

T u b u l i n 重合阻害剤の卵子 染色体不分離誘発能に関する研究

研究課題番号：57570825

昭和57～58年度科学研究費補助金

(一般研究C) 研究成果報告書

平成元年2月

研究代表者 美甘和哉
(旭川医科大学 医学部)

はしがき

昭和57年度から文部省科学研究費補助金（一般研究C）の助成のもとに行われた研究「Tubulin重合阻害剤の卵子染色体不分離誘発能に関する研究」は2年間の研究期間を終了し、ここに研究成果をまとめることになった。

ダウン症をはじめとした種々の数的染色体異常症の成因である染色体の不分離や後期遅滞(anaphase lagging)がいかなる機序で生ずるかは明らかにされていない。本研究は、紡錘糸の主成分であるtubulinの重合阻害剤、特にトリメトキシベンゼン環をもつ種々の化合物が紡錘糸の形成不全を通して染色体不分離を誘発するか否かを卵子レベルで検討する目的で行われた。検討すべき化合物は数多く、限られた研究期間内でそれらのすべてを調査することはできなかったが、種々の治療目的で現実に使用されている医薬品を中心に研究を行った。その結果、ポドフィロトキシン及びビンブラスチンには卵子染色体不分離を誘発する作用があること、また、トリメトキシベンゼン環をもつ薬品のなかにも染色体不分離誘発能をもたないものもあることなどが明らかとなった。さらに、ポドフィロトキシンとビンブラスチンの研究結果が、われわれの行ったヒト精子染色体の直接分析法の改良に応用され、この分野の研究の進展に寄与したことも本研究の成果の一つである。

研究組織

- 研究代表者：美甘和哉（旭川医科大学医学部 教授）
研究分担者：上口勇次郎（旭川医科大学医学部 助教授）
舟木賢治（旭川医科大学医学部 教務職員）
研究協力者：菅原茂樹（旭川医科大学医学部 研究生）
立野裕幸（旭川医科大学医学部 研究生）
島田昌幸（旭川医科大学医学部 研究生）

研究経費

昭和57年度	1,500千円
昭和58年度	500千円
計	2,000千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. 上口勇次郎・美甘和哉：ヒト精子染色体の直接分析法の改良。
日本人類遺伝学会誌。29巻、2号、1984年。

2. 上口勇次郎・美甘和哉：透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子進入に及ぼす各種血清アルブミンの影響。日本不妊学会誌。30巻、1号、1985年。
3. Kamiguchi, Y. and Mikamo, K.: Application of developmental biotechnology to chromosomal study of human spermatozoa. Jpn. J. Human Genet. Vol. 30, No. 2, 1985
4. Kamiguchi, Y. and Mikamo, K.: Radiosensitivity of human sperm chromosomes: Application of a method for direct chromosome analysis using zona-free hamster ova. J. Radiat. Res. Vol. 27, No. 1, 1986.
5. Kamiguchi, Y. and Mikamo, K.: Spontaneous incidence of chromosome aberrations and radiosensitivity in human spermatozoa (2nd report). Jpn. J. Human Genet. Vol. 31 No. 2, 1986.
6. Kamiguchi, Y. and Mikamo, K.: An improved, efficient method for analyzing human sperm chromosomes using zona-free hamster ova. Am. J. Hum. Genet. Vol. 38, No. 5, 1986.
7. 上口勇次郎・立野裕幸・島田昌幸・美甘和哉：ヒト精子染色体分析——環境変異原の遺伝的影響評価への応用——。トキシコロジーフォーラム。9巻、4号、1986年。
8. 上口勇次郎・美甘和哉：ヒト精子の染色体研究 I。ハムスター卵利用の異種間体外受精法。細胞。18巻、14号、1986年。
9. 美甘和哉・上口勇次郎：ヒト精子の染色体研究 II。自然発

生および放射線誘発の精子染色体異常. 細胞. 18巻、14号、1986年.

10. 立野裕幸・上口勇次郎・島田昌幸・美甘和哉：ヒトの染色体研究 異種間体外受精法の応用(1)――ヒト精子とゴールデンハムスター卵の体外受精法――. 遺伝. 40巻、10号、1986年.
11. 島田昌幸・上口勇次郎・立野裕幸・美甘和哉：ヒトの染色体研究 異種間体外受精法の応用(2)――受精卵の染色体標本作製法――. 遺伝. 40巻、11号、1986年.
12. 上口勇次郎・立野裕幸・島田昌幸・美甘和哉：ヒトの染色体研究 異種間体外受精法の応用(3)――ヒト精子染色体研究の成果と考察――. 遺伝. 40巻、12号、1986年.
13. Tateno, H. and Mikamo, K.: A chromosomal method to distinguish between X- and Y-bearing spermatozoa of the bull in zona-free hamster ova. J. Reprod. Fert. Vol. 81, No. 1, 1987.
14. Kamiguchi, Y. and Mikamo, K.: Cytogenetic effects of an alkylating agent, MMS, on human sperm chromosomes. Jpn. J. Human Genet. Vol. 32, No. 2, 1987.
15. Shimada, M., Kamiguchi, K., Tateno, H. and Mikamo, K.: Chromosome analysis of the mouse spermatozoa by the interspecific in-vitro fertilization method. Zool. Sci. Vol. 4, No. 6, 1987.
16. Kamiguchi, Y., Tateno, H., Shimada, M. and Mikamo, K.: Assessment of genetic effects of environmental muta-

gens using human sperm chromosome analysis. Zool. Sci.
Vol. 4, No. 6, 1987.

17. 立野裕幸・島田昌幸・上口勇次郎・美甘和哉：ポドフィロトキシンの分裂阻止剤としての作用．染色体Ⅱ、49号、1988年．
18. 上口勇次郎・立野裕幸・島田昌幸・美甘和哉：アルキル化薬（MMS）のヒト精子染色体異常誘発能．染色体Ⅱ、49号、1988年．
19. Kamiguchi, Y., Tateno, H., Shimada, M. and Mikamo, K.: Radiation-induced chromosome damage in spermatozoa: Comparison between human and other mammalian species. Jpn. J. Human Genet. Vol. 33, No. 2, 1988.
20. Tateno, H., Kamiguchi, Y. and Mikamo, K.: In vivo assay for meiotic nondisjunction in female Chinese hamsters: Effect of chemical compounds with a trimethoxybenzene ring. Jpn. J. Human Genet. Vol. 33, No. 2, 1988.
21. 上口勇次郎：最新の染色体分析——基礎と実際 2. 配偶子、受精卵、初期胚．臨床病理．特集第80号．印刷中．

(2) 口頭発表

1. 上口勇次郎・美甘和哉：ハムスター卵を用いたヒト精子染色体の直接分析法とその問題点．日本動物学会北海道支部第32回大会．1983年8月27日．
2. 上口勇次郎・美甘和哉：ヒト精子染色体の直接分析法の改良．日本人類遺伝学会第28回大会．1983年11月9日．

3. 上口勇次郎・美甘和哉：透明帯除去ハムスター卵を用いたヒト精子染色体分析法の改良．日本不妊学会第26回北海道地方部会．1984年1月31日．
4. 美甘和哉：妊娠前の母体への処置による発生異常．シンポジウム「生殖毒性学の展望――特に受精前から着床までの時期における処置による発生障害について――」．第24回日本先天異常学会．1984年7月6日．
5. 上口勇次郎：ヒト精子染色体研究における発生工学的手法の導入．シンポジウム「染色体研究法の新しい展開」．日本人類遺伝学会第29回大会．1984年11月15日．
6. 上口勇次郎：ヒト精子の受精能および染色体構成のハムスターテスト―その問題点と改良―．第3回日本受精着床学会．特別講演．1985年7月27日．
7. 上口勇次郎・美甘和哉：ヒト精子における染色体異常自然発生率．日本動物学会北海道支部第34回大会．1985年8月24日．
8. 上口勇次郎・美甘和哉：ヒト精子染色体の放射線感受性：zona-free ハムスター卵による直接法の応用．第28回日本放射線影響学会．1985年10月16日．
9. 上口勇次郎・美甘和哉：ヒト精子染色体の異常自然発生率および放射線感受性（第2報）．日本人類遺伝学会第30回大会．1985年11月7日．
10. Mikamo, K. and Kamiguchi, Y.: Spontaneous and radiation-induced chromosome aberrations in human spermatozoa. International Workshop on Re-evaluation of Hiroshima

and Nagasaki Cases by Chromosome Aberration Analysis for Dose Assessment and Risk Evaluation. November 28, 1985.

- 1 1 . 美甘和哉：ヒト精子染色体を調べる．原子力安全研究協会シンポジウム「原子力の安全性と放射線の影響」．1986年1月14日．
- 1 2 . 島田昌幸・上口勇次郎・立野裕幸・浜野光市・美甘和哉：ハムスター卵利用の牛精子性染色体判別法．日本不妊学会第28回北海道地方部会．1986年2月1日．
- 1 3 . 浜野光市・立野裕幸・島田昌幸・上口勇次郎・美甘和哉：ハムスター卵子を利用した牛精子の染色体分析：X，Y精子の判別法．第78回畜産学会．1986年3月29日．
- 1 4 . 上口勇次郎・美甘和哉：ヒト精子染色体に及ぼす放射線の影響．日本動物学会北海道支部第35回大会．1986年8月19日．
- 1 5 . 立野裕幸・島田昌幸・上口勇次郎・美甘和哉：透明帯除去ハムスター卵を用いたウシ精子性染色体判別法．日本動物学会北海道支部第35回大会．1986年8月19日．
- 1 6 . Kamiguchi, Y., Mikamo, K., Tateno, H. and Shimada, M.: X-ray-induced chromosome aberrations in human spermatozoa. 5th International Symposium on Spermatology. August 26, 1986.
- 1 7 . Tateno, H., Mikamo, K., Kamiguchi, Y., Shimada, M. and Hamano, K.: Chromosomal method for identifying X- and Y-bearing sperms in the cattle. 5th International Sym-

posium on Spermatology. August 26, 1986.

18. 立野裕幸・美甘和哉：透明帯除去ハムスター卵利用によるウシ精子性染色体判別法．第37回染色体学会．1986年10月13日．
19. 上口勇次郎・美甘和哉：ヒト精子染色体に及ぼす化学物質MMSの影響．日本人類遺伝学会第31回大会．1986年11月6日．
20. 美甘和哉：配偶子における放射線誘発染色体異常の数量化．第18回放医研シンポジウム「染色体研究の新しい展開——ヒトの染色体を中心にして——」．1986年12月10日．
21. 浜野光市・内山京子・湊芳明・谷中匡・吉田敏・相澤明・佐々木捷彦・美甘和哉：染色体分析による牛X、Y精子判別法について．第23回精子研究会．1987年4月6日．
22. 立野裕幸・島田昌幸・上口勇次郎・美甘和哉：ポドフィロトキシンの分裂阻止剤としての作用．第38回染色体学会．1987年9月26日．
23. 上口勇次郎・立野裕幸・島田昌幸・美甘和哉：アルキル化薬（MMS）のヒト精子染色体異常誘発能．第38回染色体学会．1987年9月26日．
24. 島田昌幸・上口勇次郎・立野裕幸・美甘和哉：異種間体外受精によるマウス精子の染色体分析．日本動物学会第58回大会．1987年10月7日．
25. 上口勇次郎・立野裕幸・島田昌幸・美甘和哉：ヒト精子染色体分析による環境変異原の遺伝的影響評価．日本動物学会第58回大会．1987年10月7日．

26. 上口勇次郎・立野裕幸・島田昌幸・美甘和哉：精子染色体に及ぼす放射線の傷害作用：ヒト精子と実験動物精子の比較。日本人類遺伝学会第32回大会。1987年11月13日。
27. 立野裕幸・上口勇次郎・美甘和哉：チャイニーズハムスター卵子におけるtrimethoxybenzene化合物の染色体不分離誘発能。日本人類遺伝学会第32回大会。1987年11月12日。
28. 加納宏・関本邦敏・下郡洋一郎・立野裕幸・美甘和哉：透明帯除去ハムスター卵を用いたブタ精子の核型分析。日本畜産学会。第80回大会。1988年3月31日。
29. 上口勇次郎・立野裕幸・美甘和哉：ヒト精子における異数体について（第1報）。日本人類遺伝学会第33回大会。1988年9月8日。
30. 立野裕幸・上口勇次郎・美甘和哉：ヒト精子染色体に及ぼす γ 線の影響。日本人類遺伝学会第33回大会。1988年9月8日。
31. 上口勇次郎・立野裕幸・美甘和哉・澤田昭三：トリチウム β 線のヒト精子染色体に及ぼす影響。日本放射線影響学会31回大会。1988年10月7日。
32. Kamiguchi, Y. and Mikamo, K.: Effects of tritium β -rays on human sperm chromosomes. The third Japan-US workshop on tritium radiobiology and health physics. November 10, 1988.
33. 赤池政彦・立野裕幸・福井豊・小野斉・美甘和哉：透明帯除去ハムスター卵を用いたヒツジ精子の核型分析法について。

家畜繁殖学会第74回大会，1988年11月11日。

(3) 出版物

1. 美甘和哉・上口勇次郎：卵子の染色体標本作製法。「リプロダクション実験マニュアル」。飯塚理八・他編。講談社。分担執筆。1985年10月。
2. 美甘和哉・上口勇次郎：放射線の遺伝的影響——ヒトの遺伝損傷の測定——精子染色体異常。「放射線の影響評価研究の現状と展望」。原子力安全研究協会。分担執筆。1985年12月。
3. 上口勇次郎・美甘和哉：放射線の遺伝的影響——ヒトの遺伝的効果のモニタリング系の開発——体外受精法。「放射線の影響評価研究の現状と展望」。原子力安全研究協会。分担執筆。1985年12月。
4. 上口勇次郎・美甘和哉：ヒト精子の受精能および染色体構成のハムスターテスト：その問題点と改良。「受精・着床'85」。飯塚理八・他編。学会誌刊行センター。分担執筆。1986年6月。
5. Kamiguchi, Y., Tateno, H., Shimada, M. and Mikamo, K.: X-ray-induced chromosome aberrations in human spermatozoa. in "New Horizons in Sperm Cell Research", Mohri H., ed., Japan Sci. Soc. Press, July 1987.
6. 美甘和哉・上口勇次郎・立野裕幸・島田昌幸：ヒト配偶子における放射線誘発染色体異常の数量化。「染色体研究の新しい展開——ヒトの染色体を中心として——」。石原隆昭・戸

張巖夫編．放射線医学総合研究所．分担執筆．1987年
12月．

7. Kamiguchi, Y., Tateno, H. and Mikamo, K.: Chromosomal damage in human spermatozoa caused by in vitro irradiation of tritium β -rays. Proceedings of the Third Japan-US Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics. in press.

研究成果

はじめに

Trimethoxybenzene 環をもつ種々の薬品(colchicine, colcemid, podophyllotoxin, reserpineなど)及びその類似物質(vinblastineなど)が紡錘糸の構成蛋白であるtubulinの重合阻害あるいは脱重合を引き起こすということは多くの生化学的研究によってすでに明らかにされている。しかし、これらの薬品が紡錘糸の形成不全を通して、異数体の成因である染色体不分離を誘発する可能性についてはcolchicineと colcemidについて報告があるのみで、他の薬品についての詳細な検討は行われていない。

Colcemidが染色体不分離を誘発することは哺乳類の体細胞を用いたin vitroの実験により証明されている(Cox and Puck, 1969; Kato and Yoshida, 1970, 1971; Cox, 1973)。また、これらの研究より前に、colchicineのin vivo投与が卵母細胞の第2成熟分裂期染色体の分離を抑制し、結果的に3倍体を誘発することが齧歯類で報告されている(Edward, 1954, 1958; Piko and Bomsel-Helmreich, 1960; McGaughey and Chang, 1969)。同時に、これらの研究から倍数体の他に異数体も誘発されることが示唆されたが、卵細胞の染色体標本作製技術が不十分であったため結論的な結果は得られなかった。

ダウン症をはじめとした数的染色体異常症患者児における余剰染色体の由来を研究した結果から、ヒトでは(1) 卵子側で精子側よりもはるかに多くの染色体不分離が生じている、(2) 不分離頻度は卵子の第1成熟分裂時で第2分裂時よりもはるかに高いことなどが明らかにされている(Jacobs and Morton, 1977; Magenis et al., 1977; Niikawa

et al., 1977; Mattei et al., 1979)。したがって、上述の薬品を用いて紡錘糸形成不全と染色体不分離の関連性を卵子レベルで検討することは異数体の生成機序を解明するうえで極めて重要である。

我々はこの研究に適した実験動物（チャイニーズハムスター）を選定し、卵子染色体標本作製法を改良して（Kamiguchi et al., 1976, 1978; Mikamo and Kamiguchi, 1983）、卵子レベルでの詳細な研究を始めて行った。その結果、卵母細胞の第1成熟分裂期紡錘体形成の開始直前におけるcolchicine (3 μ g/g 体重) のin vivo 投与が染色体不分離やanaphase lagging (分裂後期での移動遅延による染色体の消失) を顕著に誘発することが明らかとなった(Sugawara and Mikamo, 1980a,b; Mikamo and Sugawara, 1980)。この研究結果は成熟分裂期紡錘体の形成不全が染色体不分離の原因であることを強く示唆するものである。

本研究ではtrimethoxybenzene 環をもつ種々の薬品及びその類似物質のなかから特に各種の治療目的で用いられている医薬品を中心に11種を選び、上述の研究の場合と同じ実験系を用いて染色体不分離及びanaphase lagging誘発能の調査、解析を行った。

材料と方法

1) 実験動物

動物は当研究室で繁殖・育成されたチャイニーズハムスター（旭川コロニー=C H A colony）で、安定した条件下（照明：午前5時から午後7時までの14時間明期、10時間暗期；室温：23 \pm 2 $^{\circ}$ C；湿度：50~60%）で飼育された。本種は染色体数が少なく(2n=22)、個々の染色体の形態的特徴が明瞭であるため染色体分析が容易であることや、

卵細胞膜が強固で染色体標本を作製しやすいことなど、この分野の研究に適した特性をもっている。また、このコロニーは極めて安定した4日型の性周期をもつように改良されているので、動物の選抜の際の無駄が少ない。上述の光条件下では、黄体形成ホルモンのサージは大部分の動物で発情前期の日の14:00～15:00の間に、第1卵母細胞の卵核胞崩壊は16:00～17:00の間に起こり、排卵は翌日（発情期）の3:30～4:30の間に起こる。

実験には成熟雌（5～8ヶ月齢）を用いた。膣垢検査によって性周期を確認し、正常4日型の性周期を保持している個体のみを選抜して実験を行った。これにより、遅延排卵、遅延受精などの数的染色体異常誘発要因を実験系から排除し、特定の薬品の影響のみを適確に検討することができた。

2) 薬品及び投与方法

調査した薬品の種類及び投与量は表1に示す通りである。これらの薬品はすべてSigma社（米国）より購入した。薬品(1)～(9)はtrimethoxybenzene環をもつ化合物、(10)及び(11)はその類似物質である。薬品(11)以外は水に不溶または難溶なので、DMSO(dimethylsulfoxide)に溶かして用いた。投与量を変える場合には、常に一定量（約0.1ml）が動物（約40g）に注射されるように溶液の濃度を調整した。

薬品は発情前期の日の17:30に腹腔内投与された。この時刻は1)の項で述べた卵核胞崩壊の時刻に続く時期で、第1成熟分裂期紡錘体の形成が開始される直前である。翌日（排卵日）の9:00頃に動物を開腹して卵管膨大部より第2卵母細胞を回収し、0.5%トリプシン処理により卵丘細胞を除去した。卵母細胞は実体解剖顕微鏡下で形態的観察

(巨大極体の有無の観察)を行った後に次項に述べる方法で染色体標本にした。

表1、調査した薬品の投与量および動物の反応

薬品	投与量 ($\mu\text{g/g}$ 体重)	動物の反応
(1) colcemid	10	変化なし
(2) podophyllotoxin	20	変化なし
(3) reserpine	0.5	これ以上の量で行動機能障害顕著
(4) trimethoprim	100	これ以上の量で致死
(5) 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde	500	この倍量で致死
(6) 3,4,5-trimethoxybenzamide	500	これ以上の量で排卵障害
(7) 3,4,5-trimethoxybenzoic acid	500	この倍量で致死
(8) 3,4,5-trimethoxycinnamic acid	500	これ以上の量で排卵障害
(9) 1,2,4-trimethoxy-5-propenylbenzene	500	これ以上の量で排卵障害
(10) griseofulvin	300	これ以上の量で運動機能障害顕著
(11) vinblastine	3	変化なし

薬品投与による効果(巨大極体誘発、染色体不分離誘発)が認められない場合には投与量をふやして実験を行い、動物に著しい行動障害、排卵抑制、死亡などの影響を生ずる限界量まで調査した(表1)。

3) 染色体標本作製及び分析

染色体標本は我々が開発した漸進固定・空気乾燥法を用いて作製された。方法の概略は図1に示す通りである。この方法では卵が3段階の固定液で順次穏やかに固定されるので、標本作製過程で卵細胞膜の破損による染色体の人為的流失がほとんど起こらない。したがって、完成したスライドの信頼度は極めて高く、この方法は本研究のように唯一の核板から数的異常の有無を判定しなければならない場合に極めて有効である。

チャイニーズハムスター卵の第二成熟分裂期染色体標本作製法

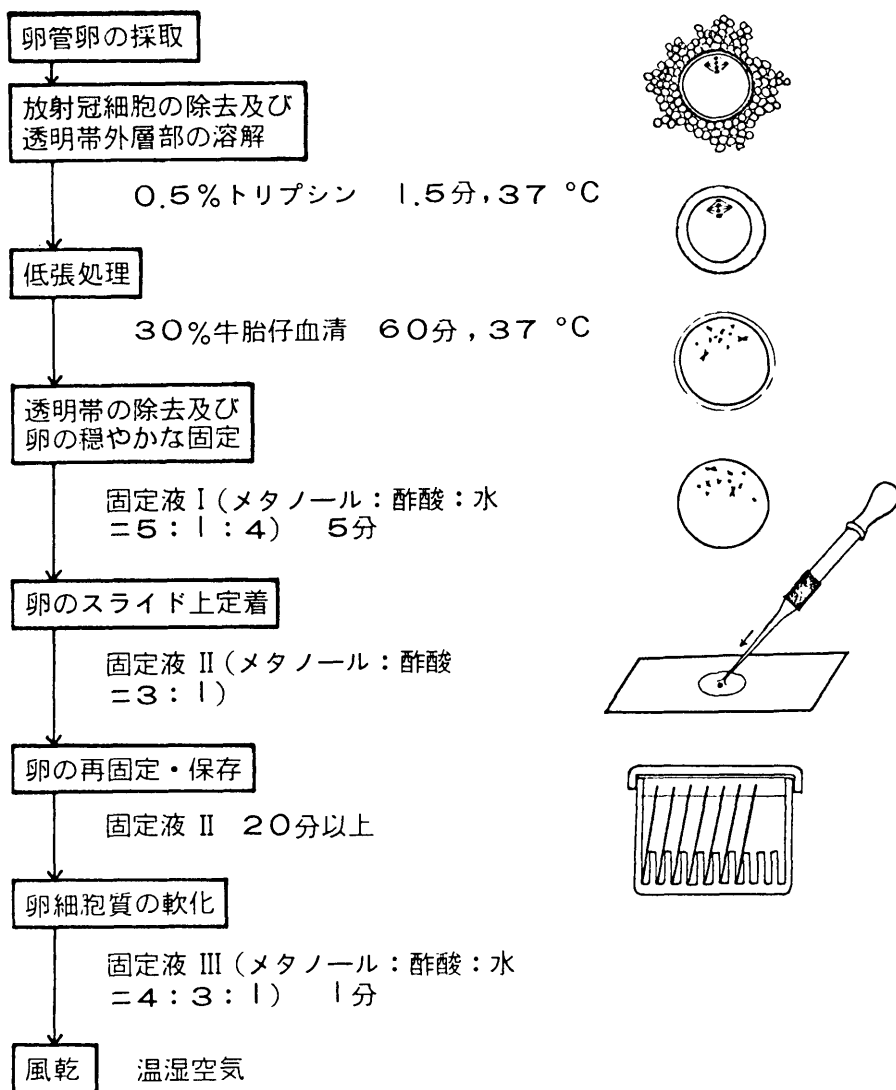


図1 チャイニーズハムスター第2卵母細胞の染色体標本作製法の概略

チャイニーズハムスター第2卵母細胞の核板は11本の2分染色体より成り、これらはその形態的特徴によって4つのグループ、すなわち、2本の大型中部着糸型染色体（A群）、3本の中型中部着糸型染色体（B群）、3本の中型端部着糸型染色体（C群）及び3本の小型中部着糸型染色体（D群）に分類されるので（図6）、これにしたがって異常染色体の同定を行った。

結果

1) 巨大極体をもつ卵母細胞の出現率

すでに我々は、colchicine投与が巨大極体をもつ卵母細胞を高頻度に誘発すること及びこの形態異常卵では染色体不分離頻度が著しく高いことを明らかにした（Sugawara and Mikamo, 1980a, b; Mikamo and Sugawara, 1980）。そこで、まず巨大極体をもつ卵母細胞の出現率を指標にして11種類の薬品の影響を調査した。

観察された巨大極体の大きさにはかなりの変異があり、2細胞期の割球の大きさにはほぼ匹敵するほど巨大なもの（図2、A）、比較的小形のもの（図2、B）、あるいはそれらの中間のもの（図2、C）など色々な段階のものがあつた。また、極体が2個誘発された例（図2、D）も観察された。

巨大極体をもつ卵母細胞の出現頻度は表2に示す通りである。対照Iは無処理の動物群、対照IIは各薬品を溶解するのに用いたDMSOのみを注射した動物群である。Trimethoprim, 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde, 3,4,5-trimethoxybenzamide, 3,4,5-trimethoxycinnamic acid及びgriseofulvinの各群では、投与量をかなり多くしたにもかかわらず、巨大極体は全く誘発されなかつた。また、1,2,4-trimethoxy

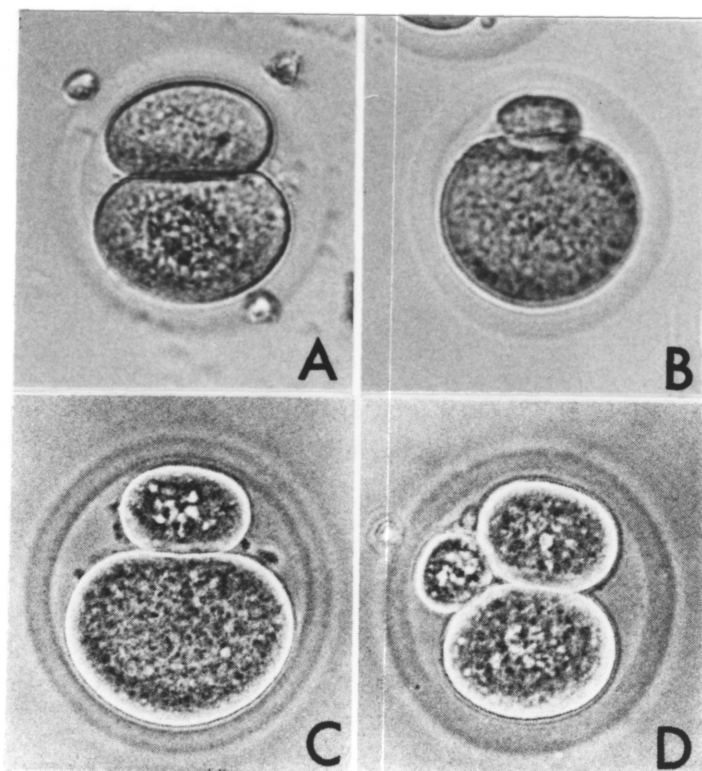


図2 種々の大きさの巨大極体を1個もつ第2卵母細胞（A～C）及び2個もつ卵母細胞（D）の例。いずれもpodophyllotoxin, reserpineあるいはvinblastine投与群で観察されたもの。

-5-propenylbenzene群ではごく少数の卵 (2.9%) で巨大極体が観察されたが、対照群との間に統計的有意差は全くなかった。3,4,5-trimethoxybenzoic acid群では異常卵の出現率(3.5%)がやや増加する傾向を示したが、有意差はなかった。一方、colcemid, podophyllotoxin, reserpine及びvinblastine の各群では巨大極体をもつ卵の出現率が有意に増加した。

表2、種々の薬品の投与後にみられた、巨大極体をもつ第2卵母細胞の出現頻度

実験群	動物数	調査卵数	正常卵数 (%)	巨大極体をもつ卵 (%)	χ^2 検定*
対照 I	254	1912	1899 (99.3)	13 (0.7)	
対照 II	22	212	209 (98.6)	3 (1.4)	0.3<P<0.5
colcemid	8	69	64 (92.8)	5 (7.2)	0.02<P<0.05
podophyllotoxin	19	171	143 (83.1)	28 (16.3)	P<0.001
reserpine	22	202	184 (91.1)	18 (8.9)	P<0.01
trimethoprim	13	116	116 (100)	0 (0)	
3,4,5-trimethoxybenzaldehyde	5	49	49 (100)	0 (0)	
3,4,5-trimethoxybenzamide	6	51	51 (100)	0 (0)	
3,4,5-trimethoxybenzoic acid	20	201	194 (96.5)	7 (3.5)	0.2<P<0.3
3,4,5-trimethoxycinnamic acid	6	52	52 (100)	0 (0)	
1,2,4-trimethoxy-5-propenylbenzene	8	70	68 (97.1)	2 (2.9)	0.7<P<0.8
griseofulvin	4	36	36 (100)	0 (0)	
vinblastine	21	187	127 (67.9)	60 (32.1)	P<0.001

* 対照 II の P 値は対照 I との比較の場合。他の P 値はすべて対照 II との比較。

2) 異数性卵母細胞の出現率

巨大極体出現率の有意な増加または増加傾向の認められた、podophyllotoxin, reserpine, 3,4,5-trimethoxybenzoic acid及びvinblastine の4群について、卵母細胞の染色体標本を作製し、異数体の出現率を調査した。

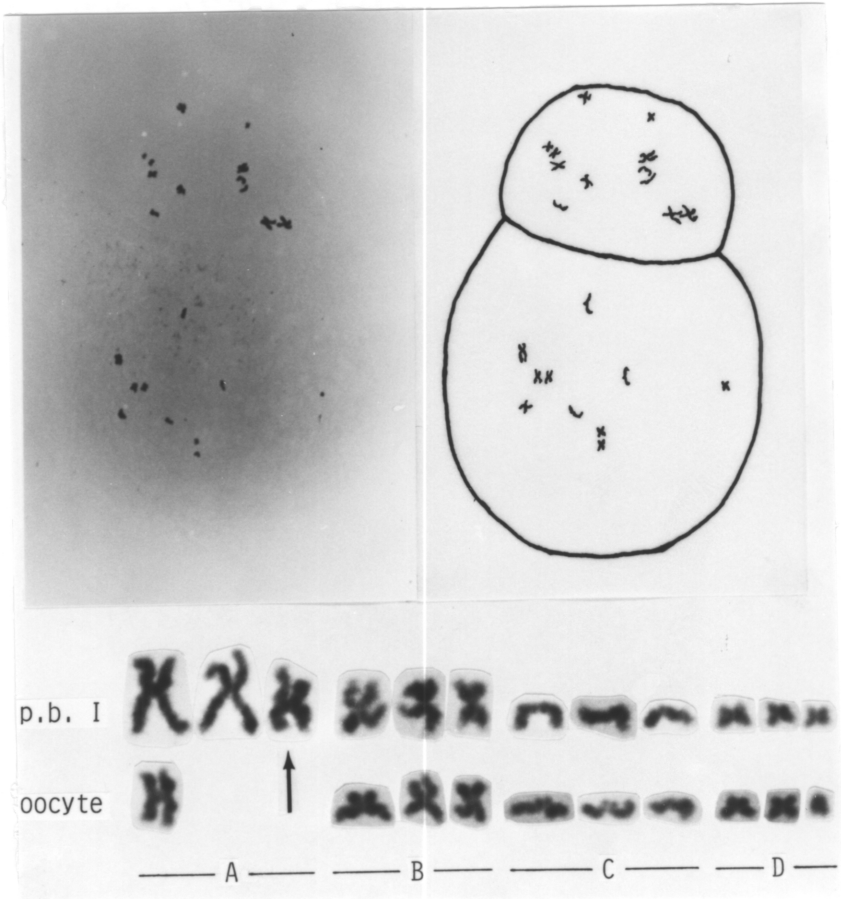


図3 巨大極体をもつ第2卵母細胞の染色体標本(上)及びその核型(下)。上左:ギムザ染色後の染色体標本写真。上右:同標本の模式図。卵と極体の細胞質及び染色体の特徴を強調して表してある。Aグループの染色体1本(矢印)が不分離を起こして第1極体側(p. b. I)に含まれ、卵母細胞(oocyte)は低数性異常になっている。

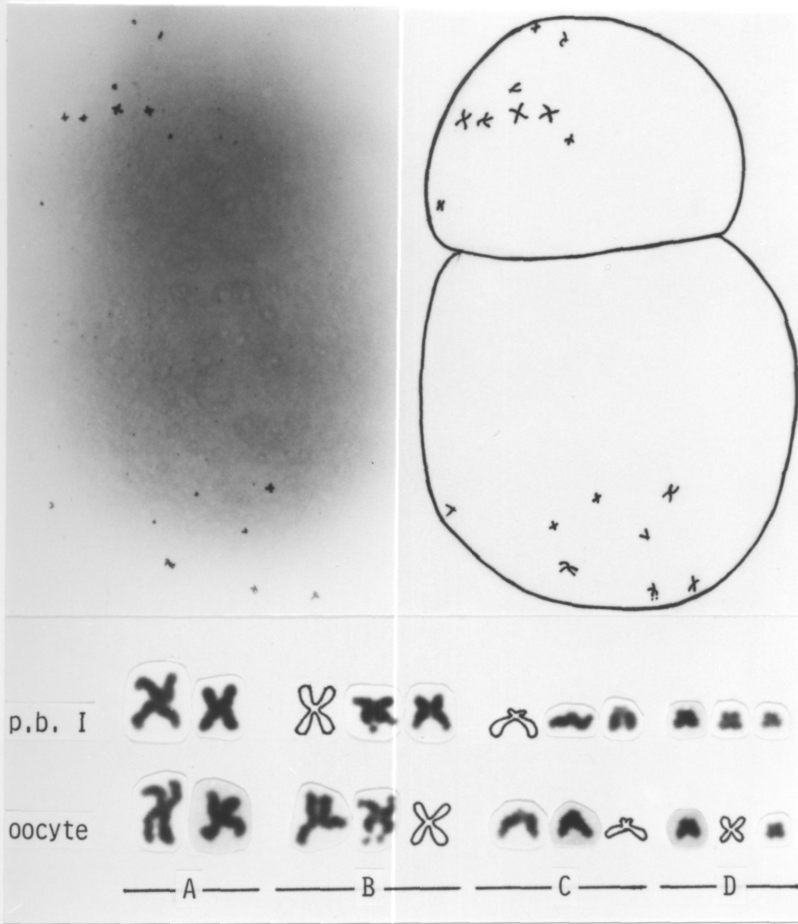


図4 巨大極体をもつ第2卵母細胞の染色体標本(上)及びその核型(下)。写真及び模式図の特徴は図3の場合と同じ。何本かの染色体(核型のなかの白ぬきの染色体)が卵母細胞(oocyte)にも極体(p. b. I)にも含まれず消失してしまった結果、両者とも低数性異常となった例。

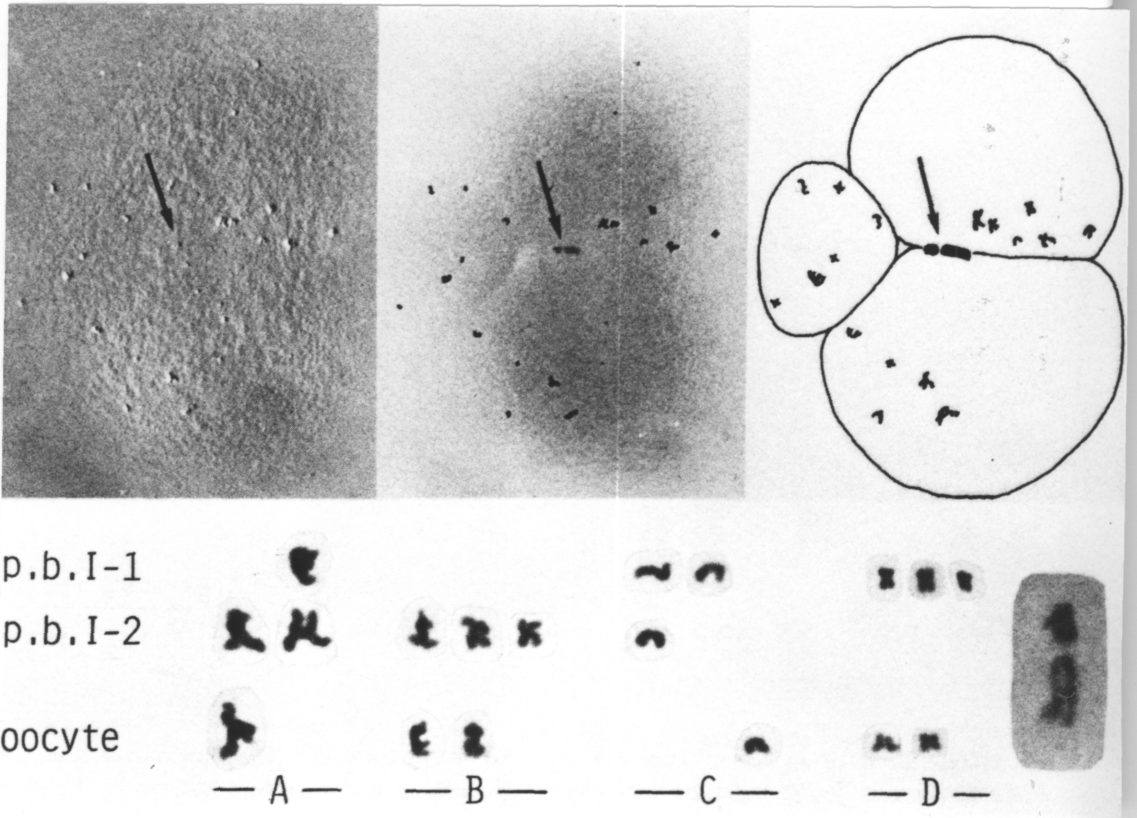


図5 2個の巨大極体をもつ第2卵母細胞(oocyte)の染色体標本(上)及びその核型(下)。上左:ノマルスキーの微分干渉顕微鏡で撮った標本の写真。未染色。極体及び卵の薄く広がった細胞質が明瞭に区別され、両者の染色体がお互いに混じり合っていないことがわかる。上中:ギムザ染色後の染色体標本写真。上右:同標本の模式図。この図の特徴は図3の場合と同じ。退化した染色体の塊(矢印)が極体と卵母細胞の境界部の細胞質外にみられる。anaphase laggingの後の染色体の運命を示している。卵母細胞では5本の染色体が消失して極端な低数性異常となっている。消失した染色体の一部は細胞質外の退化した塊に含まれていると思われる。

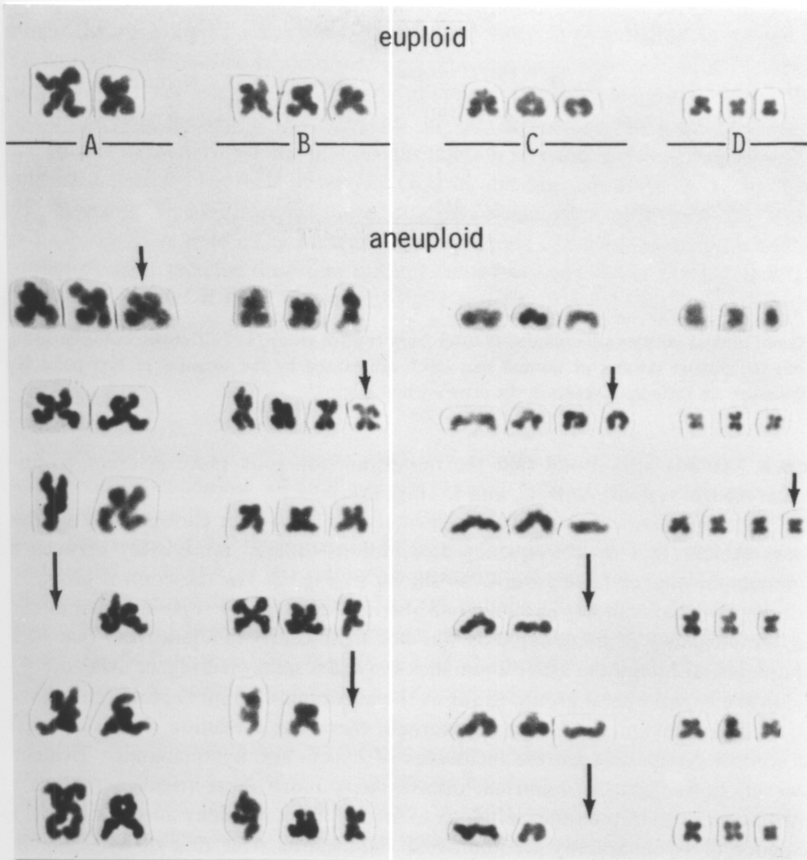


図6 チャイニーズハムスター第2卵母細胞の正常核型(euploid, $n=11$)。染色体は形態的特徴によってA～Dの4グループに分類される。2段目以下(aneuploid)は薬品投与群でみられた異数性卵母細胞の核型の例。染色体不分離は染色体グループA～Dのいずれからも生じている。矢印は消失した、あるいは余剰の染色体を示す。

巨大極体をもつ卵母細胞では、2分染色体が卵母細胞と極体の間で不均等に配分された結果生じた異数体の例（図3）、多くの染色体に不分離またはanaphase laggingが起こった結果、極端に染色体数が減少してしまった異常卵の例（図4）、卵細胞と極体の境界部の細胞質外に退化した染色体の塊（anaphase laggingの過程を示すものと考えられる）がみられる例（図5）など種々のタイプの異数性卵母細胞が観察された。いくつかの異数体の核型例は図6に示されている。この図からわかるように、不分離はA～Dのどの染色体グループからも出現していた。

表3、種々の薬品の投与後にみられた異数性卵母細胞の出現頻度

実験群	分析卵数	正常卵 (%)	異数性卵 (%)	χ^2 検定
対照 I	1742	1707 (98.0)	35 (2.0)	
対照 II	198	195 (98.5)	3 (1.5)	0.8<P<0.9
podophyllotoxin	155	93 (60.0)	62 (40.0)	P<0.001
reserpine	188	182 (96.8)	6 (3.2)	0.3<P<0.5
3,4,5-trimethoxy- benzoic acid	190	184 (96.8)	6 (3.2)	0.3<P<0.5
vinblastine	159	26 (16.4)	133 (83.6)	P<0.001

表3に示す通り、異数性卵母細胞の出現率はpodophyllotoxin 及びvinblastine の2群で有意に増加した。特に後者は異常誘発能が強く、

異常卵の出現率は80%以上の高率を示した。一方、reserpine と3,4,5-trimethoxybenzoic acidの2群では異数体の出現率に増加傾向が認められたものの、現時点での分析卵数では対照群との間に出現率の有意差はなかった。巨大極体誘発が認められたもう一つの実験群、すなわち、colcemid群ではまだ調査例数が十分蓄積されていないが、現在まで60卵が染色体分析された。異数体の出現率(3例、5.0%)はやや増加していたが、対照群との間に有意差はなかった(0.2<P<0.3)。

表4、異数性卵母細胞の出現頻度：正常極体をもつ卵と巨大極体をもつ卵の間の比較

実験群	正常極体をもつ卵母細胞			巨大極体をもつ卵母細胞				
	分析卵数	異数性(%)		分析卵数	異数性(%)			
		高数性	低数性		合計	高数性	低数性	合計
対照 I	1698	14 (0.8)	18 (1.1)	32 (1.9)	12	0 (0.0)	3 (25.0)	3 (25.0)
対照 II	195	1 (0.5)	2 (1.0)	3 (1.5)	3	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
podophyllotoxin	130	7 (5.4)	34 (26.2)	41 (31.5)	25	4 (16.0)	17 (68.0)	21 (84.0)
reserpine	174	1 (0.6)	4 (2.3)	5 (2.9)	14	0 (0.0)	1 (7.1)	1 (7.1)
3,4,5-trimethoxybenzoic acid	182	2 (1.1)	1 (0.5)	3 (1.6)	8	1 (12.5)	2 (25.0)	3 (37.5)
vinblastine	111	24 (21.6)	63 (56.8)	87 (78.4)	48	16 (33.3)	30 (62.5)	46 (95.8)

次に、巨大極体形成と染色体不分離の関連性をより詳細に検討するために、卵母細胞を正常極体をもつものと巨大極体をもつものに分類して異数性卵の出現率を比較した(表4)。巨大極体をもつ卵母細胞群における異数性卵の出現頻度は正常極体をもつ卵母細胞群での頻度よりはるかに高く、この現象は各薬品投与群のみならず対照群でもみ

られた。また、低数性異常の出現率は高数性異常の場合よりも高く、この事は対照群よりも薬品投与群で特に著しかった。これらの結果は、巨大極体の形成が異数性、特に低数性異常の生成と密接に関連していることを示唆している。

考察

我々は tubulin の重合阻害剤の1つである colchicine がチャイニーズハムスター卵母細胞の第1成熟分裂期に高頻度の染色体不分離を誘発することを明らかにした (Sugawara and Mikamo, 1980a, b; Mikamo and Sugawara, 1980)。今回、同じ trimethoxybenzene 環をもち、且つ tubulin 重合阻害作用のある医薬品、すなわち、podophyllotoxin と vinblastine が colchicine と同様に巨大極体や異数体を高頻度に誘発することが明らかにされた。これらの事は、tubulin 重合阻害による紡錘体形成不全という共通事象が上述の異常の原因であることを強く示唆している。

一方、今回の研究から同じ trimethoxybenzene 環をもつ薬品のなかには reserpine のように巨大極体を誘発するにもかかわらず、異数体の誘発が顕著でないものもみつかった。巨大極体形成の原因には、紡錘体が卵の中央に移動するためであるという説 (Braden and Austin, 1954; Donahue, 1970; Plachot et al., 1978) や紡錘体の軸の方向性が重要であるという説 (Plachot et al., 1978) など紡錘体の異常によるという説の他に、卵細胞質表層の microfilament から成る収縮環が関与しているという説 (Van Den Brank and Stone, 1974; Cremer et al., 1976) もある。Reserpine の場合、actin 系の繊維である microfilament に対する阻害作用が強く、tubulin 系の紡錘体への作

用が弱いため、上述のような効果の差が生じたという可能性も考えられる。

Colchicineでは、その分子構造に含まれる trimethoxybenzene 環が tubulin の疎水領域と特異的に結合して tubulin の重合を阻害するといわれている。しかし、今回、同じ trimethoxybenzene 化合物である trimethoprim, 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde, 3,4,5-trimethoxybenzamide, 3,4,5-trimethoxycinnamic acid, 1,2,4-trimethoxy-5-propenylbenzene 及び griseofulvin では巨大極体も異数体も全く誘発されなかった。したがって、これらの化合物では trimethoxybenzene 環が必ずしも tubulin の重合阻害を引き起こしていないものと考えられる。事実、colchicine に紫外線を照射して lumicolchicine に変えると、trimethoxybenzene 環がそのまま保たれているにもかかわらず、tubulin と結合しなくなることが知られている。

今回の研究は *in vivo* の実験系で行われたので、各薬品の吸収率や代謝率の問題も異常誘発能の有無と関連して十分考慮されなければならない。この点を明らかにするためには *in vitro* の系（培養系）で各薬品の効果を調査してみる必要がある。Colcemid は $0.4 \mu\text{g/ml}$ の濃度で培養体細胞の紡錘体形成を完全に阻害するが、今回の *in vivo* の系ではその20倍以上の量（ $10 \mu\text{g/g}$ 体重）でも異数性卵の有意な増加は認められなかった。したがって、この薬品の場合には吸収、代謝の問題が関係している可能性が強い。異常誘発能の認められなかった他の薬品についても同様の可能性が残されている。

最近、ヒトの第2卵母細胞を用いた染色体研究から、ヒトでは異数性卵が頻発しており、特に極端な低数性異常が多いことが示されている (Martin et al., 1986; Wramsby et al., 1987; Plachot et al.,

1988; Djalali et al., 1988)。これらの結果は今回の薬品による異数性誘発の場合と非常によく似ている。彼等の報告には染色体標本作製技術の不備のために生じた人為的な染色体異常が一部含まれている可能性は否定できないが、もしこれらの報告が事実とすれば、その原因が紡錘体の形成不全にあるという可能性は極めて強い。卵胞内過熟によって加齢した卵母細胞では成熟分裂期紡錘体の形成不全が頻発し、これが染色体不分離の原因になっていることは両生類の卵で証明されている(Mikamo, 1968a, b)。その後、同様の現象はラットでも実験的に証明されている(Mikamo and Hamaguchi, 1975; Kamiguchi et al., 1979)。もし、ヒト卵子で加齢に伴う紡錘体の形成不全が生じやすく、そのために異数体が頻発しているとすれば、当然巨大極体の出現頻度もまた高いものと推定されるが、これまでの報告でこの事に言及しているものはない。ヒト卵母細胞の染色体研究ではこの点からの検討が必要であろう。

文献

- Braden, A.W.H. and Austin, C.R. : Reactions of unfertilized mouse eggs to some experimental stimuli. *Expl. Cell Res.* 7 : 277-280 (1954).
- Cox, D.M. : A quantitative analysis of Colcemid-induced chromosomal nondisjunction in Chinese hamster cells in vitro. *Cytogenet. Cell Genet.* 12 : 165-174 (1973).
- Cox, D.M. and Puck, T.T. : Chromosomal nondisjunction: the action of Colcemid on Chinese hamster cells in vitro. *Cyto-*

genetics **8**: 158-169 (1969).

Cremer, T., Zorn, C., Cremer, C. and Zimmer, J.: Formation of viable cell fragments by treatment with colchicine. *Expl. Cell Res.* **100** : 345-355 (1976).

Djalali, M., Rosenbusch, B., Wolf, M. and Sterzik, K.: Cytogenetics of unfertilized human oocytes. *J. Reprod. Fert.* **84**: 647-652 (1988).

Donahue, R.P.: Maturation of the mouse oocyte in vitro. II. Anomalies of first polar body formation. *Cytogenetics* **9**: 106-115 (1970).

Edwards, R.G.: Colchicine-induced heteroploidy in early mouse embryos. *Nature* **174** : 276-277 (1954).

Edwards, R.G.: Colchicine-induced heteroploidy in the mouse. I. The induction of triploidy by treatment of the gamete. *J. Exp. Zool.* **137** : 317-347 (1958).

Jacobs, P.A. and Morton, N.E.: Origin of human trisomics and polyploids. *Hum. Hered.* **27**: 59-72 (1977).

Kamiguchi, Y., Funaki, K. and Mikamo, K.: A new technique for chromosome study of murine oocytes. *Proc. Japan Acad.* **52**: 316-319 (1976).

Kamiguchi, Y., Funaki, K. and Mikamo, K.: A method for chromosome preparation of murine oocytes and preimplantation embryos. *Congenit. Anom.* **18** : 41-48 (1978).

Kamiguchi, Y., Funaki, K. and Mikamo, K.: Chromosomal anomalies caused by preovulatory overripeness of the primary

- oocyte. Proc. Japan Acad. **55**: 398-402 (1979).
- Kato, H. and Yoshida, T.H.: Nondisjunction of chromosomes in a synchronized cell population initiated by reversal of Colcemid inhibition. Expl. Cell Res. **60**: 459-464 (1970).
- Kato, H. and Yoshida, T.H.: Isolation of aneusomic clones from Chinese hamster cell line following induction of nondisjunction. Cytogenetics **10** : 392-403 (1971).
- Magenis, R.E., Overton, K.M., Chamberlin, J., Brady, T. and Lovrien, E.: Paternal origin of the extra chromosome in Down's syndrome. Hum. Genet. **37** : 7-16 (1977).
- Martin, R.H., Mahadevan, M.M., Taylor, P.J., Hildebrand, K., Long-Simpson, L., Peterson, D., Yamamoto, J. and Fleetham, J.: Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes. J. Reprod. Fert. **78**: 673-678 (1986).
- Mattei, J.F., Mattei, M.G., Ayme, S. and Giraud, F.: Origin of the extra chromosome in trisomy 21. Hum. Genet. **46**: 107-110 (1979).
- McGaughy, R.W. and Chang, M.C. : Inhibition of fertilization and production of heteroploidy in eggs of mice treated with colchicine. J. Exp. Zool. **171**: 465-480 (1969).
- Mikamo, K.: Mechanism of non-disjunction of meiotic chromosomes and of degeneration of maturation spindles in eggs affected by intrafollicular overripeness. Experientia **24**: 75-78 (1968a).
- Mikamo, K.: Intrafollicular overripeness and teratologic de-

- velopment. *Cytogenetics* 7 : 212-233 (1968b).
- Mikamo, K. and Hamaguchi, H.: Chromosomal disorder caused by preovulatory overripeness of oocytes. In "Aging Gametes", R.J. Blandau, Ed., S. Karger, Basel, pp. 72-97 (1975).
- Mikamo, K. and Kamiguchi, Y.: A new assessment system for chromosomal mutagenicity using oocytes and early zygotes of the Chinese hamster. In "Radiation-Induced Chromosome Damage in Man", T. Ishihara and M.S. Sasaki, Eds., Alan R. Liss, New York, pp. 411-432 (1983).
- Mikamo, K. and Sugawara, S.: Colchicine-induced abnormal meiotic chromosomal segregation in primary oocytes of the Chinese hamster. Part II. Anaphase lagging. *Jpn. J. Human Genet.* 25 : 241-248 (1980).
- Niikawa, N., Merotto, E. and Kajii, T.: Origin of acrocentric trisomies in spontaneous abortuses. *Hum. Genet.* 40: 73-78 (1977).
- Piko, L. and Bomsel-Helmreich, O.: Triploid rat embryos and other chromosomal deviants after colchicine treatment and polyspermy. *Nature* 186: 737-739 (1960).
- Plachot, M., Mandelbaum, J. and de Grouchy, J.: Anomalies de la maturation nucleaire in vitro d'ovocytes de hamster dore. *Annls. Genet.* 21: 33-39 (1978).
- Plachot, M., Veiga, A., Montagut, J., de Grouchy, J., Calderon G., Lepretre, S., Junca, A.-M., Santalo, J., Carles, E., Mandelbaum, J., Barri, P., Degoy, J., Cohen, J., Egozcue,

- J., Sabatier, J.C. and Salat-Baroux, J.: Are clinical and biological IVF parameters correlated with chromosomal disorders in early life: a multicentric study. *Hum. Reprod.* **3** : 627-635 (1988).
- Sugawara, S. and Mikamo, K.: An experimental approach to the analysis of mechanisms of meiotic nondisjunction and anaphase lagging in primary oocytes. *Cytogenet. Cell Genet.* **28**: 251-264 (1980a).
- Sugawara, S. and Mikamo, K.: Colchicine-induced abnormal meiotic chromosomal segregation in primary oocytes of the Chinese hamster. Part I. Nondisjunction. *Jpn. J. Human Genet.* **25**: 235-240 (1980).
- Van den Brenk, H.A.S. and Stone, M.G.: Actions and interaction of colchicine and cytochalasin B on contraction of granulation tissue and on mitosis. *Nature* **251**: 327-329 (1974).
- Wramsby, H., Fredga, K. and Liedholm, P.: Chromosome analysis of human oocytes recovered from preovulatory follicles in stimulated cycles. *N. Engl. J. Med.* **316** : 121-124 (1987).