体異常が観察される
- 5) 体細胞の場合と異なり、雄生殖細胞を化学変異原物質で処置した場合は、1細胞期胚の染色体分析で、おもに染色体型の異常が発見されやすい。
- 6) 染色体異常を有した大部分の1細胞期胚は、初期胚および胎仔に

において発生遅延や発生停止を引き起こし、致死経過をとる。

- 7) 化学変異原物質で雄生殖細胞を処置した後、1細胞期胚の染色体分析で主に染色体型の異常を発現させる化学変異原物質は、次世代のF<sub>1</sub>において転座ヘテロ個体を高頻度に誘発する。

従って、1細胞期胚の染色体分析は優性致死誘発作用および次世代の転座ヘテロ個体の発現頻度を事前評価でき、環境変異原を対象とした簡便な遺伝毒性の検出系として充分利用できると考えられる。

## 謝 辞

本研究は麻布大学教授大地隆温博士の御鞭撻と御懇篤なる御指導並びに御校閲の賜物であり、ここに深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行は食品薬品安全センター理事長橋本虎六博士並びに研究所長江頭靖之博士の御鞭撻と、研究顧問岩原繁雄博士の御懇篤なる御指導の賜物である。また大学への論文提出に際し、御校閲と御懇篤な御指導を賜りました国立遺伝学研究所村上昭雄博士に衷心から御礼を申し上げます。また論文の御校閲と貴重な御助言を頂きました麻布大学教授中村経紀博士、同教授石橋正彦博士ならびに同教授赤堀文昭博士に対し衷心より感謝致します。また、本研究の御指導ならびに御支援を賜った食品薬品安全センター遺伝・生殖学研究部長水谷正寛博士ならびに同細胞毒性学研究室長田中憲穂博士に対して心より謝意を表します。

最後に論文の作成に対して御助言を頂いた食品薬品安全センター遺伝学研究室研究員原巧博士に謝意を表します。また多大の御協力を頂いた同研究室研究生山上康氏ならびに同研究室員松田良枝女史に謝意を表します。

本研究の遂行には厚生科学研究費補助研究事業に負うところが大きく付記して謝意を表します。



## 引用文献

- Adler, I.-D. (1976) Aberration induction by mitomycin C in early primary spermatocytes of mice, *Mutation Res.*, 35, 247-256.
- Adler, I.-D. (1980) New approaches to mutagenicity studies in animals for carcinogenic and mutagenic agents. I. Modification of the heritable translocation test, *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 1, 75-86.
- Auerbach, C. (1947) The induction by mustard gas of chromosome instabilities in *Drosophila melanogaster*, *Proc. Roy. Soc. Edinburgh, B*, 62, 307-320.
- Bateman, A.J. (1966) Testing chemicals for mutagenicity in a mammal, *Nature*, 210, 205-206.
- Bellve, A.R., E. Anderson and L. Hanley-Bowdoin (1975) Synthesis and amino acid composition of basic proteins mammalian sperm nuclei, *Develop. Biol.*, 47, 349-365.
- Bender, M.A., H.G. Griggs and J.S. Bedford (1974) Mechanisms of chromosomal aberration production. III. Chemicals and ionizing radiation, *Mutation Res.*, 23, 197-212.
- Bloom, W. and D.W. Fawcett (1976) Female reproductive system, in: *A textbook of histology*, W.B. Saunders company, Philadelphia, London, Toronto, pp. 858-904.
- Brewen, J.G., H.S. Payne, K.P. Jones and R.J. Preston (1975) Studies on chemically induced dominant lethality. I. The cytogenetic basis of MMS-induced dominant lethality in post-meiotic male germ cells, *Mutation Res.*, 33, 239-250.
- Brittinger, D. (1966) Die mutagene Wirkung von Eondoxan bei der Maus, *Hum. Genet.*, 3, 156-165.
- Bruce, W.R., R. Furrer and A.J. Wyrobek (1974) Abnormalities in the shape of murine sperm after acute testicular X-irradiation, *Mutation Res.*, 23, 381-386.
- Bürki K. and W. Sheridan (1978) Expression of TEM-induced damage to postmeiotic stages of spermatogenesis of the mouse during early embryogenesis, II. Cytological investigations, *Mutation Res.*, 52, 107-115.
- Cacheiro, N.L.A., L.B. Russell and M.S. Swartout (1974) Translocations, the predominant cause of total sterility in sons of mice treated with mutagens, *Genetics*, 76, 73-91.
- Carter, T.C., M.F. Lyon and R.J.S. Phillips (1956) Gene-tagged

- chromosome translocations in eleven stocks of mice, *J. Genet.*, 53, 154-166.
- Chevallier, Ph. and M. Philippe (1976) Activité DNA-polymérase nucléaire dans les spermatozoides de souris et évolution de cette activité au cours de la spermatogenèse, *Exp. Cell Res.*, 99, 237-244.
- Cowell, J.K. (1984) A photographic representation of the variability in the G-banded structure of the chromosomes in the mouse karyotype, A guide to the identification of the individual chromosomes, *Chromosoma, Berl.*, 89, 294-320.
- Clermont, Y. (1963) The cycle of the seminiferous epithelium in man, *Am. J. Anat.*, 112, 35-51.
- Donahue, R.P. (1972a) Cytogenetic analysis of the first cleavage division in mouse embryos, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 69, 74-77.
- Donahue, R.P. (1972b) Fertilization of the mouse oocyte: Sequence and timing of nuclear progression to the two-cell stage, *J. Exp. Zool.*, 180, 305-318.
- Ehling, U.H., R.B. Cumming and H.V. Malling (1968) Induction of dominant lethal mutations by alkylating agents in male mice, *Mutation Res.*, 5, 417-428.
- Ehling, U.H. (1971) Comparison of radiation- and chemically-induced dominant lethal mutations in male mice, *Mutation Res.*, 11, 35-44.
- Ehling, U.H., D.G. Doherty and H.V. Malling (1972) Differential spermatogenic response of mice to the induction of dominant-lethal mutations by *n*-propyl methanesulfonate and *isopropyl* methanesulfonate, *Mutation Res.*, 15, 175-184.
- Ehling, U.H. (1974) Differential spermatogenic response of mice to the induction of mutations by untineoplastic Drugs, *Mutation Res.*, 26, 285-295.
- Ehling, U.H. (1977) Dominant lethal mutations in male mice, *Arch. Toxicol.*, 38, 1-11.
- Ehling, U.H. (1979) Induction of dominant lethal mutations in male mice by fosfestrol, *Arch. Toxicol.*, 42, 171-177.
- 江藤禎一, 鈴木善裕, 星冬四郎 (1964) 日照逆転に対するラット排卵時期の適用性について、*家畜繁殖誌*, 10, 77-80.
- Falconer, D.S., B.M. Slizynski and C. Auerbach (1952) Genetical effects of nitrogen mustard in the house mouse, *J. Genet.*, 51, 81-89.



- Fawcett, D.W. and L.V. Leak and P.M.. Heidger Jr. (1970) Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier, *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 10, 105-122.
- Ford, C.E., A.G. Searle, E.P. Evans and B.J. West (1969) Differential transmission of translocations induced in spermatogonia of mice by irradiation, *Cytogenetics*, 8, 447-470.
- Generoso, W.M., S.W. Huff and K.T. Cain (1979a) Relative rates at which dominant-lethal mutations and heritable translocations are induced by alkylating chemicals in postmeiotic male germ cells of mice, *Genetics*, 93, 163-171.
- Generoso, W.M., K.T. Cain, M. Krishina and S.W. Huff (1979b) Genetic lesions induced by chemicals in spermatozoa and spermatids of mice are repaired in the egg, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 76, 435-437.
- Generoso, W.M., J.B. Bishop, D.G. Gosslee, G.W. Newell, C-J. Sheu and E.V. Halle (1980) Heritable translocation test in mice, *Mutation Res.*, 76, 191-215.
- Generoso, W.M., K.T. Cain, C.V. Cornett, E.W. Russell, C.S. Hellwig and C.Y. Horton (1982) Difference in the ratio of dominant-lethal mutations to heritable translocations produced in mouse spermatids and fully mature sperm after treatment with triethylenemelamine (TEM), *Genetics*, 100, 633-640.
- Hitotsumachi, S. and Y. Kikuchi (1977) Chromosome aberrations and dominant lethality of mouse embryos after paternal treatment with triethylenemelamine, *Mutation Res.*, 42, 117-124.
- Hughenoltz, A.P. and W.R. Bruce (1983) Radiation induction of mutations affecting sperm morphology in mice, *Mutation Res.*, 107, 177-185.
- 上口勇次郎, 舟木賢治, 美甘和哉 (1978) ゲッ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.
- 菊池康基, 木村善昭, 山本好一, 一ッ町晋也 (1982) 6-Mercaptopurineの優性致死作用ならびに染色体異常の発現機構について、日本環境変異原学会第11大会講演要旨集、27.
- 北爪雅之, 岡本正則, 中井文武 (1983) 精子形態異常による変異原性の検出、トキシコロジーフォーラム、6. 214-223.
- Komatsu, H., T. Kakizoe, T. Niijima, T. Kawachi and T. Sugimura (1982) Increased sperm abnormalities due to dietary restriction, *Mutation Res.*, 93, 439-446.
- Kratochvilova, J. (1973) Fertilization ability of male mice after

- treatment with tumor inhibitors, *Mutation Res.*, 21, 191.
- Lang, R. and I.-D. Adler (1977) Heritable translocation test and dominant-lethal assay in male mice with methyl methane-sulfonate, *Mutation Res.*, 48, 75-88.
- Léonard, A. and Gh. Dekundt (1968) The sensitivity of various germ cell stages of the male mouse to radiation induced translocations, *Can. J. Gente. Cytol.*, 10, 495-507.
- Léonard, A. and I.-D. Adler (1984) Test for haritable translocations in male mammals, in: B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel (eds.), *Handbook of mutagenicity test procedures* 2nd ed., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 293-299.
- Lorke, D. and L. Machemer (1975) Testing mutagenic properties with the dominant lethal test on the male mice, *Environ. Qual. Safety*, 4, 239-246.
- Luthardt, F.W. (1976) Cytogenetic analysis of oocytes and early preimplantation embryos from XO mice, *Develop. Biol.*, 54, 73-81.
- Lyon, M.F. and R. Meredith (1966) Autosomal translocations causing male sterility and viable aneuploidy in the mouse, *Cytogenetics*, 5, 335-354.
- Lyon, M.F. and B.D. Smith (1971) Species comparisons concerning radiation-induced dominant lethals and chromosome aberrations, *Mutation Res.*, 11, 45-58.
- Manyak, A. and E. Schleiermacher (1973) Action of mitomycin C on mouse spermatogonia, *Mutation Res.*, 19, 99-108.
- Matter, B.E. and I. Jaeger (1975) Premature chromosome condensation, structural chromosome aberrations, and micronuclei in early mouse embryos after treatment of paternal postmeiotic germ cells with triethylenemelamine possible mechanisms for chemically induced dominant-lethal mutations, *Mutation Res.*, 33, 251-260.
- Maudlin, I. and L.R. Fraser (1977) The effect of PMSG dose on the incidence of chromosomal anomalies in mouse embryos fertilized in vitro, *J. Reprod. Fert.*, 50, 275-280.
- Oakberg, E.F. (1956a) A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal, *Am. J. Anat.*, 99, 391-414.
- Oakberg, E.F. (1956b) Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium, *Am. J. Anat.*, 99, 507-516.



- Oakberg, E.F. and Diminno (1960) X-Ray sensitivity of primary spermatocytes of the mouse, *Int. J. Radiat. Biol.*, 2, 196-209.
- Oettel, M., A. Kurischko, J. Strecke and M. Koch (1980) Embryotoxic effects of post-coital fertility inhibiting steroids, *Arch. Toxicol. Suppl.*, 4, 248-251.
- 大地隆温 (1962) 卵胞ホルモンの生物学的測定法、農林省家畜衛生試験場、北陸支場講習資料、pp.1-9.
- 奥村勝彦 (1984) 血液-精巣関門について、トキシコロジーフォーラム、7, 599-606.
- Parkin, R., H.B. Waynforth and P.N. Magee (1973) The activity of some nitroso compounds in the mouse dominant-lethal mutation assay. I. Activity of N-nitroso-N-methylurea, N-methyl-N-nitroso-N-nitroguanidine and N-nitrosomorpholine, *Mutation Res.*, 21, 155-161.
- Röhrborn, G. (1970) The activity of alkylating agents. I. Sensitive mutable stages in spermatogenesis and oogenesis, in: F. Vogel and G. Röhrborn (eds.), *Chemical Mutagenesis in Mammals and Man*, Springer-Verlag, Berl., pp. 294-316.
- Rugh, R.I. (1968) Reproductive systems of adult mice, in: *The mouse, its reproduction and development*, Burgess publishing company, Minneapolis, pp. 7-41.
- Russell, W.L. (1951) X-ray induced mutation in mice, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 16, 327-336.
- Russell, L.B. (1962) Chromosome aberrations in experimental mammals, in: A.G. Steinberg and J.G. Bearn (eds.), *Progress in Medical Genetics*, Vol. 2, Grune and Stratton, New York, pp. 230-294.
- Sasaki, M. and S. Makino (1965) The meiotic chromosome of man, *Chromosoma*, Berl., 16, 637-651.
- Schleiermacher, E. (1970) Histological and cytogenetic investigation methods on mammalian spermatogenesis, in: F. Vogel and G. Röhrborn (eds.), *Chemical Mutagenesis in Mammals and Man*, Springer-Verlag, Berl., pp. 294-316.
- Seabright, M. (1971) A rapid banding technique for human chromosomes, *Lancet*, ii, 971-972.
- Searle, A.G. (1984) The specific locus test in the mouse, in: Kilbey, B.J., M. Legator, W. Nichols and C. Ramel (eds.), *Handbook of Mutagenicity test procedures* 2nd ed., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 373-392.

- Sega, G.A. (1974) Unscheduled DNA synthesis in the germ cells of male mice exposed in vivo to the chemical mutagen ethyl methane-sulfonate, Proc. Nat. Acad. Sci., USA., 71, 4955-4959.
- Sega, G.A., J.G. Owens and R.B. Cumming (1976) Studies on DNA repair in early spermatid stages of male mice after in vivo treatment with methyl-, ethyl-, propyl- and isopropyl methane-sulfonate, Mutation Res., 36, 193-212.
- Sega, G.A., R.E. Sotomayor and J.G. Owens (1978) A study of unscheduled DNA synthesis induced by X-rays in the germ cells of male mice, Mutation Res., 49, 239-257.
- Sega, G.A. (1979) Unscheduled DNA synthesis (DNA repair) in the germ cells of male mice-its role in the study of mammalian mutagenesis, Genetics, 92, s49-s58.
- Sega, G.A. and J.G. Owens (1978) Ethylation of DNA and protamine by ethyl methanesulfonate in the germ cells of male mice and the relevancy of these molecular targets to the induction of dominant lethals, Mutation Res., 52, 87-106.
- Sega, G.A. and J.G. Owens (1983) Methylation of DNA and protamine by methyl methanesulfonate in the germ cells of male mice, Mutation Res., 111, 227-244.
- Setchell, B.P. (1967) The blood-testicular fluid barrier in sheep, J. Physiol., London, 189, 63-65.
- Setchell, B.P., J.K. Voglmayr and G.M.H. Waites (1969) A blood-testis barrier restricting passage from blood lymph into rete testis fluid but not into lymph, J. Physiol., London, 200, 73-85.
- 渋谷徹, 室田哲郎, 加藤基恵, 関剛幸 (1976) D. 優性致死、昭和50年度食品衛生調査研究委託事業報告書, 食品添加物等の突然変異性の試験法及びその評価に関する研究、pp.93-106.
- Sotomayor, R.E. and R.B. Cumming (1975) Induction of translocations by cyclophosphamide in different germ cell stages of male mice: Cytological characterization and transmission, Mutation Res., 27, 375-388.
- Sotomayor, R.E., G.A. Sega and R.B. Cumming (1978) Unscheduled DNA synthesis in spermatogenic cells of mice treated in vivo with the indirect alkylating agents cyclophosphamide and mitomen, Mutation Res., 50, 229-240.
- Takagi, N. and M. Sasaki (1976) Digynic triploidy after superovulation in mice, Nature, 264, 278-281.
- Tanaka, N. and M. Katoh (1979) Unscheduled DNA synthesis in the

germ cells of male mice in vivo, Jpn. J. Genet., 54, 405-414.

Tanaka, N. (1981) Studies on chemical induction of chromosomal aberrations in postcopulation germ cells and zygotes of female mice. I. comparative studies on the frequency of first-cleavage chromosomal aberrations and dominant-lethal mutations, Jpn. J. Genet., 56, 117-129.

Tanaka, N., M. Katoh and S. Iwahara (1981) Formation of chromosome-type aberrations at the first cleavage after MMS treatment in late spermatids of mice, Cytogenet. Cell Genet., 31, 145-152.

Tanaka, N., M. Katoh, S. Iwahara, K. Hashimoto and I. Wakisaka (1983) Studies on chemical induction of chromosomal aberrations in postcopulation germ cells and zygotes of female mice. II. Induction of heritable translocations, Jpn. J. Genet., 58, 353-359.

Tarkowski, A.K. (1966) An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs, Cytogenetics, 5, 394-400.

Tezuka, H., Y.F. Sasaki, M. Inoue, A. Uchida, M. Moriya and Y. Shirasu (1985) Heritable translocation study in male mice with trimethylphosphate, Mutation Res., 157, 205-213.

Wyrobek, A.J. and W.R. Bruce (1975) Chemical induction of sperm abnormalities in mice, Proc. Nat. Acad. Sci., USA., 72, 4425-4429.