

卵子成熟過程の高感受期における
物理的エネルギーの安全性評価

研究課題番号：59490003

昭和59～61年度
科学研究費補助金（一般研究B）
成果報告書



平成3年3月

研究代表者 美甘和哉
(旭川医科大学 医学部)

卵子成熟過程の高感受期における
物理的エネルギーの安全性評価

研究課題番号：59490003

昭和59～61年度科学研究費補助金（一般研究B）
研究成果報告書

平成3年3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59年度から文部省科学研究費補助金（一般研究B）の助成のもとに行われた研究「卵子成熟過程の高感受期における物理的エネルギーの安全性評価」は3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。

放射線や超音波、磁場等種々の物理的エネルギーが生産、医療、日常生活手段等に盛んに応用されるようになり、それらのエネルギーに人間が曝露される機会は一層増加する傾向にある。ところが、発達中の哺乳類卵巣卵に及ぼすこれらの物理的エネルギーの影響については放射線についてのみ最近ようやく一部が明らかにされてきたに過ぎない。本研究では、チャイニーズハムスターを実験動物に用いて、放射線と超音波を中心に幼若卵子に対する影響を組織学的、生殖生理学および遺伝学的に検討した。検討課題が多岐に亘ること、また内容によっては長期間に及ぶものもあり、当初予定していたNMRの影響評価は限られた研究期間内で行えなかった。放射線での研究結果から、卵子成熟過程の複糸期から初期網糸期は極めて高感受性であり急性の卵細胞死を蒙ること、卵細胞死を蒙った個体では生殖寿命が短縮することが明らかになった。ところが生残した卵子は正常に成熟し、受精後は遺伝的障害をもたず正常に発生することも明らかになった。一方、放射線高感受期の卵子に超音波を照射したが卵細胞死は認められなかった。

ヒト胎児では6～9カ月齢に複糸期から初期網糸期の卵子が出現することから、この時期の放射線への曝露が将来、生殖寿命の短縮という再生産力の低下をもたらす可能性は十分考えられる。最近になって、放射線高感受期の卵子は化学物質に対しても同様な感受性を示すことが知られるようになってきていることから、今後は化学物質の影響調査も重要な研究課題である。

目 次

研究組織	-----	1
研究経費	-----	1
研究発表	-----	2
研究成果	-----	6
序	-----	6
I. チャイニーズハムスター新生仔期における 卵子成熟過程と放射線感受性	-----	8
II. 新生仔期卵巢照射の生殖寿命に及ぼす影響	-----	2 2
III. X線被曝した新生仔期幼若卵子の細胞遺伝 学的、発生学的研究	-----	2 7
IV. 複糸期・初期網糸期卵子に及ぼす低線量X線 の急性および晩発性効果	-----	3 4
V. 放射線高感受期卵子に及ぼす超音波の影響	-----	3 9
結論および摘要	-----	4 3
参考文献	-----	4 4

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）
田中邦雄（旭川医科大学医学部 助教授）
立野裕幸（旭川医科大学医学部 教務職員）

研究経費

昭和59年度	6,300千円
昭和60年度	2,000千円
昭和61年度	500千円
計	8,800千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. Tateno, H. and Mikamo, K.: Neonatal oocyte development and selective oocyte-killing by X-rays in the Chinese hamster, Cricetulus griseus. Int. J. Radiat. Biol., Vol. 45, No. 2, 1984.
2. Mikamo, K.: Developmental impairment caused by treatments to the female before conception. Cong. Anom., Vol. 24, No. 3, 1984.
3. Tateno, H. and Mikamo, K.: Reduction of female fertility span after X-irradiation at neonatal stages, without teratogenic and cytogenetic effects on surviving oocytes. Jpn. J. Hum. Genet., Vol. 30, No. 2, 1985.
4. Kamiguchi, K. and Mikamo, K.: Application of developmental biotechnology to chromosomal study of human spermatozoa. Jpn. J. Hum. Genet., Vol. 30, No. 2, 1985.
5. 美甘和哉・上口勇次郎・舟木賢治・菅原茂樹・小出展久・立野裕幸: 放射線の卵巣照射による卵子染色体異常と発生異常の誘発. 第15回放医研シンポジウム報文集「放射線による遺伝損傷とリスクーその生物医学的アプローチ」. 1985年.
6. 立野裕幸・美甘和哉: 奇形の発生—子宮内被曝: 幼若卵子の放射線細胞死と生殖寿命の短縮. 「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. 1985年.
7. Tateno, H. and Mikamo, K.: Absence of teratogenic and cytogenetic effects of X-rays on pachytene oocytes in neonatal Chinese hamster. J. Radiat. Res.,

- Vol. 27, No. 1, 1986.
8. Tateno, H. and Mikamo, K.: Absence of late effects on survival and developmental abilities of pachytene oocytes X-irradiated during neonatal stages in the Chinese hamster. *Int. J. Radiat. Biol.*, Vol. 49, No. 1, 1986.
 9. Tateno, H. and Mikamo, K.: Correlation Between X-ray Induced Oocyte-killing and Fertility in the Chinese hamster. In "Radiation Research", Fielden, E.M. et al. Eds., Taylor & Francis, July, 1987.
 10. Tateno, H., Mikamo, K., Kamiguchi, Y. and Tanaka, K.: Acute and late effects on oocytes in Chinese hamsters X-irradiated during neonatal stages. *Zool. Sci.*, Vol. 4, No. 6, 1987.
 11. Kamiguchi, Y. and Mikamo, K.: Spontaneous incidence of chromosome aberrations in mammalian zygotes. *Zool. Sci.*, Vol. 5, No. 6, 1988.
 12. Tateno, H. and Mikamo, K.: Effects of neonatal ovarian X-irradiation in the Chinese hamster. I. Correlation between the age of irradiation and the fertility span. *J. Radiat. Res.*, Vol. 30, No. 2, 1989.
 13. Tateno, H. and Mikamo, K.: Effects of neonatal ovarian X-irradiation in the Chinese hamster. II. Absence of chromosomal and developmental damages in surviving oocytes irradiated at pachytene and resting dictyate stages. *J. Radiat. Res.*, Vol. 30, No. 3, 1989.
 14. 上口勇次郎: 最新の染色体分析 - 基礎と実際: 生殖細胞などの培養と染色体分析. 臨床病理. 特集第80号, 1989年.

15. 美甘和哉：初期発生における胚の淘汰。日本医師会雑誌。101巻、2号、1989年。
16. 美甘和哉：ヒトの生殖障害について：初期胚淘汰の生殖生物学的考察。環境変異原研究。11巻、3号、1989年。
17. 美甘和哉：ヒトでは初期胚淘汰がなぜ頻発するのか。医学のあゆみ。150巻、5号、1989年。
18. 美甘和哉：ヒト胚淘汰の細胞遺伝学的考察。ペリネイタルケア。8巻、8号、1989年。

(2) 口頭発表

1. 立野裕幸・美甘和哉：新生仔期被曝雌の生殖能および卵子の細胞遺伝学的研究。日本人類遺伝学会第29回大会。1984年11月15日。
2. 美甘和哉：妊娠前の雌に対する処置による発生障害。シンポジウム「生殖毒性学の展開—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—」。日本先天異常学会第24回大会。1984年7月6日。
3. 上口勇次郎：ヒト染色体における発生工学的手法の導入。日本人類遺伝学会第29回大会。1984年11月15日。
4. 立野裕幸・美甘和哉：太糸期(pachytene) 卵子の放射線抵抗性：晩発効果の発生学的・細胞遺伝学的研究。日本放射線影響学会第28回大会。1985年10月18日。
5. 立野裕幸・美甘和哉：幼若卵巣卵の成熟段階と急変する放射線感受性：生殖寿命、発生能、染色体に関する研究。日本不妊学会北海道地方部会第28回大会。1986年1月31日。
6. Tateno, H. and Mikamo, K.: Correlation between X-ray induced oocyte-killing and fertility in the Chinese hamster. Proceedings of the 8th International Congress of Radiation Research, July 23, 1987.

7. 立野裕幸・美甘和哉・上口勇次郎・田中邦雄：哺乳類新生仔の幼若卵巣卵に及ぼすX線の晩発効果の検討。日本動物学会第58回大会。1987年10月7日。
8. 上口勇次郎・美甘和哉：哺乳類受精卵における染色体異常自然発生率の比較。日本動物学会第59回大会。1988年10月8日。
9. 美甘和哉：ヒトの生殖障害について一初期胚淘汰の意義一。環境変異原学会公開シンポジウム。1989年5月18日。
10. 美甘和哉：人間における遺伝障害を子孫へのその現れ方。原子力安全研究協会公開シンポジウム。1989年11月8日。
11. 立野裕幸・上口勇次郎・美甘和哉：哺乳類卵巣卵の発育段階に伴う放射線感受性の変化。日本人類遺伝学会第35回大会。1990年8月1日。

研究成果

序

一般に哺乳類では、胎生後期から新生仔期の幼若卵巢中に第一成熟分裂前期の太糸期から網糸期の卵子が多数含まれている。それらが全卵巢卵に占める割合は胎仔の発生段階によっても動物種によっても異なる。また、卵子がこの時期に留まっている時間も種によって大きく異なることが知られている(Baker, 1971; Baker and Neal, 1977)。マウス(Borum, 1961)やラット(Beaumont and Mandl, 1962)のような小型のゲッ歯類では成熟分裂の進行が比較的同調しているので、生後十数日のうちに全卵子が休止性網糸期に入る。この時期に放射線を照射されると著しい卵子数の減少がみられることから、幼若卵巢卵は放射線の細胞致死効果に対して極めて高い感受性をもつことが示されてきた(Peters, 1961, 1969; Beaumont, 1962; Oakberg, 1962; Peters and Levy, 1964; Baker, 1971; Baker and Neal, 1977; Dobson and Felton, 1983)。特に、マウスの幼若卵子は感受性が高く、そのLD₅₀ (50%致死線量)はわずか6-7 cGyであると言われていている(Oakberg, 1962; Baker, 1971; Dobson and Felton, 1983; Satow et al., 1987)。一方、ウシやアカゲサル、ヒトなど大型動物や霊長類の幼若卵子は10 Gy以上の高線量放射線の急照射でも細胞死を蒙らないため、極めて放射線抵抗性であると言われてきた(Erickson et al., 1965, 1966, 1967; Baker and Beaumont, 1967; Baker and Neal, 1969)。しかしながら、イヌやサルでも低線量の放射線に長期間曝露されると卵子数の著しい減少が起こるという報告もある(Andersen and Simpson, 1970; Andersen et al., 1977; Dobson et al., 1978)。最近になって、初期網糸期の卵子は種の違いにかかわらず、放射線に対して感受性が高いこと、また、哺乳類の卵子成熟段階に依存した放射線感受性の変化はこれまで考えられてきた以上に種共通の現象であることなどが示唆されるようになってきたが

(UNSCEAR 1982, 1986)、実験的証拠はいまだ十分得られていない。

卵子は放射線で死滅すると、けっして再生産されることはない。したがって、新生仔期に著しい卵細胞死を蒙った個体では卵巣卵の早期枯渇により若い時期に不妊となる危険性が高い。また、晩発効果として、排卵数の減少、受精率の低下、卵子の染色体異常あるいは優性致死突然変異による胎仔死亡率の増加、子宮環境の劣悪化など再生産力の低下も考えられる。この点に関して、卵子への放射線照射が次世代（胎仔）の先天異常を誘発することがマウスの研究で明らかにされてきた(Nomura, 1979, 1982, 1988; Kirk and Lyon, 1982, 1984)。しかしながら、胎仔期や新生仔期の幼若卵子に対する放射線の遺伝学的・発生学的影響については十分な研究がなされていないのが現状である。

最近では超音波がヒト胎児診断に広く利用されるようになってきており、放射線高感受期の幼若卵巣卵がそれに曝される機会も増えてきている。しかしながら、発達中の幼若卵子に対する超音波の影響についてはまったく研究がなされていない。

そこで、本研究ではチャイニーズハムスターを実験動物に用いて以下の研究を行った。第一に新生仔期の幼若卵子は成熟分裂の過程で放射線感受性をどの様に変化させるか、第二に、新生仔期における卵巣卵の減少が将来の生殖能に如何なる影響をもたらすか、第三に、卵細胞死をまぬがれて生き残った卵子に遺伝学的・発生学的影響があるかどうか、第四として高感受期の卵子に対する低線量放射線の影響を調査した。そして最後に放射線高感受期の卵子に対する超音波の影響について卵細胞死、生殖寿命および胎仔発生の点から検討を加えた。

今回我々が実験動物として選定したチャイニーズハムスターでは卵子成熟段階の進行が極めてよく同調しているので、特定の段階の卵子に対する放射線や超音波の影響を的確に知ることができる。この同調性はマウス、ラットなど他の動物種よりはるかに高く、上述した詳細な研究は我々の動物を用いて初めて可能なものである。

I. チャイニーズハムスター新生仔期における卵子成熟過程と放射線感受性

【はじめに】

哺乳類卵子の放射線感受性は動物種によってはもちろん、系統や成熟分裂のステージあるいは卵胞の発達段階で大きく異なっている (Baker, 1971; Baker and Neal, 1977)。胎生期から新生仔期のラットの幼若卵子は第一成熟分裂前期の細糸期から太糸期にかけてはX線の細胞致死作用に対して抵抗性であるが、複糸期から網糸期初期になると高感受性になる (Beaumont, 1961, 1962, 1966)。同様の結果はマウスの研究でも得られているが (Peters, 1969; Dobson and Felton, 1983)、太糸期の卵子については感受性であるという報告 (Peters, 1961; Peters and Borum, 1961) とラットと同様、抵抗性である (Rugh and Jackson, 1958; Russell et al., 1959; Rugh and Wohlfromm, 1964) という相対する結果が得られている。一方、チャイニーズハムスターでは卵子成熟過程と放射線感受性の関係についての研究はなされていない。

そこで、Part I ではチャイニーズハムスター新生仔期における卵子の成熟過程を日齢を追って調査すると同時に、その成熟段階によって卵子の放射線感受性がどのように変化するかを検討した。さらに、これらの結果をマウス、ラットの研究結果と比較し、卵子放射線感受性の種差について考察を行った。

【材料および方法】

(1) 動物

実験に用いたチャイニーズハムスターは全て旭川コロニー (CHA) で繁殖・飼育されたものである (Mikamo and Kamiguchi, 1983)。このコロニーは室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 50-60%、5:00-19:00 の 14 時間明期で維持されている。

(2) 卵巣の組織学的研究

生後0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20日の新生仔から両卵巣を取り出し、一方を組織標本作製のためブアン液で固定した。固定後、通常のパラフィン切片法にて5 μ mの厚さで連続切片とし、ヘマトキシリン染色標本とした。他方の卵巣はBorum(1961)の方法に従って押しつぶし標本とした。

卵子の発達段階は Pedersen and Peters(1968)がマウスで提唱した分類法に準じて、卵子の成熟分裂段階と卵胞細胞層の発達段階から6タイプに分類された(図1)。

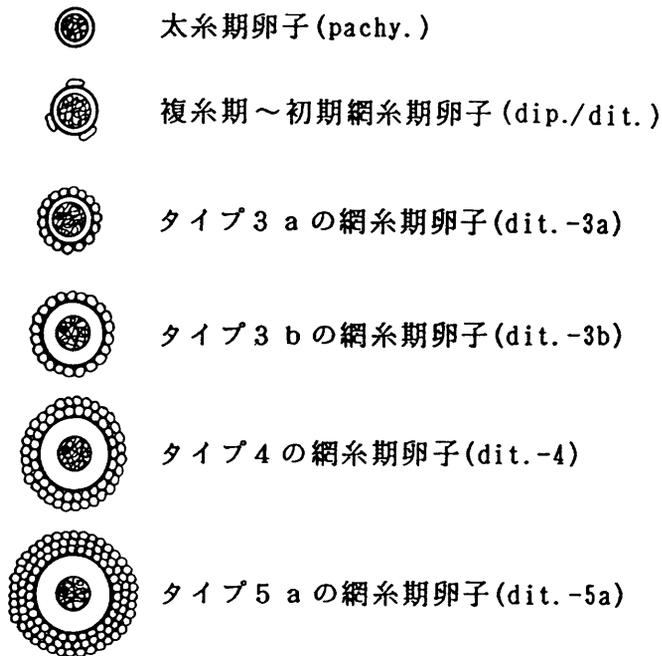


図1 成熟分裂と卵胞の発達段階による幼若卵子の分類。
Pedersen and Peters (1968)の分類法に従う。

卵子数は10枚毎の組織切片で数えられた。太糸期および複糸期～初期網糸期の卵子については Beaumont and Mandl(1962)の方法に従って、最大経あるいはそれに近いところで切断されているものだけを数えた。タイプ3aの複糸期卵子(dit.-3a)よりも発達しているものについては Mandl and Zuckerman(1951)の方法に従って、核小体をマーカーにして数えられた。卵子数は片方の卵巣で、しかも10枚毎の組織切片で数えられたので、最終的に全卵子数を求める時には実際に得えられた数を20倍した。

(3)被曝卵巣の組織学的研究

生後0、2、4、6、8、10、12、14、16、18日の新生仔の卵巣部位に1GyのX線(220kVp, 20 mA, 42.6 cGy/min)を照射した。照射後48時間で卵巣を取り出し、未照射卵巣と同様にして組織標本作製した。卵子の発達段階および卵子数も同じ方法で調査された。

【結果】

(1)新生仔期の卵巣卵の発達過程

生後いろいろな日齢における卵子数および卵子の成熟段階と卵胞の発達段階を Table 1に示した。生後0日ではすべての卵子は太糸期であった(図2A、B)。生後2日の卵巣では卵子数は減少していたが、卵子の約30%は複糸期～初期網糸期にまで発達していた(図2C、D)。生後4日になると卵子数は生後0日の3分の2にまで減少していた。この日齢になると卵子の大部分は複糸期～初期網糸期に達していたが(図2E)、卵胞の発達は顕著ではなかった。少数の太糸期卵子がまだ卵巣周辺部に認められた(図2F)。生後6日以後になると殆ど全ての卵子が複糸期～網糸期に達しており、卵胞の発達も皮質内層で認められるようになった(図2G-N)。しかしながら、生後18日まではタイプ4より発達した卵胞は認められなかった。タイプ5aの卵胞は生後20日になって初めて現れた(図2N)。

Table 1. Neonatal age-dependent distribution of oocytes at the different meiotic stages in normal Chinese hamsters.

Age at sacrifice (days)	Number of animals	Number of oocytes per animal (s.e.)	Distribution of oocytes					
			pachy.	dip./dit.	dit.-3a	dit.-3b	dit.-4	dit.-5a
0	9	21111 (5027)	21111 (100.0%)	0	0	0	0	0
2	7	18600 (5125)	12803 (68.8%)	5797 (31.2%)	0	0	0	0
4	6	13300 (1977)	960 (7.2%)	12287 (92.4%)	53 (0.4%)	0	0	0
6	7	12500 (2794)	129 (1.0%)	11571 (92.6%)	680 (5.4%)	120 (1.0%)	0	0
8	8	11906 (2722)	43 (0.3%)	11010 (92.5%)	495 (4.2%)	350 (2.9%)	8 (0.1%)	0
10	6	12863 (2533)	0	11503 (89.4%)	597 (4.6%)	743 (5.8%)	20 (0.2%)	0
12	7	12408 (1642)	0	11094 (89.4%)	486 (3.9%)	634 (5.1%)	194 (1.6%)	0
14	5	8692 (1762)	0	7540 (86.7%)	520 (6.0%)	500 (5.8%)	132 (1.5%)	0
16	6	8570 (1477)	0	6998 (81.7%)	705 (8.2%)	670 (7.8%)	197 (2.3%)	0
18	5	8376 (957)	0	6808 (81.3%)	684 (8.2%)	736 (8.8%)	148 (1.8%)	0
20	8	7759 (535)	0	6392 (82.4%)	622 (8.0%)	570 (7.3%)	173 (2.2%)	3 (0.04%)

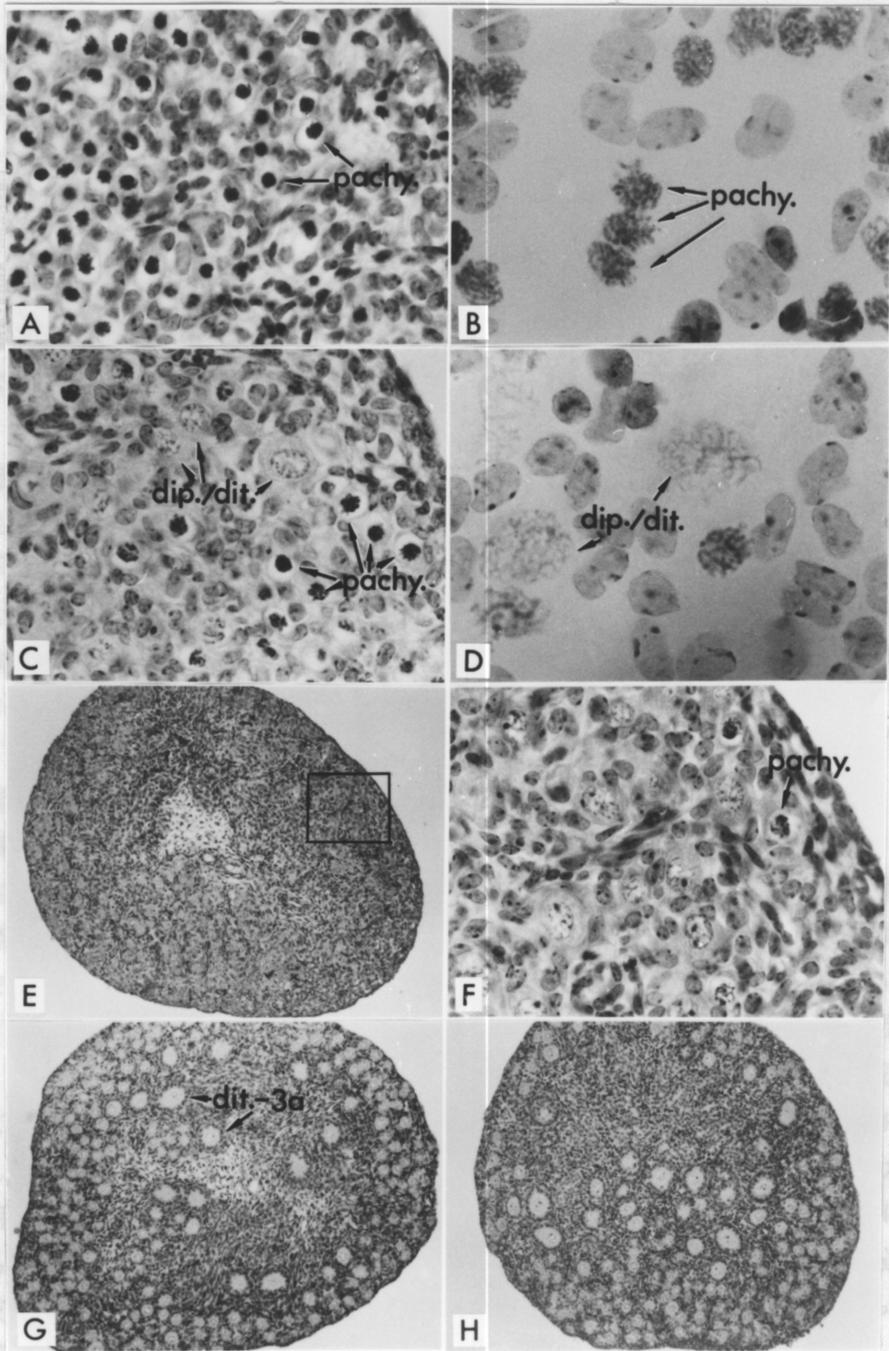


図 2. チャイニーズハムスター新生仔卵巢の組織像（次項に続く）

(2) X線照射による卵細胞死の発生
 照射後48時間生き残っている卵子の成熟段階とそれの数を
 Table 2に示した。本照射卵巣と照射卵巣の卵細胞数を比較する

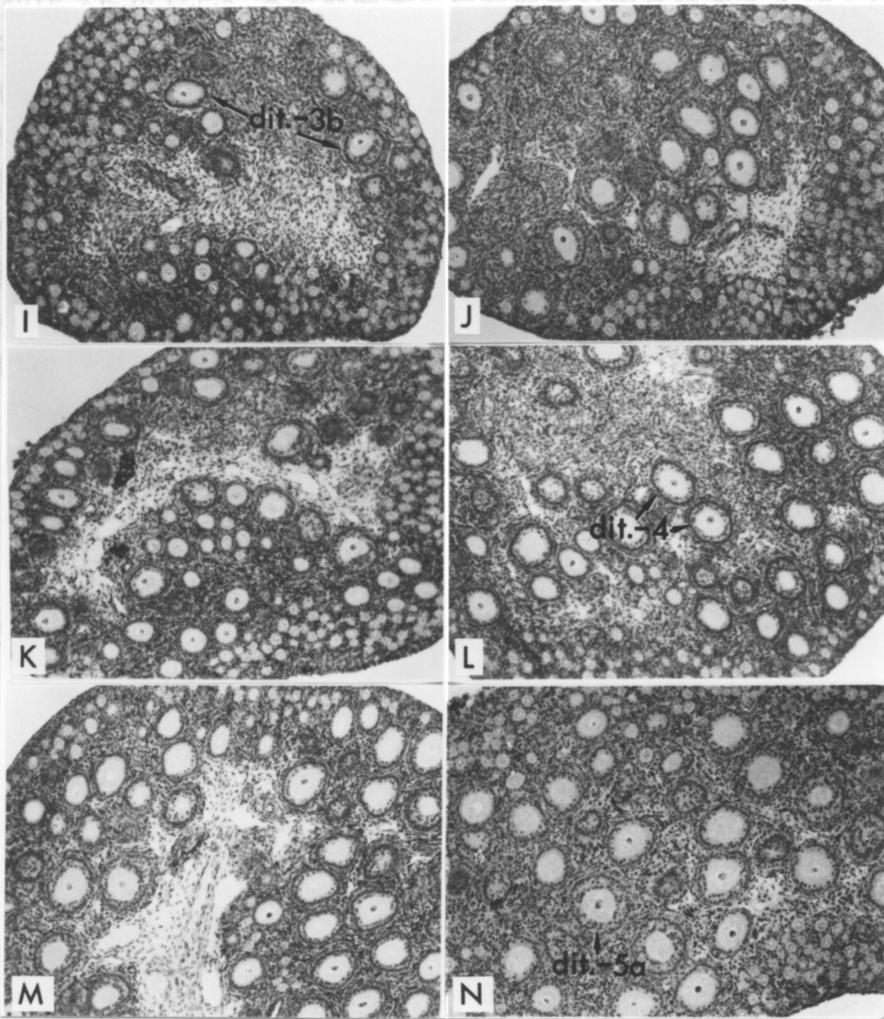


図2. チャイニーズハムスター新生仔卵巣の組織像
 A, B (押しつぶし) : 生後0日; C, D (押しつぶし) : 生後2日; E, F : 生後4日; G : 生後6日; H : 生後8日;
 I : 生後10日; J : 生後12日; K : 生後14日; L : 生後16日;
 M : 生後18日; N : 生後20日

Table 2. Numbers of oocytes at the different stages in animals killed at 48 hours after X-irradiation with 1 Gy.

Age at irradiation (days)	Age at sacrifice (days)	Number of animals	Number of oocytes per animal (s.e.)	Survival of oocytes (s.e.)						Irrad./ control (%)
				pachy.	dip./dit.	dit.-3a	dit.-3b	dit.-4	dit.-5a	
0	2	7	18902 (2460)	14311 (1751)	4591 (2388)	0	0	0	0	101.6
2	4	6	8820 (1450)	577 (231)	8243 (1369)	0	0	0	0	66.3
4	6	9	1065 (363)	76 (56)	973 (362)	16 (15)	0	0	0	8.5
6	8	8	976 (419)	0	453 (271)	258 (150)	265 (120)	0	0	8.2
8	10	7	848 (209)	0	149 (123)	305 (81)	391 (160)	3 (7)	0	6.6
10	12	5	3452 (1445)	0	1680 (844)	656 (327)	940 (223)	176 (238)	0	27.8
12	14	6	4361 (2045)	0	3129 (1811)	462 (141)	617 (75)	153 (66)	0	50.2
14	16	6	6203 (1810)	0	4662 (1635)	645 (203)	683 (97)	213 (64)	0	72.4
16	18	5	7416 (757)	0	5816 (659)	720 (66)	648 (83)	236 (45)	0	88.5
18	20	6	7593 (976)	0	6137 (925)	563 (34)	680 (95)	220 (21)	7 (3)	97.9

(2) X線照射による卵細胞死の誘発

照射後48時間で生き残っている卵子の成熟段階とそれらの数をTable 2に示した。未照射卵巣と照射卵巣の調査結果を比較するために、Table 1とTable 2のデータを図3に図式化した。生後0日の照射は卵子の生存率や成熟分裂には影響を及ぼさなかったことから、太糸期卵子は放射線抵抗性であることが明らかになった(図4A)。生後2日に照射され生後4日に調査された個体の卵巣では、卵子数が対照の66%にまで減少していた(図4B)。太糸期卵子の自然退化による卵子数の減少を考慮すると、X線で死滅した卵子数は照射時の生後2日に観察された複糸期～初期網糸期の卵子数とほぼ一致していた。照射卵巣に生き残っている複糸期～初期網糸期の卵子

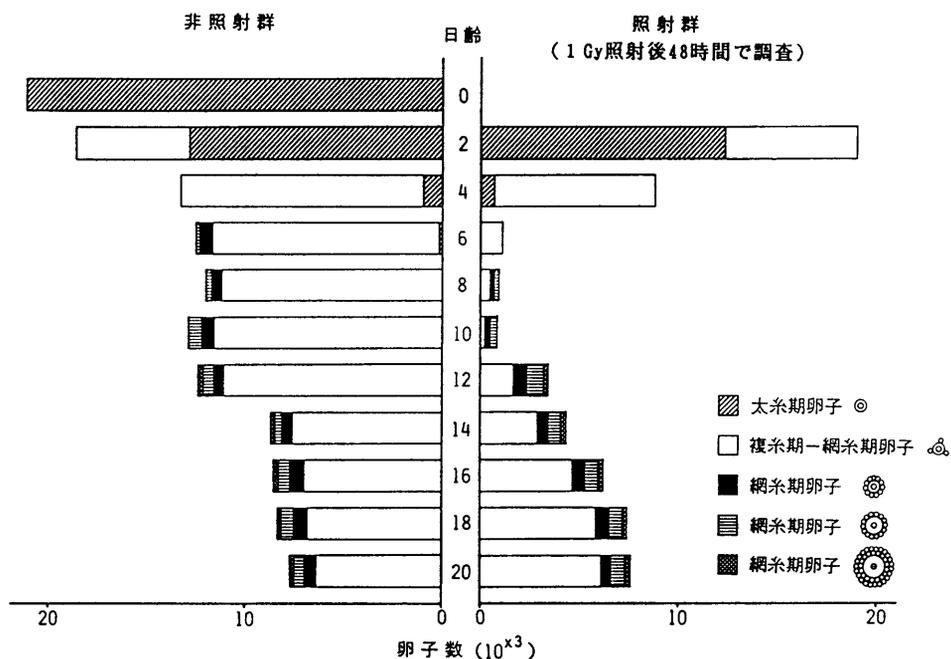


図3. 非照射卵巣および照射卵巣における卵子成熟段階と卵子数

は照射時に抵抗性の太糸期にあったものが2日の間に発達したものである。生後4日の照射では卵細胞死による著しい卵子数の減少が認められ、複糸期～初期網糸期の卵子が放射線高感受性であることが明かとなった(図4C)。照射卵巣の周辺部に生き残っている複糸期～初期網糸期の卵子は照射時(生後4日)卵巣で観察された太糸期から発達したものである(図4D)。一方、卵胞の発達したタイプ3aおよび3bの卵子が観察できなかったことから、これらのステージへ発達するはずの複糸期～初期網糸期の卵子がX線によって完全に死滅したことが明らかになった。生後6日と8日の照射でも顕著な卵子数の減少がみられたが、生後4日での照射結果とは異なりタイプ3aと3bの卵胞が観察できた(図4E)。これらの卵子はすでに放射線高感受期を通過して発達していた卵子である。生後10日以後に照射された個体の卵巣にはかなりの数の網糸期卵子に加え、卵胞の発達した網糸期卵子が生き残っており(図4F-H)、日齢が進むにつれ、卵子の放射線抵抗性が増すことが示された。生後18日の照射では卵子数の減少はほとんど見られなかった(図4H)。

今回の研究によりチャイニーズハムスターにおける日齢に伴う卵子の成熟過程および放射線感受性の変化はマウス(Peters, 1969)、ラット(Mandl, 1959; Beaumont, 1962)とは異なることが明らかになった(図5)。

【考察】

チャイニーズハムスターでは卵成熟の進行が同調していたので、生後0日に太糸期にあった卵子の大部分は数日の内に複糸期をへて網糸期へと発達した(Table 1)。ラットやマウス、ゴールデンハムスターにおいても成熟分裂の進行は同調している。特にラットでは生まれる1日前(受精後21日目)の胎仔の卵巣卵のほとんど全てがチャイニーズハムスターと同様、太糸期であり、それらは生後5日のうちに複糸期～網糸期にはいることが報告されている(Beaumont and Mandl, 1962)。一方、ゴールデンハムスターにおいては生後0日

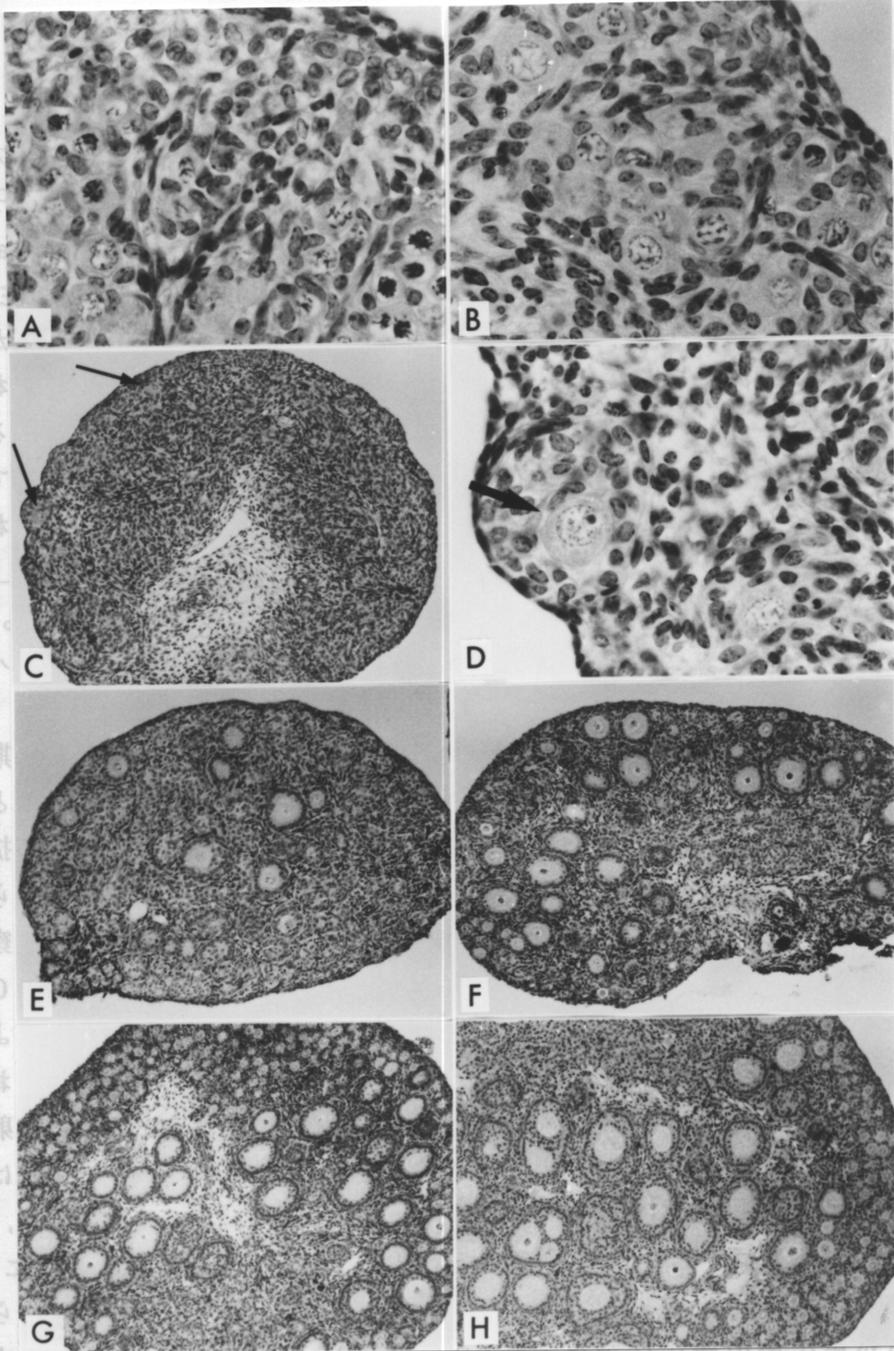


図4. 照射後48時間の卵巢組織像
 A: 生後2日; B: 生後4日; C、D: 生後6日; E: 生後10日; F: 生後12日; G: 生後16日; H: 生後20日

の卵巢には活発に分裂・増殖している卵原細胞が含まれており、太糸期卵子は生後4日で多くなり、生後9日までにはほとんどの卵子が複糸期に達すると報告されている(Lemon and Morton, 1968; Challoner, 1974)。卵成熟に関していえば、ゴールデンハムスターの生後4日はラットやチャイニーズハムスターの誕生日にあたる。したがって、ゴールデンハムスターの短い妊娠期間(16日)を考慮すれば、この動物の卵成熟の進行も他のゲッ歯類と同様であると言える。マウスでは卵成熟の進行は系統によって異なっている。Street系では、誕生日の卵巢には太糸期と複糸期の卵子がほぼ1:1で含まれているが(Borum, 1961)、Swiss albino random-bred系では90%以上の卵子が誕生日にはすでの網糸期まで発達している(Speed, 1982)。いずれの系統においても、卵成熟の進行はラットやチャイニーズハムスターのように同調していない。

X線照射の調査結果より、チャイニーズハムスター卵子は太糸期には放射線抵抗性であるが、複糸期から初期網糸期には高感受性となること明らかになった。また、休止性の網糸期になると再び抵抗性となり、卵胞が発達にするにつれ、より抵抗性を増すことも明らかになった。図5に示したように、チャイニーズハムスターで観察された放射線感受性の変化はラットのそれと似ていたが、生後10日以後においては、チャイニーズハムスターの方がラットに比べより抵抗性となった。マウスでは放射線高感受期が長期におよんでおり、成熟段階への依存性は乏しい。マウスの初期網糸期卵子が放射線高感受性であることは示されているが、太糸期の卵子に関しては明らかに矛盾がある。Rugh and Jackson(1958), Russell et al., (1959), Rugh and Wohlfrohm (1964)らは卵子の大部分が太糸期にある胎生15.5日から誕生日までの胎仔にX線を照射しても不妊にならないが出生後の新生仔では不妊になりやすいことを報告した。一方、Peters(1961)は誕生日に放射線を照射された卵巢皮質に退化卵子が観察されたことから、太糸期卵子は放射線高感受性であると結論した。しかしながら、Baker (1971)は Peters が観察した退化卵子は

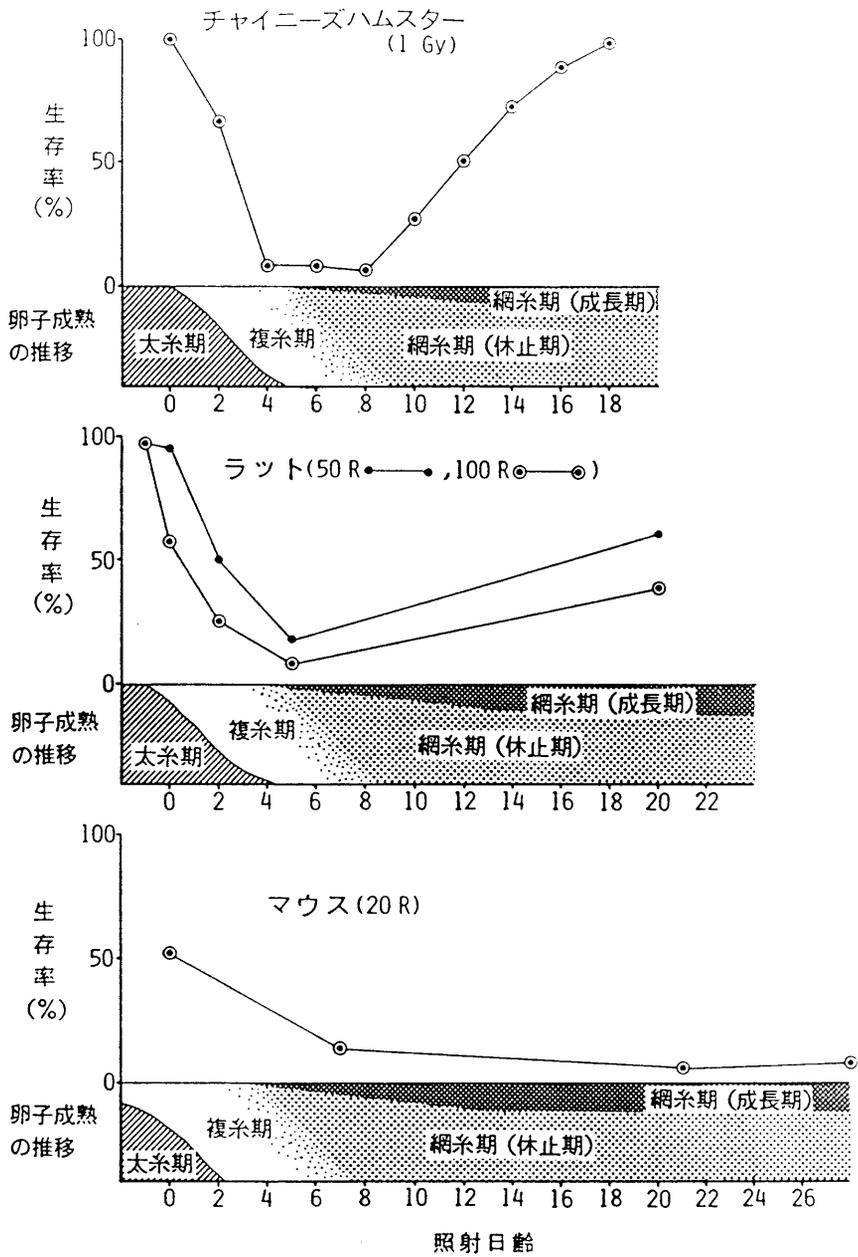


図5. ゲツ歯類3種の新生仔における卵子成熟過程と放射線感受性の変化

太糸期で起きる卵子の自然退化であろうと推察している。これまでのマウス、ラットを用いた研究結果と今回のチャイニーズハムスターの研究結果を考え合わせると、ゲッ歯類の卵子は細糸期から太糸期にかけては放射線抵抗性であるが、次の複糸期から初期網糸期には急に高感受性となり、また休止期に入ると抵抗性を獲得し、その抵抗性は卵胞の成長につれて高くなると結論できるであろう。ただし、日齢にともなう感受性の変化には種差があって、チャイニーズハムスターではマウス、ラットに比べその変化が劇的である。

卵細胞死の標的器官は核 (DNA) であると考えられてきた (Baker et al., 1969; Baker, 1971; Baker and Neal, 1977)。ところが、最近になって卵細胞膜の損傷が卵細胞死の原因であるとも示唆されている (Dobson and Felton 1983; Straume et al. 1987)。現在のところ、決定的な証拠は見つかっておらず、今後の研究に待たなければならない。

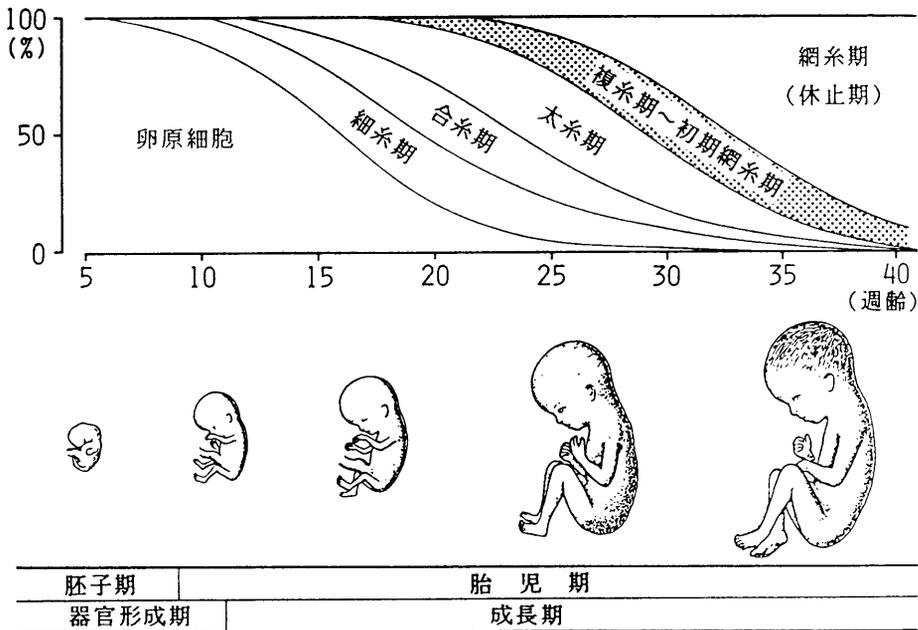


図 6. ヒト胎児期における卵巣卵の成熟過程

最近になって、新生仔あるいは幼若マウスの放射線高感受性卵子はある種の化学物質に対しても傷つきやすいことが明らかにされてきた(Dobson and Felton, 1983; Shiromizu and Mattison, 1985)。ヒト胎児では、複糸期～初期網糸期卵子は14週齢以後に出現する(Kurilo, 1981; Speed, 1985; Garcia et al., 1987)。ヒトの卵子もゲッ歯類の卵子と同様、放射線や化学物質に対して高感受性であるならば、妊娠後期にそのような環境変異原に長期間曝されることによって卵細胞死を蒙ることも十分ありうるであろう(図6)。

II. 新生仔期卵巣照射の生殖寿命に及ぼす影響

【はじめに】

マウスやラットにおいては新生仔期に比較的低線量(0.2-0.3 Gy)のX線を照射された個体でも若いうちに不妊になることが知られている(Peters, 1969; Matsumoto, 1971)。両種とも新生仔期の幼若卵巣には放射線高感受性の卵子が多数含まれているので、X線により急性の卵細胞死を蒙りやすい(Peters, 1961, 1969; Beaumont, 1962; Oarkberg, 1962; Peters and Levy, 1964; Baker, 1971; Beker and Neal, 1977; Dobson and Felton, 1983)。このことから、X線照射による生殖能の低下は卵巣卵の減少が原因であると考えられてきた(Baker and Neal, 1977)。

Part Iで述べたように、チャイニーズハムスターにおける卵子の放射線感受性は成熟分裂段階に依存しており、その変化はマウス、ラットよりも劇的である。出生日(生後0日)には全ての卵子が放射線抵抗性の太糸期にあるため、1 GyのX線でも急性の卵細胞死を蒙らない。生後2日以後には放射線高感受性の複糸期から初期網糸期の卵子が急増するため、照射後は卵細胞死により卵巣卵は減少する。特に生後4~8日の照射では90%以上の卵子が死滅する。ところが生後10日以後では放射線抵抗性の休止期(網糸期)卵子が出現するので、照射後に生残する卵子数も増加する。このようにチャイニーズハムスターでは照射後の卵子の生存率およびそれらの成熟分裂段階を照射日齢を指標にして決定できる。

Part IIでは、このチャイニーズハムスターの利点を生かして、新生仔期の卵巣照射が将来の生殖寿命に如何なる影響をもたらすかを調査した。

【材料と方法】

使用したチャイニーズハムスターはすべて旭川コロニー(CHA)から供された。Part Iと同様、新生仔の卵巣を含む下腹部に1 GyのX線

を照射した。照射は生後0、2、4、6、8、10および14日の新生仔を対象に行われた。照射後すぐに新生仔は母親に戻された。生後20日で離乳され、6～8匹の動物が1つのケージで飼育された。

膣開口後、膣スメアにより発情周期開始日（初発排卵日）および発情周期終了日（最終排卵日）が調査された。発情周期を失った個体から卵巣を摘出し、ブアン固定後、通常のパラフィン切片法にて7 μ mの連続切片とした。ヘマトキシリン-エオシン二重染色後、組織標本とした。

【結果】

Table 3に示したように、生後0、2、10、14日に照射された動物の発情周期開始週齢は非照射動物のそれと統計的有意差が認められなかった（t-test; $0.05 < P < 0.87$ ）。一方、生後4、6、8日に照射された個体では明らかに性成熟は遅れていた（ $P < 0.002$ ）。

Table 3. Fertility span of females exposed to 1 Gy X-rays at different neonatal stages.

Age at irradiation	First estrus		Last estrus		Fertility span (weeks)	t-test
	Number of females	Average age \pm s.e. (weeks)	Number of females	Average age \pm s.e. (weeks)		
Control	68	6.7 \pm 0.2	24	92.6 \pm 3.4	85.9	-
Day 0	11	6.8 \pm 0.7	10	90.1 \pm 5.0	83.3	P=0.867
Day 2	10	7.3 \pm 0.9	6	74.3 \pm 3.8	65.0	P=0.021
Day 4	15	9.6 \pm 0.4	11	24.5 \pm 1.7	14.9	P<0.001
Day 6	16	9.6 \pm 0.7	16	25.3 \pm 1.4	15.7	P<0.001
Day 8	17	9.2 \pm 0.6	12	28.3 \pm 0.9	19.1	P<0.001
Day 10	16	7.1 \pm 1.0	10	46.8 \pm 1.5	39.7	P<0.001
Day 14	18	7.4 \pm 0.3	10	78.9 \pm 5.5	71.5	P=0.028

生後0日に照射された個体は90週齢まで安定した発情周期を維持しており、正常な生殖寿命を持つことが明らかになった。しかしながら、生後2日に照射された個体では発情周期は非照射個体よりも早期に消失した($P=0.021$)。生後4、6、8日に照射された個体のほとんどは29週齢までに発情周期を失った。生後10日に照射された個体では、生殖寿命は生後4-8日に照射された個体よりも有意に($P<0.01$)長かったが、非照射個体よりは短かった($P<0.001$)。生後14日に照射された個体のほとんどは約1年半の間、安定した発情周期を維持していたが、非照射個体に比較すれば生殖寿命は明らかに短縮していた($P=0.028$)。

生後4日に照射されて早期に発情周期を失った個体の卵巣は非常に小さかった(図7)。また内部には健康な卵子は含まれておらず、かわりに閉鎖卵胞や大きな囊胞がみつめられた(図8)。

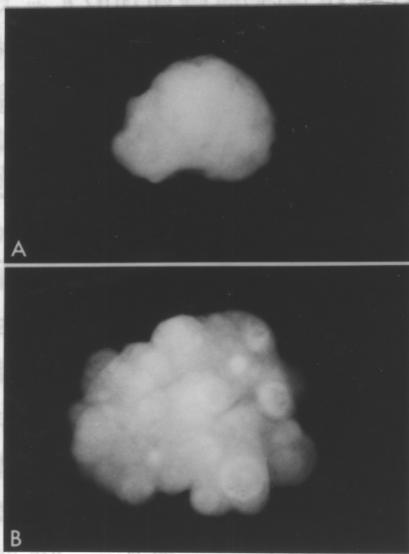


図7. チャイニーズハムスターの6カ月齢の卵巣

A. 照射卵巣； B. 非照射卵巣

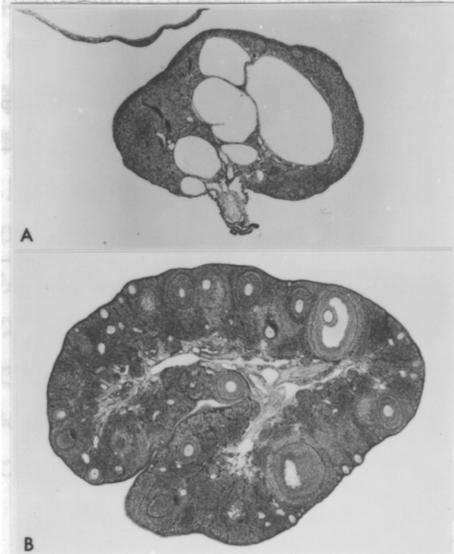


図8. 図7の卵巣組織像

A. 照射卵巣

B. 非照射卵巣

【考察】

被曝個体の生殖寿命と照射後の生存卵子数の関係を調査するために、今回の生殖寿命の結果をPart Iの組織学的研究結果と比較した(図9)。照射日齢に依存した生殖寿命の変化は明らかに照射後の卵子の生存率を反映しており、両者が密接に関係していることが示された。

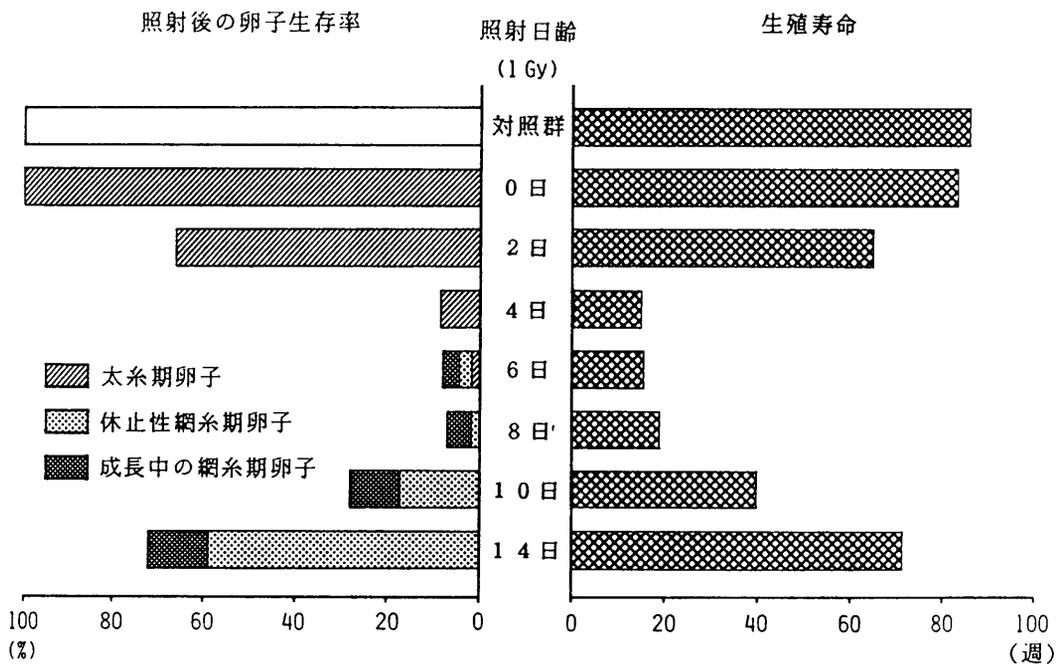


図9. 照射後4-8時間における卵子の生存率と生殖寿命の比較

生後4日-8日に照射された個体における発情周期の早期喪失は卵巣卵の枯渇によるものであることが卵巣の組織学的研究で明らかになった。さらに、これらの個体では発情周期の開始も遅れたことから、新生仔期の卵巣照射による卵巣卵の極端な減少は性成熟の遅

延をもたらすことが示された。マウスでも新生仔期のX線照射による卵細胞死が生殖活動の開始を遅らせることが知られている(Rugh and Wohlfromm, 1964)。これらの結果は正常な生殖機能の発達には新生仔期の卵巣に一定数以上の卵子が必要であることを示唆している。生後10日に照射された個体が正常に性成熟したことを考慮すれば、チャイニーズハムスターでは少なくとも2000以上の卵子が新生仔期卵巣に存在することが正常な性成熟の条件であるのかもしれない。生殖寿命と幼若期卵巣卵数の関係は Baker(1971)、Baker and Neal(1977)らも指摘している。

ヒトでは閉経期までにほとんどの卵巣卵が消失することが知られており(Foot, 1975)、卵巣卵の枯渇が閉経の要因であると考えられている。最近、Dobson(1985)はヒトの胎生期において生殖細胞の50%以上が失われると閉経が早まることを示唆した。サル類を使った研究データ(Dobson et al., 1978; Dobson and Felton, 1983)から、妊娠後期に0.6-3.8cGy/dayの被曝線量が閉経を早期に引き起こすと推論している。ヒトではこの時期に大部分の卵子が放射線高感受性の複糸期から初期網糸期を通過することを考慮すると(Kurilo, 1981; Speed, 1985; Garcia et al., 1987)、この報告は大変興味深い。

一般に、胎生後期から新生仔期は放射線や化学物質のようないわゆる変異原物質の催奇形性作用に対して比較的抵抗性であると言われており、安全性評価の上であまり重要視されてこなかった。しかしながら、本研究結果が示すようにいわゆる「抵抗期」における放射線照射が卵細胞死を誘発し、結果的に生殖能の低下を招いたことは極めて重要なことである。複糸期から初期網糸期の卵子はある種の化学物質に対しても傷つきやすいことが明らかにされてきており(Dobson and Felton, 1983; Shiromizu and Mattison, 1987)、胎生後期から新生仔期は生殖学的に極めて重要な時期であるといえる。

Ⅲ. X線被曝した新生仔期幼若卵子の発生学的、細胞遺伝学的研究

【はじめに】

卵子におよぼす放射線の遺伝的影響はその成熟段階で大きく異なることが知られている。成熟卵巣に含まれる未熟な網糸期卵子ほど放射線感受性が高く、染色体異常や優性致死突然変異、先天異常を誘発されやすいことがマウスを用いた研究で示されている(Searle and Beechey, 1974; Caine and Lyon, 1977; Kirk and Lyon, 1982; Tease, 1983; Nomura, 1979, 1982, 1988)。また、diakinesisから metaphase II の成熟卵子の高感受性についてはマウス(Reichert et al., 1975; Hansmann et al., 1982; Tease and Fisher, 1986)およびチャイニーズハムスター(Mikamo et al., 1981; Mikamo, 1982; Mikamo et al., 1985)の研究で明らかにされている。

一方、胎仔および新生仔の幼若卵巣にみられる細糸期から網糸期卵子に対する放射線の発生学的、遺伝学的影響については十分な研究がなされていない。Part I で示したように、チャイニーズハムスター新生仔では照射日齢により太糸期および休止性網糸期の卵子を選択的に生残させることができる。この特徴を利用して両時期の卵子に対する放射線の影響について調査した。

【材料および方法】

Part I、part II と同様に、生後 0、4、8 および 14 日のチャイニーズハムスター新生仔の卵巣部位に 1 Gy の X 線を照射した。被曝個体が 4 - 5 カ月齢に達したときに正常雄と交配させた。受精卵の染色体分析のために受精後 20 時間目に前核期卵を回収し、第一卵割中期まで培養してからわれわれの漸進固定・空気乾燥法(Mikamo and Kamiguchi, 1983)にて染色体標本を作製した。なお、染色体研究には雌性前核染色体と雄性前核染色体を区別するために転座ホモ雄を用いた(Tateno and Mikamo, 1981)。

胎仔の優性致死および先天異常の調査は妊娠 18.5 日目に行った。

開腹後、黄体数、着床数および生存胎仔数を数えた。胎仔については体重測定後、実体顕微鏡下で外表奇形の有無を調査した。放射線誘発の優性致死率 (DL:%) は下記の Russell and Russell(1956)の計算式に従って求められた。

$$DL(\%) = \left\{ 1 - \frac{\text{生存胎仔数} / \text{黄体数} (\text{照射群})}{\text{生存胎仔数} / \text{黄体数} (\text{対照群})} \right\} \times 100$$

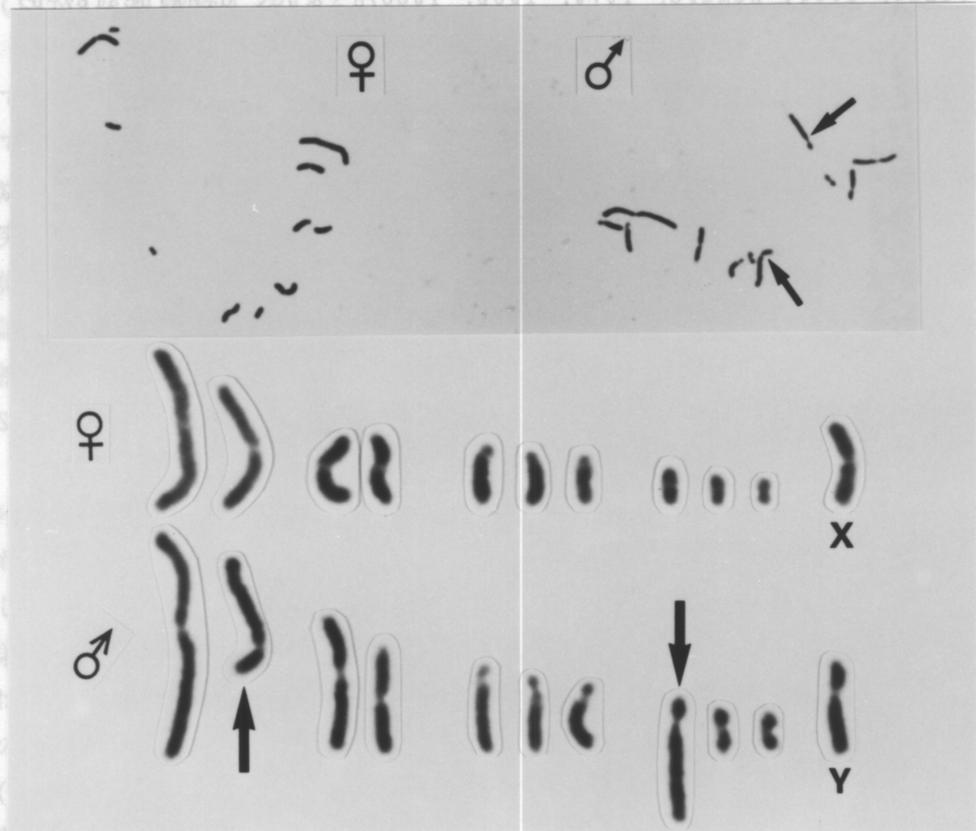


図10. 漸進固定・空気乾燥法による1細胞期染色体標本。矢印は精子由来のマーカー染色体。

【結果】

雌雄両前核染色体が分離した標本において雌性前核染色体のみを分析した(図10)。生後0日～14日までのいずれの照射群においても異数性および構造異常頻度の有意な増加は認められなかった(Table 4)。妊娠18.5日目における着床前死亡率、着床後死亡率も照射群と非照射対照群との間に有意差はなく、放射線による優性致死率の増加はなかった(Table 5)。また生存胎仔における先天異常の増加もみられなかった(Table 6)。

Table 4. Incidences of chromosomal anomalies in female pronuclei of fertilized ova collected from irradiated females.

Age at irradiation	Number of females	Number of female chromosome complements	Aneuploidy (%)	χ^2 -test	Structural aberration (%)	χ^2 -test
Control	54	376	5 (1.3)	-	2 (0.5)	-
Day 0	37	267	5 (1.9)	P>0.8	2 (0.7)	P>0.8
Day 4	46	295	3 (1.0)	P>0.9	2 (0.7)	P>0.7
Day 8	36	216	3 (1.4)	P>0.7	2 (1.4)	P>0.5
Day 14	34	230	2 (0.9)	P>0.9	4 (1.7)	P>0.3

【考察】

今回の研究結果から太糸期、網糸期に1 GyのX線を照射されて生き残った卵子は染色体異常のような致命的な遺伝傷害を持たず、正常に発生することが明らかになった。1 GyのX線は成熟卵子に遺伝的影響を誘発するのに十分な線量である。にもかかわらず影響が見

Table 5. Incidences of pre- and postimplantation death of embryos in the pregnancy of irradiated females.

Age at irradiation	Number of animals	Number of corpora lutea (mean)	Number of implantation sites (% C.L.)	Pre-implantation death (%)	χ^2 -test	Post-implantation death (%)	χ^2 -test	Dominant lethality (%)
Control	23	195 (8.5)	182 (93.3)	13 (6.7)	-	17 (8.7)	-	-
Day 0	22	180 (8.2)	165 (91.7)	15 (8.3)	P>0.5	9 (5.0)	P>0.1	-2.4
Day 4	23	177 (7.7)	163 (92.1)	14 (7.9)	P>0.5	13 (7.3)	P>0.5	-0.2
Day 8	21	149 (7.1)	136 (91.3)	13 (8.7)	P>0.3	14 (9.4)	P>0.8	3.2
Day 14	22	195 (8.9)	177 (90.8)	18 (9.2)	P>0.3	16 (8.2)	P>0.8	2.4

Table 6. Incidences of abnormal fetuses.

Age at irradiation	Number of live fetuses	Number of abnormal fetuses	Type of abnormality
Control	165	2 (1.2%)	underdevelopment umbilical hernia
Day 0	156	0 (0.0%)	
Day 4	150	1 (0.6%)	underdevelopment
Day 8	122	1 (0.8%)	microgenia
Day 14	161	1 (0.6%)	underdevelopment

られなかったことからこれらのステージの卵子は極めて高いDNA修復能を持っていると考えられる。Russell et al., (1959)はほとんどの卵子が太糸期にある出生日に3 GyのX線を照射されたマウスは同じ線量を照射された成熟マウスよりも産仔数が多いことを報告している。また、Carter et al., (1960)も太糸期卵では放射線照射後の遺伝子座当りの突然変異頻度は照射前と変わらないことを示した。これらの結果は太糸期の卵子は遺伝的にも放射線抵抗性であるという我々のチャイニーズハムスターの研究結果を支持するものである。

チャイニーズハムスターを用いたわれわれの一連の研究において、卵子成熟過程には二つの放射線高感受期があることが明らかになった(図11)。その一つは本研究で明らかにしたように複糸期～初期網糸期で、放射線の細胞致死作用に敏感であり、もう一つは排卵

チャイニーズハムスター

卵細胞死	(LD ₅₀ :40cGy)	
染色体異常		(43%)
優性致死		(55%)
先天異常		(5%)

マウス

卵細胞死	(LD ₅₀ :6cGy)	
染色体異常		(10-15%) (87%)
優性致死		(10-25%) (74-87%)
先天異常		(2-5%) (未調査)

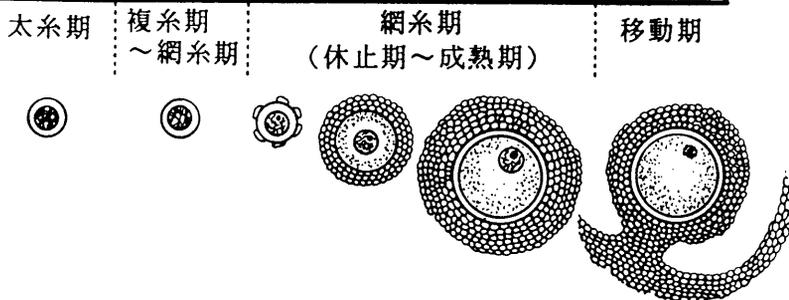


図 1 1. チャイニーズハムスターおよびマウスの卵子成熟過程における放射線感受性の変化。() 内の数値は 2 Gy の X 線照射による誘発率。

直前の diakinesis から metaphase II の時期で、染色体異常、優性致死、先天異常のような遺伝的障害を受けやすい (Mikamo et al., 1981; Kamiguchi and Mikamo, 1982; Mikamo, 1982; Mikamo et al.,

1985)。さらに、太糸期卵子や休止性網糸期卵子がきわめて放射線抵抗性であることも本研究の重要な発見の1つである。このような卵子成熟過程における放射線感受性の変化はマウス卵子でも同様であるが、いずれの指標でみてもマウス卵子の方がチャイニーズハムスター卵子に比べかなり感受性が高いことがわかる。このような卵子の放射線感受性の動物種における違いが何に起因しているかは未だ明かにされていないが、マウス卵子の致死標的器官はチャイニーズハムスター卵子のそれよりも放射線感受性が高いこと、またチャイニーズハムスター卵子のDNA修復能がマウス卵子よりも高いことなどが考えられる。

IV. 複糸期・初期網糸期卵子に及ぼす低線量X線の急性および晩発性効果

【はじめに】

Part Iで述べたようにチャイニーズハムスター新生仔の幼若卵巢にある複糸期～初期網糸期卵子は放射線高感受性で1 GyのX線で完全に死滅する。これらの卵子が死滅しないような低い線量を照射された場合、その影響がDNA傷害として固定され経代的影響につながる危険性がある。

そこで、このpartでは複糸期～初期網糸期卵子に1 Gy以下のX線を照射し、これまでのpartと同様、卵子の生存率、被曝個体の生殖寿命、および卵子の染色体異常率、発生異常率を調査した。

【材料および方法】

X線照射はほとんどの卵子が複糸期～初期網糸期にある生後6日に行った。照射線量は0.1 Gy、0.25 Gy、0.5 Gyとした。

照射後の卵子の生存率はPart Iと同じ方法で計算された。照射後48時間で卵巢を摘出し、ブアン固定後、通常のパラフィン切片法にて連続組織標本を作製した。

Part IIと同様にして被曝個体の生殖寿命も調査した。また、part IIIと同様に、前核期卵の染色体分析、妊娠18.5日での胎仔発生調査を行い、生存卵子の染色体異常誘発率、優性致死誘発率を求めた。

【結果】

(1) 照射卵巢の組織学的研究

各線量を照射された卵巢における卵子数を Table 7 に示した。0.1Gy および 0.25Gy 照射群では卵子数の有意な減少はみられなかった。一方、0.5Gy照射では急性の卵細胞死が生じ、およそ70%の卵子が死滅した。特に複糸期～初期網糸期卵子の減少が著しかった。いずれの照射卵巢においても退化中の卵子は見られず、生存卵子お

よび卵胞細胞は正常であった(図12)。

Table 7. Number of ovarian oocytes in females exposed to X-rays of different doses on day 6 after birth.

Dose (Gy)	Number of animals	Number of oocytes per animal (s.e.)	Distribution of oocytes					Irrad./control (%)
			pachy.	dip./dic.	dic.-3a	dic.-3b	dic.-4	
0	8	11906 (2722)	43	11010	495	350	8	-
0.10	9	11223 (1451)	7	9996	840	362	18	94.3
0.25	8	11019 (2032)	25	9933	753	300	8	92.5
0.50	8	3769 (1091)	3	2878	555	320	13	31.7

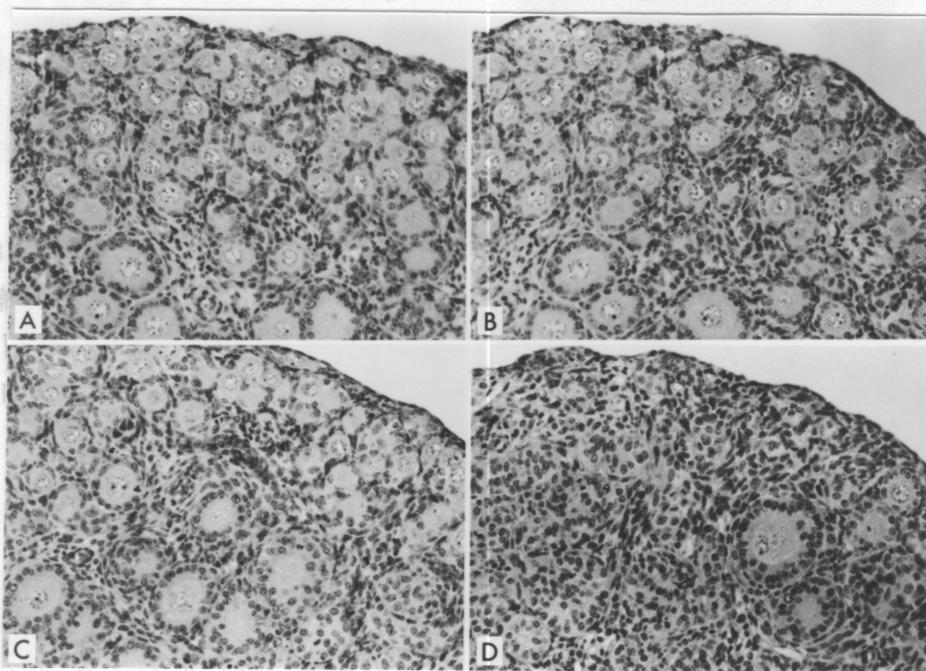


図12. 生後6日にいろいろなX線線量を照射された卵巣の組織像(生後8日で調査)。A: 非照射卵巣; B: 0.1 Gy照射卵巣; C: 0.25 Gy照射卵巣; D: 0.5 Gy照射卵巣

(2) 被曝個体の生殖寿命

各照射群の発情周期開始週齢および終了週齢を Table 8 に示した。0.1 Gy および 0.25 Gy 照射群においては開始および終了週齢は非照射対照群と有意差がなく、正常な生殖寿命を持つことが明らかになった。一方、0.5 Gy 照射群では性成熟は遅れ、発情周期を早期に喪失し、生殖寿命が短縮していた。

Table 8. Fertility span of females exposed to X-rays of different doses.

Dose (Gy)	First estrus		Last estrus		Fertility span (weeks)	t-test
	Number of females	Average age + s.e. (weeks)	Number of females	Average age + s.e. (weeks)		
0	68	6.7 ± 0.2	24	92.6 ± 3.4	85.9	-
0.10	19	7.7 ± 0.5	10	94.4 ± 5.4	86.7	P>0.9
0.25	23	7.1 ± 0.3	12	83.5 ± 3.9	76.4	P>0.1
0.50	15	8.0 ± 0.4	12	58.2 ± 2.8	50.2	P<0.001

(3) 雌性前核染色体異常

染色体分析は 0.25Gy 照射群および 0.5Gy 照射群から得られた前核期卵を使って行われた (Table 9)。両照射群とも 200 以上の雌性前核の染色体分析を行ったが異数性および構造異常頻度の有意な増加は見られなかった。

Table 9. Incidences of chromosome aberrations in female pronuclei.

Dose (Gy)	Number of animals	Number of female complements analysed	Aneuploidy	χ^2 -test	Structural aberration	χ^2 -test
			(%)		(%)	
0	54	376	5 (1.3)	-	2 (0.5)	-
0.25	32	235	6 (2.5)	P>0.2	0 (0.0)	-
0.50	29	205	3 (1.3)	P>0.5	4 (1.8)	P>0.5

(4) 胎仔発生成績

いずれの照射群においても着床前および着床後死亡率は対照群との間に有意差を示さなかった (Table 10)。また、生存胎仔における先天異常の増加もなかった (Table 11)。

Table 10. Incidence of pre- and postimplantation death in the pregnancy of irradiated females.

Dose (Gy)	Number of animals	Number of corpora lutea (mean)	Pre-implantation death (%)	χ^2 -test	Post-implantation death (%)	χ^2 -test	Total (%)	χ^2 -test
0	32	307 (9.6)	24 (7.8)	-	28 (9.1)	-	52 (16.9)	-
0.10	24	244 (10.2)	30 (12.3)	P>0.05	14 (5.7)	P>0.1	44 (18.0)	P>0.7
0.25	23	232 (10.1)	23 (9.9)	P>0.3	17 (7.3)	P>0.3	40 (17.2)	P>0.9
0.50	24	228 (9.5)	18 (7.9)	P>0.9	21 (9.2)	P>0.9	39 (17.1)	P>0.9

Table 11. Incidence of abnormal fetuses

Dose (Gy)	Number of live fetuses	Number of abnormal fetuses (%)	Type of abnormality
0	255	2 (0.8)	underdevelopemnt
0.10	200	0 (0.0)	-
0.25	192	3 (1.6)	underdevelopment
0.50	189	3 (1.6)	underdevelopment subcutaneous hemorrhage tail less

【考察】

チャイニーズハムスターの複糸期～初期網糸期卵子は 0.25 Gy 以下の線量で殆ど細胞死を蒙らなかったが、0.5 Gyでは細胞死による著しい卵子数の減少がみられた。この結果は卵細胞死には域値があることを示唆するものである。この点に関しては照射線量を細かく設定して詳細に調べる必要がある。一方、マウスでは 0.1 Gy および 0.25 Gyの X線はそれぞれ 50%、90%以上の卵子を死滅させることが知られており (Oarkberg, 1962; Peters, 1969; Baker, 1972)、複糸期～初期網糸期卵子の放射線感受性に種差のあることは甚だ興味深い。

0.1 Gy、0.25 Gy照射個体が正常な生殖寿命を維持していたことは、逆に言えば照射によって急性および晩発性の卵細胞死が起きなかったことを示している。一方、0.5 Gy 照射個体における性成熟遅延の現象は part II で述べた生後 4、6 および 8 日に 1 Gyの X線照射個体における性成熟の遅延と同様、卵巣卵の著しい減少が原因である。今回の結果も新生仔期の卵巣卵数と生殖寿命との間には密接な関係のあることを示しており、part II の結果をよく裏付けている。

いずれの照射群においても染色体異常、優性致死、先天異常の増加がみられなかった。このことから、複糸期～初期網糸期卵子は高い線量の X線を照射されると細胞死を蒙り、細胞死を蒙らない程度の線量では、遺伝的障害を持たず正常に発生するという、いわゆる all or none的性質を持つことが明らかになった。低線量照射の場合、複糸期～初期網糸期卵子に生じた DNA 障害は照射後すぐに修復されるか、あるいは照射後、排卵までの長い網糸期の間には修復されるものと考えられる。

V. 放射線高感受期卵子におよぼす超音波の影響

【はじめに】

近年、産婦人科領域において超音波は胎児診断の手段として重要なものとなっており、発達中の卵巣卵が超音波に曝される機会は益々増加する傾向にある。超音波の安全性に関してはこれまで分子レベル、細胞レベルあるいは胎仔奇形発生の点から評価されてきたが (WHO, 1982)、幼若卵巣卵におよぼす超音波の影響についてはいまだまったく研究がない。先述したようにヒトでは胎生後期から出生までの間に複糸期～初期網糸期の卵子が出現することから (Kurilo, 1981; Speed, 1985; Garcia et al., 1987)、この時期が生殖学的に極めて重要な時期である。この part では、特に放射線高感受性の複糸期から初期網糸期卵子が大部分を占める日齢に超音波照射を行い、part I から part IV までの放射線研究と同様の方法論で、卵細胞死や優性致死の誘発率および生殖寿命を調査した。

【材料および方法】

生後 6 日 (90%以上の卵子が複糸期～初期網糸期) のチャイニーズハムスターに平均音響強度 $3.25\text{W}/\text{cm}^2$ の超音波を照射した。照射装置 (USP-1型) および照射条件は Shimizu and Tanaka (1981) の方法に準じた。動物の胴部を 37°C の温水中に浸し、その真下に超音波発生装置の振動子をおいて 5 分間の連続照射を行った (図 1 3)。照射後 10 日 (生後 16 日) で卵巣を摘出し、プアン固定後、通常のパラフィン切片法にて連続切片 ($5\ \mu\text{m}$) を作製して生存卵子数を調査した。また、発情周期の開始と終了を調査し生殖寿命を測定した。被曝個体が 4 - 5 カ月齢に達したときに正常雄と交尾させ、妊娠 18.5 日目における胎仔発生を調査した。

【結果】

照射群と対照群の卵巣卵数を Table 12 に示した。照射群の卵子生

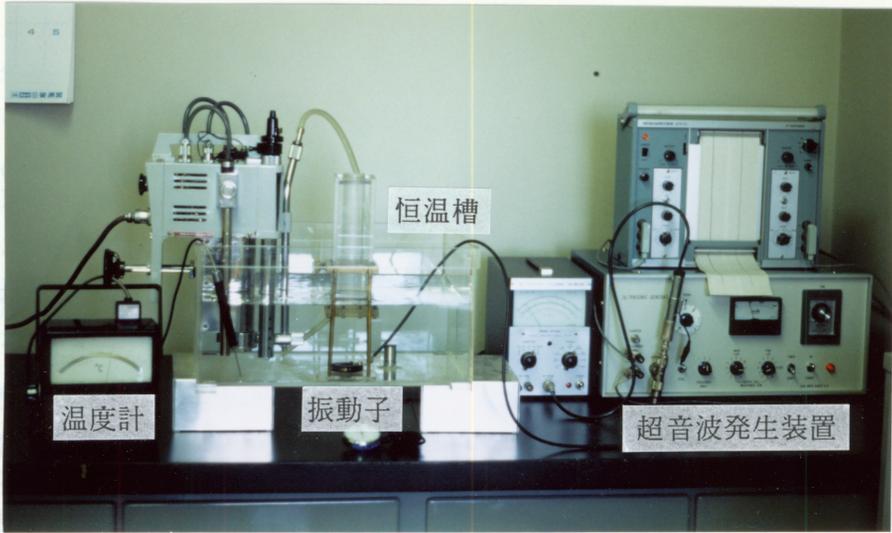


図 1 3. 超音波照射装置

存率は95.4%とやや減少していたが、対照群との間に有意差はなかった。また、照射動物における発情周期の開始と終了は非照射動物とほとんど同時期に起こっており、超音波照射が性成熟の遅延や生殖寿命の短縮を誘発することはなかった (Table 13)。妊娠18.5日での胎仔発生成績において (Table 14)、照射群の着床前死亡率がやや高かったが有意な増加ではなかった (χ^2 -test; $P>0.05$)。着床後死亡率は対照群と同様であった。異常胎仔の出現頻度および異常のタイプについても両群で違いはなかった (Table 15)。

Table 12. Number of ovarian oocytes in females killed at 10 days after exposure to ultrasound (3.25 W/cm^2).

Group	Number of animals	Number of oocytes per animal (s.e.)	Distribution of surviving oocytes				Survival rate of oocytes
			dip./dit.	dit.-3a	dit.-3b	dit.-4	
Control	6	8570 (1477)	6998	705	670	197	-
Sonicated	7	8178 (993)	6912	597	454	214	95.4%

Table 13. Fertility span of females exposed to ultrasound

Group	First estrus		Last estrus		Fertility span (weeks)	t-test
	Number of animals	Average age + s.e. (weeks)	Number of animals	Average age + s.e. (weeks)		
Control	68	6.7 ± 0.2	24	92.6 ± 3.4	85.9	-
Sonicated	19	6.9 ± 0.2	17	91.9 ± 2.3	85.0	P>0.9

Table 14. Incidences of pre- and postimplantation death in the pregnancy of females exposed to ultrasound.

Group	Number of animals	Number of corpora lutea (mean)	Pre-implantation death (%)	Post-implantation death (%)	Total (%)	χ^2 -test
Control	32	307 (9.6)	24 (7.8)	28 (9.1)	52 (16.9)	-
Sonicated	26	270 (10.4)	34 (12.6)	25 (9.3)	59 (21.9)	P>0.1

Table 15. Incidence of abnormal fetuses

Group	Number of live fetuses	Number of abnormal fetuses (%)	Type of abnormality
Control	255	2 (0.8)	underdevelopment
Sonicated	211	2 (0.9)	underdevelopment

【考察】

今回使用した超音波の出力は通常の胎児診断で使われている出力（約10 mW/cm²）よりもはるかに高いものである。それにもかかわらず超音波照射による卵細胞死が認められなかったことから、複糸期～初期網糸期卵子は放射線に対しては高感受性で容易に死滅するが、超音波に対しては抵抗性であることが示唆された。いまだ卵細胞致死の標的器官が解明されていないが、放射線と超音波では卵子に対する作用機序が全く異なるものと考えられる。

被照射個体の性成熟や生殖寿命に及ぼす影響、幼若卵子に対する遺伝的影響についても結果は否定的であった。ただ、照射群で着床前死亡率がやや高かったことから、超音波によって卵子の受精能が低下したか、あるいは染色体異常が誘発された可能性は完全には否定できない。

体細胞を用いたこれまでの研究結果から、超音波が染色体異常や突然変異のような遺伝的傷害を誘発する可能性は低いと考えられている（WHO, 1982; Miller et al., 1983; Thacker, 1985）。Lyon and Simpson (1974) はマウスの精巣、卵巣に超音波を照射しても精子や卵子に染色体異常や優性致死突然変異の増加はないと報告した。今回、我々は放射線高感受期の卵子を用いて調査したにもかかわらず、これまでの研究と同様に影響の有無に関して否定的な結果となった。しかしながら、今回の調査は特定の成熟段階にある卵巣卵に対する影響をみたものであり、この結果から超音波の影響がないという結論をだすのはまだ尚早である。卵子はその成熟分裂の過程で外的因子に対する感受性を刻一刻と変化させているので、安全性を正しく評価するには染色体研究を含めたさらなる研究が必要である。今後は放射線抵抗性の太糸期、休止性網糸期卵子に対する影響調査や、動物種をかえた幅広い研究が必要であろう。

結論および摘要

チャイニーズハムスター新生仔（生後0日～20日）を用いて卵子成熟過程におけるX線(0.1-1.0 Gy)および超音波(3.25 W/cm²)の影響を急性卵細胞死、生殖機能障害、卵子の染色体異常、胎仔における優性致死、先天異常などの点から詳細に検討した。その結果、以下の点が明らかになった。

(1) 卵巣卵の放射線感受性はその成熟段階に依存して劇的に変化した。すなわち、複糸期～初期網糸期の卵子は1 GyのX線により細胞死を蒙ったが、その直前の太糸期と直後の休止性網糸期卵子はきわめて抵抗性であった。

(2) 新生仔期の卵巣のなかにある卵子数はその後の生殖機能の発達と密接な関係があり、著しい卵細胞死を蒙った個体では性成熟の遅延が起こった。また、卵子数の減少に応じて生殖寿命は短縮した。

(3) 照射後生き残った太糸期卵子および休止性網糸期卵子は正常に成熟した。また、染色体異常や優性致死突然変異のような致命傷を蒙ることなく成熟し、受精後は正常に発生した。

(4) 低線量照射後に生き残った複糸期～初期網糸期卵子に関してみると、染色体異常、優性致死突然変異の増加はなく、胎仔発生も正常であった。

(5) 放射線高感受性の複糸期～初期網糸期卵子は超音波によって死滅しなかった。優性致死や先天異常の経代的影響はなかった。

最近では、卵子成熟過程における放射線感受性の変化はヒトやゲッ歯類を問わず哺乳類に共通したものであると考えられるようになってきた。しかし、超音波が産科領域などで多用されている現状からみて、本研究により超音波がX線などとは異なる性質をもつもので、脆弱な未成熟卵に対してもほとんど影響しないらしいことが示唆されたことは幸いであった。

参考文献

- Andersen, A.C., Hendrickx, A.G. and Momeni, M.N.: Fractionated X-irradiation damage to developing ovaries in the bonnet monkey (*Macaca radiata*). *Radiat. Res.* 71: 398-405 (1977).
- Andersen, A.C. and Simpson, M.E.: Effect of fractionated X-irradiation during oogenesis in the beagle. *Radiat. Res.* 43: 232 (1979). Abstract.
- Baker, T.G.: Comparative aspects of the effects of radiation during oogenesis. *Mutation Res.* 11: 9-22 (1971).
- Baker, T.G.: Oogenesis and ovarian development. In "Reproductive Biology" (H. Balin and S.R. Glasser, eds.), pp. 397-437. *Excerpta Med. Found.*, Amsterdam, 1972.
- Baker, T.G. and Beaumont, H.M.: Radiosensitivity of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal monkey. *Nature (London)* 214: 981-983 (1967).
- Baker, T.G. and Neal, P.: The effects of X-irradiation on mammalian oocytes in organ culture. *Biophysik* 6: 39-45 (1969).
- Baker, T.G. and Neal, P.: Action of ionizing radiation on the mammalian ovary. In "The Ovary III: Regulation of oogenesis and steroidogenesis" (P.L. Zuckerman and B.J. Weir, eds), pp. 1-58, Academic Press, New York, 1977.
- Beaumont, H.M.: Radiosensitivity of oogonia and oocytes in the foetal rat. *Int. J. Radiat. Res.* 3: 59-72 (1961).
- Beaumont, H.M.: The radiosensitivity of germ-cells at various stages of ovarian development. *Int. J. Radiat. Biol.* 4: 581-590 (1962).
- Beaumont, H.M.: The effects of acute X-irradiation on

- primordial germ-cells in the female rats. *Int. J. Radiat. Biol.* 10: 17-28 (1966).
- Beaumont, H.M. and Mandl, A.M.: A quantitative and cytological study of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B* 155: 557-579 (1962).
- Borum, K.: Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase. *Exp. Cell Res.* 24: 495-507 (1961).
- Caine, A. and Lyon, M.F.: The induction of chromosome aberrations in mouse dictyate oocytes by X-rays and chemical mutagens. *Mutation Res.* 45: 325-331 (1977).
- Carter, T.C., Lyon, M.F. and Phillips, R.J.S.: The genetic sensitivity to X-rays of mouse foetal gonads. *Genet. Res.* 1: 351-355 (1960).
- Challoner, S: Studies of oogenesis and follicular development in the golden hamster. 1. A quantitative study of meiotic prophase in vivo. *J. Anat.* 117: 373-383 (1974).
- Dobson, R.L.: Delayed reproductive consequences of low level irradiation early in life. American Nuclear Safety Meeting 1985, UCRL-92866 (1985).
- Dobson, R.L., Koehler, C.G., Felton, J.S., Kwan, T.C. Wuebbles, B.J. and Jones, D.C.L.: Vulnerability of female germ cells in developing mice and monkeys to tritium, gamma rays and polycyclic aromatic hydrocarbons. In "Developmental Toxicology of Energy-Related Pollutants" (D.D. Mahlum, M.R. Sikov, P.L. Hackett and F.D. Andrew, eds.), pp. 1-14, US Department of Energy, Washington, 1978.
- Dobson, R.L. and Felton, J.S.: Female germ cell loss from

- radiation and chemical exposure. *Am. J. Industrial Med.* 4: 175-190 (1983).
- Erickson, B.H.: Radiation effects on gonadal development in farm animals. *J. Anim. Sci.* 24: 568-583 (1965).
- Erickson, B.H.: Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *J. Reprod. Fertil.* 11: 97-105 (1966).
- Erickson, B.H.: Effect of gamma radiation on the prepuberal bovine ovary. *Radiat. Res.* 31: 441-451 (1967).
- Foot, R.H.: The gametogenic function of the aging ovary in the mammal. In "Aging Gametes" (R.J. Blandau, ed.), pp. 179-200, Karger, Basel, 1975.
- Garcia, M., Dietrich, A.J.J., Freixa, L., Vink, A.C.G., Ponsa, M. and Egozcue, J.: Development of the first meiotic prophase stage in human fetal oocytes observed by light and electron microscopy. *Hum. Genet.* 77: 223-232 (1987).
- Hansmann, I., Jenderny, J. and Probeck, H.D.: Nondisjunction and chromosome breakage in mouse oocytes after various X-rays doses. *Hum. Genet.* 61: 190-192 (1982).
- Kamiguchi, Y. and Mikamo, K.: Dose-response relationship for induction of structural chromosome aberrations in Chinese hamster oocytes after X-irradiation. *Mutation Res.* 103: 33-37 (1982).
- Kirk, M. and Lyon, M.F.: Induction of congenital anomalies in offspring of female mice exposed to varying doses of X-rays. *Mutation Res.* 106: 73-83 (1982).
- Kurilo, L.F.: Oogenesis in antenatal development in man. *Hum. Genet.* 57: 86-82 (1981).
- Lemon, J.G. and Morton, W.R.M.: Oogenesis in the golden

- hamster (*Mesocricetus auratus*): A study of the first meiotic prophase. *Cytogenetics* 7: 376-389 (1968).
- Lyon, M.F. and Simpson, G.M.: An investigation into the possible genetic hazards of ultrasound. *Br. J. Radiol.* 47: 712-722 (1974).
- Mandl, A.M.: A quantitative study of the sensitivity of oocytes to X-irradiation. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B* 150: 53-71 (1959).
- Mandl, A.M. and Zuckerman, S.: The relation of age to numbers of oocytes. *J. Endocrinol.* 7: 190-193 (1951).
- Matsumoto, A: Effects of perinatal X-ray irradiation on subsequent development of ovaries in rats. *Annot. Zool. Jpn.* 44: 99-104 (1971).
- Mikamo, K.: Meiotic chromosomal radiosensitivity in primary oocytes of the Chinese hamster. *Cytogenet. Cell Genet.* 33: 88-94 (1982).
- Mikamo, K. and Kamiguchi, Y.: A new assessment system for chromosomal mutagenicity using oocytes and early zygotes for the Chinese hamster. In "Radiation-induced Chromosome Damage in Man" (T. Ishihara and M.S. Sasaki, eds.), pp. 441-432, Alan R. Liss, Inc., New York, 1983.
- Mikamo, K., Kamiguchi, Y., Funaki, K., Sugawara, S., Koide, N. and Tateno, H.: Induction of oocyte chromosome aberrations and developmental anomalies by ovarian irradiation. *Proceedings of the 15th Symposium of National Institute of Radiation Sciences on 'Radiation-Induced Genetic Damages and Risks'*. NIRS-M-54, pp 243-256 (1985), in Japanese.
- Mikamo, K., Kamiguchi, Y., Funaki, K., Sugawara, S. and

- Tateno, H.: Stage dependent changes in chromosomal radiosensitivity in primary oocytes of the Chinese hamster. *Cytogenet. Cell Genet.* 30: 174-181 (1981).
- Miller, M.W., Wolff, S., Filly, C., Cox, C. and Carstensen, E.L.: Absence of an effect of diagnostic ultrasound on sister-chromatid exchange induction in human lymphocytes in vitro. *Mutation Res.* 120: 261-268 (1983).
- Nomura, T.: Changed urethane and radiation response of the mouse germ cells to tumor induction. In "Tumors of Early Life in Man and Animals" (L. Severi, ed.) pp. 837-891, Perugia Univ. Press, Perugia, 1978.
- Nomura, T.: Prenatal exposure to X-rays and chemicals induces heritable tumores and anomalies in mice. *Nature* 296: 575-577 (1982).
- Nomura, T.: X-ray- and chemically induced germ-line mutation causing phenotypical anomalies in mice. *Mutation Res.* 198: 309-320 (1988).
- Oakberg, E.F.: Gamma-ray sensitivity of oocytes of immature mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 109: 763-767 (1962).
- Pedersen, T. and Peters, H.: Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J. Reprod. Fertl.* 17: 555-557 (1968).
- Peters, H.: Radiation sensitivity of oocytes at different stages of development in the immature mouse. *Radiat. Res.* 15: 582-593 (1961).
- Peters, H.: The effect of radiation in early life on the morphology and reproductive function of the mouse ovary. In "Advances in Reproductive Physiology", Vol. 4 (A. McLaren, ed.), pp. 149-185, Logos-Academic, London, 1969.

- Peters, H. and Borum, K.: The development of mouse ovaries after low dose irradiation at birth. *Int. J. Radiat. Biol.* 3: 1-6 (1961).
- Peters, H. and Levy, E.: Effect of irradiation in infancy on the mouse ovary. A quantitative study of oocyte sensitivity. *J. Reprod. Fertil.* 7: 37-45 (1964).
- Reichert, W., Hansmann, I. and Röhrborn, G.: Chromosome anomalies in mouse oocytes after irradiation. *Humangenetik* 28: 25-28 (1975).
- Rugh, R. and Jackson, S.: Effects of fetal X-irradiation upon the subsequent fertility of the offspring. *J. Exp. Zool.* 138: 209-221 (1958).
- Rugh, R. and Wohlfromm, M.: X-irradiation sterilization of the pre-mature female mouse. *Atompraxis* 10: 511-518 (1964).
- Russell, L.B. and Russell, W.L.: The sensitivity of different stages in oogenesis to the radiation induction of dominant lethals and other changes in the mouse. In "Progress in radiobiology" (J.S. Mitchell, B.E. Holmes and C.C. Smith, eds.), pp. 187-192, Oliver and Boyd Ltd., Edinburgh, 1956.
- Russell, W.L., Russell, L.B., Steele, M.H. and Phipps, E.L.: Extreme sensitivity of an immature stages of the mouse ovary to sterilization by X-irradiation. *Science* 129: 1288 (1959).
- Satow, Y., Lee, J.Y., Ohtaki, M., Sawada, S., Nakamura, N. and Okada, S.: Effect of tritiated water on germ cells: A comparison with tritium simulation using mouse newborn oocyte death as index. *Proc. Hiroshima Univ. RINMB.* 28: 143-153 (1987), in Japanese.

- Searle, A.G. and Beechey, C.V.: Cytogenetic effects of X-rays and fission neutrons in female mice. *Mutation Res.* 24: 171-186 (1974).
- Shimizu, T. and Tanaka, K.: Experimental safety-study on sonication of pulsed ultrasound. *超音波医学* 4: 289-292 (1981), in Japanese.
- Shiromizu, K. and Mattison, D.R.: Murine oocyte destruction following intraovarian treatment with 3-methylcholanthrene or 7,12-dimethylbenz(a)anthracene: Protection by alpha-naphthoflavone. *Teratogen. Carcin. Mut.* 5: 463-472 (1985).
- Speed, R.M.: Meiosis in the foetal mouse ovary. I. An analysis at the light microscope level using surface spreading. *Chromosoma* 85: 427-437 (1982).
- Speed, R.M.: The prophase stages in human foetal oocytes studied by light and electron microscopy. *Hum. Genet.* 69: 69-75 (1985).
- Straume, T., Dobson, R.L. and Kwan, T.C.: Neutron RBEs and the radiosensitive target for mouse immature oocyte killing. *Radiat. Res.* 111: 47-57 (1987).
- Tateno, H. and Mikamo, K.: Establishment of Chinese hamster stocks homozygous for a reciprocal translocation originally induced by testicular X-irradiation. *Cytogenet. Cell Genet.* 33: 333-339 (1982).
- Tease, C.: X-ray-induced chromosome aberrations in dictyate oocytes of young and old female mice. *Mutation Res.* 119: 191-194 (1983).
- Tease, C. and Fisher, G.: X-ray-induced chromosome aberrations in immediately preovulatory oocytes. *Mutation Res.* 173: 211-215 (1986).

Thacker, J.: Investigations into genetic and inherited changes produced by ultrasound. In "Biological Effects of Ultrasound" (W.L. Nyborg and M.C. Ziskin, eds.), pp. 67-76, Churchill Livingstone, New York, 1985.

UNSCEAR, United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation: In "Ionizing radiation Sources and Biological Effects", pp. 492-494, United Nations, New York, 1982.

UNSCEAR, United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation: In "Genetic and Somatic Effects of Ionizing Radiation", pp. 87-89, United Nations, New York, 1986.

WHO, Environmental Health Criteria 22: Ultrasound. World Health Organization, Geneva, 1982.