
放射線誘発の染色体異常は受精卵の初期発生 過程でどう推移するか

(研究課題番号 : 13680615)

平成 13 年度～平成 16 年度科学研究費補助金 (基盤研究 C)

研究成果報告書

平成 17 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
研究組織および研究経費	2
研究発表	2
研究成果	6
I. マウス初期胚染色体標本作製法の開発	6
II. 1細胞胚の細胞遺伝学的調査	16
III. 2細胞胚の細胞遺伝学的調査	22
IV. 4細胞胚の細胞遺伝学的調査	28
V. 胚盤胞の発生学的調査	35
VI. 初期着床胚の発生学的・細胞遺伝学的調査	37
VII. 後期着床胚の発生学的調査	43
VIII. まとめ	46
引用文献	50
参考論文（原著・総説別刷の掲載）	52

は し が き

平成 13 ～ 16 年度科学研究費補助金（基盤研究 C）の助成を受けて行われた研究「放射線誘発の染色体異常は受精卵の初期発生過程でどう推移するか」（課題番号 13680615）を終え、ここに研究成果をまとめることになった。

放射線の遺伝的影響を知る上で、染色体異常誘発率はよい指標となる。また、精子や卵子は次世代（新個体）を形成する細胞であり、これらの細胞での放射線影響評価はきわめて重要である。近年、配偶子での染色体研究が発展し、成熟精子や排卵直前の卵細胞が放射線に対して敏感である（染色体異常を起こしやすい）ということが数種の動物で明らかにされた。しかし、被曝した配偶子が受精した場合、放射線誘発の染色体異常が初期発生の過程でどのような運命を辿るのか、その全貌はほとんど明らかにされていない。その最大の理由は、成功率の高い染色体標本作製技術が初期胚で確立されていないことにある。

本研究のねらいは、受精卵のもつ放射線誘発染色体異常のうち、どのような異常が発生後期まで残存し続けるのかを明らかにすることである。特に、モザイク型染色体異常胚は比較的高い生存能・発生能をもつので、新生仔期まで残存する遺伝的影響という観点からその調査が重要である。

研究の初年度に当たる平成 13 年度は、まず研究の基礎となるマウス初期胚（1 ～ 8 細胞胚、胚盤胞）の染色体標本作製技術の開発・改良を行った。次年度（平成 14 年度）は、確立した染色体標本作製法を用い、放射線照射精子の受精によって生じた 1 細胞胚および 4 細胞胚の染色体分析を行った。続いて平成 15 年度には 2 細胞胚および 4 細胞胚の染色体分析を行うとともに 8 細胞胚と胚盤胞における発生異常胚出現率の調査を行った。最終年度となる平成 16 年度には、初期着床胚（10～11 日齢胎仔）における染色体異常胚、発生異常胚出現率の調査と後期着床胚（16～17 日齢胎仔）における発生異常胚出現率の調査を行った。4 年間の研究期間内では 8 細胞胚と胚盤胞の染色体分析を行うことができなかったが、それでも胚発生の過程で染色体異常がどのように推移するかの全体像はほぼ把握することができた。

【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助教授）
研究分担者： 日下部 博一 （旭川医科大学医学部教務職員）

【研究経費】

平成 13 年度	1,000 千円
平成 14 年度	1,000 千円
平成 15 年度	1,000 千円
平成 16 年度	700 千円
計	3,700 千円

【研究発表】

〈1〉 学会誌等

1. 上口勇次郎：被曝した精子や卵子が受精したら。 Isotope News, 583: 2-6, 2002.
2. Kamiguchi, Y. and Tateno, H.: Radiation- and chemical-induced structural chromosome aberrations in human spermatozoa. Mutation Res., 504: 183-191, 2002.
3. Tateno, H. and Kamiguchi, Y.: Abnormal chromosome migration and chromosome aberrations in mouse oocytes during meiosis II in the presence of topoisomerase II inhibitor ICRF-193. Mutation Res., 502: 1-9, 2002.
4. 立野裕幸・上口勇次郎・渡邊誠二：精子の形態、運動性と染色体異常。 Medical Science Digest, 28: 138-141, 2002.
5. Tsuchiya, K., Kamiguchi, Y., Sengoku, K. and Ishikawa, M.: A cytogenetic study of in-vitro matured murine oocytes after ICSI by human

- sperm. Hum. Reprod., 17: 420-425, 2002.
6. Tateno, H., Akutsu, H., Kamiguchi, Y., Latham, K.E. and Yanagimachi, R.: Inability of mature oocytes to create functional haploid genomes from somatic cell nuclei. Fertil. Steril., 79: 216-218, 2003.
 7. Tateno, H., Latham, K.E. and Yanagimachi, R.: Reproductive semi-cloning biparental origin. A biologically unsound principle. Hum. Reprod., 18: 472-475, 2003.
 8. Tateno, H., Kosuge, M. and Yanagimachi, R.: Avian chromosomes can be examined by injection of erythrocyte nuclei into mouse oocytes. Hereditas, 138: 158-159, 2003.
 9. Kusakabe, H. and Kamiguchi, Y.: Chromosomal integrity of freeze-dried mouse spermatozoa after ^{137}Cs γ -ray irradiation. Mutation Res., 556: 163-168, 2004.
 10. Kusakabe, H. and Kamiguchi, Y.: Ability to activate oocytes and chromosome integrity of mouse spermatozoa preserved in EGTA Tris-HCl buffered solution supplemented with antioxidants. Theriogenology, 62: 897-905, 2004.
 11. Kusakabe, H. and Kamiguchi, Y.: Chromosome analysis of mouse zygotes after injecting oocytes with spermatozoa treated in vitro with green tea catechin, (-)-epigallocatechin gallate (EGCG). Mutation Res., 564: 195-200, 2004.
 12. Tateno, H. and Kamiguchi, Y.: Chromosome analysis of mouse one-cell androgenones derived from a sperm nucleus exposed to topoisomerase II inhibitors at pre- and post-fertilization stages. Mutation Res., 556: 117-126, 2004.

〈2〉 口頭発表

1. 上口勇次郎：不妊と配偶子・胚の染色体異常。不妊新治療ワークショップ，2001年8月，仙台。
2. Kamiguchi, Y.: Radiation- and chemical-induced structural chromo-

some aberrations in human spermatozoa. The 5th Intern. Symp. on Chromosomal Aberrations, October 26-28, 2001, Awaji Island, Hyogo, Japan.

3. 立野裕幸・上口勇次郎：マウス第二卵母細胞染色体に及ぼすトポイソメラーゼII（トポII）阻害剤の影響。第52回染色体学会，2001年11月，米子。
4. 上口勇次郎：精子・卵子の染色体異常と不妊。第44回日本不妊学会北海道地方部会，特別講演，2002年3月，札幌。
5. 上口勇次郎：被曝した精子や卵子が受精したら：染色体異常胚の発生運命。第13回原子力安全研究協会シンポジウム，2002年6月，東京。
6. 菅沼亮太・柳田薫・片寄治男・呉竹昭治・阿久津英憲・両角和人・佐藤章・立野裕幸・上口勇次郎：卵細胞質内精子注入法に電気刺激法を併用する場合の電気刺激を加えるタイミングについての基礎的検討。第20回日本受精着床学会，2002年10月，岐阜。
7. 日下部博一・Szczygiel, M.A., Whittingham, D.G., 柳町隆造：凍結乾燥処理後のマウス精子における染色体正常性の維持について。第53回染色体学会，2002年10月，奈良。
8. 立野裕幸・阿久津英憲・上口勇次郎・Latham, K.E., 柳町隆造：マウス除核卵に移植された体細胞核染色体の分離異常。第53回染色体学会，2002年10月，奈良。
9. 日下部博一・Szczygiel, M.A., Whittingham, D.G., 柳町隆造：キレート剤を使用するマウス精子の凍結乾燥保存法とゲノム正常性の維持。第45回日本不妊学会北海道地方部会，2003年3月，札幌。
10. 立野裕幸・阿久津英憲・上口勇次郎・Latham, K.E., 柳町隆造：体細胞核で再構築された卵子における染色体の半数化(haploidization)について。第45回日本不妊学会北海道地方部会，2003年3月，札幌。
11. 両角和人・柳田薫・片寄治男・佐藤章・立野裕幸・上口勇次郎：56℃ 30分間加熱処理精子を用いた卵細胞質内精子注入後のマウス受精卵の染色体の検討。第21回日本受精着床学会，2003年10月，東京。
12. 両角和人・柳田薫・片寄治男・小宮ひろみ・呉竹昭治・林章太郎・佐藤章・立野裕幸・上口勇次郎：ICSIに併用したストロンチウム処理卵活性化法がマウス配偶子染色体に及ぼす影響に関する検討。第21回日本受精着床学会，2003年10月，東京。

13. 日下部博一・上口勇次郎：ビタミンEで処理した非凍結保存精子の卵活性化能および染色体正常性について。第32回日本環境変異原学会，2003年11月，津。
14. 日下部博一・上口勇次郎：抗酸化物質を含む凍結乾燥用溶液中で室温保存したマウス精子の正常性。第46回日本不妊学会北海道地方部会，2004年3月，札幌。
15. 立野裕幸・上口勇次郎：マウス単為発生卵へのICSIによって作製された受精卵の染色体分析。第46回日本不妊学会北海道地方部会，2004年3月，札幌。
16. 立野裕幸：受精過程における精子核リモデリングと染色体異常。第23回日本アンドロロジー学会，シンポジウムI，2004年7月，甲府。
17. 上口勇次郎：不妊と配偶子染色体異常。第22回日本受精着床学会，会長講演，2004年9月，旭川。
18. 立野裕幸・上口勇次郎：マウス単為発生卵へのICSI：受精率、染色体、発生能。第22回日本受精着床学会，2004年9月，旭川。
19. Tateno, H.: Effects of topoisomerase II inhibitors on mouse sperm chromatin during fertilization. Workshop for assessing human germ cell mutagenesis in the Post-Genome Era, September 28-30, 2004, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA.
20. 日下部博一・上口勇次郎：緑茶カテキンで処理されたマウス精子の染色体分析。第55回染色体学会，2004年11月，岡山。
21. 立野裕幸：生殖工学と染色体解析。第55回染色体学会，公開シンポジウム「染色体がもたらす新しいバイオテクノロジー」，2004年11月，岡山。
22. 日下部博一・上口勇次郎：ガンマ線照射された凍結乾燥精子の染色体正常性。第33回日本環境変異原学会・第18回日本動物実験代替法学会合同学術大会，2004年12月，長崎。

【研究結果】

I. マウス初期胚染色体標本作製法の開発

本研究課題「放射線誘発の染色体異常は受精卵の初期発生過程でどう推移するか」を解明するための実験動物としては、マウスを用いることにした。この動物は放射線や化学物質の影響評価の研究に最も一般的に用いられており、豊富な基礎データが蓄積されているからである。しかし、すでに「はしがき」の項でも述べたように、研究の最も基礎となる染色体標本作製技術がまだマウスでは確立されていなかった。そこでまず最初にこの技術開発に取り組んだ。

我々はすでにチャイニーズハムスターの初期胚を用いて成功率の高い染色体標本作製法（漸進固定空気乾燥法）を確立している（Mikamo and Kamiguchi, 1983）、この技術をマウス初期胚用に修正、適用するという方法で技術開発を進めた。以下に、各発生段階の初期胚で最終的に確立された染色体標本作製法について述べる。

1. 1細胞胚

(1) 実験動物

8-16 週齢の成熟マウス (B6D2F1) を用いた。実験までの間、動物は 14 時間明期 (15:00-19:00) -10 時間暗期 (19:00-5:00) の照明条件下で飼育された。

(2) 過排卵処理、体外受精および受精卵培養 (表 1)

頸椎脱臼法により雄を屠殺して精巣上体尾部を摘出し、精子塊を絞り出した。精子塊を TYH 液中に移し、5% CO₂, 37.5 °C の条件下で 1.0~1.5 時間培養して精子に受精能を獲得させた。

一方、多数の未受精卵を採取するために、8~15 週齢の成熟雌の腹腔内に卵巣刺激ホルモン (PMSG と hCG) を 48 時間間隔で注射して過排卵を誘発した。hCG 注射後 15.5 時間目に輸卵管から未受精卵を回収し、上述の受精能獲得精子で媒精した。精子と卵子を 2 時間共培養した後に、CZB 液中で卵を洗浄して余剰の精子を除去し、新鮮な CZB 液中で受精卵の培養を継続した。

表 1 マウス初期胚 (体外受精胚) の染色体標本作製スケジュール

	1細胞胚	2細胞胚	4細胞胚	8細胞胚	胚盤胞
卵巣刺激(PMSG投与)	22:00(1日目)	22:00(1日目)	22:00(1日目)	6:00(1日目)	18:00(1日目)
誘発排卵(hCG投与)	22:00(3日目)	22:00(3日目)	22:00(3日目)	6:00(3日目)	18:00(3日目)
精子の採取	12:00(4日目)	12:00(4日目)	12:00(4日目)	20:00(3日目)	8:00(4日目)
採卵および媒精	13:30(4日目)	13:30(4日目)	13:30(4日目)	21:30(3日目)	9:30(4日目)
受精卵培養	15:30(4日目)	15:30(4日目)	15:30(4日目)	23:30(3日目)	11:30(4日目)
培養液交換				15:00(5日目)	9:00(6日目)
分裂阻害剤添加	22:00(4日目)	21:00(5日目)	8:00(6日目)	8:00(6日目)	9:00(8日目)
染色体標本作製開始	7:00(5日目)	0:00(6日目)	13:00(6日目)	10:00(6日目)	12:00(8日目)

この方法での受精率は 88% (122/139) と高率であった。

(3) 染色体標本作製

媒精後 6~10 時間目に 0.006 $\mu\text{g/ml}$ のビンブラスチン (細胞分裂阻害剤) を含む CZB 液中に移し、培養を継続した。第 1 卵割中期に達した 1 細胞胚 (媒精後 18~20 時間目) を 0.5% アクチナーゼ溶液で 6~8 分間 (室温下) 処理して透明帯を溶解した (次の低張処理で卵を十分に膨潤させるため)。この受精卵を低張液 (30% 牛胎仔血清と 1% クエン酸ナトリウム溶液を等量混合した溶液) 中で 10 分間 (室温下) 処理して染色体の細胞質内分散を促した。最後に、低張処理した卵を漸進固定空気乾燥法にて標本化した。すなわち、① 1 細胞胚を固定液 I (メタノール : 氷酢酸 : 水 = 5:1:4) 中に移して穏やかに固定し、② 固定された胚をスライドガラス上に載せて固定液 II (メタノール : 氷酢酸 = 3:1) を静かに覆い被せて胚をスライドに定着させ、③ そのスライドを固定液 III (メタノール : 氷酢酸 : 水 = 3:3:1) に移して胚を再固定し (胚の細胞質が軟化する)、④ 最後に、ノズルから吹き出させた温湿風でスライドをゆっくり乾燥させた。この操作によって胚は薄く扁平に押し広げられ、染色体は細胞質中に分散する。

(4) 染色

- ① ギムザ染色 : この乾燥標本を軽く水洗いした後に 2% ギムザ液 (pH 6.8) で 8 分間染色し、通常の核型分析を行った (図 1)。
- ② C バンド分染 : ギムザ染色標本に C バンド分染を施して動原体部分を特異的に染色し (図 7)、より詳細な染色体異常の解析 (数的異常と構造異常の識別) を行った。C バンド分染法の手順は次の通りである。
 - Ⓐ 標本を 50 $^{\circ}\text{C}$ で 1~2 時間処理して卵を固化させる。
 - Ⓑ 0.2N HCl で 30 分間処理する (室温下)。
 - Ⓒ 水洗後、45 $^{\circ}\text{C}$ の 5% Ba(OH)₂ · 7H₂O で 3~4 分間処理する。
 - Ⓓ 水洗後、45 $^{\circ}\text{C}$ の 2 × SSC (standard saline citrate: 0.3M NaCl + 0.03M クエン酸ナトリウム) で 5 分間処理する。
 - Ⓔ 水洗後、4% ギムザ液 (pH 6.8) で 10 分間染色する。
- ③ FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 法による動原体およびテロメアの検出 : 染色体の末端部分にあるテロメアと動原体を同時に検出することによって、C バンド分染法の場合よりもさらに詳しく構造的染色体異常の由来や成因を解析することができる。培養体細胞で確立されているこの方法が、厚い細胞質をもつ初期胚染色体標本に応用できるかどうか検討した。

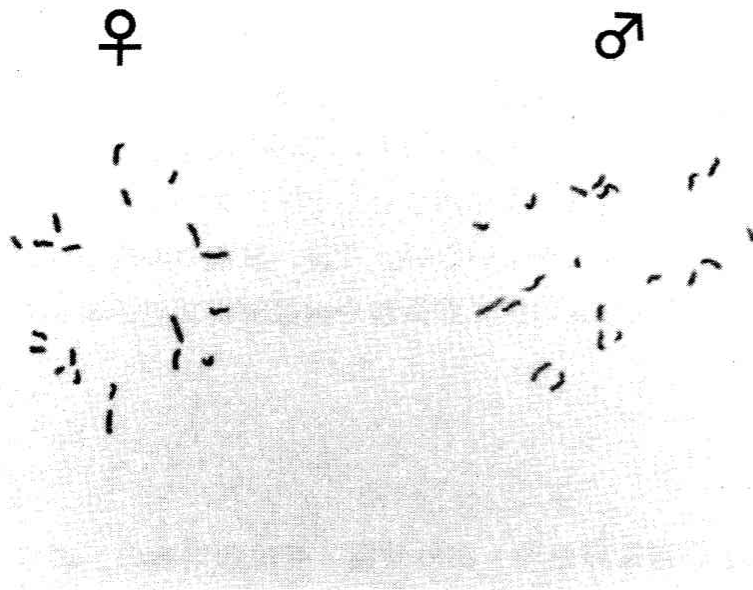


図1 1細胞胚の染色体標本（ギムザ染色）.
 ♀：雌性前核染色体（n=20），♂：雄性前核染色体（n=20）.

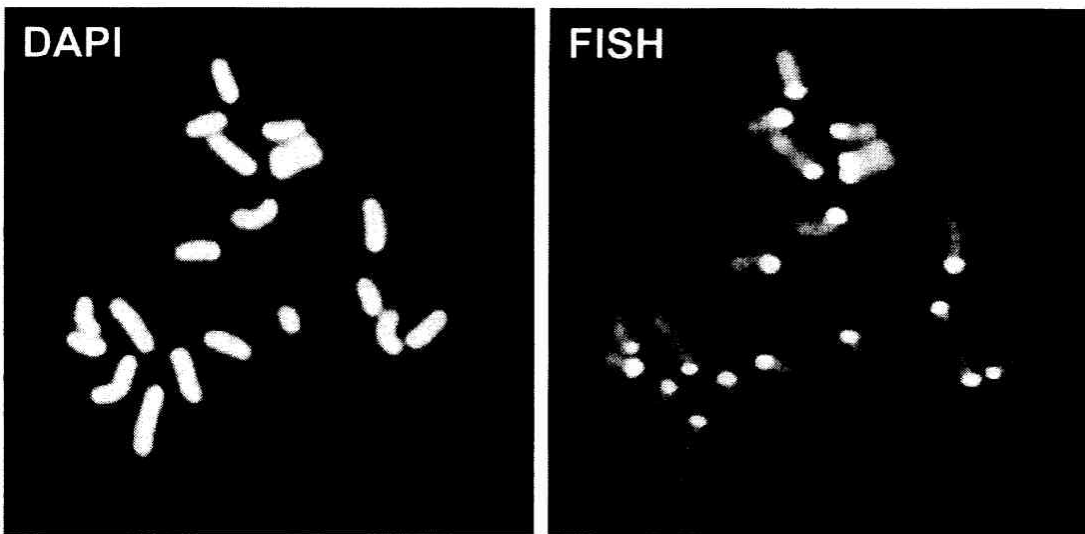


図2 DAPI染色した1細胞胚の染色体核板（n=20）（左）及び同じ核板を動原体FISH法で染色したもの（右）. 動原体部の蛍光シグナルが明瞭である.

- ①動原体 FISH : FITC (fluorescein isothiocyanate) でラベルされた DNA プローブ (Mouse Pan-Centromeric Paint, Calbio 社製) を用いた場合、染色体標本作製法を特に変更しなくても、製造元のプロトコールにしたがって良好な動原体シグナルを得ることができた (図 2)。
- ②テロメア FISH : 上と同様に初期胚染色体に対してビオチンでラベルされた合成ヌクレオチドプローブ [(TTAGGG)⁷ および (CCCTAA)⁷, 北海道システムサイエンス社] を作用させて FISH を行ったが、いまのところ明瞭なシグナルを確認できていない。今後、試薬や実験手順の見直しをするとともに、より高性能の蛍光顕微鏡や画像解析装置の導入も検討しなければならない。

2. 2細胞胚

- (1) 実験動物および過排卵処理・体外受精・受精卵培養の手順 (表 1) は 1細胞胚の場合と同様である。ただ、胚発生の時間経過の都合により、染色体標本作製開始時刻 (第 2 卵割中期到達時刻) は深夜となる。
- (2) 染色体標本作製 : 媒精後 32~33 時間目に 2 種類の分裂阻害剤 (0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ビンブラスチンと 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ノコダゾル) を含む CZB 液中に 2 細胞胚を移し、第 2 卵割中期まで培養を継続した。約 3 時間後、実体顕微鏡下で 2 割球とも核膜が消失している胚 (卵割中期到達胚) を選別し、コンカナバリン A (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含む 0.5% アクチナーゼ溶液で処理して透明帯を溶解した。コンカナバリン A 処理によって割球どうしの接着が強固になり、透明帯溶解後も 2 つの割球細胞が離散しないので、一度に 5~10 個の胚をいっしょに酵素処理することが可能となり、標本作製の作業効率が格段に上がった。2 細胞胚では 1 細胞胚や 4 細胞胚と比べて低張処理による染色体の細胞質内分散がうまくゆかず、質のよい標本ができなかった。しかし、低張液の組成を色々工夫した結果、40% 牛胎仔血清 : 1.0% クエン酸ナトリウム = 3:2 の混合液で 10 分間処理するという条件で最も良好な標本が得られた (図 3)。低張処理後の胚の固定法、空気乾燥標本作製法は 1 細胞胚の場合と同じである。上述した 2 つの大きな改良によって染色体分析の成功率は 60~70% まで高められた。

2nd polar body



図3 2細胞胚の染色体標本（ギムザ染色）。2割球とも染色体分析可能（ $2n=40$ ）。両割球の間（上方）に第2極体の核がみられる。

3. 4細胞胚

- (1) 実験動物および過排卵処理、体外受精、受精卵培養の手順（表1）は1細胞胚の場合と同様である。
- (2) 染色体標本作製：手順は低張液の組成に変更を加えた以外、基本的には2細胞胚の場合と同様である。すなわち、媒精後42~43時間目にビンプラスチン（ $0.01\mu\text{g/ml}$ ）を含むCZB液に4細胞胚を移し、培養を継続した。媒精後48~55時間の間に実体顕微鏡下で個々の胚を観察し、4つの割球細胞すべてにおいて核膜が消失している（細胞分裂中期に達している）胚を選別した。これらの胚をコンカナバリンA（ $10\mu\text{g/ml}$ ）含有0.5%アクチナーゼ溶液で処理して透明帯を軟化し、60%牛胎仔血清と1.2%クエン酸ナトリウム溶液の4:1混合液中で10分間低張処理をした。標本作製の手順は1細胞胚の場合と同じであり、良好な染色体標本が得られた（図4）。これらの改良によって染色体分析の成功率は80~90%に達した。

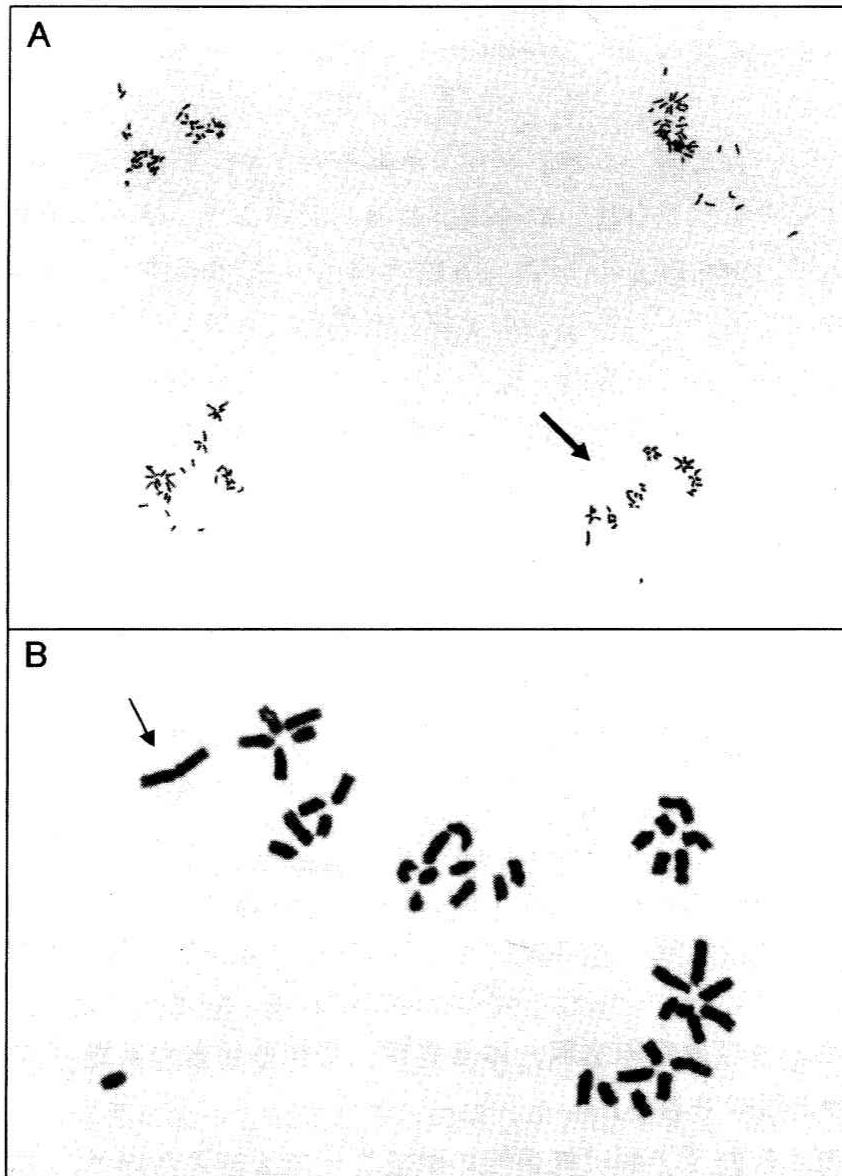


図4 A : 4細胞胚の染色体標本の全体像 (ギムザ染色). 4割球のすべてで染色体分析可能 ($2n=40$). 矢印の染色体核板だけに転座染色体がある.
 B : 転座染色体をもつ核板の拡大像. 正常なマウス染色体ではすべての染色体で動原体が末端部にあるが, この例では転座により, 大形でしかも中央に動原体をもつ染色体 (矢印) に変化している.

4. 8細胞胚

- (1) 過排卵処理、体外受精、受精卵培養の手順：手順は1細胞胚の場合と同様である。この発生段階になると個々の胚が細胞分裂中期に到達する時刻にかな

りのばらつきが出てくるので、それに応じて染色体標本作製の所要時間も長くなる。この標本作製時間帯を研究者の勤務時間内に設定するためには、過排卵処理～分裂阻害剤添加までのタイムスケジュールを1～4細胞胚の場合から大幅に変更する必要があった。最終的には表1に示した手順が最もよい（細胞分裂中期像が多い）と判明した。

- (2) 染色体標本作製：媒精後 58~59 時間目にピンプラスチンを含む CZB 液に胚を移し、60~61 時間から標本作製を開始した。透明帯除去に伴う割球細胞の離散は8細胞胚から起こりにくくなるのでコンカナバリンA処理は不要である。この時期の胚でも割球細胞が分裂中期に到達しているかどうかを核膜消失によって確認できるが、各割球の細胞周期が同調しなくなるので、8割球すべてに染色体を出現させることは難しくなる。低張処理、標本作製の手順は4細胞胚の場合と同じで、染色体の広がりや良好な標本が得られた（図5）。

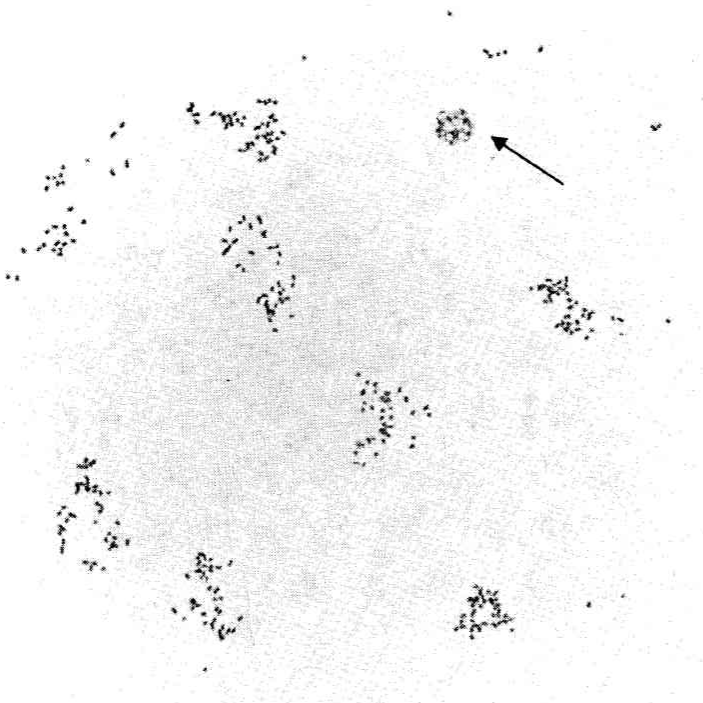


図5 8細胞胚の染色体標本（ギムザ染色）。8つの染色体核板が観察される。矢印は第2極体の核。

しかし、それでも8細胞胚の染色体標本作製には体外受精のステップを夜遅く行わなければならない、かなりの労力を要するためにまだ十分な染色体分析の

例数が積み上がっていない。

5. 胚盤胞

- (1) 過排卵処理、体外受精、受精卵培養の手順：手順は1細胞胚の場合と同様である。この時期では胚を構成する細胞数がかかなり多くなるため、あまり標本作製の時刻を限定しなくても比較的多数の分裂中期像を得ることができる。実験開始から染色体標本完成まで8日間を要する長丁場の実験ではあるが、表1のタイムスケジュールにしたがえば、途中の作業が深夜になることはなく、比較的楽に実験できる。
- (2) 染色体標本作製：媒精後 98~99 時間目にピンブラスチンを含む CZB 液に胚を移し、101~102 時間から標本作製を開始した。低張処理、標本作製の手順は8細胞胚の場合と同じである。

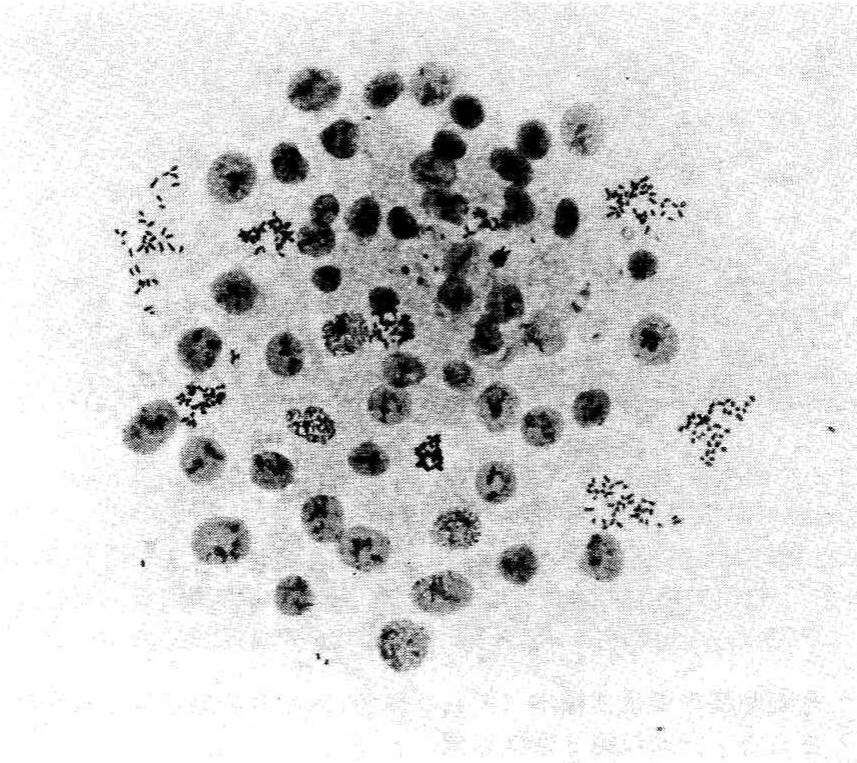


図6 胚盤胞の染色体標本（ギムザ染色）。栄養芽細胞層（標本の辺縁部）では染色体の分散が良好であるが、内部細胞塊（標本の中心部）では染色体の分散が不十分である。

この時期の胚では、栄養芽細胞（将来、胎盤に分化する細胞群）と内部細胞塊（将来、胎仔本体に分化する細胞群）が区別される。染色体標本を作製してみると、栄養芽細胞では染色体の広がり良好な分裂像が得られるが、内部細胞塊では周囲の栄養芽細胞の圧迫によって分裂中期細胞の染色体が十分には広がらない（図6）。低張液の組成や処理時間その他をいろいろ工夫してみたが、いまのところ内部細胞塊の染色体分析に適した方法が見つかっておらず、今後の課題として残されている。

II. 1 細胞胚の細胞遺伝学的調査

研究の初年度に当たる平成 13 年度は、まず研究の土台となるマウス初期胚の染色体標本作製法の開発に取り組み、成功率・信頼度の高い方法の確立に成功した。そこで、2 年目に当たる平成 14 年度は、この技術を用いて 1 細胞胚の細胞遺伝学的調査（染色体分析）を行った。

精子に放射線を照射してもその運動能や受精能は障害されず、受精卵に精子由来の構造的染色体異常が高頻度に出現することはすでに数種の哺乳動物で報告されている (Matsuda et al., 1985; Kamiguchi et al., 1990; Tateno et al., 1996; Kamiguchi and Tateno, 2002)。本研究の目的は、受精卵のもつ各種染色体異常が初期発生過程でどのように推移するのかを調査することであるから、かなりの割合の受精卵に染色体異常が生じていることが望ましい。そこで、高線量の γ 線を精子に照射し、被曝精子を正常卵子と体外受精させ、胚発生のスタート時点（受精卵）での染色体異常の種類と出現頻度をまず明らかにした。

【材料と方法】

- (1) γ 線照射装置（ガンマセル 40）を使用して 10~16 週齢の成熟雄マウスの精巣部位へ 2.0 Gy および 4.0 Gy の γ 線（線量率：約 0.95 Gy/分）を単一照射した。照射後 24 時間以内に雄を屠殺して精子を採取した（成熟精子への照射となる）。
- (2) 体外受精および受精卵の染色体標本作製の詳細は「研究結果」I に示したとおりである。

【結果と考察】

対照群 503 例、2.0 Gy 照射群 317 例、4.0 Gy 照射群 350 例の合計 1,170 例の 1 細胞胚を染色体分析した（表 2, 3）。我々の開発した染色体標本作製法を用いた場合、80~90%の胚で精子由来ゲノムと卵子由来ゲノムを区別して核型分析することができる（図 1）。しかし、今回の研究の目的が受精卵のもつ染色体異常を初期発生過程で追跡することであり、また、2 細胞期以降は卵子由来染

染色体と精子由来染色体を区別できなくなることもあるので、表2と3ではあえて精子・卵子両ゲノムの染色体異常を区別せずに1細胞胚全体の異常頻度として集計した。因みに、2.0 Gy 照射群で出現した構造的染色体異常をもつ胚82例中、精子と卵子のゲノムを別々に分析できた胚は70例(85.4%)であった。そのうち、精子ゲノム側の異常が70例、卵子ゲノム側の異常が0例であった。すなわち、放射線照射を受けていない卵子の染色体に生じている構造的異常の頻度はかなり低率である。

表2 γ 線照射精子由来の1細胞胚における染色体異常出現率

線量 (Gy)	分析数	正常胚 (%)	染色体異常をもつ胚 (%)		
			異数性	構造異常	計
0.0	503	486 (96.6)	9 (1.8)	8 (1.6)	17 (3.4)
2.0	317	231 (72.9)	4 (1.3)	82 (25.9)	86 (27.1)
4.0	350	225 (64.3)	0 (0.0)	125 (35.7)	125 (35.7)

異数性を示す胚の頻度は精子への放射線照射によって増加しなかったが、一方、構造的染色体異常をもつ胚の出現率は線量依存的に顕著な増加を示した(表2)。放射線照射の2群で観察された構造的染色体異常で最も出現頻度の高かったのは切断型の異常で(表3, 図7A, 図8)、全異常の約70%を占め、染色体型切断は染色分体型切断の約2倍の出現頻度を示した。染色分体型切断をもつ胚は第1卵割を経て2細胞期には正常割球細胞と染色体切断をもつ割球細胞から構成されるモザイク型染色体異常胚に変化すると考えられる(図9)。この異常胚は正常細胞をもつがゆえに高い発生能をもち、個体発生の後期まで生き残る可能性をもっている。

精子への放射線照射によって二動原体染色体(表3, 図7B, 図8)も比較的高い頻度で誘発された(20~30%)。成熟精子自身は放射線誘発のDNA損傷を修復する能力をもっていない。しかし、精子DNA損傷の一部は受精後に卵子の

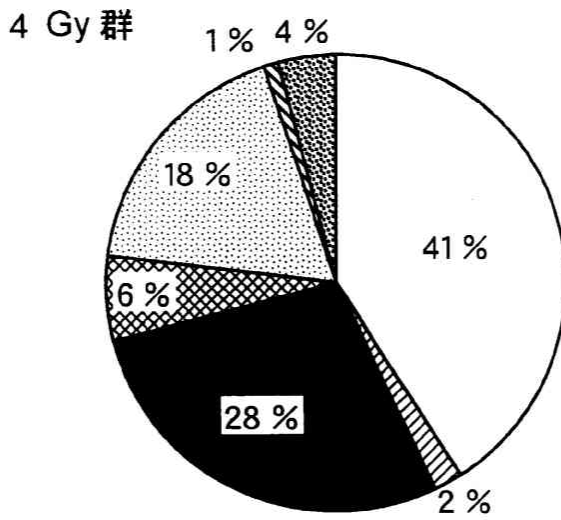
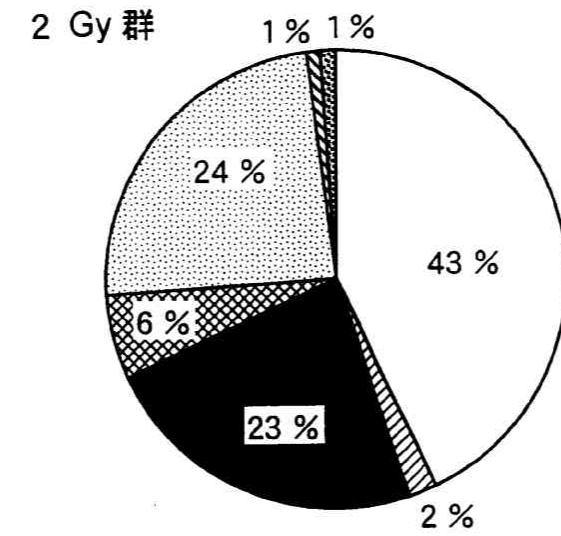
表 3 γ線照射精子由来の1細胞胚にみられた構造的染色体異常のタイプと頻度

線量 (Gy)	分析数	構造異常 をもつ胚 数 (%)	構造的異常の内訳 (胚当たりの頻度)							計	
			切断/断片	gap	二動原体	転座	環状	切断/断片	gap		交換
0.0	503	8 (1.6)	4 (0.008)	0 (0.000)	1 (0.002)	0 (0.000)	0 (0.000)	3 (0.006)	0 (0.000)	0 (0.000)	8 (0.016)
2.0	317	82 (25.9)	46 (0.145)	2 (0.006)	24 (0.076)	6 (0.019)	0 (0.000)	26 (0.082)	1 (0.003)	1 (0.003)	106 (0.334)
4.0	350	125 (35.7)	67 (0.191)	4 (0.011)	47 (0.134)	9 (0.026)	1 (0.003)	29 (0.083)	1 (0.003)	7 (0.020)	165 (0.471)



図7 1細胞胚の精子由来ゲノムにみられた γ 線誘発の染色体異常 (Cバンド染色).

- A: 染色体型切断 (矢印) の例. 太い矢印の切断片が濃染しているの
で、動原体を含むことが分かる. 一方、細い矢印の方は動原体を
もたない切断片. 図の中央部には、卵表面に到達したが受精でき
なかつた精子の頭部 (*) がみられる.
- B: 二動原体染色体 (太い矢印) の例. 細い矢印は派生染色体断片を
示す. 図の中央部にY染色体がある.









- | | | | |
|---|-----------|---|-------------|
|  | 染色体型切断・断片 |  | 染色体分体型切断・断片 |
|  | 染色体型ギャップ |  | 染色体分体型ギャップ |
|  | 二動原体染色体 |  | 染色体分体型交換 |
|  | 染色体型転座 | | |

図8 γ 線照射精子由来の1細胞胚で観察された構造的染色体異常のタイプとそれらの頻度.

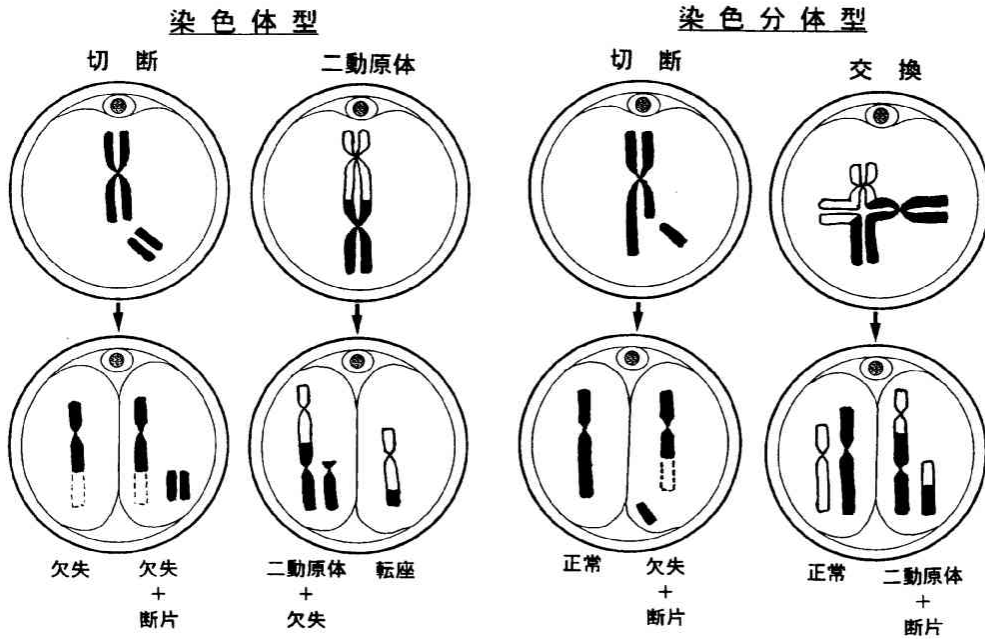


図9 種々の構造的染色体異常をもつ1細胞胚がモザイク型の構造異常をもつ2細胞胚に変化する過程を示した模式図。

もつ DNA 修復系によって修復される。二動原体染色体はこの時の修復のミスによって生じたものと考えられる。この異常染色体は動原体を2ヶ所にもつため、細胞分裂（卵割）の際に染色体不分離を起こしたり、途中でちぎれて新たな構造異常に変化したりしてモザイク型の染色体異常胚に変化する可能性が高い（図9）。

以上のように、モザイク型染色体異常に変化する可能性の高い異常が放射線照射によって比較的高い頻度で受精卵に生成することが分かったので、それらの異常が2細胞期以後の発生過程でどのように推移するか注目しつつ染色体研究を進める必要がある。

Ⅲ. 2細胞胚の細胞遺伝学的調査

放射線を照射された精子の受精によって生じた1細胞胚にどのような染色体異常がどのくらいの頻度で出現するかの調査（研究結果のⅡ）に引き続き、それらの染色体異常が第1卵割を経て2細胞期にはどのように変化するかを調査した。

染色体に及ぼす放射線の影響を2細胞胚で研究した報告は世界的にみてもほとんどない。唯一の報告はWeissenborn and Streffer (1988, 1989)のものであるが、彼らは2細胞胚の割球をばらばらにしたうえで、多数の胚の割球をいっしょにまとめて染色体標本にしているために個体（胚）ごとの染色体異常出現頻度が不明である。また、染色体標本作製技術が低いために得られたデータの信頼性が低いという問題点もある。

一方、我々は染色体標本作製過程で人為的な染色体流失の起こりにくい新しい方法（漸進固定空気乾燥法）を開発し、割球細胞どうしの離散を防ぐ技術（コンカナバリンA処理）も開発して2細胞胚の研究に取り組んでおり、本研究は染色体異常出現率を個体単位で明らかにした世界で初めてのものである。

【材料と方法】

マウス精子への放射線照射、体外受精法は1細胞胚の場合と同様である。また、2細胞胚の染色体標本作製法もすでに記載したとおりである（研究成果Ⅰ参照）。

【結果と考察】

第1卵割中期に達した2細胞胚の割合は放射線照射の2群とも99%という高率であったことから、この時期までは染色体異常の存在が胚発生にほとんど影響していないと考えられる。

対照群131例、2.0 Gy群132例、4.0 Gy群133例の合計396胚を染色体分析した（表4）。1細胞期と同様に、染色体異常をもつ胚の出現率は線量依存的に増加した。2細胞期で観察された構造的染色体異常の多くは染色体型であり、染色分型異常はほんの少数しか出現しなかった。構造異常のタイプ別では、1細胞期と同様に、切断/断片や二動原体染色体が高頻度に観察された（表5）。

表4 γ 線照射精子由来の2細胞胚における染色体異常出現率

線量 (Gy)	分析数	正常胚 (%)	染色体異常をもつ胚 (%)				計
			数的異常		構造異常		
			異数性	モザイク	通常型	モザイク型	
0.0	131	123 (93.9)	1 (0.8)	2 (1.5)	1 (0.8)	4 (3.1)	8 (6.1)
2.0	132	99 (75.0)	6 (4.5)	4 (3.0)	3 (2.3)	20 (15.2)	33 (25.0)
4.0	133	81 (60.9)	14 (10.5)	2 (1.5)	10 (7.5)	26 (19.5)	52 (39.1)

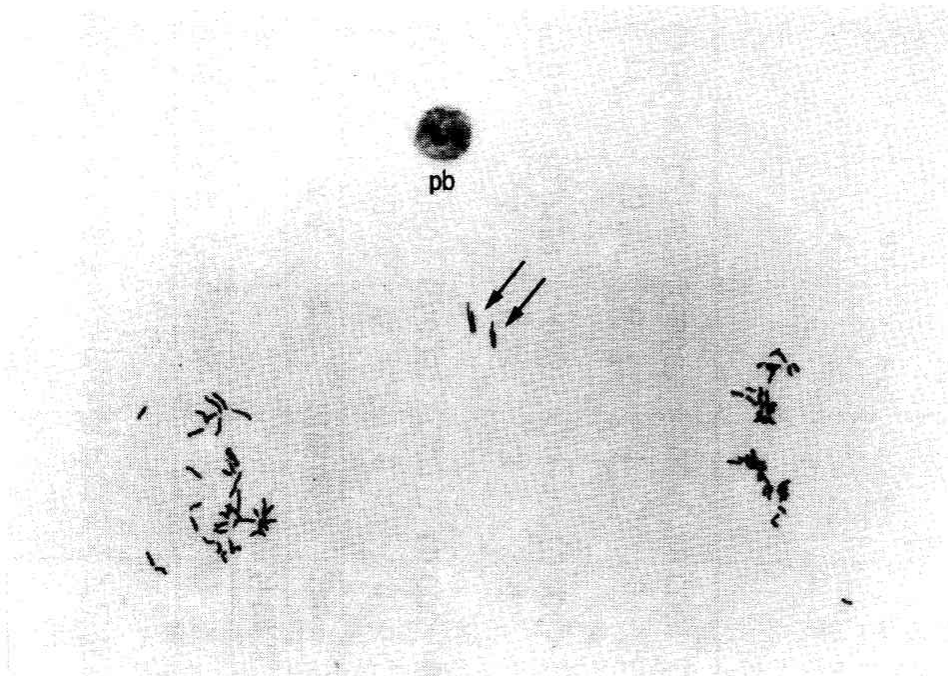


図10 γ 線照射精子由来の2細胞胚で観察された低数性の例. 2本の染色体(矢印)が分裂後期移動遅延を起こし, 2割球とも核板の染色体数は38本に減少している. pb: 第2極体の核.

表 5 γ 線照射精子由来の2細胞胚にみられた構造的染色体異常のタイプと頻度

線量 (Gy)	分析 胚数	構造異常 をもつ胚 数 (%)	構造的異常の内訳 (分析細胞*当たりの頻度)							計		
			染色体型			染色体型						
			切断/断片	gap	二動原体	転座	欠失	環状	切断/断片	gap	交換	
0.0	131	5 (3.8)	2 (0.008)	0 (0.000)	2 (0.008)	0 (0.000)	0 (0.000)	0 (0.000)	3 (0.011)	0 (0.000)	0 (0.000)	7 (0.027)
2.0	132	23 (17.4)	22 (0.083)	0 (0.000)	11 (0.042)	4 (0.015)	4 (0.015)	0 (0.000)	3 (0.011)	0 (0.000)	1 (0.004)	45 (0.170)
4.0	133	36 (35.7)	41 (0.154)	1 (0.004)	26 (0.098)	11 (0.041)	10 (0.038)	0 (0.000)	1 (0.004)	0 (0.000)	1 (0.004)	91 (0.342)

* 分析細胞数=分析胚数×2

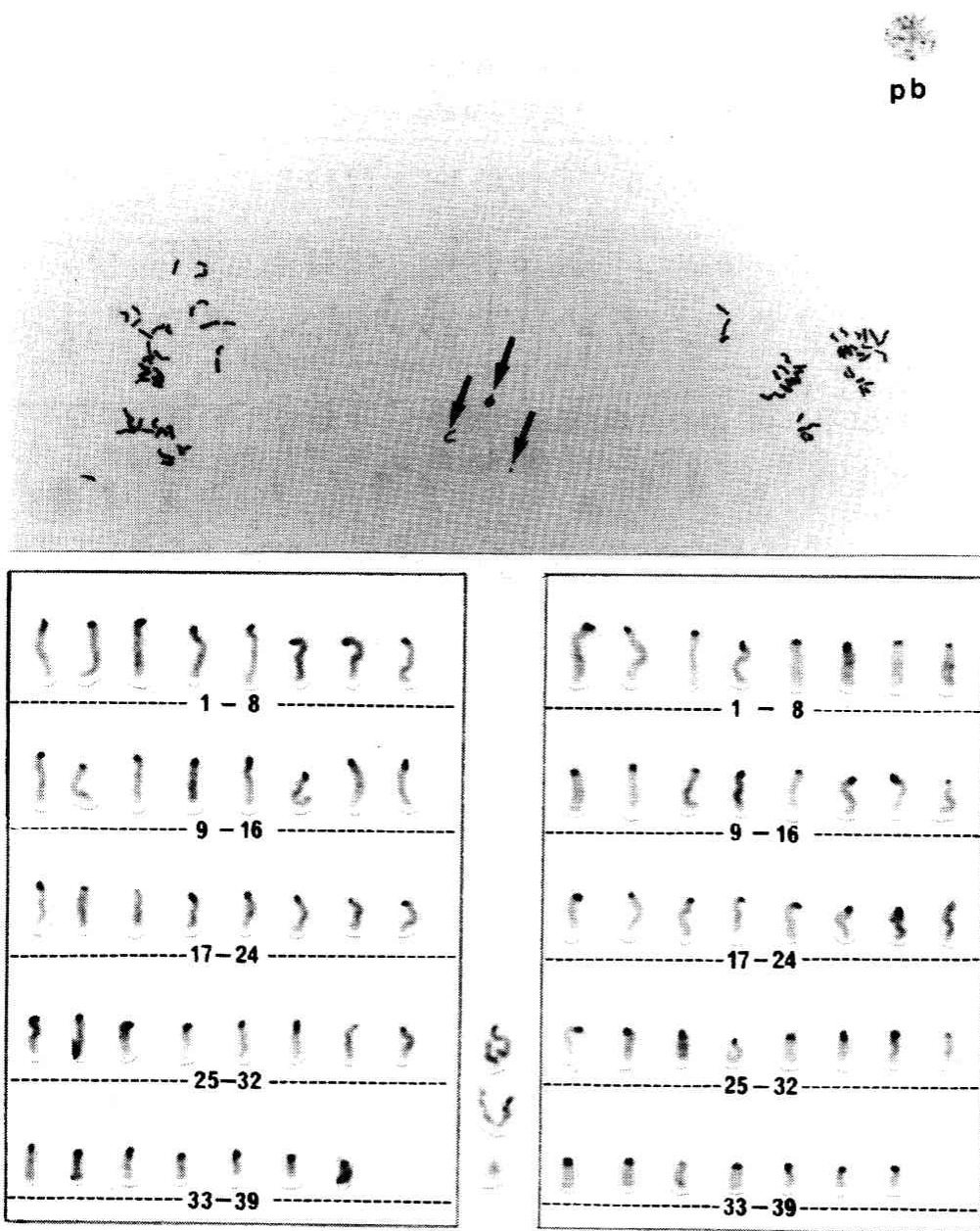


図11 上段： γ 線照射精子由来の2細胞胚で観察された低数性の例（ギムザ染色）。分裂後期移動遅延を起こし、退化しかけている2本の一分染色体（monad）と染色体断片（矢印）が両割球の間にみられる。pb：第2極体の核。

下段：左右の割球細胞の核型（Cバンド染色）。 $2n=39$ 。

また、2細胞期では転座や欠失も線量依存的に増加していた。欠失は、1細胞胚でみられた切断の一部が第1卵割の過程で切断片を失った結果生じたものと考えられる。マウスの染色体は端部着糸型染色体であり、欠失を正確に検出することが難しいという事実を考慮すれば、実際には欠失の頻度は観察値よりもかなり高いものと推測される。

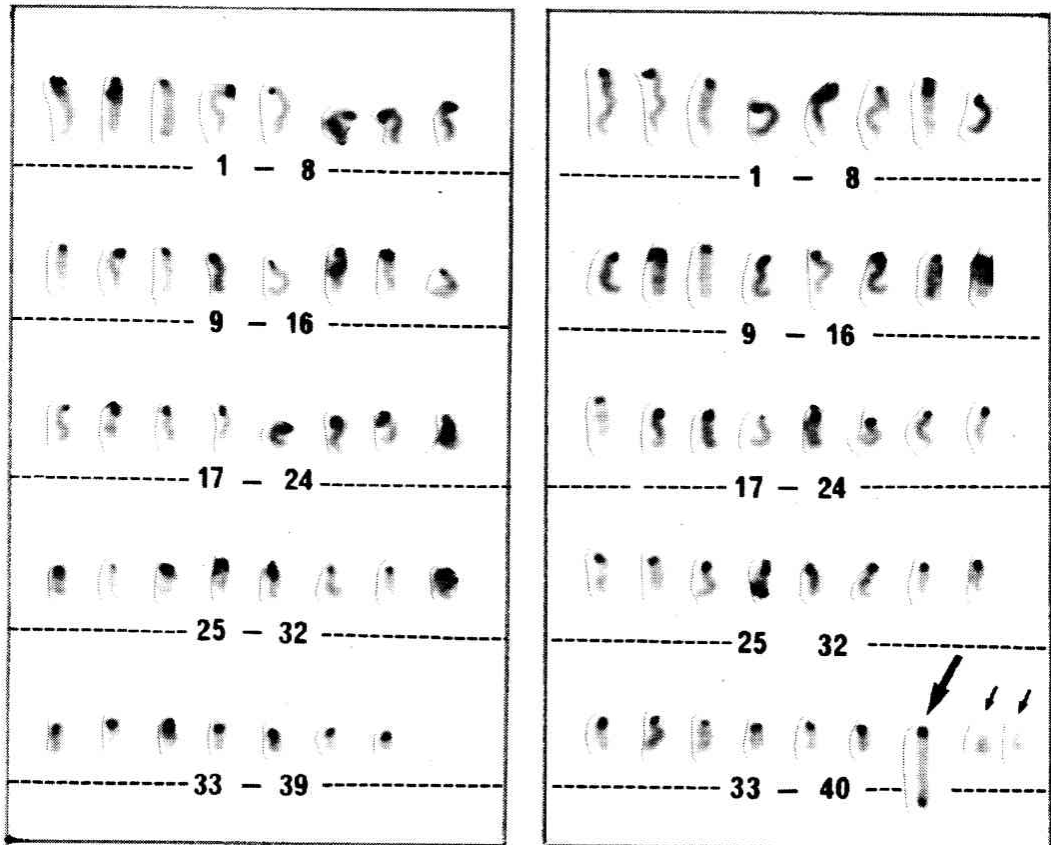


図12 構造異常を伴うモザイク型の数的異常をもつ2細胞胚の核型(Cバンド染色).
左: $2n=39$, 右: $2n=40$, 1 dic, 2 csb.

2細胞胚の染色体分析結果の集計では、2つの割球細胞間で同じタイプの構造的染色体異常をもつものを「通常型」、異なるタイプの構造異常をもつものを「モザイク型」と区別し、また、数的異常も「異数性」(2割球とも同じタイプの数的異常をもつ)と「モザイク」に分類して、それらの出現頻度を比較した(表4)。その結果、放射線照射群でみられた構造異常の多くはモザイク型であり、第1卵割の際に異常染色体が2つの割球に不均等に分配されたものと思われる。また、

表 6 正常細胞と染色体異常細胞から成るモザイク型染色体異常の2細胞胚出現率

線量 (Gy)	分析数	モザイク型染色体異常胚の数 (%)			全異常胚中に 占める割合
		40/39)*	40/40+構異**	計	
0.0	131	2 (1.5)	4 (3.1)	6 (4.6)	6/8=75.0%
2.0	132	5 (3.8)	9 (6.8)	14 (10.6)	14/33=42.4%
4.0	133	1 (0.8)	9 (6.8)	10 (7.5)	10/52=19.2%

* 正常細胞(染色体数 40)と低数性細胞(染色体数 39 以下)のモザイク

** 正常細胞(染色体数 40)と構造的染色体異常をもつ細胞のモザイク

1細胞期では低率だった数的異常が2細胞期の放射線照射群で増加した。数的異常の大部分は低数性異常であり、それらのなかには1～数本の染色体が2割球細胞核のどちらにも含まれずに分裂後期移動遅延(anaphase lagging)を起こしている例が認められた(図10)。なかには、それらの移動遅延染色体が退化しかかっている例もあり(図11)、染色体の両極移動に引き続いて起こる細胞質分裂の過程で移動遅延染色体が割球細胞質外に取り残されてしまったのかもしれない。このような分裂後期移動遅延の原因としては、動原体部にある紡錘糸付着タンパク(キネトコア)の機能消失が考えられ、また、染色体構築異常の原因としては、中期染色体の骨格タンパクであるトポイソメラーゼIIの異常や染色体の構造的安定性に関わっているテロメアの異常などが関係している可能性もある。しかし、現在のところ、異常生成のメカニズムは不明である。表4の数的異常には構造異常を伴わない例だけを分類したが、これに匹敵するくらいの頻度で、構造異常を伴うモザイク型の数的異常も出現していた(表では構造異常に分類した)

(図12)。これらの異常は1細胞期の構造異常(二動原体染色体など)から二次的に生じた数的異常と思われる。また、モザイク型染色体異常胚のなかには、染色体異常をもつ割球細胞と正常割球細胞から成る異常胚も含まれており、その出現率は照射群で8~10%程度あり、全異常胚のなかに占める割合は20~40%に達していた(表6)。正常細胞を含むこれらの異常胚は比較的高い生存能・発生能をもつ可能性があるため、新生児期まで残存する遺伝的影響という観点から、その出現頻度の追跡調査が必要である。

IV. 4細胞胚の細胞遺伝学的調査

放射線被曝精子の受精によって生じた1細胞胚および2細胞胚における染色体異常出現率の調査（研究結果ⅡおよびⅢ）に引き続いて、4細胞胚の染色体分析を行った。

この時期の胚における染色体研究も Streffer (1993) の報告以外には見当たらない。彼らの研究方法の問題点は研究結果Ⅲですでに述べたとおりであり、4つの割球細胞すべてを染色体分析した結果に基づく染色体異常の解析は世界で初めてのものである。

【材料と方法】

マウス精子への放射線照射方法、体外受精法は1細胞胚の場合と同様である。また、4細胞胚の染色体標本作製法もすでに記載したとおりである（研究結果Ⅰを参照）。

【結果と考察】

4割球すべてが細胞分裂中期に達した胚の割合は2.0 Gy 群で97%、4.0 Gy 群では少し低下して92%であった。これらの値と対照群での97%の間に有意差はなく、染色体異常をもっている4細胞期までの発生能はほとんど低下しないことが分かった。

4細胞胚で観察された染色体異常は2細胞胚の場合と同様に4つのタイプ、すなわち、異数性、モザイク、通常型構造異常、モザイク型構造異常に分けて集計された（表7）。その結果、異数性、構造異常を伴わない数的モザイクおよび通常型構造異常の出現率は低く、対照群と放射線照射群の間に有意差を示さなかった。一方、モザイク型の構造異常は他の3タイプの異常と比べて圧倒的に高い出現率を示し、照射群で線量依存的な増加を示した。すなわち、1細胞期にみられた染色体異常の大部分は2回の卵割を経てモザイク型の構造異常に変化したといえる。モザイク型構造異常胚のなかには、2細胞期に観察されたと同様に二動原体染色体の不分離によって生じた異常例や（図13）、一部の割球細胞の核板に凝

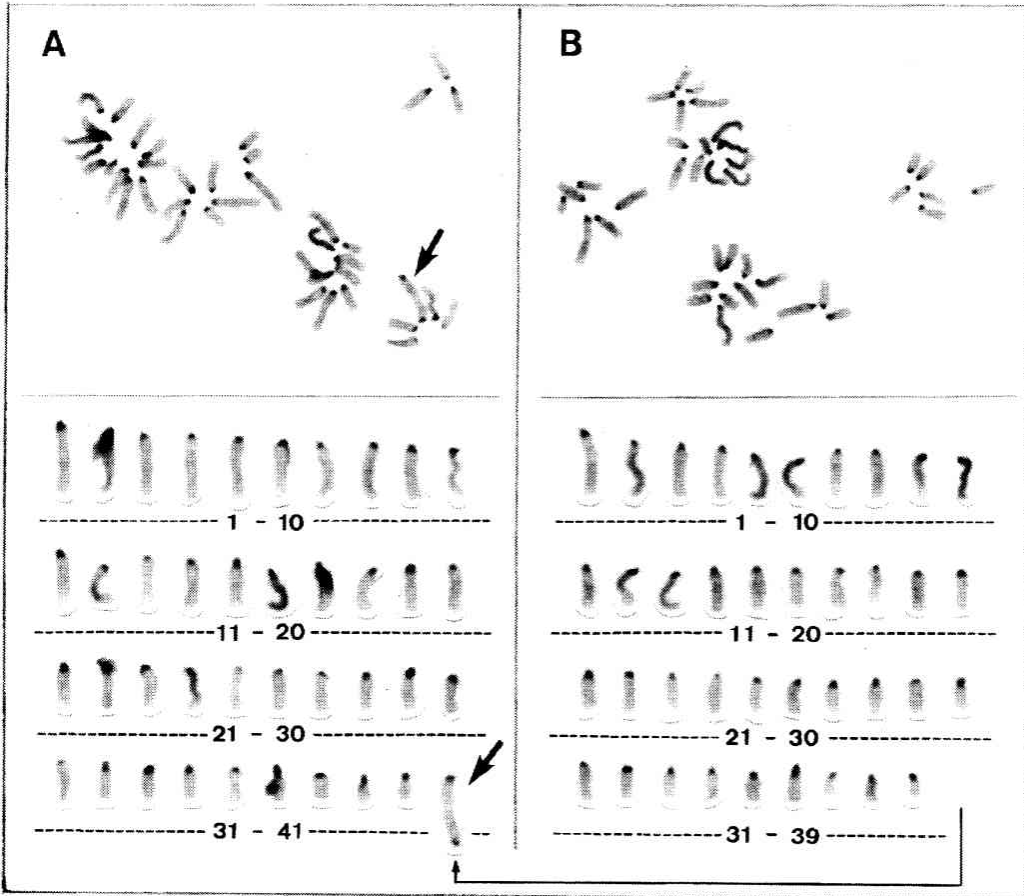


図13 構造異常を伴うモザイク型の数的異常をもつ4細胞胚の核型（Cバンド染色）。4つの割球細胞のうち、染色体異常をもつ2つの細胞の染色体核板（上）と核型（下）を示す。
 A：二動原体染色体（矢印）を含んでおり、Cバンド陽性を示す動原体部位が41ある（ $2n=40, 1 \text{ dic}$ ）。
 B：Cバンド陽性部位が39認められる（ $2n=39$ ）。
 これら2つの異常細胞は二動原体の不分離によって生じたものである。他の2割球細胞の核型はいずれも正常（ $2n=40$ ）であった。

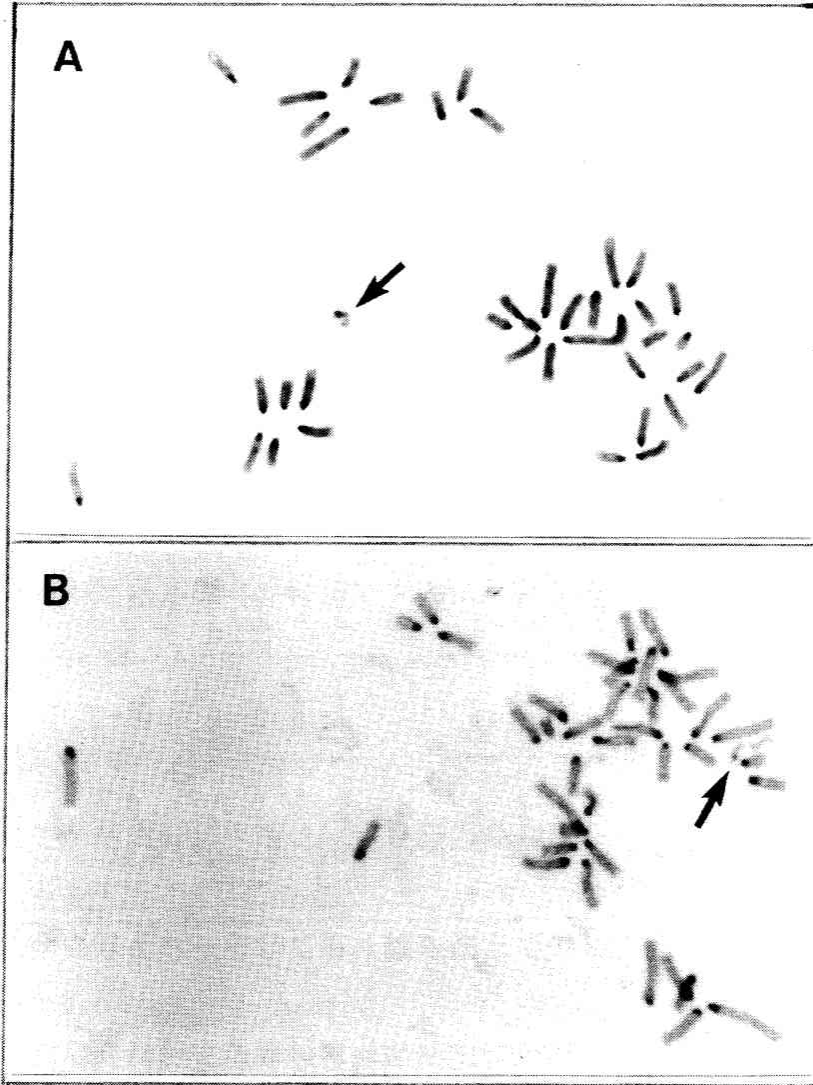


図14 構築異常を起こした染色体を含む核板をもつ4細胞胚の例（Cバンド染色）。

A：動原体（Cバンド陽性部位）はあるが、毛羽立っていて退化的な染色体（矢印）をもつ割球細胞の例。

B：凝縮異常を起こして細長いままの染色体（矢印）をもつ細胞の例。

表7 γ 線照射精子由来の4細胞胚における染色体異常出現率

線量 (Gy)	分析数	正常胚 (%)	染色体異常をもつ胚 (%)				計
			数的異常		構造異常		
			異数性	モザイク	通常型	モザイク型	
0.0	200	140 (70.0)	0 (0.0)	8 (4.0)	0 (0.0)	52 (26.0)	60 (30.0)
2.0	173	93 (53.8)	1 (0.6)	6 (3.5)	2 (1.2)	71 (41.0)	80 (46.2)
4.0	164	78 (47.6)	0 (0.0)	4 (2.4)	2 (1.2)	80 (48.8)	86 (52.4)

縮不全や高次螺旋構造のほぐれなどにより構築異常となった染色体を含む例（図14）も観察された。これらの異常染色体は4細胞期以降の細胞分裂の過程で消失し、胚が低数性モザイクに変化する可能性をもっている。染色体構築異常の原因は未だ不明であるが、染色体の凝縮に関わっているトポイソメラーゼの活性低下や染色体の構造的安定性に関わっているテロメアの異常が関係している可能性も考えられる。

構造異常のタイプ別では、各異常とも2細胞期の場合とほぼ等しい出現頻度を示し、切断/断片や二動原体染色体の割合が高かった（表8）。これら2種の異常とともに転座や欠失にも線量依存的増加が認められた。ただ一つ2細胞期での観察結果と異なる点は、染色分体型の切断/断片の出現頻度がかなり高かったことである。この異常は線量依存的増加を示さず、非照射対照群でもかなり高頻度に観察されたので、培養条件など実験系そのものに原因があるかもしれない。このことを明らかにするためには、雄との交尾によって得られた体内受精の4細胞胚を用いて染色体分析を行い、結果を比較する必要がある。

これまで1細胞胚、2細胞胚、4細胞胚で調査した結果を基にして染色体異常胚の純出現率を計算し、初期発生過程における染色体異常胚出現率の推移を解析した（表9）。異常胚の純出現率（本来正常の核型をもつはずの初期胚が、精子への γ 線照射によってどれだけ染色体異常胚に変化したか）は表の脚注に示した計算式を用いて算出された。また、表の結果をグラフ化して図15に示した。表

表 8 γ線照射精子由来の4細胞胚にみられた構造的染色体異常のタイプと頻度

線量 (Gy)	分析 胚数	構造異常 をもつ胚 数 (%)	構造的異常の内訳 (分析細胞*当たりの頻度)										計
			染色体型					染色体分型					
			切断/断片	gap	二動原体	転座	欠失	環状	切断/断片	gap	交換		
0.0	200	52 (26.0)	9 (0.011)	1 (0.001)	1 (0.001)	1 (0.001)	2 (0.003)	0 (0.000)	40 (0.050)	18 (0.023)	1 (0.001)	73 (0.091)	
2.0	173	73 (42.2)	53 (0.077)	1 (0.001)	14 (0.020)	10 (0.014)	6 (0.009)	1 (0.001)	57 (0.082)	8 (0.012)	4 (0.006)	154 (0.223)	
4.0	164	82 (50.0)	123 (0.188)	2 (0.003)	65 (0.099)	25 (0.038)	28 (0.043)	0 (0.000)	42 (0.064)	2 (0.003)	2 (0.003)	289 (0.441)	

* 分析細胞数 = 分析胚数 × 4

表9 γ 線照射精子由来のマウス初期胚における染色体異常胚の純出現率

線量 (Gy)	胚発生 段階	数的異常		構造異常		計
		異数性	モザイク	通常型	モザイク型	
2.0	1細胞期	-0.5	—	24.7	—	24.6
	2細胞期	3.8	1.5	1.5	12.5	20.1
	4細胞期	0.6	-0.02	1.2	20.3	23.2
4.0	1細胞期	-1.8	—	34.7	—	33.5
	2細胞期	9.8	-0.6	6.8	17.0	35.1
	4細胞期	0.0	-1.6	1.2	30.8	32.1

$$\text{染色体異常胚の純出現率(\%)} = \left(1 - \frac{\text{正常核型胚数} / \text{調査胚数 (照射群)}}{\text{正常核型胚数} / \text{調査胚数 (対照群)}} \right) \times 100$$

9中にあるマイナスの数値は、照射群における染色体異常出現率が対照群より低いということ、すなわち、放射線照射によって染色体異常が減少したということの意味している。しかし、4細胞期までは染色体異常胚は正常胚と変わらぬ発生能をもち、染色体分析率も高率で対照群と照射群の間に差がないので、数値がマイナスの値をとるとは考えられず、実験誤差によるものと思われる。したがって、図15ではそれらの数値を‘純出現率0%’として取り扱った。

図から分かるとおり、2.0 Gy群、4.0 Gy群ともに観察された全染色体異常胚の割合は1細胞期～4細胞期の間でほとんど差がなかった。すなわち、この間に染色体異常胚の淘汰は起こっていない。しかし、染色体異常のタイプ別にみるとかなりの変化がみられる。受精卵（1細胞胚）に存在した構造的染色体異常の多くは第1卵割を経て2細胞期にはモザイク型の構造異常に変化した。その理由は、二動原体染色体や、動原体をもたない染色体切断片が2つの割球に不均等に配分されたためと思われる。同時に2細胞期では、分裂後期移動遅延に起因すると思われる異数性異常（低数性）が新たに出現した。また、2つの割球とも同じタイプの異常をもつ通常型構造異常も低率ながら出現した。しかしながら、第2卵割を経て4細胞期になると、異数性の出現率が大幅に減少し、通常型構造異常も減

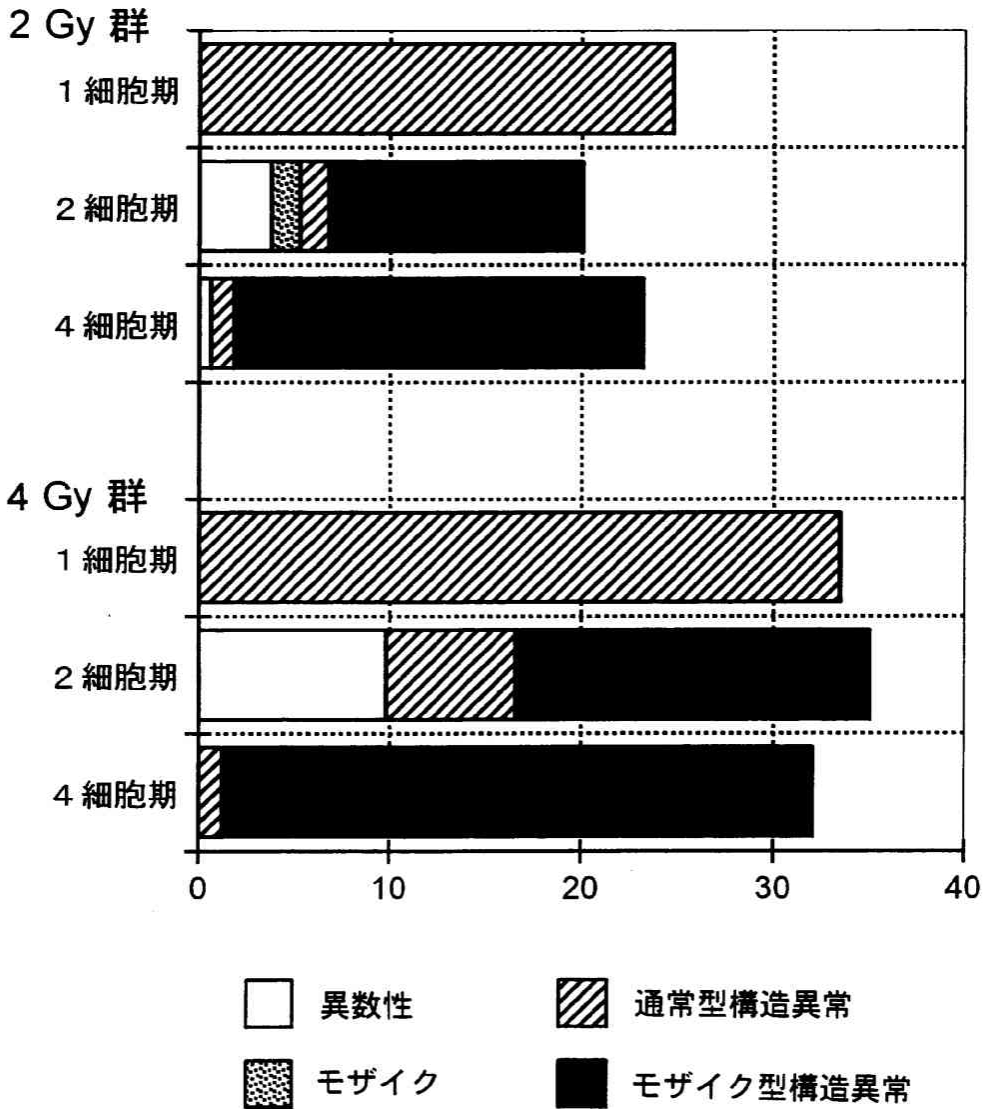


図15 γ 線照射精子由来のマウス初期胚（1～4細胞胚）における各種染色体異常の純出現率の比較.

少し、モザイク型構造異常の割合が大幅に増加した。モザイク型構造異常が増加した理由としては、①2細胞期には染色体異常として現れなかった一部のDNA損傷が第2卵割を経て顕在化した（遅延型染色体異常の出現）、②2細胞胚の一方の割球で構造異常染色体が二次的に別の構造異常に変化した、③第2卵割過程で一方の割球細胞の染色体に凝縮不全や高次螺旋構造のほぐれなどの構築異常が生じたなどが考えられる。

V. 胚盤胞の発生学的調査

本研究を計画した当初は、8細胞期および胚盤胞期においても染色体分析を行う予定であった。しかし、研究結果 I で述べたように、8細胞期の調査は胚発生の都合（実験が早朝・深夜になる）により、また、胚盤胞期の調査は染色体標本作製法の開発が不十分なことにより、細胞遺伝学的データを積み上げることができなかった。しかし、染色体標本作製技術の開発研究に付随して発生学的なデータは得ることができた。そこで、このデータを1～4細胞胚の染色体分析結果と比較することによって、染色体異常をもつ胚がどのくらいの割合で胚盤胞期まで発生することができるのかの推定を試みた。

【材料と方法】

マウス精子への放射線照射、体外受精法は1細胞胚の場合と同様である。表1に示した染色体標本作製スケジュールにしたがって受精卵を培養して胚盤胞期まで発生させた。媒精後101～102時間目の染色体標本作製時点で個々の胚の形態を顕微鏡下で観察し、発生停止・遅延を起こしている胚（8細胞期～桑実胚期に留まっている胚）の出現率を調査した。

【結果と考察】

発生異常胚の出現率は表10に示すとおりである。比較のために2細胞期での発生学的データも示した。2細胞期では対照群、実験群とも発生異常胚はほとんど出現しないが、胚盤胞期になると放射線照射群で発生異常胚が増加し、4.0 Gy群では統計学的に有意な増加となった ($P < 0.001$)。非照射対照群でも発生異常胚が出現するので、表の脚注に示した計算式を用いて放射線照射の影響による発生異常胚の純出現率を求めた結果、胚盤胞期の2.0 Gy群では7.3%、4.0 Gy群では14.8%という値が得られた。仮にこれらの発生異常胚のすべてが染色体異常胚と仮定して、それらの値を4細胞期における染色体異常胚の純出現率（表9：23.2%および32.1%）から差し引くと、染色体異常をもっていたにもかかわらず胚盤胞期まで発生した胚の推定値が得られ、それらは2つの照射群で15.9%

表 10 γ 線照射精子精子由来のマウス未着床胚における発生異常胚の出現率

線量 (Gy)	調査卵 数	発生異常胚の数(%)		異常胚の純出現率*	
		2細胞期	胚盤胞期	2細胞期	胚盤胞期
0.0	157	0 (0.0)	11 (7.0)	—	—
2.0	145	5 (3.4)	18 (12.4)	3.4	7.3
4.0	149	5 (3.4)	31 (20.8)	3.4	14.8

$$* \text{異常胚の純出現率}(\%) = \left[1 - \frac{\text{正常胚数} / \text{調査胚数} (\text{照射群})}{\text{正常胚数} / \text{調査胚数} (\text{対照群})} \right] \times 100$$

および 17.3%となった。つまり、4細胞期における染色体異常胚の少なくとも5割(4.0 Gy群)～7割(2.0 Gy群)は染色体異常をもったまま、正常胚と同様に胚盤胞期まで発生すると推定される。マウス初期胚では、染色体異常につながる放射線誘発のDNA損傷を修復するための細胞周期チェックポイント機構も異常細胞を排除するアポトーシス機構も働いていないように思われる。このことはマウスが多胎の動物であることと関連している可能性がある。すなわち、DNA修復のために細胞周期を停止させれば、それだけその胚の発生が遅れ、結局、わずかな時間しか開いていない着床ウィンドウに飛び込めないことになり、DNA修復を行って胚を正常に復帰させた意味が損なわれることになる。多胎動物では初期胚のもつ多少のDNA損傷(染色体異常)には目をつぶり、とにかく受精卵のすべてを着床させるということが優先されているように思われる。もしそうであれば、ヒトのような単胎の動物では染色体異常胚の発生はマウスとは違った形を取るのかもしれない。

VI. 初期着床胚の発生的・細胞遺伝学的調査

未着床胚（1細胞期～胚盤胞期）の研究により、 γ 線誘発の染色体異常をもつ初期胚の5～7割は正常胚と同等の発生能を示し、胚盤胞期に到達すると推定された。しかし、胚盤胞の染色体標本作製技術の開発が不十分であったため、染色体分析による直接的証拠を得ることができなかった。

そこで、研究期間の最終年度に当たる平成16年度は、当初の研究計画（染色体異常の初期発生過程における推移の調査）を変更し、着床後間もない初期着床胚（10～11日齢胎仔）の発生的、細胞遺伝学的調査を行うことにした。この調査によって、染色体異常をもつ胚盤胞が着床を経てどの程度胎仔期まで残存しているか、また、染色体異常が胎仔の形態異常とどのように関係しているのかを解析することができる。

【材料と方法】

- (1) 実験動物および γ 線照射方法：研究結果ⅠおよびⅡの項に記載したとおりである。
- (2) 胎仔の発生的調査： γ 線照射後4日以内に雄マウスを非照射正常雌と1晩同居させて交配を行った。交尾の成否は膣プラグの有無によって確認した。交尾に成功した雌を単独飼育し、交尾確認後後10～11日目に頸椎脱臼によって屠殺した。開腹して卵巣と子宮を摘出し、妊娠黄体の数（排卵数）、着床数および胎仔の発生異常を調査した。
- (3) 胎仔細胞の染色体分析：妊娠母獣の子宮内から採取した10～11日齢の生存胎仔（図16A）をMEM培養液（10%牛胎仔血清を含む）に移し、細口ピペットで吸引、吐出を繰り返すことによって胎仔組織を破碎した。浮遊してきた細胞を、コルセミド（0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を含むMEM培養液に再懸濁させ、短時間（30～60分間）培養した。その後は、通常の方法と同様に0.075M KCl溶液で30分間低張処理した後、酢酸アルコールで固定し、スライドガラスへ滴下して自然乾燥させた。通常のギムザ染色標本（図16B）で染色体分析を行った後、さらにGバンド分染およびQバンド分染（図16C, D）を施して詳しい核型分析を行った。

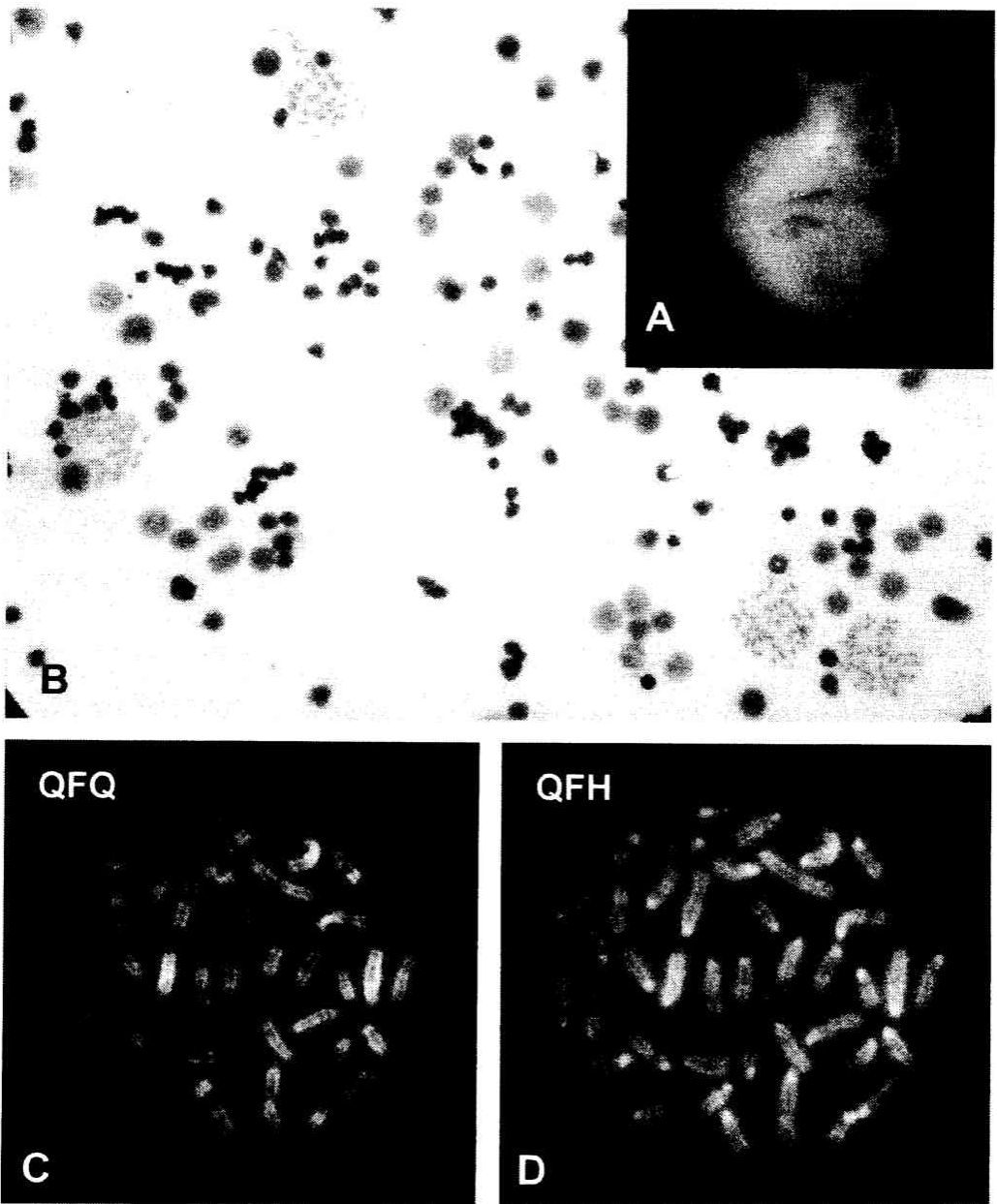


図16 γ 線照射精子由来の10-11日齢マウス胎仔（A）の染色体標本（ギムザ染色）とQ-バンド分染を施した染色体核板。

QFQ：キナクリンマスタードを用いた蛍光Q-バンド染色，

QFH：Hoechst 33258を用いた蛍光Q-バンド染色。

【結果と考察】

1. 発生学的調査

γ 線照射精子および非照射精子由来の 10~11 日齢胎仔における発生異常出現率は表 11 に示すとおりである。着床前死亡胚の数は黄体数（排卵数）から着床数を減じた値として算出された。まず高線量（4.0 Gy）照射群から実験を開始したが、2.0 Gy 群の実験は最終年度内に行うことができなかった。

照射群における着床前死亡胚の出現率（29.4%）は対照群の場合（20.4%）と比較して増加の傾向を示し（ $0.1 < P < 0.2$ ）、それは胚盤胞期でみられた発生遅延・停止胚の出現率（20.8%）を超えるものであった。このことは、胚盤胞期の発生異常胚の大部分が着床に到らずに死亡するであろうということを示唆している。着床後の発生異常に関してみると、異常をもつ生存胚は対照群のみならず照射群でもまったく出現しなかった。一方、着床後の死亡胚は照射群で有意に増加していた（ $P < 0.001$ ）。これらの死亡胚の大部分は胎仔の形態を残していない退化受胎産物（degenerated conceptus）であり、着床直後（胚の器官形成期以前）に死亡した胚と思われる。照射群で増加した全発生異常胚（着床前死亡胚＋着床後死亡胚）の出現率（55.9%）は、4細胞胚でみられた染色体異常胚出現率（52.4%）にほぼ等しいことから、大部分の染色体異常胚は着床後まもない時期までに死亡すると推定される。

表 11 γ 線照射精子由来のマウス胎仔（10~11 日齢）における発生異常出現率

線量 (Gy)	母獣数	黄体数 (平均)	着床数 (%)	正 常 胎仔数 (%)	発生異常胚数 (%)			
					着床前 死亡胚	着床後の発生異常 生存胎仔	死亡胎仔	
0.0	9	93 (10.3)	74 (79.6)	71 (76.3)	19 (20.4)	0 (0.0)	3 (3.2)	22 (23.6)
4.0	12	136 (11.3)	96 (70.6)	60 (44.1)	40*1 (29.4)	0 (0.0)	36*2 (26.5)	76*2 (55.9)

*1 $0.1 < P < 0.2$,

*2 $P < 0.001$

しかし、2細胞期・4細胞期には染色体異常細胞と正常細胞から成るモザイク型の染色体異常胚も観察されており、それらは高い生存能をもつ可能性があるので、胎生 10~11 日目に観察された形態正常胎仔の中にそのような染色体異常胚が実際に出現するか否かを細胞遺伝学的に調査した。

表 12 非照射精子由来のマウス胎仔(10~11 日齢)の染色体分析

個体 番号	性	分 析 細胞数	染色体分析の内訳					
			<38	39	40	41	42<	2n 40,csb
1	♂	28	5	20	3			
2	♂	37	1	1	35			
3	♂	30		1	28	1		
4	♂	32	2	4	26			
5	♂	45	2	3	40			
6	♀	22	1		21			
7	♂	37	1	4	32			
8	♀	21		1	20			
9	♀	23			22	1		
10	♂	11			11			
11	♀	24	1		23			
12	♀	30		1	27	2		
13	♂	25	1		24			
14	♂	25			24	1		
15	♀	25		2	23			
16	♀	22		1	21			
17	♀	24		2	22			
18	♂	21			20	1		
19	♂	32		1	31			
20	♂	22		1	20	1		
21	♂	27			27			
22	♂	25			25			
23	♂	20			20			
24	♂	26		1	25			
25	♂	12			12			
26	♀	22			22			
27	♀	23			23			
28	♀	18			18			
29	♂	24	1		22	1		
30	♂	22			21	1		
31	♂	24	1		23			
32	♀	39			39			

表 13 γ 線(4 Gy)照射精子由来のマウス胎仔(10~11 日齢)の染色体分析

個体 番号	性	分析 細胞数	染色体分析の内訳						
			<38	39	40	41	42<	2n	40,csb
1	♂	27	1		25	1			
2	♀	23			23				
3	♀	8			8				
4	♀	19			19				
5	♀	20	2		18				
6	♀	12			12				
7	♂	29		1	27	1			
8	♀	5			5				
9	♂	8		1	7				
10	♂	28			27				
11	♂	21			21				
12	♂	13			11	1			
13	♀	48	2	1	43				
14	♀	28	1	2	25				
15	♂	42			40	2			
16	♂	54		2	51				
17	♀	30	1		29				
18	♂	36	2	2	32				
19	♀	23	2	2	19				
20	♂	29		1	28				
21	♀	14	1	1	12				
22	♀	35	1	5	29				
23	♀	78	2	3	73				
24	♀	40	6		33	1			
25	♀	42	2	3	36	1			
26	♀	44		3	40		1		
27	♂	37	1	2	31	3			
28	♂	42	1	2	38	1			
29	♂	32	1		30		1		
30	♂	28			28				
31	♀	21			20				1
32	♀	36	1		34		1		
33	♀	27			27				
34	♂	24		1	23				
35	♀	23			22		1		
36	♂	28		2	25				1
37	♂	30		2	28				
38	♂	12		1	11				
39	♂	12			12				
40	♂	21	1	2	18				
41	♂	12		1	11				
42	♂	17	1	1	14	1			
43	♀	22	2		20				
44	♂	28	1	2	25				
45	♂	21			21				
46	♀	33		1	30				
47	♂	20	1	2	17				
48	♂	29	1	1	27				
49	♀	26			26				
50	♂	20			19				
51	♀	26	2	1	21				
52	♂	17			17				
53	♂	22			22				

2. 細胞遺伝学的調査

表 11 に示した正常胎仔（対照群 71 個体、4.0 Gy 群 60 個体）のうち、本報告書作成時点までに対照群 32 個体から得た 818 細胞（個体当たり平均 25.6 ± 7.0 細胞）および 4.0 Gy 群 53 個体から得た 1,422 細胞（個体当たり平均 26.8 ± 12.6 細胞）を染色体分析した（表 12 および表 13）。

非照射対照群において低数性異常 ($2n=39$) が 1 例（個体番号 1）出現したが、それ以外の個体はすべて正常であり（表 12）、照射群の胎仔もすべて正常であった（表 13）。すなわち、各個体には異数性細胞、倍数性細胞あるいは構造的染色体異常をもつ細胞が少数観察されたものの、大多数の細胞は正常核型を示していた。染色体異常の存在が疑われる核板については G-バンドおよび Q-バンド分染による詳細な分析を行ったが、それにもかかわらず、構造的染色体異常の胎仔はモザイク型の例も含めて 1 例も観察されなかった。分析胎仔数はまだ少ないので、今後さらに例数を積み上げて染色体異常胎仔（特にモザイク型異常）の出現頻度を正確に調べる必要があるが、現時点で結論づければ、 γ 線照射精子由来の構造的染色体異常をもつ胚の大多数は着床直後に死亡し、発生後期胎仔期まではほとんど残存しないということになる。

VII. 後期着床胚の発生学的調査

初期着床胚（10~11 日齢胎仔）の発生学的・細胞遺伝学的調査の結果（研究結果VI）から、 γ 線照射精子由来の構造的染色体異常をもつ胚の大多数は着床直後に死亡し、発生後期胎仔期まではほとんど残存しないと推定された。しかし、初期着床胚の細胞遺伝学的調査の例数がまだ十分ではなく、正常細胞と染色体異常細胞から成るモザイク型染色体異常胚が少数ながら残存している可能性もまだ残されている。このようなモザイク型異常胚は器官形成期以降の後期発生過程で局所的な奇形をもつ発生異常胎仔になる可能性も秘めている。

そこで、初期着床胚での調査を補足する意味で、後期着床胚（16~17 日齢胎仔）の発生学的調査を行った。

【材料と方法】

- (1) 実験動物および γ 線照射方法：研究結果 I および II の項に記載したとおりである。
- (2) 胎仔の発生学的調査：発生学的調査の方法は 10~11 日齢胎仔の場合と同じで（研究結果VIの項に記載）、母獣は妊娠 16~17 日目に開腹された。

【結果と考察】

対照群および2つの照射群(2.0, 4.0 Gy)における発生異常胚の出現率は表 14 に示すとおりである。着床前に死亡した胚の数は黄体数（排卵数）から着床数を減じた値として算出された。放射線照射群における着床後の発生異常としては、着床直後に死亡して胎仔の形態を留めていない退化受胎産物（degenerated conceptus）（図 17 A）、比較的発生後期に発生を停止・死亡した浸軟胎仔（macerated embryo）（図 17 B）、腹壁破裂（gastroschisis）をもつ生存胎仔（図 17 C）などが観察された。

着床前後の死亡胚と発生異常胚を合計した異常胚出現率は対照群と比較して2つの照射群とも有意に増加していた（ $P < 0.001$ ）。異常の内訳をみると、発生異常をもつ生存胎仔の出現率は非常に低くて対照群と照射群の間で有意差を示さな

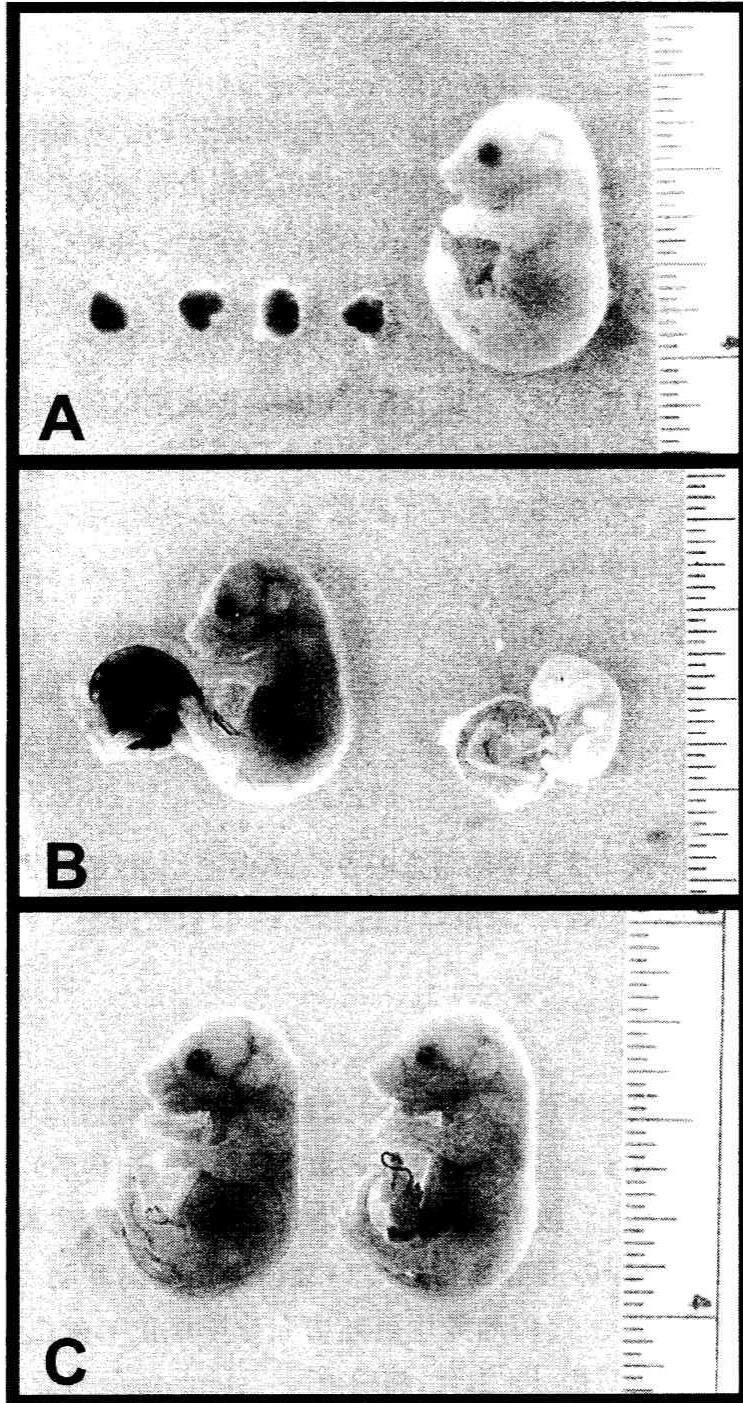


図17 γ 線照射精子由来の16-17日齢マウス胎仔にみられた発生異常.

A : 正常胎仔 (右) と4つの退化受胎産物 (左),

B : 正常胎仔 (左) と死亡浸軟胎仔 (右),

C : 正常胎仔 (左) と腹壁破裂をもつ胎仔 (右).

表 14 γ 線照射精子由来のマウス胎仔(16~17日齢)における発生異常出現率

線量 (Gy)	母獣数	黄体数 (平均)	着床数 (%)	正 常 胎仔数	発生異常胚数 (%)			計
					着床前 死亡胚	着床後の発生異常		
					生存胎仔	死亡胎仔		
0.0	19	243 (12.8)	195 (80.2)	183 (75.3)	48 (19.8)	1 (0.4)	11 (4.5)	60 (24.7)
2.0	13	192 (14.8)	142 (74.0)	116 (60.4)	50* ¹ (26.0)	1 (0.5)	25* ³ (13.0)	76* ⁴ (39.6)
4.0	20	261 (13.1)	181 (69.3)	114 (43.7)	80* ² (30.7)	1 (0.4)	66* ⁴ (25.3)	147* ⁴ (56.3)

*¹ 0.1<P<0.2, *² P<0.02, *³ P<0.01, *⁴ P<0.001

かった。一方、着床前死亡胚は 2.0 Gy 群で増加傾向を示し (0.1<P<0.2)、4.0 Gy 群で有意に増加した (P<0.01)。最も顕著な増加を示したのは着床後死亡胚で (2 照射群とも P<0.001)、その大部分は退化受胎産物 (着床直後に死亡した胚) であった。これらのデータを初期着床胚のデータ (表 11) と比較してみると、4.0 Gy 群における着床前死亡胚の出現率も着床後の発生異常胎仔の出現率もほとんど同率であった。すなわち、着床後の発生過程で異常はほとんど増加しないということが分かった。この結果は、研究結果VIの推論、すなわち、構造的染色体異常をもつ胚の大多数は着床直後に死亡し、発生後期まではほとんど残存しないということ強く支持するものである。

VIII. まとめ

成熟精子は比較的高線量の放射線照射を受けても受精過程で淘汰されず、受精卵に構造的染色体異常が高頻度に生じることは種々の動物で知られている。このようにして生じた染色体異常胚の発生運命や、初期発生過程で二次的に生じる染色体異常の実態を明らかにすることは、放射線の遺伝的（継代的）リスクを評価するうえで重要な課題である。マウスは放射線影響評価の研究に広く使用され、発生遺伝学的基礎データも豊富であり、本研究課題を行うのに最も適したモデル動物であるが、初期卵割胚における染色体標本作製技術が開発されていないためほとんど研究が行われていなかった。そこで、我々は、まずマウス初期胚染色体標本作製技術の開発から着手し、放射線誘発染色体異常の初期発生過程における推移を調査した。4年間の研究内容は以下のとおりである。

平成 13 年度：マウス 1 細胞胚、2 細胞胚、4 細胞胚、8 細胞胚で染色体分析の成功率の高い染色体標本作製法を確立した。胚盤胞では内部細胞塊での染色体の広がり不十分で、標本作製法のさらなる改良が必要である。

平成 14 年度：前年度に開発した方法を用い、 γ 線 (2.0, 4.0 Gy) 照射精子由来の 1 細胞胚および 4 細胞胚 (非照射対照群のみ) の染色体分析を行った。

平成 15 年度：昨年度に引き続き、2 細胞胚および 4 細胞胚 (照射群) の染色体分析を行い、初期卵割期における各種染色体異常の出現率の推移を解析した。

平成 16 年度：研究計画当初には 8 細胞胚および胚盤胞の染色体分析を行う予定であった。しかし、標本作製法の開発が不十分だったことと胚発生の都合で実験が深夜になることから、着床胚 (10~11 日齢および 16~17 日齢胎仔) の発生学的、細胞遺伝学的調査に研究を変更した。

これらの研究の成果の概要を表 15 に示した。すなわち、4.0 Gy γ 線照射群を例にとって、染色体異常胚の純出現率 (本来正常核型をもつはずの胚が放射線照射の影響でどれだけ染色体異常になったか) を計算し、胎仔期での優性致死率 (本来正常に発生するはずの胎仔が放射線の影響でどれだけ死亡したか) と比較し、異常胚の発生に伴う推移を解析した。

- (1) 初期胚 (1~4 細胞胚) における染色体異常出現率は 32~35%と、ほぼ一定していたが、異常の中味をみると発生に伴ってモザイク型構造異常が増加

し、4細胞期では全異常の9割を超えた。

- (2) 放射線の影響によって胚盤胞期までに発生停止・遅延を起こした胚は15%であった。この発生異常胚のすべてが染色体異常胚とは限らないが、仮にそうだと仮定して、初期胚における染色体異常胚出現率からこれを差し引いてみると、残りの約20%の染色体異常胚（全異常の5～6割に当たる）は胚盤胞期まで発生しているという計算になる。

表 15 γ 線 (4.0 Gy) 照射精子由来マウス胚における発生・染色体異常率の推移

胚発生の時期	異常の指標	異常胚出現率
1細胞期	染色体異常	33.5 %
2細胞期	染色体異常	35.1 %
4細胞期	染色体異常	32.1 %
胚盤胞期	発生停止・遅延	14.8 %
初期胎仔期 (10~11日齢)	優性致死：着床前死亡	11.3 %
	優性致死：着床後死亡	34.9 %
	生存胚中の染色体異常	0.0 % (0/53)
後期胎仔期 (16~17日齢)	優性致死：着床前死亡	13.6 %
	優性致死：着床後死亡	32.7 %

$$\text{染色体異常出現率(\%)} = \left(1 - \frac{\text{正常核型胚数} / \text{調査胚数 (照射群)}}{\text{正常核型胚数} / \text{調査胚数 (対照群)}} \right) \times 100$$

$$\text{発生停止・遅延出現率(\%)} = \left(1 - \frac{\text{正常胚数} / \text{調査胚数 (照射群)}}{\text{正常胚数} / \text{調査胚数 (対照群)}} \right) \times 100$$

$$\text{優性致死：着床前死亡率(\%)} = \left(1 - \frac{\text{着床数} / \text{排卵数 (照射群)}}{\text{着床数} / \text{排卵数 (対照群)}} \right) \times 100$$

$$\text{優性致死：着床後死亡率(\%)} = \left(1 - \frac{\text{生存胎仔数} / \text{着床数 (照射群)}}{\text{生存胎仔数} / \text{着床数 (対照群)}} \right) \times 100$$

- (3) 胎仔期の調査でみると、着床前の胚死亡率は胚盤胞期までに発生停止・遅延を起こした胚の出現率とほぼ一致しており、着床前死亡の正体は、短時間のみ開いている着床 window に飛び込めなかった異常胚と思われる。
- (4) 着床まで辿り着いた残り 20%の染色体異常胚はその後どうなったか？初期胎仔期における着床後死亡胚の出現率は 35%であり、後期胎仔期においてその出現率が増加することはない。また、死亡胚の大部分は退化妊娠産物（着床直後の死亡）であり、生存胎仔の染色体分析からは 1 例も染色体異常個体が発見されなかった（調査例数はまだ十分ではないが）。したがって、着床まで辿り着いた染色体異常胚は着床直後に効率よく淘汰されて、発生後期まではほとんど残存しないと結論される。

それでは発生初期に観察された、正常細胞と染色体異常細胞から成るモザイク胚（高い発生能をもつ可能性がある）はどこへ行ったのか。一つの可能性としては、器官形成期に染色体異常細胞の存在が障害となって胚死亡を起こしたかもしれない。他の可能性としては、胚発生の過程で染色体異常細胞のみが選択的に死亡・排除されて正常胚に復帰したかもしれない。この可能性と関連して興味深い考えとして、胚盤胞期では染色体異常細胞が栄養膜細胞層（将来、胎盤となる）に取り残され、正常細胞のみが内部細胞塊（将来、胎仔の本体となる）を形成するという説がある（Hardy et al., 1989; Kaufman et al., 1995; Jenny and Menezo, 1996）。しかし、これを否定する報告（Evsikov and Verlinsky, 1998; Magli et al., 2000）もあり、解明は今後に残された課題である。我々が現在改良中の胚盤胞期染色体標本作成法が確立されて、内部細胞塊と栄養膜細胞の両方で染色体分析できるようになれば、この問題に対して直接解答を与えることができるだろう。

マウスで得られた今回の結果がヒトへ外挿できる普遍的な現象かどうかを確認するために、チャイニーズハムスター（CH）を用いて類似の実験を行い、今回の結果と比較してみた（立野、未発表データ）。すなわち、X線（1.82 Gy）を照射した雄と交尾させた雌から妊娠 12.5 日目に得た正常胎仔の染色体分析を行った結果、9.5 %（7/74 個体）に染色体異常が観察された（相互転座 3 例、逆位 3 例、高数性 1 例）。出現頻度は低下するものの、妊娠後期（18.5 日齢胎仔）でも 3.9 %（2/51 個体）の異常がみられた。このような動物種による大きな差の原因がどこにあるのか。我々は以前の研究で、CH 精子における放射線誘発の交換型染色体異常出現率がマウス精子で報告されている値よりも 2.5~3 倍も高

く、交換型異常と切断型異常の出現率がほぼ 1 : 1 であることを報告した (Tateno et al, 1996)。一方、今回の研究から、マウス精子では交換型異常と切断型異常の出現比率がほぼ 1 : 3 で、切断型異常の割合がかなり高いことが分かった。切断型異常が少なく交換型異常が多いほど、発生後期まで残存し得る安定型染色体異常 (逆位、相互転座など) が生じやすいことになるので、このような動物種差が着床後に残存する染色体異常胎仔出現率の種差 (マウス 0 % vs CH 9.5%) の理由と考えられる。

被曝精子由来のヒト受精卵において出現する構造的染色体異常の様相がマウス型であるのか CH 型であるのかはいまだ不明である。ヒト受精卵の染色体分析が行われる機会はきわめて少なく、ましてや被曝精子を体外受精させたヒト胚の染色体研究は倫理的問題もあってほとんど不可能であろう。実験動物からヒトへの外挿の一つのアプローチとしては、カニクイザルやリスザルなどの霊長類の受精卵を用いた染色体研究なども必要であろう。

引用文献

- 1) Evsikov S and Verlinsky Y: Mosaicism in the inner cell mass of human blastocysts. *Hum. Reprod.*, 13: 3151-3155, 1998.
- 2) Hardy K, Handyside A and Winston RML: The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro. *Development*, 107: 597-604, 1989.
- 3) Jenny L and Menezo Y: Maternal age effect on early human embryonic development and blastocyst formation. *Mol. Reprod. Develop.*, 45: 31-37, 1996.
- 4) Kamiguchi Y, Tateno H and Mikamo K: Types of structural chromosome aberrations and their incidences in human spermatozoa X-irradiated in vitro. *Mutation Res.*, 228: 133-140, 1990.
- 5) Kamiguchi Y and Tateno H: Radiation- and chemical-induced structural chromosome aberrations in human spermatozoa. *Mutation Res.*, 504: 183-191, 2002.
- 6) Kaufmann RA, Menezo Y, Hazout A, Nicollet B, DuMont M and Servy EJ: Cocultured blastocyst cryopreservation: experience of more than 500 transfer cycles. *Fertil. Steril.*, 64: 1125-1129, 1995.
- 7) Magli MC, Jones GM, Gras L, Gianaroli L, Korman I and Trounson AO: Chromosome mosaicism in day 3 aneuploid embryos that develop to morphologically normal blastocysts in vitro. *Hum. Reprod.*, 15: 1781-1786, 2000.
- 8) Matsuda Y, Yamada T and Tobar I: 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, 1985.
- 9) Mikamo K and Kamiguchi Y: A new assessment system for chromosomal mutagenicity using oocytes and early zygotes of the Chinese hamster. In "Radiation-Induced Chromosome Damage in Man", T Ishihara and MS Sasaki (eds.), pp. 411-432, Alan Liss, Inc., New York, USA, 1983.

- 10) Streffer C: Chromosomal damage in preimplantation mouse embryos and its development through the cell cycle. *Mutation Res.*, 299: 313-315, 1993.
- 11) Tateno H, Kamiguchi Y, Shimada M and Mikamo K: Difference in types of radiation-induced structural chromosome aberrations and their incidences between Chinese and Syrian hamster spermatozoa. *Mutation Res.*, 350: 339-348, 1996.
- 12) Weissenborn U and Streffer C: Analysis of structural and numerical chromosomal anomalies at the first, second, and third mitosis after irradiation of one-cell mouse embryos with X-rays or neutrons. *Int. J. Radiat. Biol.*, 54: 381-394, 1988.
- 13) Weissenborn U and Streffer C: Analysis of structural and numerical chromosome aberrations at the first and second mitosis after X-irradiation of two-cell mouse embryos. *Radiation Res.*, 117: 214-220, 1989.