

# ヒト精子染色体に及ぼす放射線 および化学物質の影響

(研究課題番号：02455006)

平成2年度～3年度科学研究費補助金（一般研究B）  
研究成果報告書

平成5年3月

研究代表者 上口 勇次郎  
(旭川医科大学医学部教授)

ヒト精子染色体に及ぼす放射線および

化学物質の影響

(研究課題番号：02455006)

平成2年度～3年度科学研究補助金（一般研究B）

研究成果報告書

平成5年3月

研究代表者 上口勇次郎

(旭川医科大学医学部教授)

## 目次

はしがき	-----	1
研究組織	-----	2
研究経費	-----	2
研究発表	-----	3
研究成果	-----	8
I. ヒト精子染色体に及ぼす放射線の影響	-----	8
II. ヒト精子染色体に及ぼす化学物質の影響	-----	29
III. ヒト精子染色体異常の自然発生率	-----	41
IV. 凍結保存ヒト精子の染色体分析法の開発	-----	47
V. おわりに	-----	52
VI. 要約	-----	53
VII. 参考文献	-----	55

## はしがき

平成2年度から文部省科学研究費補助金（一般研究B）の助成を受けて行われた研究「ヒト精子染色体に及ぼす放射線および化学物質の影響」は2年の研究期間を終え、ここに研究成果をまとめることになった。

染色体異常は流産や種々の先天異常症の原因である。最近、染色体の高精度分染法やDNA診断法の発展により、種々の先天異常症が染色体の微小な異常に起因することおよびそれらの異常の多くが父親（精子）由来であることが明らかになってきた。しかし、ヒト精子染色体異常に関する直接的研究はあまり進展していなかった。最近、我々はハムスター卵への異種間体外受精を応用したヒト精子染色体分析法を改良して、従来の方法よりもはるかに成功率・信頼度の高い方法を確立した。

本研究では、この改良法を用いて（1）放射線（ガンマ線）および数種の医薬品（制癌剤）のヒト精子染色体に及ぼす影響、（2）日本人一般集団における精子染色体異常自然発生率、（3）凍結保存精子を利用した染色体分析法の開発を行った。その結果、（1）の研究に関しては、染色体異常誘発と放射線量の関係が明らかになった。また、化学物質の影響に関しては、予備的研究に予想外の時間をとられて研究のまとめが約1年間延びたものの、ほぼ目的通りの成果が得られた。（2）の研究に関しても22名の男性から得た約4,500精子の染色体分析データを蓄積することができた。（3）に関してはいまだ満足のいく（成功率の高い）精子染色体分析法が確立しておらず、今後もさらに改良が必要である。

（1）の放射線研究の今後の発展としては、線質の異なる放射線（中性子線や $\alpha$ 粒子線）を用いた比較研究が必要と考えている。また、化学物質の影響研究では、薬品の投与量と染色体異常誘発率との関係の調査や、生活関連物質（食品添加物、農薬など）の調査を考えている。（2）の研究に関しても、さらにデータ増やして精子染色体異常自然発生率と精子提供者の年齢、職業、生活習慣などとの関連性を検討したい。

## 研究組織

研究代表者：上口勇次郎（旭川医科大学医学部 教授）

研究分担者：立野 裕幸（旭川医科大学医学部 講師）

## 研究経費

平成2年度 4,300千円

平成3年度 1,000千円

計 5,300千円

## 研究発表

### (1) 学会誌等

1. Kamiguchi, Y., Tateno, H. and Mikamo, K. : Comparative study of chromosomal radiosensitivity in mammalian spermatozoa. Zool. Sci. Vol. 7, No. 6, 1990.
2. Kamiguchi, Y., Tateno, H. and Mikamo, K. : Micronucleus test of human sperm chromosomal damages. Jpn. J. Human Genet. Vol. 36, No.1, 1991.
3. Kamiguchi, Y., Iizawa, Y. and Mikamo, K. : Chemical-induced structural chromosome aberrations in human spermatozoa. Zool. Sci. Vol. 8, No. 6, 1991.
4. Kamiguchi, Y., Tateno, H. and Mikamo, K. : Micronucleus test in 2-cell embryos as a simple assay system for human sperm chromosome aberrations. Mutation Res. Vol. 252, No. 2, 1991.
5. 美甘和哉・上口勇次郎 : ヒトの精子の染色体研究. 小児内科 24巻, 6号, 1992.
6. Tateno, H., Kamiguchi, Y. and Mikamo, K. : A freezing and thawing method of hamster oocytes designed for both the penetration test and chromosome assay of human spermatozoa. Mol. Reprod. Devel. Vol. 33, No. 2, 1992.
7. Kamiguchi, Y., Tateno, H., Mikamo, K. and Iizawa, Y. : Chemi-

cal (antineoplastic agents)-induced chromosome damage in human spermatozoa. Jpn. J. Human Genet. Vol. 38, No. 1, 1993, in press.

8. Kamiguchi, Y., Iizawa, Y., Tateno, H. and Mikamo, K. : Human sperm chromosome analysis as a mutagenicity test of chemicals. Mutation Res. 1993, in press.
9. Tateno, H., Kamiguchi, Y. and Mikamo, K. : Practical use of cryopreserved hamster oocytes for analyzing human sperm chromosome aberrations induced by mutagens. Mutation Res. 1993, in press.

## (2) 口頭発表

1. 上口勇次郎：ヒト精子の染色体分析とその応用。第9回日本アンドロロジー学会特別講演，1990年6月。
2. 上口勇次郎・立野裕幸・美甘和哉：微小核テストによるヒト精子染色体傷害の検出。第35回日本人類遺伝学会，1990年8月。
3. 上口勇次郎・立野裕幸・美甘和哉：ヒト精子染色体の放射線感受性。第38回日本動物学会北海道支部大会，1990年8月。
4. 上口勇次郎：ヒト精子の染色体分析法。第8回染色体検査学会教育講演，1990年9月。
5. 上口勇次郎・立野裕幸・美甘和哉：哺乳類精子染色体の放射線感受性の種間比較。第61回日本動物学会，1990年10月。

6. Mikamo, K. : The interspecific in vitro fertilization system to measure human sperm chromosomal damages. Intern. Symp. on Trends in Biological Dosimetry, October 1990.
7. Mikamo, K. : Human sperm chromosome radiosensitivity and paternally transmitted chromosome abnormalities. US-Japan Cancer Seminar, November 1990.
8. Kamiguchi, Y., Tateno, H. and Mikamo, K. : Chromosome aberrations in human spermatozoa induced by in vitro exposure to gamma-rays. 9th Intern. Congr. Radiat. Res., July 1991.
9. 上口勇次郎・立野裕幸・美甘和哉：各種放射線に対するヒト精子染色体の感受性。第33回日本不妊学会北海道地方部会，1991年2月。
10. 上口勇次郎・飯沢禎之・美甘和哉：ヒト精子における化学物質誘発の染色体異常。日本動物学会第62回大会，1991年10月。
11. 立野裕幸・上口勇次郎・美甘和哉：ヒト精子染色体分析における凍結ハムスター卵の有効性。日本動物学会北海道支部第39回大会，1991年8月。
12. 上口勇次郎・立野裕幸・美甘和哉・飯沢禎之：制癌剤のヒト精子染色体異常誘発能。第34回日本不妊学会北海道地方部会，1992年2月。
13. Mikamo, K., Kamiguchi, Y., Tateno, H.: Progress in the chromosomal mutagenicity test of human spermatozoa using the

interspecific in vitro fertilization system with hamster oocytes. 1st China-Japan Cong. Human Genet. October 1992.

14. 上口勇次郎・立野裕幸・美甘和哉：化学物質（抗癌剤）によるヒト精子染色体障害. 第37回日本人類遺伝学会, 1992年10月.
15. Mikamo, K., Kamiguchi, Y., Tateno, H.: Reliable chromosome study of human oocytes and spermatozoa using the gradual fixation-air drying (GF-AD) method. 2nd Intern. Symp. on Chromosomal Aberrations, November 1992.
16. 上口勇次郎・立野裕幸・美甘和哉：ヒト精子染色体分析による化学物質の変異原性試験. 第21回日本環境変異原学会, 1992年11月.
17. 立野裕幸・上口勇次郎・美甘和哉：遺伝毒性試験としてのヒト精子染色体研究法の実用化：凍結ハムスター卵の利用. 第21回日本環境変異原学会, 1992年11月.

### (3) 出版物

1. Mikamo, K., Kamiguchi, Y. and Tateno, H.: Spontaneous and in vitro radiation-induced chromosome aberrations in human spermatozoa: Application of a new method. In "Mutation and the Environment. Part B", M.L. Mendelsohn and R.J. Albertini (eds.), Wiley-Liss, Inc., New York, 1990.
2. 上口勇次郎：ヒト精子染色体の放射線感受性. 「放射線による生命現象解明への展望」（生島隆治・編），京都大学原子炉実験所, 1991.

3. Mikamo, K., Kamiguchi, Y. and Tateno, H.: The interspecific in vitro fertilization system to measure human sperm chromosomal damage. In "New Horizons in Biological Dosimetry", B. L. Gledhill and F. Mauro (eds.), Wiley-Liss, Inc., 1991.
4. 立野裕幸・上口勇次郎・美甘和哉：生殖・発生毒性試験－配偶子・初期胚の染色体異常。「細胞トキシコロジー試験法」（日本組織培養学会・編），朝倉書店，1991.
5. 美甘和哉・上口勇次郎・菅原茂樹：染色体異常の成立機構。「臨床遺伝医学Ⅱ－染色体異常症候群」（古庄敏行・他編），診断と治療社，1992.
6. Mikamo, K., Kamiguchi, Y., Tateno, H.: Reliable chromosome study of human oocytes and spermatozoa using the gradual fixation-air drying (GF-AD) method. Proc. 2nd Intern. Symp. on Chromosomal Aberrations, in press.

# 研究成果

## I. ヒト精子染色体に及ぼす放射線（ $\gamma$ 線）の影響

### 1. はじめに

放射線の影響という本題に入る前にヒト精子の染色体研究の重要性について二、三ふれてみたい。

まず第一に、精子は親からの遺伝物質を担い、新個体（次世代）を形成する細胞であるから、環境変異原の遺伝的影響を考える際に卵子とともに最も重要な細胞である。すなわち、もしも精子DNAになんらかの障害が生じれば、それは染色体異常個体の生成に直接つながる危険性をもっている。障害因子がDNAに特異的に作用するもので、精子の他の機能（運動能や受精能など）に影響を与えないものであれば、異常個体生成の危険度は特に高くなると考えられる。

第二に、精子は通常の体細胞や卵細胞とは異なり、DNAに生じた傷を修復することができない（Sega, 1974; Ono and Okada, 1977）。これは、精子変態過程で細胞質が脱ぎ捨てられるのに伴い、DNA修復酵素も失われるためであると考えられている。もし、精子期に変異原が繰り返し作用すれば、その結果生じたDNA障害は未修復のまま精子内に蓄積されることになる。

第三に、この研究では精子染色体に及ぼす変異原の影響を直接ヒトで評価することができる。これまでは、ヒト培養体細胞や実験動物の生殖細胞を用いて研究を行い、得られた結果をヒト生殖細胞に外挿するという方法が取られてきた。しかし、変異原に対する感受性は細胞の種類や動物種によって大きく異なることが次第に明らかとなり、ヒト生殖細胞を用いた直接的研究の必要性がますます認識されるようになってきている。

さて、放射線のヒトに及ぼす遺伝的（継代的）影響の評価は、これま

では広島・長崎のデータからの推定、齧歯類やヒト以外の霊長類におけるモデル実験あるいは培養体細胞を用いた研究からの外挿などによって行われてきた。特に、染色体異常の誘発は放射線の影響評価のよい指標となり、体細胞レベルで数多くの研究が行われてきた。しかし、生殖細胞での染色体研究は意外に少ない。これは主として、生殖細胞の染色体標本作製が難しいという技術的な理由によるものである。これに加えて、ヒトでは材料（卵子、精子）入手の難しさもあり、研究は全く行われていなかった。

しかし、近年、幸いにも透明帯除去ゴールドンハムスター卵への異種間体外受精を応用したヒト精子染色体の分析法が開発され（Yanagimachi et al., 1976; Rudak et al., 1978）、ヒト配偶子における直接的研究が可能となった。しかし、初期の不完全な方法では染色体分析の成功率が非常に低かったため、この方法を利用してヒト精子染色体に及ぼす放射線の影響を実験的に検討した研究は全くなかった。そこで、我々は従来の方法に種々の改良を加え、成功率・信頼度の高い精子染色体分析法を確立してこの研究に取り組んできた（上口・他, 1986; Kamiguchi et al., 1986, 1987; 上口, 1989）。

これまでの研究で我々は、X線およびトリチウムβ線誘発の構造的染色体異常をもつ精子の出現率が線量増加に伴って直線的に増加することを明らかにした。この結果は、精子染色体に及ぼす放射線の影響を直接ヒトで評価した最初のものである。最近、外国でもヒト精子染色体に及ぼす放射線の影響を *in vitro* で調査した研究が初めて報告されたが（Brandriff et al., 1988）、それ以外のものはまだない。

近年、染色体の高精度分染法が開発されて、新生児集団における構造異常が微細なものまで検出されるようになってきた。同時に、染色体の多型性マーカーやDNAの制限酵素認識部位の多型性を利用した研究から、これらの構造異常の多くが父親（精子）に由来することがわかってきた（Chamberlin et al., 1980; Olson and Magenis, 1988; Butler, 1990）。また、ごく最近、英国セラフィールドにある核燃料再処理工場付近での小

児白血病多発が父親の職業被曝に関係するという疫学調査 (Gardner et al., 1990) が報告されて問題になっている。これらのこととの関連も含め、ヒト精子染色体の研究はますます重要な課題になってきている。

本研究の目的は、我々の改良法を用いてヒト精子染色体に及ぼす放射線の影響を実験的に調査し、線量効果関係を明らかにすることにある。この研究ではこれまで調査してきた放射線 (X線、 $\beta$ 線) と異なる $\gamma$ 線を用い、得られた結果をこれまでのものと比較、検討する。

## 2. 方法

### (1) ヒト精子染色体に及ぼす $\gamma$ 線の影響の調査

合計 44 名の健常男性から得られた精液試料が実験に用いられた。全ての精液提供者は正常の精液所見 (精子数、運動能、奇形率など) を示し、精液採取の 5ヶ月前までに診断・治療用の放射線照射を受けた者は一人も含まれていない。

精子染色体異常の自然発生率には個人によってかなりの差がみられるので (Brandriff et al., 1985; Kamiguchi and Mikamo, 1986; Martin et al., 1987)、精液試料毎に実験群と対照群を設定した。すなわち、精液試料を液化した (37 °C, 20 min) 後に二分し、一方に  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ 線 (ガンマセル 40, Atomic Energy of Canada Limited; 線量、6.4, 12.8, 26.8, 54.8, 109.3, 211.4 および 423.1 cGy; 線量率、135.5 cGy/min) を照射した。他方は非照射対照群とした。

両群の精液試料から精子浮遊法 (Overstreet et al., 1980) により運動能の高い精子を集めた。我々の開発した方法に従って (Kamiguchi and Mikamo, 1986)、これらの精子に受精能獲得処理 (Ca-ionophore 処理および *BWW*液による培養) を施し、透明帯除去ゴールデンハムスター卵と体外受精させた。TC 199 培養液を用いて受精卵を第一卵割中期まで培養した後、漸進固定・空気乾燥法 (Mikamo and Kamiguchi, 1983a) を用い

て受精卵の染色体標本作製を行い、精子由来の核板における染色体異常の出現率を調査した。

出現した構造的染色体異常はヒト染色体の国際命名規約 (ISCN, 1985) に従って分類された。放射線による染色体異常の誘発率は下記の計算式 (Kamiguchi et al., 1990a, b) によって算出された。

(a)  $\gamma$  線誘発の構造的染色体異常をもつ精子の出現率 (%) =

$$\left\{ 1 - \frac{\text{正常核型をもつ精子数} / \text{染色体分析された精子数 (照射群)}}{\text{正常核型をもつ精子数} / \text{染色体分析された精子数 (対照群)}} \right\} \times 100$$

(b)  $\gamma$  線誘発の構造的染色体異常出現率 (精子当たりの頻度) =

$$\left\{ 1 - \frac{1 - \text{構造的染色体異常数} / \text{染色体分析された精子数} / 23 \text{ (照射群)}}{1 - \text{構造的染色体異常数} / \text{染色体分析された精子数} / 23 \text{ (対照群)}} \right\} \times 23$$

## (2) $\gamma$ 線の影響評価のための微小核テスト

$\gamma$  線照射 (1.11 および 2.13 Gy) したヒト精子を(1)の実験と同じ手順で媒精した。受精卵を二分し、それぞれを TC 199 液で培養した。一方は第一卵割中期に染色体標本作製し、精子由来の核板における構造的染色体異常出現率を調べた。これは微小核形成と染色体異常形成の関連性を調べるための比較実験群である。

残り半分の卵については、前核期に実体顕微鏡 (80倍) 下で観察して未受精卵と多精子受精卵を取り除いた後、さらに培養を続けて2細胞期まで発生させた。2細胞期に達してから3-5時間後に、ワセリン-パラフィン (9:1) のドロップを四隅に滴下したスライドガラスの上に少量の培養液とともに胚を載せ、カバーガラスで胚を軽く押しつぶした (Yanagimachi, 1966 による初期卵割胚観察法)。胚を位相差顕微鏡下で観察し、割球細胞内の微小核の有無を調べた。微小核は球形で、細胞質との間に明瞭な境界をもっており、内部に1個以上の核小体を含んでいるので、未染色の胚においても容易に識別できる。この球状体が染色体に由来するクロ

マチン物質を含むということは、Giemsa および Hoechst 33258 染色 (Bertsche, 1985) によって確認された。

### 3. 結果と考察

#### (1) $\gamma$ 線誘発の構造的染色体異常をもつ精子の出現率

6線量群 (6.4-423.1 cGy) 合わせて、照射群で 6,977 精子が、対照群で 6,932精子が染色体分析された。各実験群における構造的染色体異常をもつ精子の出現率は表1に示す通りである。

表1 ヒト精子染色体に及ぼす $\gamma$ 線照射の影響

調査 個体数	$\gamma$ 線 線量 (cGy)	分析 精子数	構造的染色 体異常をも つ精子数	異常精子 出現率 (%)	$\gamma$ 線誘発の 異常精子出 現率 (%)
7	0	1,304	195	14.3 $\pm$ 4.5	
	6.4	1,463	263	18.0 $\pm$ 3.8	4.2 $\pm$ 2.5
9	0	1,230	212	17.1 $\pm$ 1.8	
	12.8	1,293	300	22.5 $\pm$ 3.9	6.5 $\pm$ 3.3
6	0	865	138	14.1 $\pm$ 3.8	
	26.8	1,004	287	26.2 $\pm$ 5.4	14.3 $\pm$ 2.7
6	0	935	143	16.5 $\pm$ 3.8	
	54.8	668	246	38.1 $\pm$ 6.7	26.2 $\pm$ 5.4
6	0	1121	164	14.7 $\pm$ 3.3	
	109.3	1076	523	49.8 $\pm$ 3.8	41.2 $\pm$ 2.8
6	0	972	127	13.0 $\pm$ 3.1	
	211.4	820	607	74.0 $\pm$ 3.2	70.1 $\pm$ 3.5
4	0	505	71	14.4 $\pm$ 3.5	
	423.1	653	595	91.3 $\pm$ 1.1	89.9 $\pm$ 1.3

$\gamma$ 線誘発の構造的染色体異常をもつ精子の出現率（Y）は低線量域では線量（D）の増加に伴って直線的に増加した。その回帰式は 6.4-211.4 cGy の線量範囲では  $Y (\%) = 3.29 + 32.8D (\text{Gy})$ 、6.4-109.3 cGy の線量範囲では  $Y = 1.85 + 38.1D$  で表された。両式の相関係数はほとんど同じであったが（0.993 と 0.990）、後者の方が 6.4 および 12.8 cGy での観察値をよく表現しているのので、低線量域での線量効果関係式としてより妥当と思われる（図1）。高線量域（423.1 cGy）での観察値まで含めると、その回帰式は二次曲線式  $Y = 1.5 + 44.0D - 5.5D^2$  で表され、一次項の係数は前二者よりさらに大きくなった（図1）。

また、各線量群について 4-7名の調査を行ったが、いずれの線量群でも精子染色体の放射線感受性（異常精子の出現率）に大きな個人差は認められなかった。

さらに、今回の $\gamma$ 線での調査結果をこれまで我々が行ってきたX線および $\beta$ 線での研究結果と比較すると、異常精子出現率は3線種の間でほとんど同じであった（図2）。3線種それぞれの線量効果関係式を基にして計算された、 $\gamma$ 線に対するX線および $\beta$ 線の生物学的効果比（RBE）はほぼ1であった。後述するように、切断型染色体異常の出現率や交換型染色体異常の出現率を指標にした場合もRBEは1であった。言い換えると、これら3種の放射線のヒト精子染色体に及ぼす影響は質的にも量的にもほぼ等しいということができる。

しかしながら、同じ線源（ $^{137}\text{Cs}$ ）を用いた Brandriff et al (1988)のデータでは、染色体異常精子の出現率（図2）および精子当たりの異常染色体出現率のいずれも我々の値の約半分であった。この差の大きな原因の一つは受精卵染色体標本作製技術の差にあるものと思われる。すなわち、彼女らは標本作製に Tarkowski法（Tarkowski, 1966）を採用しているが、この方法では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起りやすい。このことについてはこれまで我々がたびたび指摘し、より信頼度の高い方法を用いることを喚起してきた（Mikamo and Kamiguchi,

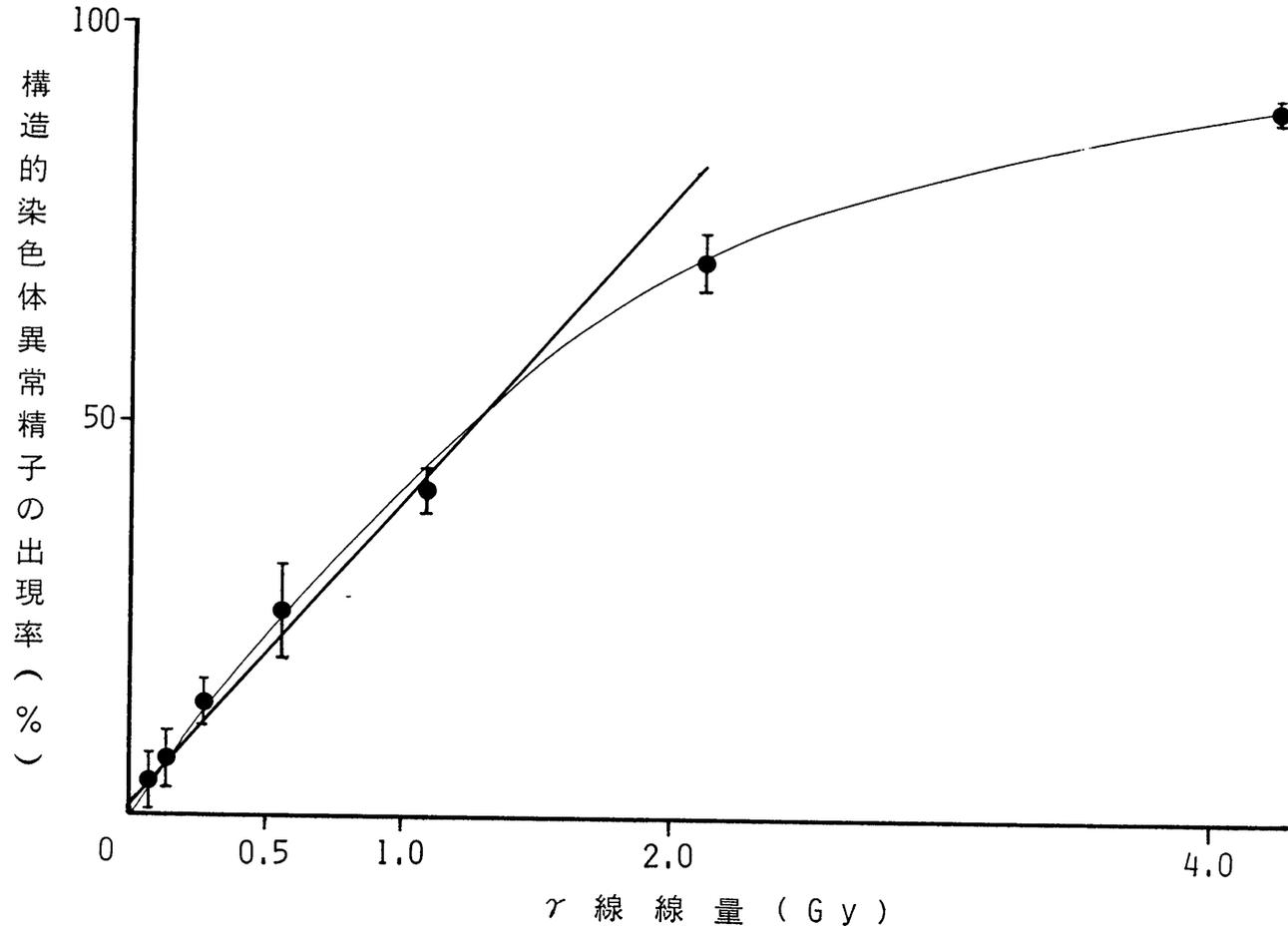


図1 γ線誘発の構造的染色体異常をもつヒト精子出現率の線量効果関係

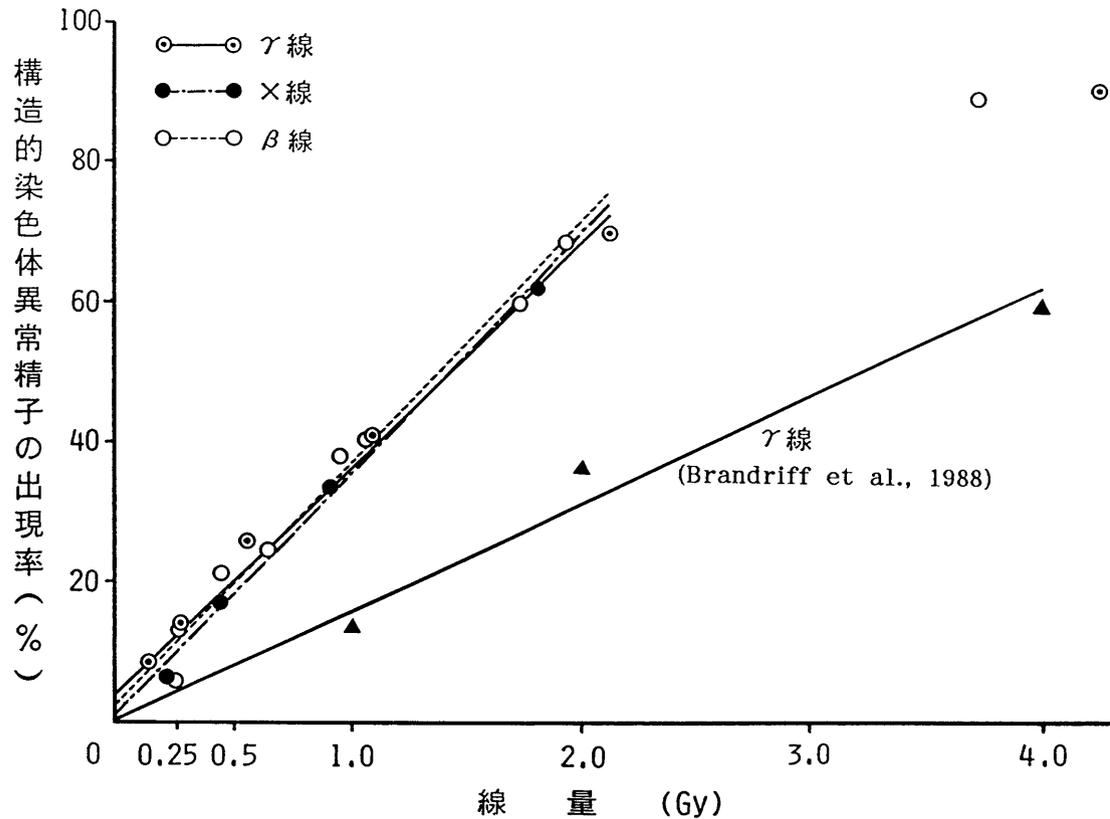


図2 放射線 ( $\gamma$  線、X 線および  $\beta$  線) によって誘発された構造的染色体異常をもつヒト精子の出現率

1983a; Kamiguchi and Mikamo, 1986)。もしも、精子核板から微小な染色体断片が人為的に流失すれば、この異常は“正常”として見過ごされてしまうことになる。事実、このような微小染色体断片は照射群で多発している。これに対して我々の漸進固定・空気乾燥法は卵細胞膜を破損しないように工夫、改良されたものであり、染色体断片の検出率が非常に高い。このため、彼女らの場合よりも異常の出現率が高いものと思われる。

## (2) $\gamma$ 線誘発の構造的染色体異常のタイプおよびそれらの出現率

図3および4に示されているように、照射群では種々のタイプの構造的染色体異常が観察された。

誘発された構造的染色体異常を種類別にみると、切断型異常の出現率は交換型異常出現率の5-10倍高かった(表2、表3および図5)。切断型異常のうち、染色体型切断の出現率は染色分体型切断の出現率より約9倍

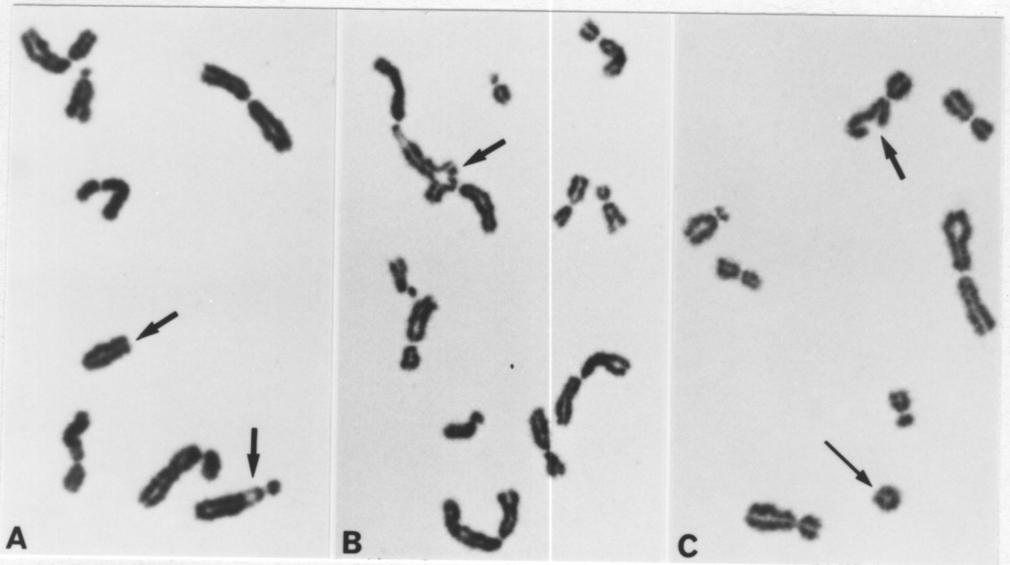


図3 放射線照射精子にみられた数種の構造的染色体異常の例  
A: 染色体型切断 (矢印)、B: 4放射状染色分体型交換 (矢印)、C: ギャップ (太い矢印) および染色体断片 (細い矢印)。

高く、いずれも線量増加に伴って直線的に増加した。これら2種の切断型異常を合わせた出現率は、一次回帰式  $Y = 0.007 + 0.482D$  で表された。

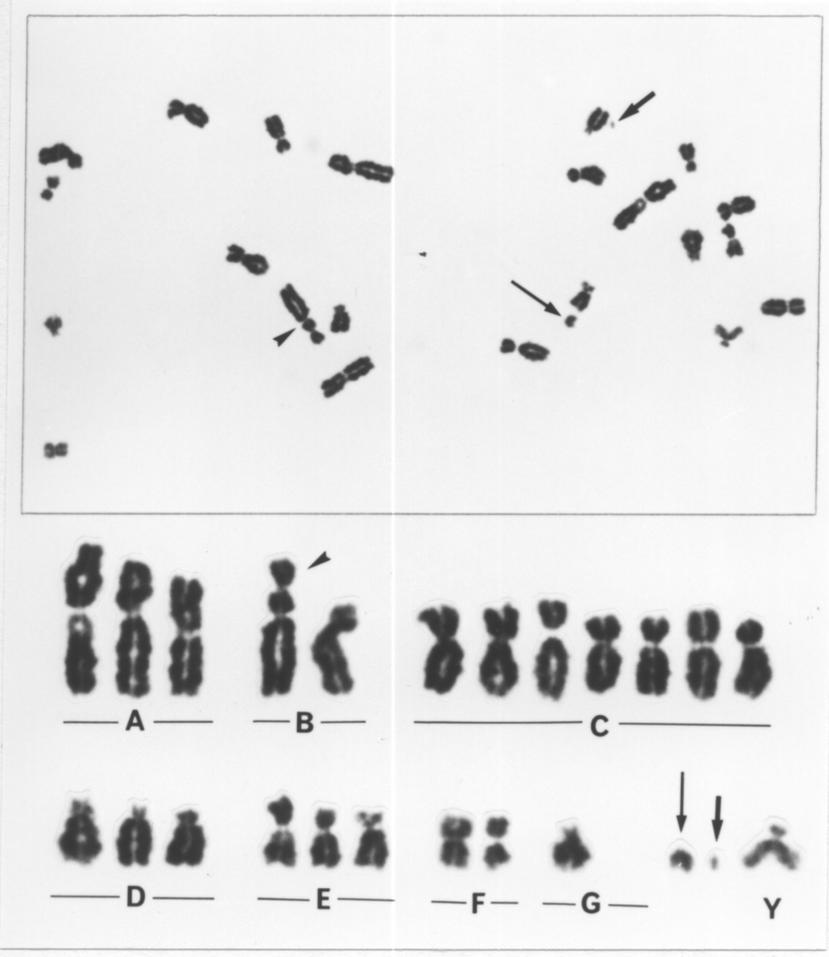


図4 放射線照射精子に由来する核板およびその核型。二動原体染色体(矢尻)、染色体断片(細い矢印)および微小な染色分体断片(太い矢印)がみられる

表2  $\gamma$ 線により誘発された切断型染色体異常の出現率

調査 個体数	$\gamma$ 線 線量 (cGy)	分析 精子数	切断型染色体異常数 (精子当たりの異常数)					
			染色体型異常数	$\gamma$ 線誘発異常数	染色体型異常数	$\gamma$ 線誘発異常数	計	$\gamma$ 線誘発異常数
7	0	1,304	206 (0.152 ± 0.059)		19 (0.014 ± 0.009)		225 (0.166 ± 0.064)	
	6.4	1,463	267 (0.180 ± 0.048)	(0.028 ± 0.029)	28 (0.019 ± 0.006)	(0.006 ± 0.009)	295 (0.199 ± 0.049)	(0.034 ± 0.030)
9	0	1,230	196 (0.153 ± 0.043)		33 (0.029 ± 0.018)		229 (0.183 ± 0.034)	
	12.8	1,293	297 (0.224 ± 0.032)	(0.071 ± 0.045)	37 (0.027 ± 0.014)	(-0.003 ± 0.020)	334 (0.251 ± 0.044)	(0.069 ± 0.037)
6	0	865	138 (0.135 ± 0.047)		18 (0.017 ± 0.009)		156 (0.152 ± 0.054)	
	26.8	1,004	291 (0.259 ± 0.084)	(0.124 ± 0.048)	43 (0.036 ± 0.021)	(0.020 ± 0.016)	334 (0.295 ± 0.088)	(0.144 ± 0.041)
6	0	935	152 (0.176 ± 0.048)		22 (0.029 ± 0.018)		174 (0.205 ± 0.062)	
	54.8	668	250 (0.385 ± 0.099)	(0.210 ± 0.087)	47 (0.066 ± 0.030)	(0.038 ± 0.034)	297 (0.452 ± 0.099)	(0.249 ± 0.072)
6	0	1,121	164 (0.148 ± 0.039)		22 (0.020 ± 0.012)		186 (0.168 ± 0.045)	
	109.3	1,076	624 (0.600 ± 0.088)	(0.455 ± 0.081)	108 (0.108 ± 0.038)	(0.088 ± 0.032)	732 (0.707 ± 0.112)	(0.543 ± 0.093)
6	0	972	126 (0.130 ± 0.043)		15 (0.016 ± 0.004)		141 (0.146 ± 0.046)	
	211.4	820	894 (1.080 ± 0.097)	(0.956 ± 0.107)	107 (0.119 ± 0.067)	(0.103 ± 0.068)	1,001 (1.199 ± 0.153)	(1.060 ± 0.165)
4	0	505	68 (0.138 ± 0.038)		8 (0.016 ± 0.007)		76 (0.154 ± 0.040)	
	423.1	653	1,235 (1.941 ± 0.197)	(0.1814 ± 0.182)	157 (0.228 ± 0.036)	(0.212 ± 0.033)	1,392 (2.169 ± 0.199)	(2.029 ± 0.184)

表3  $\gamma$ 線により誘発された交換型染色体異常の出現率

調査 個体数	$\gamma$ 線 線量 (cGy)	分析 精子数	交換型染色体異常数 (精子当たりの異常数)					
			染色体型異常数	$\gamma$ 線誘発異常数	染色分体型異常数	$\gamma$ 線誘発異常数	計	$\gamma$ 線誘発異常数
7	0	1,304	8 (0.007 ± 0.005)		16 (0.012 ± 0.007)		24 (0.019 ± 0.006)	
	6.4	1,463	11 (0.008 ± 0.005)	(0.001 ± 0.007)	21 (0.015 ± 0.006)	(0.003 ± 0.010)	32 (0.022 ± 0.008)	(0.004 ± 0.009)
9	0	1,230	9 (0.007 ± 0.006)		22 (0.017 ± 0.009)		31 (0.024 ± 0.010)	
	12.8	1,293	10 (0.009 ± 0.012)	(0.002 ± 0.010)	28 (0.020 ± 0.010)	(0.003 ± 0.014)	38 (0.029 ± 0.017)	(0.005 ± 0.017)
6	0	865	6 (0.007 ± 0.004)		15 (0.021 ± 0.009)		21 (0.028 ± 0.010)	
	26.8	1,004	13 (0.009 ± 0.009)	(0.002 ± 0.008)	37 (0.034 ± 0.022)	(0.013 ± 0.025)	50 (0.043 ± 0.027)	(0.015 ± 0.028)
6	0	935	6 (0.007 ± 0.007)		21 (0.028 ± 0.018)		27 (0.035 ± 0.021)	
	54.8	668	16 (0.026 ± 0.014)	(0.019 ± 0.012)	21 (0.039 ± 0.027)	(0.012 ± 0.019)	37 (0.065 ± 0.036)	(0.030 ± 0.028)
6	0	1,121	4 (0.004 ± 0.004)		20 (0.021 ± 0.012)		24 (0.025 ± 0.013)	
	109.3	1,076	28 (0.028 ± 0.018)	(0.024 ± 0.020)	51 (0.048 ± 0.011)	(0.027 ± 0.010)	79 (0.075 ± 0.026)	(0.050 ± 0.019)
6	0	972	5 (0.004 ± 0.005)		11 (0.011 ± 0.010)		16 (0.015 ± 0.012)	
	211.4	820	104 (0.131 ± 0.017)	(0.126 ± 0.019)	72 (0.084 ± 0.021)	(0.074 ± 0.029)	176 (0.215 ± 0.012)	(0.200 ± 0.019)
4	0	505	3 (0.007 ± 0.007)		1 (0.002 ± 0.004)		4 (0.009 ± 0.011)	
	423.1	653	172 (0.266 ± 0.030)	(0.259 ± 0.024)	92 (0.156 ± 0.049)	(0.153 ± 0.045)	264 (0.421 ± 0.067)	(0.412 ± 0.056)

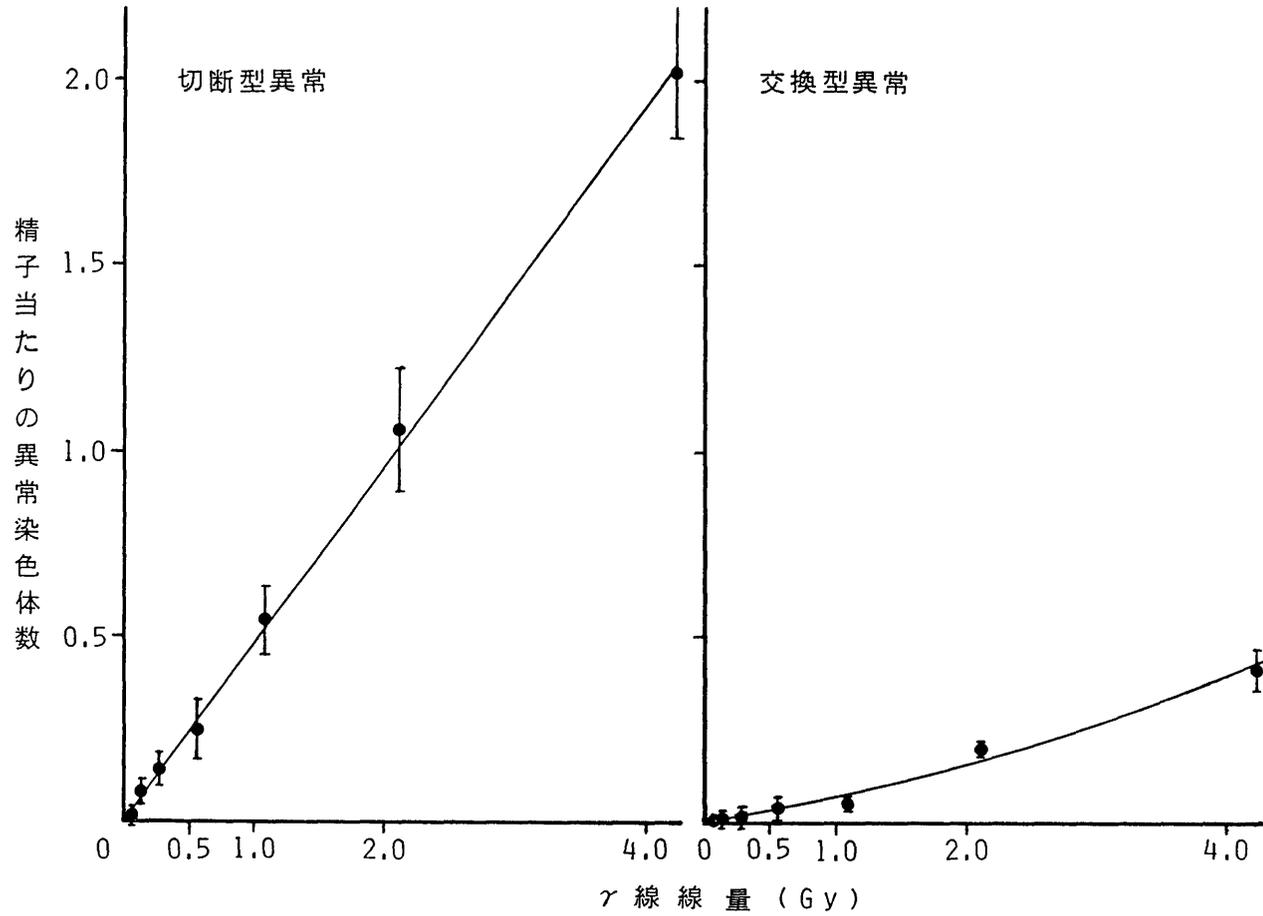


図5 γ線によりヒト精子に誘発された切断型染色体異常および交換型染色体異常の出現率 (精子当たりの異常染色体数) の線量効果関係

一方、交換型異常は線量増加に伴って二次曲線的に増加し、その回帰式は  $Y = -0.006 + 0.072D + 0.007D^2$  で表された（図5）。

交換型異常をさらに詳しく解析してみると、染色分体型交換は線量に伴って直線的に増加したが、染色体型交換の増加は二次曲線的であった（図6）。これらの増加の回帰式は、それぞれ  $Y = -0.003 + 0.036D$  および  $Y = -0.005 + 0.043D + 0.005D^2$  で表された。これらの異常の線量効果の違いは放射線による DNAの初期損傷の質的差（2重鎖切断や塩基損

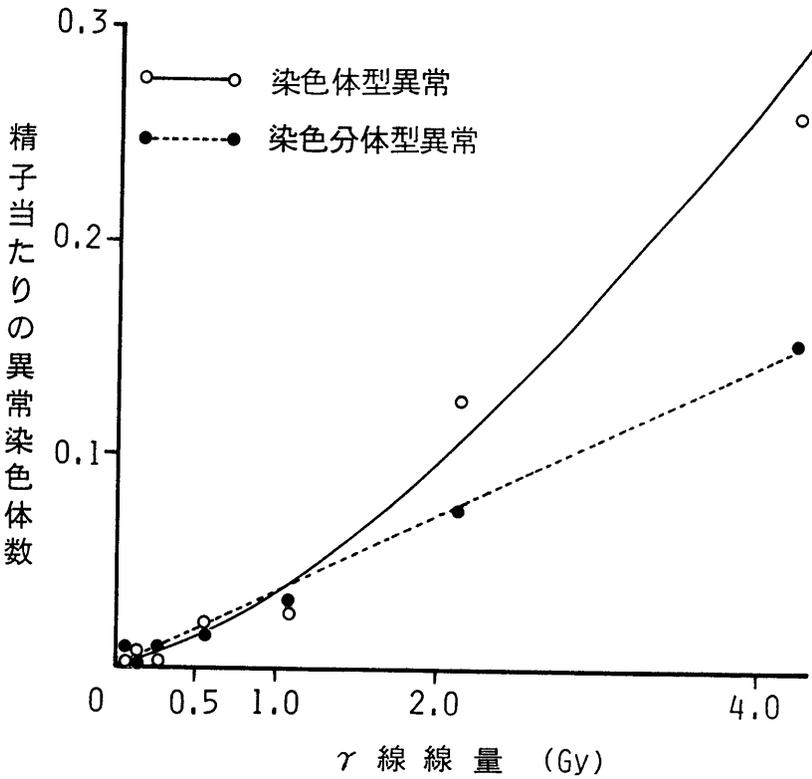


図6 γ線によりヒト精子に誘発された染色体型交換および染色分体型交換の出現率（精子当たりの異常染色体数）の線量効果関係

傷など) やそれらの損傷の修復に対する複数の DNA修復系 (除去修復や複製後修復など) の関わり方の差などを反映しているように思われるが、今後の研究を待たなければならない。

今回のデータを他の哺乳類精子で得られている結果と比較すると、ヒト精子はゴールデンハムスター精子 (Kamiguchi et al., 1988) の約 1.5 倍、マウス (Matsuda et al., 1985) およびチャイニーズハムスター精子 (Tateno et al., 1989) の約 3 倍の放射線感受性をもっている。また、優性致死率 (被照射精子の受精により生じた胚が照射の影響で死亡する割合) を指標にして表された放射線感受性のデータと比較すると、ヒト精子はモルモット精子 (Lyon, 1970) およびウサギ精子 (Lyon, 1970) の約 6 倍の感受性をもっている。ヒト精子の場合、異種間体外受精法を用いているので、この比較は厳密なものではないが、ヒト精子の放射線に対する高感受性は男性被曝の継世代的影響を評価するうえで重要な知見である。

前述したように、精子は放射線によって引き起こされた DNA障害を修復することができない (Ono and Okada, 1977) という点で、一般の体細胞とは大きく異なっている。今回の我々の結果は、このような障害をもつ精子にも受精能力があることを示している。すなわち、今回使用した放射線量の範囲内 (6.4-423.1 cGy) では照射群と対照群の間に受精率の差は全く認められなかった。また、受精した精子における構造的染色体異常精子の出現率に直線的な線量効果関係が認められたので、放射線により DNA障害を誘発された精子だけが特に受精能力が低いとは考えられない。これらのことは、精子期に生じた DNA障害は修復も淘汰も受けずに受精過程を経て新個体に持ち込まれ、染色体異常胚の生成につながる危険性が非常に大きいことを示唆している。この意味で、精子染色体検査は環境変異原の遺伝的影響評価に極めて重要である。

DNA 障害は精子内では修復されないが、受精後に卵細胞のもつ DNA修復系によって一部修復されるということがマウスで示唆された (Generoso et al., 1979)。この報告で卵内修復が示唆されたのは特定の化学物質に

よる精子 DNA障害の場合のみで、放射線による障害が修復されるという証拠は得られなかった。しかし、その後、Matsuda and Tobar (1989) により放射線障害も卵内修復を受けることがマウスで確かめられた。今回、ゴールデンハムスター卵に受精させたヒト精子でも交換型異常が観察され、彼らの結果は我々の実験系でも確かめられた。しかし、交換型異常の出現率は低かったので、卵内修復の効率はこの動物の場合あまりよくないものと推定される。一方、我々が最近行ったチャイニーズハムスター精子への放射線照射実験では、1細胞期の精子由来染色体に高率の交換型異常(約50%)が認められた。したがって、この種では放射線による精子DNA障害がかなり効率よく卵内で修復されているものと考えられる。ヒト卵子がヒト精子のDNA障害をどの程度修復できるのかということについてはまだ研究されていない。

### (3) 微小核テストによるヒト精子染色体傷害の検出

ヒト精子染色体研究の重要性は先に述べた通りであるが、この研究には異種間体外受精や染色体分析にかなりの熟練と時間を要するという難点がある。そこで、我々は放射線の影響をより簡便に評価する方法として微小核テストの応用を試みた(Kamiguchi et al., 1991)。放射線その他の変異原作用により動原体のない染色体断片が生じた場合、それらは細胞分裂の際に分裂極に移動できず、細胞質中に取り残されて小さな核を形成する。その形成頻度を調べるのが微小核テストである。

二つの照射群(1.11 および 2.13 Gy)について実験を行った。未受精卵と多精子受精卵を除外して、95卵(61.3%)および98卵(69.0%)がそれぞれ2細胞期まで発生し、微小核テストに使用された。

図7に示すように、照射群では色々な数の微小核をもつ2細胞胚が観察された。微小核をもつ胚の出現率は低、高線量群でそれぞれ49(51.6%)および81(82.7%)で、線量増加に伴って増加していた(表4)。これを精子染色体分析の結果(表5)と比較すると、微小核をもつ胚の出現率

は切断型染色体異常をもつ精子の出現率（50.3 % および 79.3 %）によく一致していた。

また、二つの線量群における胚当たりの微小核出現率（0.85 および 1.50）は精子当たりの切断型染色体異常出現率（0.88 および 1.45）にかなりよく一致していた（表6）。さらに、1 - 5個の微小核をもつ胚それぞれの頻度は1 - 5個の切断型染色体異常をもつ精子の出現率とよく対応していた（図8）。すなわち、微小核出現率は放射線によって生じた染色体切断をよく反映しており、この方法は精子染色体傷害の簡便な検出系として利用できることがわかった。

表4 微小核をもつ2細胞胚の出現率

線量 (Gy)	調査 数	1 - 5 個の微小核 (MN) をもつ胚の出現率 (%)					
		1 MN	2 MN	3 MN	4 MN	5 MN	計
1.11	95	27 (28.4)	14 (14.7)	6 (6.3)	2 (2.1)	0 (0.0)	49 (51.6)
2.13	98	35 (35.7)	30 (30.6)	13 (13.3)	2 (2.0)	1 (1.0)	81 (82.7)

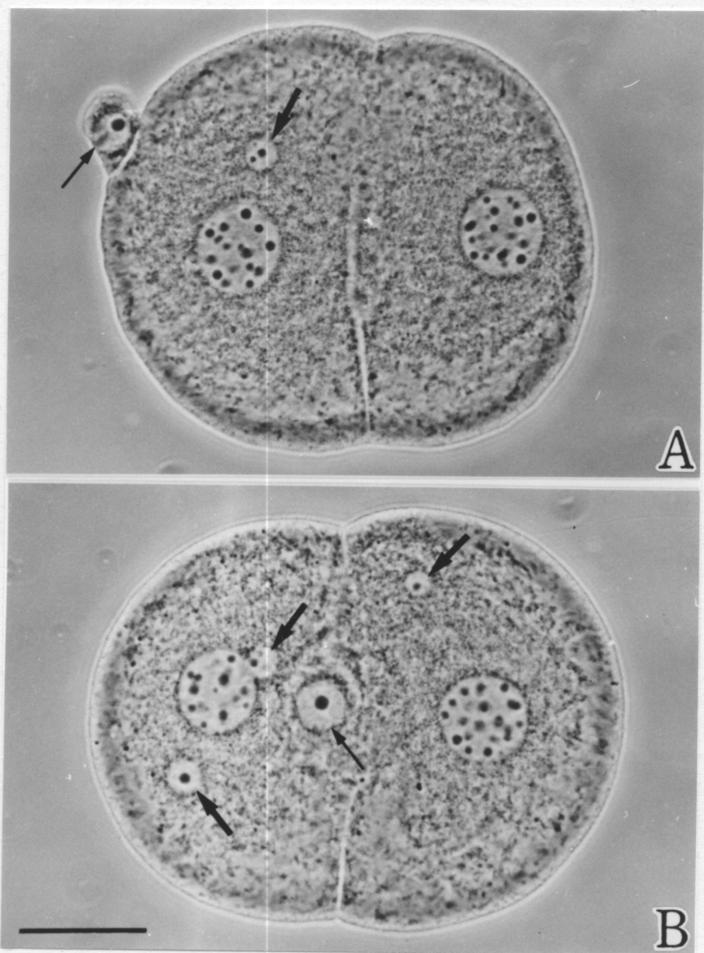
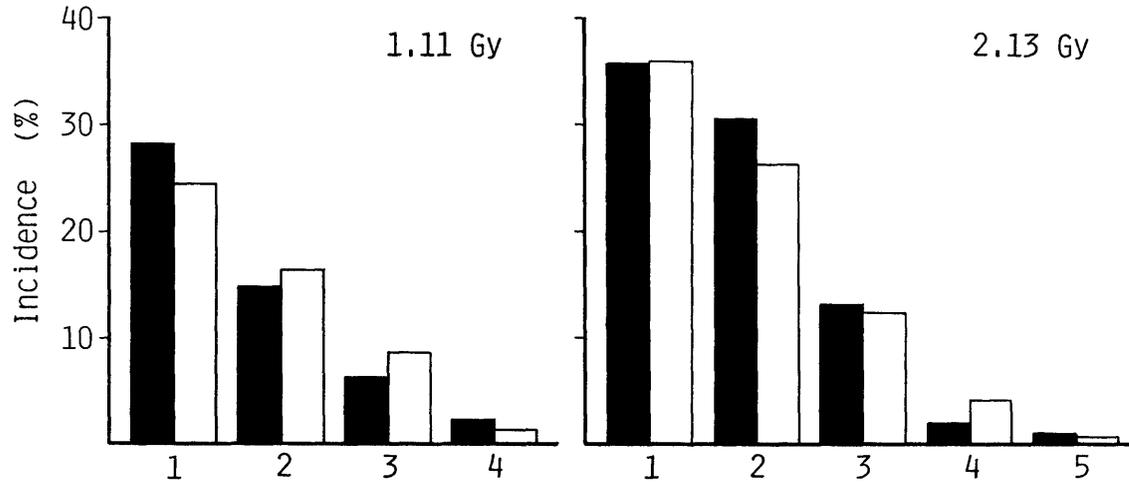


図7 微小核を1個(A)および3個(B)もつ2細胞胚の顕微鏡写真。太い矢印は微小核、細い矢印は第二極体の核を示す。図中の棒線は  $40 \mu\text{m}$

表5  $\gamma$ 線照射ヒト精子における構造的染色体異常の種類およびそれらの出現率

線量 (Gy)	分析 精子数	構造的染 色体異常 をもつ精 子数 (%)	染色体切断 ・断片をも つ精子数 (%)	染色体異常数 (精子当たりの数)					
				切断・断片		交換		ギャップ	
				c s	c t d	c s	c t d	c s	c t d
1.11	159	84 (52.8)	80 (50.3)	117 (0.736)	25 (0.157)	4 (0.025)	5 (0.031)	0 (0.0)	3 (0.019)
2.13	145	115 (79.3)	115 (79.3)	179 (1.234)	34 (0.234)	20 (0.138)	9 (0.062)	0 (0.0)	2 (0.014)

c s, 染色体型異常; c t d, 染色分体型異常



Black column: 2-cell embryos with different number of micronuclei

White column: spermatozoa with different number of breaks and fragments

図8 1～5個の微小核をもつ2細胞胚の頻度（黒い棒線）と  
1～5個の切断型染色体異常をもつ精子の頻度（白い棒  
線）の比較

表6  $\gamma$ 線誘発のヒト精子染色体障害の検出：微小核テストと染色体分析の比較

検出系	線量 (G y)	
	1. 1 1	2. 1 3
<u>微小核</u>		
調査した2細胞胚の数	9 5	9 8
微小核をもつ胚の数	4 9 (5 1. 6%)	8 1 (8 2. 7%)
微小核数(胚当たりの数)	8 1 (0. 8 5)	1 4 7 (1. 5 0)
<u>染色体分析</u>		
分析した精子の数	1 5 9	1 4 5
構造的染色体異常をもつ精子数	8 0 (5 0. 3%)	1 1 5 (7 9. 3%)
異常染色体数(精子当たりの数)	1 4 0 (0. 8 8)	2 1 0 (1. 4 5)

## II. ヒト精子染色体に及ぼす化学物質の影響

### 1. はじめに

種々の化学物質のもつ染色体異常誘発能に関しては、培養体細胞を用いて数多くの研究が成されている。しかし、生殖細胞の染色体に及ぼす影響に関する報告はそれほど多くはない。その大部分はマウスを用いて行われた研究である。すなわち、雄マウスに化学物質を腹腔内投与し、一定期間後に正常雌と交配して受精卵や初期胚の染色体を調査するという方法である。成熟分裂を終了した雄生殖細胞（初期精細胞や成熟精子）に作用させた時に化学物質の染色体異常誘発能は最も高率であり、そのような物質として、methyl methanesulfonate (Brewen et al., 1975; Tanaka et al., 1981), isopropyl methanesulfonate (Kato and Iwahara, 1983), mitomycin C (Kato et al., 1981; Hitotsumachi, 1981; Matsuda et al., 1989) および triethylenemelamine (Hitotsumachi and Kikuchi, 1977; Bürki and Sheridan, 1978) などがある。

最近、Matsuda and Tobar (1988) は *in vitro* の実験系でマウス精子に methyl methanesulfonate および ethyl methanesulfonate を作用させて、これらの薬品に精子染色体異常誘発能があることを明らかにした。

しかしながら、前項 (I) でもふれたように、ヒト精子染色体に及ぼす環境変異原の影響に関する研究はほとんど進んでおらず、化学物質の影響に関しては現在まで世界で全く論文が発表されていない。

そこで、本研究では体細胞およびマウス生殖細胞で染色体異常を誘発することが報告されている化学物質の中から、6種類の制癌剤、bleomycin, cyclophosphamide, daunomycin, methyl methanesulfonate, mitomycin C および triethylenemelamine を選定し、我々の確立したヒト精子染色体分析法を用いて染色体異常誘発能を調査した。

## 2. 方法

### (1) 薬品

各薬品の購入先は以下の通りである：bleomycin hydrochloride (BM), 日本化薬株式会社, 東京；cyclophosphamide (CP), Nakalai Tesque, 京都；daunomycin hydrochloride (DM), 明治製菓株式会社, 東京；methyl methanesulfonate (MMS), Nakarai Tesque, 京都；mitomycin C (MMC), 協和醗酵工業株式会社, 東京；triethylenemelamine (TEM), Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA. これらの薬品はヒト精子用培養液 (BWW 液 + 0.3 % human serum albumin) またはウシ精子用培養液 (mBWW液 + 0.3% bovine serum albumin) で所定の濃度 (0.1-1000  $\mu$ g/ml) に溶解して用いた。CP および MMC 溶液は毎回実験の直前に調合した。

### (2) 精子の準備および薬品処理

各薬品の最適処理濃度を決定するための予備実験は凍結保存ウシ精子を用いて行った。この材料では、同一個体から採取した多量の試料を使うことができ、染色体異常出現率の調査の際に毎回対照群を設ける必要がないので便利である。

ウシ凍結保存精液は北海道家畜改良事業団より分与を受けた。保存用ストロー入りの凍結精液を 37 °C の温水ですばやく解凍した後に約 3 倍量のウシ精子用培養液で希釈し、遠心 (550 G, 5 min) して耐凍剤を除去した。沈澱精子に 0.5 ml の培養液を加え、これに予め用意しておいた薬品溶液 (所定の濃度の 2 倍液) を等量加えて精子懸濁液を作成した。所定の濃度の薬品を含む培養液 2 ml を入れた試験管数本を用意しておき、その底に少量の精子懸濁液を静かに沈めた。試験管を 30 度に傾けて炭酸ガス培養器 (5% CO<sub>2</sub>, 95% air) 内に 60-120 分間静置した。この間に運動能の高い精子は培養液上層に泳ぎ出すとともに薬品の作用を受ける。一定の処理時間後に培養液上層を遠心して精子を回収し、Tateno et al (1987) の方

法に従って受精能獲得、媒精、染色体標本作製を行い、染色体異常出現率を調査した。

ウシ精子を用いた予備実験により薬品の最適処理濃度が決まった後、ヒト精液を用いて本実験を行った。射精直後の新鮮精液をヒト精子用培養液で約3倍に薄め、遠心して精漿を取り除いた。以後の薬品処理過程はウシ精子の場合と同様であった。本実験ではヒト精液を二分し、一方を薬品処理群、他方を未処理の対照群とした。精子の受精能獲得処理、媒精、染色体標本作製は放射線照射実験（項目 I）の場合と同じであった。

### 3. 結果および考察

#### (1) ウシ精子染色体に及ぼす制癌剤の影響

6種類の制癌剤について、処理濃度を一桁ずつ変えた数段階の溶液を用意し、ウシ精子にまず短時間（60分間）作用させた。影響（構造的染色体異常誘発）が認められない場合には処理時間を長くして（120分間）作用させた。これ以上の長時間処理は個人によっては受精率の低下を生じることがあるので、この処理によっても染色体異常が認められない場合には処理濃度を高くして調査を行った。得られた結果は表7に示す通りである。調査された処理濃度および処理時間のうち、下線を付けた数値は明らかな染色体異常誘発が認められた処理条件である。表中では異常誘発が認められたケースを（+）、認められなかったケースを（-）で表してある。CPおよびTEMでは処理濃度の調査を10  $\mu\text{g/ml}$  で打ち切っているが、これは100  $\mu\text{g/ml}$  の濃度では精子核の発生が雄性前核期で停止し、染色体の形成が認められなかったためである。

比較のために、培養体細胞で染色体異常誘発が認められる濃度も表7に示した。体細胞の場合の処理時間は24-48時間で、精子の場合よりもかなり長いので、異常誘発能の直接的な比較はできないが、興味ある結果が得られた。すなわち、DMとTEMでは体細胞の場合にほぼ匹敵する濃度で精

表7 ウシ精子染色体に及ぼす6種制癌剤の影響

制癌剤	処理濃度 ( $\mu$ g/ml)	処理時間 (分)	染色体異常誘発能	体細胞での有効濃度 ( $\mu$ g/ml)
BM	1, 10, <u>100*</u>	<u>60*</u> , 120	+	0.4 - 40
CP	1, 10, 100, 1000	60, 120	-	1.0 - 5.0
DM	0.1, <u>1</u> , 10	<u>60</u>	+	0.1 - 10
MMS	1, 10, <u>100</u>	60, <u>120</u>	+	10 - 40
MMC	0.1, 1, 10, 100	60, 120	-	0.05 - 1.5
TEM	0.1, <u>1</u> , 10	<u>60</u> , 120	+	0.2 - 5.0

\* 下線を付けた数値は、明瞭な染色体異常増加が認められた処理濃度および処理時間。

BM, プレオマイシン; CP, サイクロフォスファミド; DM, ダウノマイシン; MMS, メタンスルホン酸メチル; MMC, マイトマイシン C; TEM, トリエチレンメラミン

子に異常が認められ、BM と MMS では体細胞の場合よりも高濃度を必要とするものの、異常誘発は認められた。ところが、CP と MMC では体細胞で異常誘発が認められている濃度の 100-1000 倍の濃度でも精子染色体異常の誘発は認められなかった。しかし、この現象は奇妙なことではないと考えられる。これまでの研究で、CP そのものには染色体異常誘発能はなく、細胞内でこの物質が代謝された時に生じる phosphoramidate mustard に異常誘発能（アルキル化作用による）があると考えられている。同様に、MMC の場合にも、その代謝産物が異常誘発能（DNA のグアニン基に作用して架

橋を形成することによる)をもつと考えられている。ところが、前述したように精子は細胞質をもっておらず、細胞としての活性が休止している状態にあるので、これらの薬品は代謝されず、従って、異常誘発作用を示さないものと思われる。つまり、従来考えられていた異常誘発機序の妥当性は我々の実験系からも確認された。今回の結果からも分かるように、精子を用いた *in vitro* の実験系は、化学物質による染色体異常誘発がその物質の直接作用なのか、あるいは代謝産物による間接作用なのかを区別できる非常によい実験系であるといえる。

表 8 制癌剤誘発の染色体異常をもつヒト精子の出現率

実験群	処理濃度と時間	分 析 精子数	染色体異常 をもつ精子 の数 (%)	制癌剤誘発 異常精子出 現率 (%)
対 照		111	15 (13.5 %)	
B M	50 $\mu$ g/ml, 90 分	113	39 (34.5 %)	24.3 %
対 照		139	15 (10.8 %)	
D M	0.1 $\mu$ g/ml, 90 分	117	62 (53.0 %)	47.3 %
対 照		196	22 (11.2 %)	
M M S	100 $\mu$ g/ml, 120 分	113	67 (59.3 %)	54.1 %
対 照		139	14 (10.1 %)	
T E M I	0.1 $\mu$ g/ml, 120 分	169	94 (55.6 %)	50.7 %
対 照		143	17 (11.9 %)	
T E M II	1.0 $\mu$ g/ml, 120 分	138	128 (92.8 %)	91.8 %
対 照		2,098	296 (14.1 %)	
X 線	0.91 Gy	819	349 (42.6 %)	33.2 %

## (2) ヒト精子染色体に及ぼす制癌剤の影響

ウシ精子で得られた基礎データに基づいて、ヒト精子染色体に及ぼす影響をより詳細に調査した。調査した薬品は、ウシ精子で異常誘発能が認められた BM, DM, MMS および TEM の 4 種類である。DM および TEM では、ウシ精子を用いた予備実験で非常に高頻度の染色体異常誘発が認められたので、本実験では処理濃度を一桁低くして調査を行った。同様に BM では処理濃度を半分にした。制癌剤誘発異常の出現率は I - 2 に述べた計算式を用いて算出した。

(a) 制癌剤誘発の染色体異常精子出現率：4 つの薬品についての精子処理条件、染色体分析精子数、異常をもつ精子数は表 8 に示す通りである。BM, DM, MMS および TEM I ( $0.1 \mu\text{g/ml}$ ) 群における制癌剤誘発の異常精子出現率はそれぞれ 24.3 %, 47.3 %, 54.1 % および 50.7 % とかなり高

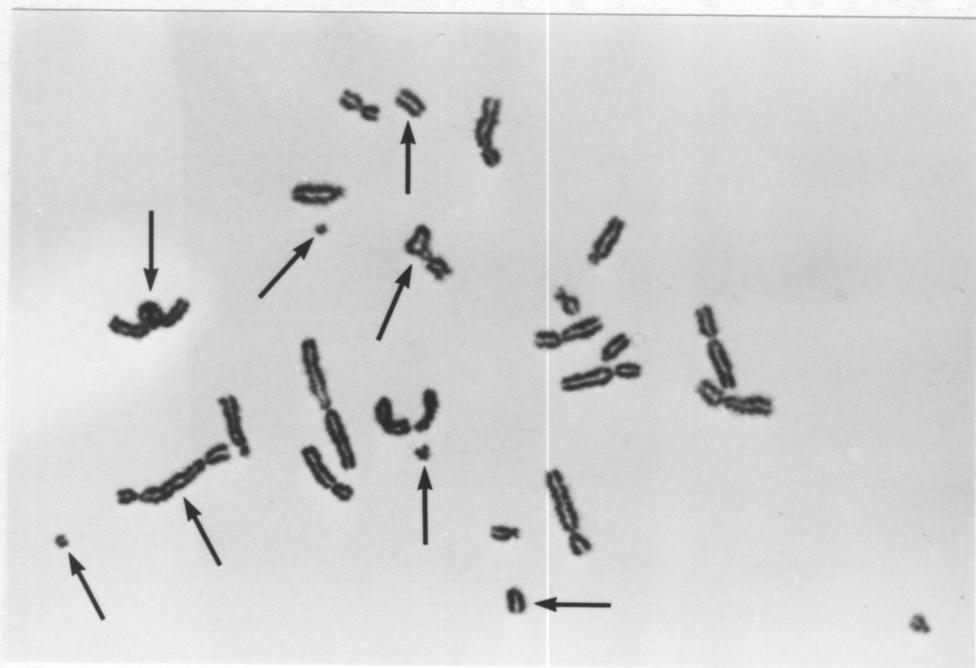


図 9 MMS 処理をしたヒト精子に由来する核板。種々のタイプの染色体異常 (矢印) がみられる

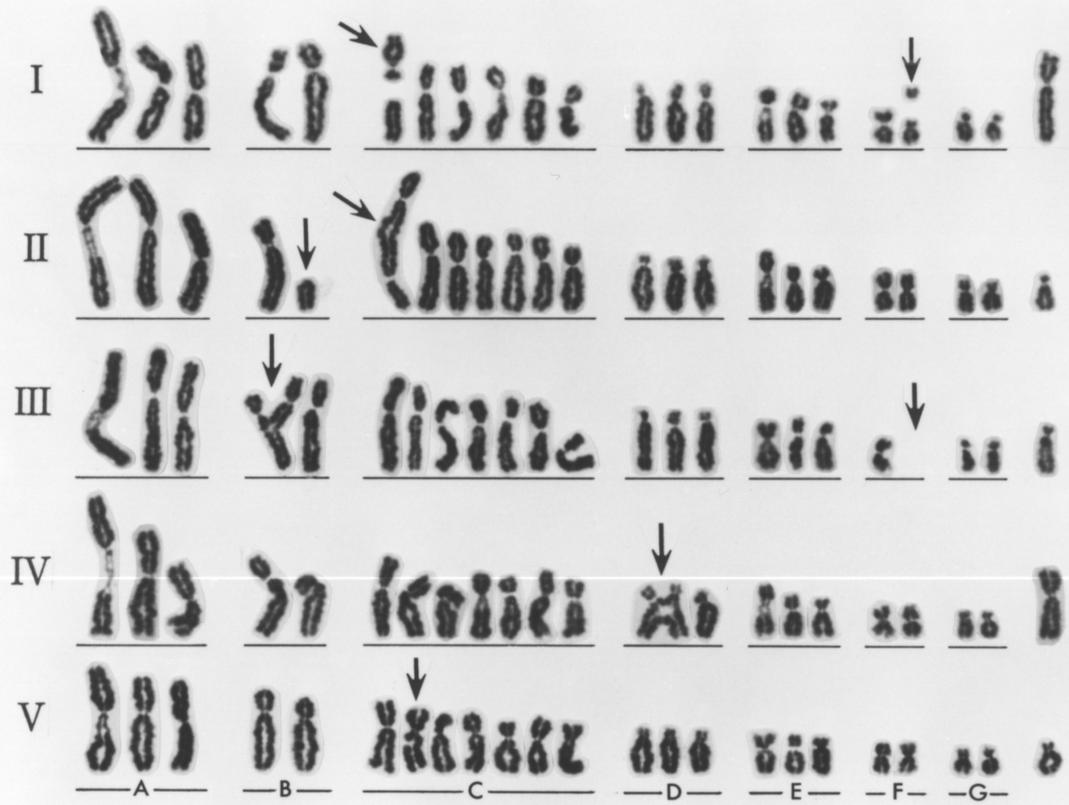


図 1 0 制癌剤処理後のヒト精子にみられた各種構造的染色体異常。I : 染色体切断、II : 二動原体染色体および派生染色体断片、III : 染色分体型交換（三放射状）、IV : 染色分体型交換（四放射状）、V : 染色分体ギャップ

く、比較のために表に載せた X線照射 (0.91 Gy) の場合に匹敵するかまたはそれ以上であった。さらに、処理濃度を10倍高くして行った TEM II (1.0  $\mu$ g/ml) 群では、異常精子出現率は 91.8 % まで上昇した。

薬品処理時間は 90-120 分間で、培養体細胞での実験系よりもかなり短いにもかかわらず、高頻度の異常誘発が認められた。したがって、これらの薬品はかなり短時間の間に精子頭部内に浸透し、DNA に障害を生ぜしめるものと考えられる。

(b) 制癌剤によって誘発された染色体異常の種類と頻度：観察された構造的染色体異常の種類は切断、染色体断片、交換、欠失およびギャップであった (図9 および 10)。前3者の異常はいずれも薬品処理によって増加したが、後2者は非常に低頻度の散発的出現を示し、実験群と対照群の間で出現率の差はなかった。前3者はそれぞれ染色体型および染色分体型異常を含んでおり、染色体型交換としては二動原体染色体、環状染色体、相互転座染色体などが観察され、染色分体型交換としては三放射状、四放射状交換および3本以上の染色体の関係する複雑な交換が観察された。これらの異常は切断型異常と交換型異常に大別され、さらにそれぞれは染色体型異常と染色分体型異常に分類された。各異常の精子当たりの出現頻度は表9、10 および図11にまとめられている。また、比較のために未処理 (対照) 群および放射線照射群における各種染色体異常頻度も同時に示した。

各構造異常の出現頻度は薬品の種類によってかなり異なっていたが、おおまかに見ると薬品処理群では放射線群や未処理群に比べて交換型異常の占める割合が高くなっていた。

さらに細かく見ると、MMS や TEMの処理群では染色体型切断の占める割合がかなり高かった。これらの薬品は DNAのアルキル化を引き起こすことが知られているが、それらの DNA損傷のかなりのものが受精卵の第一卵割 G1 期に二重鎖 DNA切断に変換されるものと思われる。

また、DM処理群では染色分体型交換の割合がかなり高くなっていた。こ

表9 制癌剤によりヒト精子に誘発された切断型染色体異常の出現率

実験群	分析 精子数	切断型染色体異常数 (精子当たりの異常数)					
		染色体型異常	制癌剤誘発異常	染色体型異常	制癌剤誘発異常	計	制癌剤誘発異常
対 照	111	14 (0.126)		2 (0.018)		16 (0.144)	
B M	113	104 (0.920)	(0.799)	4 (0.035)	(0.017)	108 (0.956)	(0.817)
対 照	139	24 (0.173)		0 (0.000)		24 (0.173)	
D M	117	50 (0.427)	(0.257)	3 (0.027)	(0.027)	53 (0.453)	(0.282)
対 照	196	19 (0.097)		2 (0.010)		21 (0.107)	
M M S	113	78 (0.690)	(0.596)	3 (0.027)	(0.016)	81 (0.717)	(0.613)
対 照	139	10 (0.072)		1 (0.007)		11 (0.079)	
T E M I	169	117 (0.692)	(0.622)	9 (0.053)	(0.046)	126 (0.746)	(0.669)
対 照	143	16 (0.112)		1 (0.007)		17 (0.119)	
T E M II	138	246 (1.783)	(1.679)	20 (0.145)	(0.138)	266 (1.928)	(1.818)
対 照	2,098	276 (0.132)		31 (0.015)		307 (0.146)	
X 線	819	452 (0.552)	(0.423)	42 (0.051)	(0.037)	494 (0.603)	(0.460)

表10 制癌剤によりヒト精子に誘発された交換型染色体異常の出現率

実験群	分析 精子数	交換型染色体異常数 (精子当たりの異常数)					
		染色体型異常	制癌剤誘発異常	染色体型異常	制癌剤誘発異常	計	制癌剤誘発異常
対 照	111	1 (0.009)		0 (0.000)		1 (0.009)	
B M	113	23 (0.204)	(0.195)	17 (0.150)	(0.150)	40 (0.354)	(0.345)
対 照	139	1 (0.007)		2 (0.014)		3 (0.022)	
D M	117	4 (0.034)	(0.027)	38 (0.325)	(0.311)	42 (0.359)	(0.338)
対 照	196	0 (0.000)		1 (0.005)		1 (0.005)	
M M S	113	2 (0.018)	(0.018)	19 (0.168)	(0.163)	21 (0.186)	(0.181)
対 照	139	0 (0.000)		2 (0.014)		2 (0.014)	
T E M I	169	4 (0.024)	(0.024)	22 (0.130)	(0.116)	26 (0.154)	(0.140)
対 照	143	1 (0.007)		0 (0.000)		1 (0.007)	
T E M II	138	20 (0.145)	(0.138)	64 (0.464)	(0.454)	84 (0.609)	(0.602)
対 照	2,098	16 (0.008)		53 (0.025)		69 (0.033)	
X 線	819	19 (0.023)	(0.016)	35 (0.043)	(0.018)	54 (0.066)	(0.033)

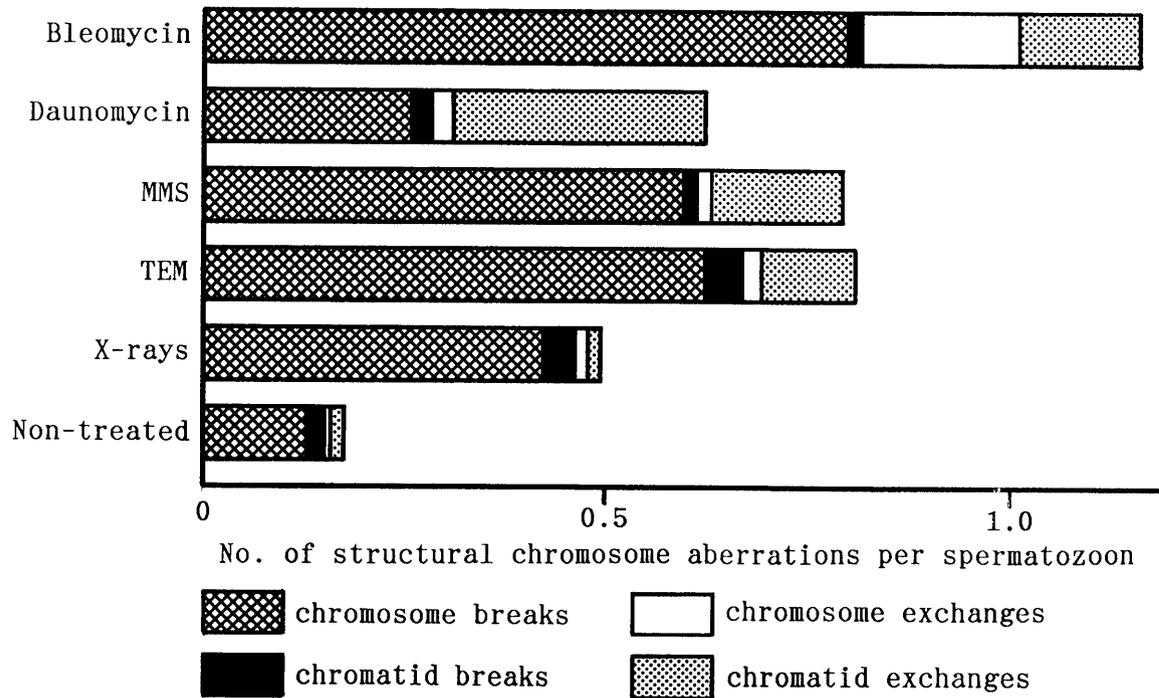


図 1 1 制癌剤処理によってヒト精子に誘発された各種染色体異常の頻度

の薬品は DNA分子の間に挿入されてその複製を阻害すると考えられているが、薬品による異常部位が S-G<sub>2</sub> 期に卵子のもつ DNA修復酵素によって切り出され、切断部位が再結合される際にミスが起こって染色分体交換になったのではないかと推測される。

BM処理群では染色体型交換の頻度が他の群よりかなり高いが、このことは BM によって生じた DNA切断部位のかなりのものが受精卵の G<sub>1</sub> 期に修復（除去修復系？）され、その際のミスによってこの異常が生じたことを示唆している。また、この薬品群では染色体異常精子の出現率が他の薬品群よりも低いにもかかわらず、精子当たりの異常染色体頻度は逆に最も高かった。すなわち、異常を全くもたない精子と複数の異常をもつ精子とに二極化する傾向を示した。このことは精子プロタミンの S-S 結合化と関連するのではないかと考えられる。DNAはプロタミンの S-S 結合によって成熟精子の頭部内にコンパクトに畳み込まれている。しかし、ヒトとゴリラでは他の哺乳類と異なり、射精された精子のなかにかかなりの頻度で S-S 結合度の低い（SH基が多い）プロタミンをもつもの（おそらく未熟精子）がある（Hoshi, 1993）。BM は SH 化合物と結合した DNAと反応して糖-リン酸結合の切断を引き起こすと考えられているので、このような未熟精子で BM による DNA障害が多発しやすい可能性がある。

いずれにしても、精子の DNA 障害は受精後に卵子のもつ DNA 修復系の修飾を受け、各種染色体異常として固定される。つまり、上に述べた異常誘発の薬品差は、各薬品による DNA損傷の質的違いとともに、それらの損傷の修復のされ方の違いも反映しているものと思われる。言い換えれば、本研究で得られたヒト精子染色体異常誘発率はハムスター卵子のもつ DNA 修復酵素系の特性に依存しているということを忘れてはならない。究極的には DNA障害をもつヒト精子がヒト卵子に受精した時にどのような異常がどのような頻度で生ずるのかということが問題であるが、今のところ、ヒト卵子がどのような DNA修復系の特性をもっているのか全く分かっていない。

今回の研究は、制癌剤に精子染色体異常誘発能があるか否かを明らかにすることを主体とした定性的研究であったが、次の段階としては薬品の投与量と異常誘発率の関係を明らかにする定量的研究を行わなければならない。

また、今回の結果は *in vitro* の系での結果で、*in vivo* の場合（患者に制癌剤を投薬した場合）には薬品の体内での代謝や各組織での吸収率の問題が絡んでくる。従って、今後は実際に化学療法を施す前後で患者の精子染色体異常出現率を調べることが必要である。特に、治療後は経時的に調査を持続し、治療直後にみられた異常がどのような消長を示すかを調べることは、患者の家族計画にアドバイスを与える上で重要な資料となるものである。

### Ⅲ. ヒト精子染色体異常の自然発生率

#### 1. はじめに

ヒト精子染色体分析の結果が初めて報告されて以来（Rudak et al., 1978）、この分野で最も多い研究報告は染色体異常自然発生率に関するものである（表11）。しかし、各染色体異常の出現率は研究者によってかなり異なっている。例えば、異数性精子の出現率は1.6-12.8%、構造的染色体異常の出現率は1.7-8.6%の範囲に広がっている。これらの差が各研究者の取り扱った集団の特性を反映しているという可能性はもちろんあるが、精子染色体標本作製技術の不備という人為的原因も重要であるということはずでに本研究のI項で述べた通りである。

そこで我々はより信頼性の高いデータを得るべく、成功率の高い標本作製法を確立して（Kamiguchi and Mikamo, 1986）この問題に取り組んだ。

本科学研究補助金による研究を開始してから現在まで、22名の健常男性

から得た合計 4,579精子について染色体を分析した。研究方法については I 項ですでに述べたので、ここでは省略する。

## 2. 結果および考察

### (1) 異数性精子の出現率

異数性精子の出現率は平均  $1.3 \pm 0.6\%$  で、高数性 ( $0.6 \pm 0.4\%$ ) および低数性 ( $0.7 \pm 0.5\%$ ) の頻度はほぼ等しかった (表 1 2)。

ヒトの特定の染色体がもつ異形性 (正常変異) を利用して、異常染色体がその個体の両親のどちらに由来するかを調査することができる。この方法を用いて流産児や新生児におけるトリソミーの余剰染色体の由来を調査した研究から、母親 (卵子) 由来の異常が父親 (精子) 由来の異常よりもはるかに多いことが明らかにされている (Hassold and Matsuyama, 1979;

表 1 1 ヒト精子染色体異常の自然発生率：従来の研究報告

著 者	調 査 年	分 析 個体数	精 子 数	染色体異常頻度 (%)		
				高数性	低数性	構造異常
Rudak et al.	(1978)	1	60	1.7	3.3	1.7
Martin et al.	(1983)	33	1,000	2.4	2.7	3.3
Sèle et al.	(1985)	7	70	5.7	7.1	1.4
Brandriff et al.	(1985)	11	2,468	0.7	0.9	7.7
Jenderny & Röhrborn	(1987)	6	129	0.8	0.8	6.2
Martin et al.	(1987)	30	1,582	1.3	3.4	6.2
Rosenbusch et al.	(1991)	10	413	1.0	1.0	7.0
Benet et al.	(1992)	3	505	2.0	9.1	6.9
Martin et al.	(1992)	107	5,448	0.8	3.9	8.6
Kamiguchi et al.	(本研究)	22	4,579	0.6	0.7	15.1

Mikkelsen et al., 1980;)。これらの研究結果と、ヒトで異数性精子の出現率が比較的低いという今回の結果を考え合わせると、異数体生成に関して父親側の寄与率はそれほど高くないものと思われる。母親側で異数性が生じやすい原因の一つとしては母親の加齢、遅延排卵、遅延受精に伴って起こる卵子のエージングが重要視されている (Mikamo and Hamaguchi, 1975; 美甘、1978)。

## (2) 構造的染色体異常の出現率

構造的染色体異常をもつ精子の出現率は  $15.1 \pm 4.1\%$  で、異数性精子の出現率よりはるかに高かった (表 1 2)。また、構造異常の出現率には著しい個人差 (7.0-24.8%) がみられた。観察された異常を種類別にみると、切断が最も多く、次いで染色体断片、転座、ギャップ、欠失の順であった (表 1 3)。

今回の異常精子出現率からみて、構造的染色体異常をもつ児の生成への父親側の寄与率はかなり高いものと思われる。これを支持する結果は、染色体の異形性マーカーや DNA の制限酵素認識部位の多形性を利用した研究からも得られている。すなわち、構造異常のうち両親が正常の核型をもっており、遺伝性でないことが確かめられている異常の多くが父親 (精子) 側の原因によるものであるということが最近明らかになってきている (Chamberlin and Magenis, 1980; Olson and Magenis, 1988; Butler, 1990)。

今回観察された構造異常の 80% 以上が切断や染色体断片であった。動原体のない切断片がまだ残っていることからみて、これらの異常は、成熟分裂を終了した精細胞が成熟精子期を経て射精されるまでの期間 ( $40 + \alpha$  日間) に生じたものと考えられる。前述したように、この時期には精子の DNA 修復がなく、変異原による DNA 障害作用を受けやすい時期であるということもこの考えを支持するものである。

ヒトでは受精の機会を得た卵の 74% が着床直後までに死亡すると報告されており (Edmonds et al., 1982)、また、受精卵の約半数が染色体異

常で、その多くが数的異常であると推定されている (Boué et al., 1975)。  
 しかし、今回の結果から考えると、ヒトで高率にみられる初期死亡胚のな  
 かには数的異常のほかに精子由来の構造異常に起因するものも少なからず

表 1 2 ヒト精子染色体異常自然発生率

個体 番号	分 析 精子数	正 常 (%)	異 常 (%)		
			高数性	低数性	構造異常
1	253	226 (89.3)	1 (0.4)	1 (0.4)	25 (9.9)
2	200	176 (88.0)	1 (0.5)	2 (1.0)	21 (10.5)
3	110	91 (82.7)	1 (0.9)	2 (1.8)	16 (14.5)
4	201	163 (81.1)	1 (0.5) [1]	2 (1.0) [1]	37 (18.4)
5	302	254 (84.1)	2 (0.7) [1]	2 (0.7) [1]	46 (15.2)
6	163	141 (86.5)	1 (0.6)	0 (0.0)	21 (12.9)
7	301	261 (86.7)	2 (0.7)	3 (1.0) [2]	37 (12.3)
8	591	515 (87.1)	4 (0.7) [1]	5 (0.8)	68 (11.5)
9	139	121 (87.1)	2 (1.4)	1 (0.7)	15 (10.8)
10	129	96 (74.4)	1 (0.8)	0 (0.0)	32 (24.8)
11	243	225 (92.6)	1 (0.4)	0 (0.0)	17 (7.0)
12	271	214 (79.0)	1 (0.4)	0 (0.0)	56 (20.7)
13	132	113 (85.6)	0 (0.0)	1 (0.8)	18 (13.6)
14	181	161 (89.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	19 (10.5)
15	209	176 (84.2)	1 (0.5)	2 (1.0)	30 (14.4)
16	152	126 (82.9)	1 (0.7) [1]	1 (0.7) [1]	26 (17.1)
17	203	167 (82.3)	1 (0.5)	3 (1.5) [1]	33 (16.3)
18	135	108 (80.0)	0 (0.0)	1 (0.7)	26 (19.3)
19	113	91 (80.5)	1 (0.9)	0 (0.0)	21 (18.6)
20	157	125 (79.6)	1 (0.6)	2 (1.3)	29 (18.5)
21	235	191 (81.3)	2 (0.9)	1 (0.4)	41 (17.4)
22	159	128 (80.5)	2 (1.3)	1 (0.6)	28 (17.6)
計	4,579	3,869 (83.8 ± 4.1)	27 [4] (0.6 ± 0.4)	31 [6] (0.7 ± 0.5)	662 (15.1 ± 4.1)

表13 ヒト精子染色体異常の種類および出現率

個体 番号	分 析 精子数	染色体異常数 (精子当たりの異常数)				計
		切断型異常		交換型異常		
		染色体型	染色分体型	染色体型	染色分体型	
1	253	19 (0.075)	4 (0.016)	1 (0.004)	4 (0.016)	28 (0.111)
2	200	16 (0.080)	2 (0.010)	1 (0.005)	3 (0.015)	22 (0.110)
3	110	19 (0.173)	1 (0.009)	1 (0.009)	0 (0.000)	21 (0.191)
4	201	43 (0.214)	3 (0.015)	1 (0.005)	2 (0.010)	49 (0.244)
5	302	52 (0.172)	2 (0.007)	1 (0.003)	6 (0.020)	61 (0.202)
6	163	22 (0.135)	2 (0.012)	1 (0.006)	2 (0.012)	27 (0.166)
7	301	34 (0.113)	3 (0.010)	1 (0.003)	2 (0.007)	40 (0.133)
8	591	59 (0.100)	6 (0.010)	2 (0.003)	4 (0.007)	71 (0.120)
9	139	24 (0.173)	0 (0.000)	1 (0.007)	2 (0.014)	27 (0.194)
10	129	30 (0.233)	9 (0.070)	1 (0.008)	4 (0.031)	44 (0.341)
11	243	15 (0.062)	4 (0.016)	1 (0.004)	1 (0.004)	21 (0.086)
12	271	58 (0.214)	7 (0.026)	3 (0.011)	5 (0.018)	73 (0.269)
13	132	15 (0.114)	3 (0.023)	0 (0.000)	1 (0.008)	19 (0.144)
14	181	12 (0.066)	5 (0.028)	1 (0.006)	2 (0.011)	20 (0.110)
15	209	25 (0.120)	3 (0.014)	1 (0.005)	3 (0.014)	32 (0.153)
16	152	27 (0.178)	5 (0.033)	2 (0.013)	2 (0.013)	36 (0.237)
17	203	30 (0.148)	3 (0.015)	1 (0.005)	3 (0.015)	37 (0.182)
18	135	36 (0.267)	2 (0.015)	5 (0.037)	4 (0.030)	47 (0.348)
19	113	24 (0.212)	1 (0.009)	0 (0.000)	2 (0.018)	27 (0.239)
20	157	34 (0.217)	1 (0.006)	2 (0.013)	4 (0.025)	41 (0.261)
21	235	45 (0.191)	2 (0.009)	1 (0.004)	5 (0.021)	53 (0.226)
22	159	29 (0.182)	3 (0.019)	1 (0.006)	1 (0.006)	34 (0.214)
計	4,579	668 (0.156 ± 0.058)	71 (0.017 ± 0.014)	29 (0.007 ± 0.007)	62 (0.014 ± 0.008)	830 (0.195 ± 0.071)

含まれているものと思われる。上述のように構造異常の多くは切断型異常であった。これらの異常をもつ精子が受精した場合、動原体のない染色体断片は初期卵割の過程で消失してしまうので、胚は欠失型の異常をもつことになる。これらの部分モノソミー胚では遺伝的荷重が大きいので、大部

分が着床直後までに死亡すると思われる。

今回、構造異常をもつ精子の出現率に著しい個人差のあることがわかった。そこで、異常出現率と年齢および喫煙習慣の有無との関連性について調査してみた。しかし、現在までのデータでは、年齢に伴う異常の増加も喫煙による異常の増加も認められなかった。一方、ヒト精子の構造異常出現率を実験動物精子の場合と比べてみると約10倍高いことがわかった（マウス, 0.9%, Matsuda et al., 1985; チャイニーズハムスター, 1.4%, Mikamo and Kamiguchi, 1983b)。これらの個人差や種差の原因は今のところ全く不明であるが、一つの可能性としては、それらが環境変異現から受けた影響の量的・質的差、あるいは変異原に対する感受性の差を反映していると考えられることもできよう。この意味で、身の周りにおける生活関連化学物質の精子染色体に及ぼす影響を調査することはきわめて重要な課題であろう。

### (3) 従来のヒト精子染色体研究との比較

我々の得た異数性精子出現率はこれまでの報告の中で最も低く、逆に構造的染色体異常精子の出現率は最も高かった(表11)。このような差異の原因としては、調査個体の質的差も考えられるが、実験方法の差もまた大きいものと思われる。すなわち、我々の受精卵染色体標本作製法(漸進固定・空気乾燥法, 美甘, 1981; Mikamo and Kamiguchi, 1983a; 美甘・上口, 1985)では、従来の方法(Tarkowski, 1966)と異なり、染色体標本作製過程で卵細胞膜破損による染色体の流失が起こらないので、検出された異数性のなかに人為的に生じた低数性が含まれることはない。また、同様に、染色体断片の流失もないので、構造異常の検出率は最も高い。このような違いが上述の差の原因の一つになっていると思われる。方法論上のこの問題は従来の研究結果を解釈するうえで十分考慮されなければならない。この点、年代を経るにつれて同一研究者のデータが次第に我々のものに近づいてきていることは(Martin et al., 1983, 1987, 1992)大変

興味深い。

#### IV. 凍結保存ヒト精子の染色体分析法の開発

##### 1. はじめに

上述のように、我々はヒト精子を用いて放射線や化学物質の遺伝的影響の評価システムを開発した。しかし、この方法は新鮮な精液試料を用いる方法であるから、それに伴う研究上の制約がある。最も大きな制約は研究場所が限定されることである。すなわち、精子染色体研究技術をもつ研究室は世界でも数える程しかなく、日本国内では我々の研究室以外には一、二カ所しかない。現在、多くの研究者が我々の研究室を訪れて技術の習得を行っているが、世界的に体制が整うにはまだしばらくかかるであろう。このような状況のもとでは、技術をもつ研究室が新鮮精液を入手できるごく限られた個人例でしか染色体調査ができない。しかし、もし本課題の「凍結保存ヒト精子の染色体分析法の開発」が成功すれば、次のような研究上の発展が期待できる。すなわち、(1) なんらかの事故などにより変異原への被曝例が一度に多数生じた場合、それらの精液試料を凍結保存しておき、随時染色体調査を行うことができる。(2) このような症例が遠隔地で生じた場合、精液試料を凍結して検査技術をもつ研究室まで輸送することができる。(3) 一つの精液資料を分割、保存して何回かに利用できるので1試料当たりの分析精子数は飛躍的に増大する。

そこで、本研究ではこれまで報告されている数種のヒト精子凍結保存法が実際に精子染色体分析に応用できるか否かの検討を行った。

##### 2. 方法

###### (1) ヒト精子凍結保存液

調査したヒト精子凍結保存液は、Human Sperm Preservation Medium (HSP 液) (Mahadevan et al., 1983)、Modified Human Sperm Preservation Medium (修正 HSP 液) (Mahadevan and Trounson, 1983)、KS-II 液 (小林・他, 1987)、Ackerman's Cryopreservation Medium (AC 液) (Chernos and Martin, 1989) および TEST Yolk Buffer with Glycerol (TYB 液) (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) の 5 種類で、各精子保存液の組成は表 14-17 に示す通りである。なお、市販の TYB 液については正確な組成は不明である (企業秘密)。

保存液は各著者の記載した方法にしたがって調合し、ガラスバイアルに 5 ml ずつ分注して  $-40^{\circ}\text{C}$  以下で冷凍保存した。

## (2) 凍結・解凍および媒精方法

採取した精液を  $37^{\circ}\text{C}$  の恒温器中で 20-30 分間液化した後に、血球計算盤あるいは精子数測定チェンバーを用いて精子濃度と運動能をもつ精子の比率率を測定した。

凍結保存液をあらかじめ室温あるいは  $37^{\circ}\text{C}$  に温めておき、これに液化精液を加えて所定の濃度に希釈した。希釈精液を 0.5 ml 精液ストローに詰め、シーリングパウダーで封入した。ストローをプログラムフリーザーにセットし、所定のスケジュールで冷却・凍結し、液体窒素の中に保存した。また、プログラムフリーザーを用いない簡便法では、精液ストローあるいはクライオチューブに分注した希釈精液を液体窒素タンク内に吊して窒素の蒸気で凍結させ、そのまま液体窒素中に投入した。

2-7 日間の保存期間の後に、ストローを  $37^{\circ}\text{C}$  の温水中に直接浸して急速解凍した。解凍後、精液を少量スライドグラスに取り、顕微鏡下で生存精子の割合を調べた。残りの解凍精液に BWW 液 5 ml を加えて希釈した後、遠心して上澄みの耐凍剤を除去した。沈澱精子に少量の BWW 液を加えて精子懸濁液を作り、その後は新鮮精液の場合と同様に精子の浮遊、受精能獲得、媒精を行った。

表 1 4 H S P 液の組成

グリセリン	7.5 ml (15 %)
蔗糖	855.75 mg (50 mM)
H e p e s *	238.30 mg (20 mM)
蒸留水	42.5 ml

\* N-2 Hydroxyethylpiperazine N-2 ethane sulphonic acid

表 1 5 修正 H S P 液の組成

NaCl	584.4 mg (100.000 mM)
KCl	40.0 mg ( 5.365 mM)
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	40.0 mg ( 2.721 mM)
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10.0 mg ( 0.492 mM)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	5.0 mg ( 0.321 mM)
NaHCO <sub>3</sub>	260.0 mg ( 30.949 mM)
乳酸ナトリウム	0.22 ml ( 12.856 mM)
H e p e s	476.6 mg ( 20.000 mM)
蔗糖	1711.5 mg ( 50.000 mM)
グリシン	1000.0 mg (133.210 mM)
ブドウ糖	100.0 mg ( 5.551 mM)
グリセリン	15.0 ml
硫酸カナマイシン	5.0 mg
ヒト血清アルブミン	400.0 mg
蒸留水	100.0 ml

表 1 6 K S - II 液の組成

溶液 A		K S - II 液	
NaCl	580 mg	溶液 A	60 ml
KCl	40 mg	グリセリン	15 ml
MgSO <sub>4</sub>	9.8 mg	新鮮卵黄	25 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10.8 mg	-----	
NaHCO <sub>3</sub>	200 mg	計	100 ml
Tris	240 mg	-----	
蔗糖	1600 mg		
グリシン	1000 mg		
乳酸カルシウム	75 mg		
-----			
蒸留水	100 ml		

表 1 7 A C 液の組成

Bacto egg yolk enrichment-50%	40 ml
Glycerol	30 ml
Glycine	2.0 g
Glucose	2.6 g
Sodium citrate	2.3 g
-----	
Distilled water	98.7 ml

### 3. 結果および考察

正常精液所見をもつ 5-10 名の男性について精子凍結保存処理を行った。解凍後の精子生存率には大きな個人差がみられ、特定の個人ではどの凍結保存液を用いても良好な精子生存率は得られなかった。

比較的高い精子耐凍性をもつ個体についてみると、HSP 液、修正 HSP 液および AC 液を用いた場合の解凍精子生存率は10-40%と低いのに対して、KS-II 液および TYB 液の場合の生存率はそれぞれ平均 50-70% および 50-60 % で、後 2 者の成績が良好であった。

そこで、これら二つの液で保存した精子を用いて以後の受精能獲得・媒精実験を行った。いずれの場合も、解凍直後の精子の生存率は比較的好かったものの、受精能獲得のための Ca-ionophore 処理、BWW 液による 3-4 時間の精子培養の間に相当数の精子が死亡し、ハムスター卵への受精率の低いケースが多かった。なかには少数例ではあるが、かなりの精子活性低下にもかかわらず新鮮精子を用いた場合に匹敵する高い受精率を示したケースもあった。しかし、全体的には成功率はまだまだ低く、さらに改良が必要である。

具体的な改良点としては、(1) 家畜で凍結精子の活性を高めるために培養液に加えられているテオフィリン、カフェイン、ヒアルロニダーゼなどをヒト精子に応用してみる、(2) Ca-ionophore の濃度や処理時間を変えてみる、(3) BWW 液の組成を修正してみる、などを考えているが、いずれも今後の課題である。

上述の検討を行うと同時に、航空機による凍結精子の運搬も実際に試みた。液体窒素タンクによる運搬にはもちろん問題はなかったが、ストローあるいはクライオチューブを板状のドライアイスでサンドウィッチ状にして発泡スチロール製の箱に入れて運搬しても精子の活性に変化のないことが確かめられた。航空機で運搬する場合、液体窒素は貨物扱いになるが、ドライアイス入りの発泡スチロール箱は手荷物扱いになるので、海外へ運

搬する場合には後者の方が便利であることが分かった。

## V. おわりに

我々の改良法を用いて得られたヒト精子染色体に及ぼす放射線および化学物質の影響の研究成果を報告した。

この分野の研究はまだ進んでおらず、世界でも少数の研究室でデータが得られているに過ぎない。特に、環境変異原の精子染色体に及ぼす影響を *in vitro* の系で定量的に調査した研究は、我々のもの以外にはわずか一篇しかない (Brandriff et al., 1988)。最近、放射線療法を施された患者で、精子染色体異常の増加傾向が報告されているが (Martin et al., 1986; Jenderny and Röhrborn, 1987; Genescà et al., 1990)、分析精子数が少ないので今後さらに検討されなければならない。この研究テーマも含め、今後の研究課題としては (a) 精子染色体異常自然発生率と人種、年齢、職業、地域、嗜好品その他の生活関連化学物質などとの関連の疫学的検討、(b) 種々の放射線や化学物質の精子染色体異常誘発能の実験的検討、(c) 放射線療法や化学療法を受けた患者や男性不妊症患者の精子染色体の臨床的検討、などが挙げられる。また、この研究が広く一般に行われるためには、(a) 蘇生率の高いヒト精子凍結保存法の開発、(b) 発生能の高いハムスター卵子凍結法の開発 (実験動物飼育の必要がなくなり、何時でも何処でもすぐに実験を開始できる) などの改良も必要である。(a) の研究に関しては、残念ながら当該研究期間内に成果をあげることはできなかったが、今後のさらに研究を続けていく予定である。(b) の研究に関しては、本研究補助金で購入したプログラムフリーザーを活用して満足のいく成果を収め、論文として公表した (Tateno et al., 1992)。

本研究で用いた、ヒト精子染色体分析による遺伝的影響評価システムは、種々の化学物質の調査のみならず、来るべき宇宙時代にそなえた宇宙線の

影響評価、リニアモーターカーの開発に伴う電磁波の影響評価、電子レンジから出されるマイクロ波の影響評価など多様な分野の研究に応用可能であり、今後、環境変異原の遺伝毒性に関して全く新しい情報を提供していくであろう。

## VI. 要約

透明帯除去ゴールデンハムスター卵への異種間体外受精を応用したヒト精子染色体分析法を用いて以下の研究を行った。

### 1. ヒト精子染色体に及ぼす放射線の影響

種々の線量 (6.4-423.1 cGy) の  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$  線を *in vitro* でヒト精子に照射し、構造的染色体異常誘発の線量効果関係を調査した。合計 44 名の男性から得られた 1,3909 精子 (照射群, 6,977 精子; 対照群, 6,932 精子) が染色体分析された。構造的染色体異常をもつ精子の出現率は低線量域 (6.4-109.3 cGy) では線量に伴って直線的に増加したが、高線量域 (423.1 cGy) まで含めるとその増加は二次曲線的であった。誘発された異常の中で、切断型異常は交換型異常の 5-10 倍高かった。また、線量に伴う増加は前者では直線的、後者では二次曲線的であった。

### 2. ヒト精子染色体に及ぼす化学物質の影響

ブレオマイシン (BM)、サイクロフォスファミド (CP)、ダウノマイシン (DM)、メタンサルホン酸メチル (MMS)、マイトマイシン C (MMC)、トリエチレンメラミン (TEM) の 6 種の制癌剤について精子染色体に及ぼす影響を調査した。凍結保存ウシ精子を用いた予備実験により薬品の処理濃度、処理時間を決定した後、ヒト精子を用いて本実験を行った (染色体分析精子数: 薬品処理群、650 精子; 対照群、728 精子)。

染色体異常をもつ精子の出現率は BM (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 90 min) 群、24.3 %;

DM (0.1 $\mu$ g/ml, 90 min) 群、47.3 %; MMS (100 $\mu$ g/ml, 120 min) 群、54.1 %; TEM (0.1 $\mu$ g/ml, 120 min) 群、50.7 %; TEM (1.0  $\mu$ g/ml, 120 min) 群、91.8 % で、対照群より有意に高かった。一方、CP (1-1000 $\mu$ g/ml, 120 min) 群および MMC (0.1-100 $\mu$ g/ml, 120 min) 群では、培養体細胞で異常誘発が認められている濃度の 10-100 倍の濃度でも異常の誘発は認められなかった。

### 3. ヒト精子染色体異常の自然発生率

正常男性 22 名から得た 4,579 精子を染色体分析した。異数性精子の出現率は平均  $1.3 \pm 0.6$  % で、高数性の頻度 ( $0.6 \pm 0.4$  %) と低数性の頻度 ( $0.7 \pm 0.5$  %) はほぼ等しかった。構造異常の出現率は  $15.1 \pm 4.1$  % で、異常精子の出現率には大きな個人差 (7.0-24.8 %) が認められた。観察された構造異常は出現頻度の高い順に切断、染色体断片、交換、ギャップそして欠失であった。

### 4. 凍結保存ヒト精子の染色体分析法の開発

5 種のヒト精子凍結保存液、HSP 液、修正 HSP液、KS-II 液、AC 液および TYB 液で保存した精子で染色体分析が可能か否かを調査した。

5-10 名の男性について調査した結果、凍結・解凍後の精子生存率に大きな個人差がみられた。比較的高い精子耐凍性をもつ個体についてみると、HSP 液、修正 HSP液および AC 液を用いた場合の解凍精子生存率は10-40% と低いのに対して、KS-II 液および TYB 液の場合の生存率はそれぞれ平均 50-70% および 50-60 % で、後 2 者の成績が良好であった。しかし、受精能獲得のための Ca-ionophore 処理、BWW 液による 3-4時間の精子培養の間に相当数の精子が死亡し、ハムスター卵への受精率の低いケースが多かった。今後、さらに改良が必要である。

## VI. 参考文献

- Benet, J., Genescà, A., Navarro, J., Egozcue, J. and Templado, C. (1992) Cytogenetic studies in motile sperm from normal men. *Hum. Genet.* 89: 176-180.
- Bertsche, U. (1985) Micronucleus induction in mammalian cell cultures treated with ionizing radiations. *Radiat. Environ. Biophys.* 24: 27-44.
- Boué, J., Boué, A. and Lazar, P. (1975) The epidemiology of human spontaneous abortions with chromosomal anomalies. In "Aging Gametes", Blandau, R. J. (Ed.), Karger, Basel, pp. 330-348.
- Brandriff, B. F., Gordon, L. A., Ashworth, L. K., and Carrano, A. V. (1988) Chromosomal aberrations induced by in vitro irradiation: Comparisons between human sperm and lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 12: 167-177.
- Brandriff, B., Gordon, L., Ashworth, L., Watchmaker, G., Moore II, D., Wyrobek, A. J. and Carrano, A. V. (1985) Chromosomes of human sperm: Variability among normal individuals. *Hum. Genet.* 70: 18-24.
- Brewen, J. G., Payne, H. S., Jones, K. P. and Preston, R. J. (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.
- Bürki, K. and Sheridan, W. (1978) Expression of TEM-induced damage to postmeiotic stages of spermatogenesis of the mouse during early embryogenesis. *Mutation Res.* 52: 107-115.
- Butler M. G. (1990) Prader-Willi syndrome: Current understanding of cause and diagnosis. *Am. J. Med. Genet.* 35: 319-332.
- Chamberlin, J. and Magenis, R. E. (1980) Parental origin of de novo chromosome rearrangements. *Hum. Genet.* 53: 343-347.
- Chernos, J. E. and Martin, R. H. (1989) A cytogenetic investigation of the effects of cryopreservation on human sperm. *Am. J. Hum. Genet.* 45: 766-777.
- Edmonds, D. K., Lindsay, K. S., Miller, J. F., Williamson, E. and Wood, P. J. (1982) Early embryonic mortality in women. *Fertil. Steril.* 38: 447-453.
- Gardner, M. J., Snee, M. P., Hall, A. J., Powell, C. A., Downes, S. and Terrell, J. D. (1990) Results of case-control study of leukaemia and lymphoma among young people near Sellafield nuclear plant in West Cumbria. *Br. Med. J.* 300: 423-429.
- Generoso, W. M., Cain, K. T., Krishna, M. and Huff, S. W. (1979) Genetic

- lesions induced by chemicals in spermatozoa and spermatids of mice are repaired in the egg. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 435-437.
- Genescà, A., Barros, L., Miró, R., Caballin, M.R., Benet, J., Fuster, C., Bonfill, X. and Egozcue, J. (1990) Lymphocyte and sperm chromosome studies in cancer-treated men. *Hum. Genet.* 84: 353-355.
- Hassold, Y. and Matsuyama, A. (1979) Origin of trisomies in human spontaneous abortions. *Hum. Genet.* 46: 285-294.
- 一ツ町晋也 (1981) Triethylenemelamine および Mitomycin C による優性致死作用の細胞遺伝学的研究. *J. Takeda Res. Lab.* 40: 37-66.
- Hitotsumachi, S. and Kikuchi, Y. (1977) Chromosome aberrations and dominant lethality of mouse embryos after paternal treatment with triethylenemelamine. *Mutation Res.* 42: 117-124.
- 星和彦 (1993) 受精にともなう精子の変化. 日本不妊学会北海道地方部会総会, 平成5年2月, 札幌.
- ISCN (1985) An international system for human cytogenetic nomenclature (1985), *Cytogenet. Cell Genet.*, Karger, Basel, pp. 1-117.
- Jenderny, J. and Röhrborn, G. (1987) Chromosome analysis of human sperm. I. First result with a modified method. *Hum. Genet.* 76: 385-388.
- 上口勇次郎 (1989) 生殖細胞の培養と染色体分析. 2. 配偶子、受精卵、初期胚. *臨床病理.* 80: 299-309.
- Kamiguchi, Y. and Mikamo, K. (1986) An improved, efficient method for analyzing human sperm chromosomes using zona-free hamster ova. *Am. J. Hum. Genet.* 38: 724-740.
- Kamiguchi, Y., Tateno, H. and Mikamo, K. (1990a) Dose-response relationship for the induction of structural chromosome aberrations in human spermatozoa after in vitro exposure to tritium beta-rays. *Mutation Res.* 228: 125-131.
- Kamiguchi, Y., Tateno, H. and Mikamo, K. (1990b) Types of structural chromosome aberrations and their incidences in human spermatozoa X-irradiated in vitro. *Mutation Res.* 228: 133-140.
- Kamiguchi, Y., Tateno, H. and Mikamo, K. (1991) Micronucleus test in 2-cell embryos as a simple assay system for human sperm chromosome aberrations. *Mutation Res.* 252: 297-303.
- 上口勇次郎・立野裕幸・島田昌幸・美甘和哉 (1986) 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: 381-388.
- Kamiguchi, Y., Tateno, H., Shimada, M. and Mikamo, K. (1987) X-ray-induced chromosome aberrations in human spermatozoa. in "New Horizons in Sperm Cell Research", Mohri, H. (Ed.), *Japan Sci. Soc.*

- Press, Tokyo, pp. 117-123.
- Kamiguchi, Y., Tateno, H., Shimada, M. and Mikamo, K. (1988) Radiation-induced chromosome damage in spermatozoa: Comparison between human and other mammalian species. *Jpn. J. Human Genet.* 33: 227.
- Katoh, M. and Iwahara, S. (1983) Relationship between chromosome aberrations at the first cleavage metaphases and postimplantation loss in dominant lethal mutations induced by isopropyl methanesulfonate. *Jpn. J. Genet.* 58: 345-351.
- Katoh, M., Tanaka, N. and Iwahara, S. (1981) Chromosome aberrations induced by mitomycin C treatment in early spermatids of male mice. *Jpn. J. Genet.* 56: 357-363.
- 小林俊文・兼子智・翁文開・李顯統・青木類 (1987) 凍結精子による人工授精の妊娠率向上のポイント. *産婦人科の実際.* 36: 1897-1901.
- Lyon, M.F. (1970) X-ray-induced dominant lethal mutations in male guinea-pigs, hamsters and rabbits. *Mutation Res.* 10: 133-140.
- Mahadevan, M.M. and Trounson, A.D. (1983) Effect of cryoprotective media and dilution methods on the preservation of human spermatozoa. *Andrologia* 15: 355-366.
- Mahadevan, M.M., Trounson, A.D. and Leeton, J.F. (1983) Successful use of human semen cryobanking for in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 40: 340-345.
- Martin, R.H., Balkan, W., Burns, K., Rademaker, A.W., Lin, C.C. and Rudd, N.L. (1983) The chromosome constitution of 1000 human spermatozoa. *Hum. Genet.* 63: 305-309.
- Martin, R.H., Hildebrand, K., Yamamoto, J., Rademaker, A., Barnes, M., Douglas, G., Arthur, K., Ringrose, T. and Brown, I.S. (1986) An increased frequency of human sperm chromosomal abnormalities after radiotherapy. *Mutation Res.* 174: 219-225.
- Martin, R. H., Rademaker, A. W., Hildebrand, K., Long-Simpson, L., Peterson, D. and Yamamoto, J. (1987) Variation in the frequency and type of sperm chromosomal abnormalities among normal men. *Hum. Genet.* 77: 108-114.
- Martin, R.H., Rademaker, A.W., Ko, E., Barclay, L. and Hildebrand, K. (1992) A comparison of the frequency and type of chromosomal abnormalities in human sperm after different sperm capacitation conditions. *Biol. Reprod.* 47: 268-270.
- Matsuda, Y., Seki, N., Utsugi-Takeuchi, T. and Tobari, I. (1989) X-ray- and mitomycin C (MMC)-induced chromosome aberrations in spermiogenic germ cells and the repair capacity of mouse eggs for the X-ray and MMC damage. *Mutation Res.* 211: 65-75.

- Matsuda, Y. and Tobari, I. (1988) Chromosomal analysis in mouse eggs fertilized in vitro with sperm exposed to ultraviolet light (UV) and methyl and ethyl methanesulfonate (MMS and EMS). *Mutation Res.* 198: 131-144.
- Matsuda, Y. and Tobari, I. (1989) Repair capacity of fertilized mouse eggs for X-ray damage induced in sperm and mature oocytes. *Mutation Res.* 210: 35-47.
- Matsuda, Y., Yamada, T. and Tobari, I. (1985) Studies on chromosome aberrations in the eggs of mice fertilized in vitro after irradiation. I. Chromosome aberrations induced in sperm after X-irradiation. *Mutation Res.* 148: 113-117.
- 美甘和哉 (1978) 染色体異常の発生要因. 「染色体異常—ヒトの細胞遺伝学—」, 外村晶・編, 朝倉書店, 東京, pp. 195-220.
- 美甘和哉 (1981) 初期胚の形態学的研究—染色体研究法. 「哺乳動物の初期発生」, 妹尾左知丸・他編, 理工学社, 東京, pp. 307-314.
- Mikamo, K. and Hamaguchi, H. (1975) Chromosomal disorder caused by preovulatory overripeness of oocytes. In "Aging Gametes", Blandau, R. J. (Ed.), Karger, Basel, pp. 72-97.
- Mikamo, K. and Kamiguchi, Y. (1983a) A new assessment system for chromosomal mutagenicity using oocytes and early zygotes of the Chinese hamster. In "Radiation-Induced Chromosome Damage in Man", Ishihara, T. and Sasaki, M. S. (Eds.), Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 411-432.
- Mikamo, K. and Kamiguchi, Y. (1983b) Primary incidences of spontaneous chromosomal anomalies and their origins and causal mechanisms in the Chinese hamster. *Mutation Res.* 108: 265-278.
- 美甘和哉・上口勇次郎 (1985) 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, 東京, pp. 82-89.
- Mikkelsen, M., Poulsen, H., Grinsted, J. and Lange, A. (1980) Nondisjunction in trisomy 21. Study of chromosomal heteromorphisms in 110 families. *Ann. Hum. Genet.* 44: 17-28.
- Olson, S.B. and Magenis, R.E. (1988) Preferential paternal origin of de novo structural chromosome rearrangements. In "The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements", Daniel, A (Ed.), Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 583-599.
- Ono, T. and Okada, S. (1977) Radiation-induced DNA single-strand scission and its rejoining in spermatogonia and spermatozoa of mouse. *Mutation Res.* 43: 25-36.
- Overstreet, J.W., Yanagimachi, R., Katz, D.F., Hayashi, K. and Hanson, F.W. (1980) Penetration of human spermatozoa into the human zona

- pellucida and the zona-free hamster egg: A study of fertile donors and infertile patients. *Fertil. Steril.* 33: 534-542.
- Rosenbusch, B. and Sterzik, K. (1991) Sperm chromosomes and habitual abortion. *Fertil. Steril.* 56: 370-372.
- Rudak, E., Jacobs, PA. and Yanagimachi, R. (1978) Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature* 274: 911-913.
- Sega, G.A. (1974) Unscheduled DNA synthesis in the germ cells of male mice exposed in vivo to the chemical mutagen ethyl methanesulfonate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71: 4955-4959.
- Sèle, B., Pellestor, F., Jalbert, P., Estrade, C., Ostotero, C. and Gelas, M. (1985) Analyse citogenetique des pronucleus a partir du modele de fecondation interspecificque homme-hamster. *Ann. Genet.* 28: 81-85.
- Tanaka, N., Katoh, M. and Iwahara, S. (1981) Formation of chromosome-type aberrations at the first cleavage after MMS treatment in late spermatids of mice. *Cytogenet. Cell Genet.* 31: 145-152.
- Tarkowski, A.K. (1966) An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs. *Cytogenetics* 5: 394-400.
- Tateno, H., Kamiguchi, Y. and Mikamo, K. (1989) Cytogenetic effects of X- and gamma-rays on spermatozoa of the Chinese hamster. *J. Radiat. Res.* 30: 95.
- Tateno, H., Kamiguchi, Y. and Mikamo, K. (1992) A freezing and thawing method of hamster oocytes designed for both the penetration test and chromosome assay of human spermatozoa. *Mol. Reprod. Develop.* 33: 202-209.
- Tateno, H. and Mikamo, K. (1987) A chromosomal method to distinguish between X- and Y-bearing spermatozoa of the bull in zona-free hamster ova. *J. Reprod. Fert.* 81: 119-125.
- Yanagimachi, R. (1966) Time and process of sperm penetration into hamster ova in vivo and in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 11: 359-370.
- Yanagimachi, R., Yamagimachi, H. and Rogers, B.J. (1976) The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 15: 471-476.