

環境変異原研究

Environmental
Mutagen
Research
Communications

Vol.11 No.3 1989

環境変異原研究

第11卷 第3号 1989年

目 次

第1回公開シンポジウム特集号の発刊によせて

祖父尼俊雄

日本環境変異原学会公開シンポジウム

環境変異による遺伝的障害を考える

—ショウジョウバエからヒトまで—

座長 武部 啓
菊地 康基

子孫に伝わる突然変異と伝わらない突然変異:

ショウジョウバエによる研究	藤川 和男	1
メダカ生殖細胞での突然変異と淘汰	嶋 昭絃	13
ハムスターにおける染色体異常とその淘汰	孫田 信一	19
カニクイザル生殖細胞での遺伝的障害	戸張 巍夫	31
発がん性変異の垂直伝達	野村 大成	41
ヒト赤血球での遺伝子突然変異	秋山 実利	47
ヒトの生殖障害について	美甘 和哉	55

パネルディスカッションおよび総合討論

マウス優性致死と特定座位	土川 清	63
マウス始原生殖細胞の突然変異	渋谷 徹	65
ヒト生殖細胞の突然変異	佐藤千代子	73
ヒトリンパ球の突然変異	巽 紘一	81
人類遺伝学の立場から	松永 英	89
日本学術会議だより No. 15, 16		95

付 記

日本環境変異原学会 会則	99
" 役員名簿	100
" 評議員名簿	101
" 入会申し込み書	102

第1回公開シンポジウム特集号の発刊によせて

当学会主催の第1回の公開シンポジウムが、「環境変異原による遺伝的障害を考える——ショウジョウバエからヒトまで——」というテーマで開催されたことは皆様ご承知の通りである。このシンポジウムでは、当学会以外の先生方が多数シンポジスト、パネリストとして参加して頂き、幅広く討論することができ、有意義なものであった。これも座長を勤められた武部 啓、菊池康基、両先生のご尽力によるもので、改めて深謝申し上げる。

この度、このシンポジウムの内容が、「変異原研究」の特集号として発刊する運びとなり、紙面からその論議の内容をさらに多くの人に伝えられることになったのは、シンポジウムの開催に携わったものとして喜びにたえない。原稿作成に努められたシンポジスト、パネリスト、さらにそれを取りまとめられた座長の両先生に敬意を表する。また、「変異原研究」の発刊のために地道にご努力された編集委員の先生方に深謝申し上げる。

公開シンポジウムは当学会企画委員会により計画されたものであるが、この企画委員会および前述の編集委員会は、ご承知の通り前学会長松島泰次郎先生のご意向により設けられた活性化委員会を母胎としているものである。このように当学会の活動がより幅広く、且つ内容の豊かなものへと進められているのも、松島先生のご慧眼によるものである。すでに第2回の公開シンポジウムが大西克成先生を中心に計画され、その開催が目前にせまっている。さらに盛大なものとなることはまちがいないが、これらの成果が編集委員会の活躍と相俟って、益々当学会の活動が盛大になるものと確信している。

平成2年4月

国立衛生試験所 祖父尼俊雄

〒553 大阪府茨川
Non-heritable mutations
of potential carcinogenicity
Kazuji Fujikawa
Drug-Safety Research Laboratory
Osaka 553, Japan

子孫に伝わる突然変異と伝わらない突然変異

子孫に伝わる突然変異と伝わらない突然変異: ショウジョウバエによる研究

武田薬品工業株式会社研究開発本部 薬剤安全性研究所 藤川和男

1. はじめに

子孫に伝わる突然変異とは、生殖細胞で生ずる突然変異のことと、その表現型の発現に伴う疾病や生体機能の低下等が遺伝的障害である。当然、「環境変異原による遺伝的障害を考える」場合には、環境変異原によってヒトの生殖細胞で生ずる突然変異が問題となる。とは言っても、ヒトの生殖細胞突然変異が環境変異原によって生じたとする確固たる証拠は、今のところ、得られていない。このような現状で、環境変異原の遺伝的影響を正当に評価し、将来、我々の子孫が遭遇するかもしれない災難を未然に防ぐためには、地道な動物実験を積み重ねる以外有効な方策はない。

環境変異原の遺伝毒性について、最も古くから、地道な研究を積み重ねてきた系がショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* である。実際、ショウジョウバエの突然変異や変異原の研究は、もっぱら、生殖細胞を対象として行われてきたし、得られた成果は放射線や化学物質によって誘発される生殖細胞突然変異の出現様相や誘発変異の性質を理解するのに大いに貢献してきた (Muller, 1954a, b; Auerbach, 1976)。ところが、ここ 10 年の間に、子孫に伝わらない突然変異、即ち、体細胞突然変異を対象とする研究が盛んに行われるようになった (Würgler and Vogel, 1986; 藤川, 1988)。これはショウジョウバエによる変異原検出の感度と効率を一段と高め、突然変異の基礎研究をさらに深める方向への変化である。こ

のような研究戦略の転換期にあって、本稿を草する機会が与えられた幸運を喜びたい。

以下、生殖細胞に対する変異原の遺伝的効果について、ショウジョウバエの研究で何が明らかにされているか、子孫を環境変異原による遺伝的障害から守るために、ショウジョウバエの研究、とりわけ、体細胞を対象とする変異原検索研究はいかなる意義を有するかを述べ、最後に、遺伝的障害を正当に怖がるために、現在、私達が追求している課題に言及する。

2. 子孫に伝わる突然変異

(1) 誘発率の遺伝子座依存性

誘発される突然変異は自然でも生ずる (Muller, 1927)。Table 1 に、自然突然変異率と X 線による誘発突然変異率の両方が知られているショウジョウバエの遺伝子座を、自然突然変異率によって A から D の 4 群に分け、それぞれのグループの遺伝子座について平均した自然突然変異率と誘発突然変異率を示している。この表から自然突然変異率が高ければ高い程、誘発突然変異率も高いことがわかる。変異原に曝された集団の子孫に変異体が出現しても、それが誘発突然変異によるものか自然突然変異によるものかの区別はできないのである。変異原と変異体出現の因果関係は、変異原に曝されていない (= 対照) 集団の子孫における変異体の出現頻度との定量的比較から初めて明らかにされる性質のもので、この比較は、突然変異

〒532 大阪市淀川区十三本町 2 丁目 17-85

Non-heritable mutation versus heritable mutation: A strategic change in tests with *Drosophila* for evaluation of potential mammalian genotoxins

Kazuo Fujikawa

Drug-Safety Research Laboratories, Research and Development Division, Takeda Chemical Industries, Ltd.
Osaka 532, Japan

Table 1. ショウジョウバエの自然突然変異率と誘発突然変異率

遺伝子座 ^{a)}	自然突然変異率	X線誘発突然変異率 ^{b)}
	変異/座/世代 ($\times 10^{-5}$)	変異/座/cGy ($\times 10^{-7}$)
A) <i>umpy</i>	24.5	15.3
B) <i>yellow</i> <i>white</i> <i>cut</i> <i>garnet</i>	1.2	1.6
C) <i>carmine</i> <i>forked</i> <i>raspberry</i>	0.6	0.5
D) <i>prune</i> <i>dusky</i> <i>outstretched-</i> <i>small-eye</i> <i>carnation</i> <i>singed</i> <i>echinus</i>	0.2	0.2

a) いずれも劣性可視突然変異をもたらす特定座位。
A), Fujikawa and Inagaki (1979), B)~D), Shukla et al. (1979) より。

b) 成熟精子に対する 30 Gy 照射による誘発突然変異頻度より算出。

誘発実験と疫学調査に共通した原則的方法となっている。

(2) 誘発頻度の変異原用量依存性

突然変異の誘発頻度は変異原用量に依存する。この原則は、まず放射線遺伝学で確立されたもので、X線、γ線、中性子線などの電離放射線による遺伝子突然変異の線量に対する直線的增加やX線やγ線の高線量域における染色体突然変異の指數関数的增加は、ショウジョウバエ以外でもよく経験された線量・効果関係である。化学変異原の場合の1例を Fig. 1 に示している。この図の縦軸は遺伝子変化の指標として定量した伴性劣性致死突然変異(3-(1) 参照)の出現頻度で、横軸は成虫雌に給餌した 5% 庶糖液中の ethyl methanesulfonate (EMS) の濃度。この図から卵原細胞でも成熟卵母細胞でも、EMS 濃度にはほぼ直線的に依存して突然変異が誘発されることがわかる。EMS の用量と伴性劣性致死突然変異の誘発頻度が直線的関係を示すことは、用量を成虫雄への体内摂取量 (Ayaki et al., 1985) や精子 DNA のエ

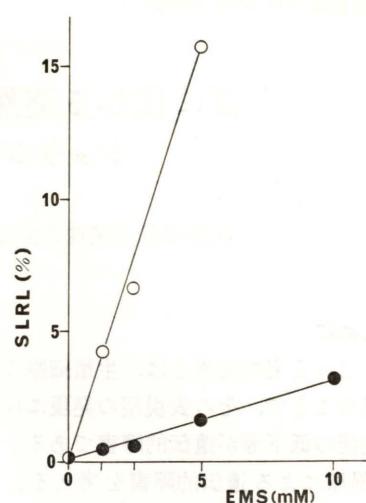


Fig. 1. ショウジョウバエ成虫雌における ethyl methanesulfonate (EMS) の用量と遺伝的効果の関係(原図)。
用量(横軸): 紙餌した 5% 庶糖液中に溶解させた EMS の濃度。
効果(縦軸): 成熟卵母細胞(○)と卵原細胞(●)で生じた伴性劣性致死突然変異(SLRL)の頻度

チル化量 (Aaron and Lee, 1978) で測定した研究でも確かめられている。但し、この直線的関係を一般化するわけにはいかない。精子で methyl methanesulfonate (MMS) によって誘発される伴性劣性致死突然変異の頻度 F と DNA のメチル化量 D の関係は、 $F = aD + bD^2$ の式によくフィットする (Lee et al., 1989)。また、ethylnitrosourea (ENU) によって誘発される劣性致死突然変異の頻度は、その体内摂取量に対して、精子では直線的に、精原細胞ではシグモイド状に上昇する (Yoshikawa et al., 1984)。用量・効果関係は、突然変異のタイプによっても変わる。例えば、精子における相互転座の頻度は、EMS の腹腔内投与量の約 3 乗に比例して上昇する (Ikebuchi, 1982)。このように、突然変異誘発に関する用量・効果関係は、変異原の DNA に対する作用機序、標的細胞の状態、突然変異の生成機構、等々を反映して、大きく変わるものであるが、今までのところ、放射線を含めて、変異原の遺伝的効果に閾値が存在する証拠は得られていない (Würgler, 1984)。

(3) 誘発頻度の細胞時期依存性

突然変異の誘発頻度は生殖細胞の発育段階に応じて変化する。成虫雄への X 線照射では、精子細胞初期の細胞で最も高い頻度で突然変異が誘発され、精原細胞期が最も低い突然変異感受性を示す。成虫雌への X 線照射では、成熟卵母細胞(第 1 選元分裂中期)と卵原細胞が、それぞれ、最高と最低の突然変異感受性を示す (Sankaranarayanan and Sobels, 1976)。化学変異原の遺伝的効果も細胞時期に依存する。Fig. 1 はその 1 例であるが、化学変異原の遺伝的効果は、雌処理は妊娠を低下させるとか、突然変異の検出に手間がかかるとかで、ほとんど雄で調べられてきた。その結果、間接変異原、直接変異原を問わず、化学変異原の一般的な傾向として、還元分裂前の細胞よりも、還元分裂後の細胞が比較的高い突然変異感受性を有することが明らかになっている (稻垣・藤川, 1984)。間接変異原に関しては、細胞時期依存性がとりわけ顕著で、多くの場合、精母細胞から初期精子細胞で突然変異出現のピークをもたらす (Sobels and Vogel, 1976; Vogel et al., 1982)。これらの細胞は、比較的高い薬物代謝酵素活性によって特徴づけられる。

伴性劣性致死突然変異の誘発に関して、精原細胞が還元分裂後の細胞と比較して、放射線にも化学変異原にも抵抗性なのは、精原細胞に備わっている高い DNA 修復能 (Smith et al., 1983) と、生じた致死変異を担う細胞の精子形成過程での淘汰 germinal selection (Muller, 1954b; Vogel et al., 1982) で説明されている。精子形成過程での淘汰は、遺伝子変化よりも染色体異常に対して、より強く働くので、染色体異常の遺伝子突然変異に対する相対的誘発頻度は、精原細胞で最低になる(例、Valencia and Valencia, 1961)。3-(1) で、別の観点から精原細胞の変異原抵抗性の問題を再び取上げる。

(4) 突然変異のタイプの変異原依存性

染色体突然変異の誘発効率は変異原によって異なる。ある報告 (Sobels and Broerse, 1970) によれば、成虫雄へ X 線を 30 Gy 照射すると、約 10% の精子で伴性劣性致死突然変異が、約 7% の精子で相互転座が生ずる。別の報告 (Vogel and Natarajan, 1979a) によれば、1 mM の MMS や 0.1 mM の methylnitrosourea (MNU) の 48 時間給餌で、伴性劣性致死突然変異を X 線 30 Gy とほぼ同程度の頻度で誘発することができる。しかし、転座は、被処理精子を交配相手(テスター雌)の貯精囊に 10~13 日間貯蔵して、染色体切断生成を最大限に促進させても、せいぜい 2% しか生じない。もっと極端なケースが ENU である。このアルキル化剤は、30~40% の頻度で伴性劣性致死突然変異を誘発する濃度で処理して、被処理精子を MMS や MNU と同様に貯蔵しても、相互転座をほとんど誘発しない。優性致死や染色体欠損の誘発にも無効である (Vogel and Natarajan, 1979b)。これらの例に見られるように、放射線と比較して、化学変異原は、一般に、大きな染色体再配列を伴う突然変異を誘発しにくい。また、アルキル化剤で得られた結果の比較から明らかなように、化学変異原のなかでも、染色体突然変異の誘発効率に大きな違いがみられる。

なお、上記の精子貯蔵効果は、DNA のアルキル化による染色体異常の誘発に対して特異的に見られる現象で、その効果の有無は、放射線と化学変異原の染色体毒性発現機構の違いと、化学変異原による染色体突然変異と遺伝子突然変異の初期損傷の違いを特徴づける (Auerbach, 1976)。MMS の貯蔵効果発現のメカニズムは Ryo et al. (1981) に詳しい。

特定のタイプの突然変異に伴う遺伝的変化のスペクトラムも変異原によって異なる。このスペクトラムの違いは、劣性致死突然変異について、唾腺染色体を利用する細胞遺伝学的手法や相補性テストのような遺伝学的方法で調べられた限り (Hochman et al., 1964; Hochman, 1971; Lifschitz and Falk, 1968, 1969; Lim and Snyder, 1974), 変異原の染色体異常誘発効率の違いを反映する傾向にある。古典遺伝学的な基準で遺伝子突然変異として得られた white 座や Adh 座の X 線誘発突然変異のほとんどすべてが DNA 欠失で、同じ座の ENU 誘発突然変異のほとんどすべてが塩基変化であった、という最近の報告 (Batzer et al., 1988; Pastink et al., 1987, 1988) も考慮すると、突然変異スペクトラムの変異原依存性はゲ

ノムから遺伝子のレベルまで一貫して成立するものと思われる。

3. 環境変異原の遺伝毒性検索研究

(1) 伴性劣性致死法

ショウジョウバエによる変異原研究の歴史は、伴性劣性致死法を駆使した研究の歴史といつても過言ではない。すでに何度も出てきた伴性劣性致死突然変異は、この方法で検出される突然変異のことである。この方法を用いると、X染色体上の600~800の遺伝子座で生ずる劣性突然変異を、それが異型接合(=XY)状態で個体致死効果をもたらす限り、すくなく検出できる(詳細は稻垣・藤川, 1983)。そのため、本法は変異原(あるいは、変異原性が未知な検体)と突然変異の因果関係を定量的に解析するのに格好な方法である。検出された劣性致死突然変異は、紛れもなく継代遺伝性を示すもので、ある種の変異原では、すべて遺伝子突然変異によるが、別の変異原では、遺伝子内変化から染色体再配列までいろいろなタイプの変化を伴う。このような遺伝的変化の多様性も変異原性が未知な化学物質の変異原性試験には好都合である。

合衆国の Gene-Tox Programm のためにまとめられた資料には、197の化学物質が伴性劣性致死法の陽性物質として記載されている(Lee et al., 1983)。問題は、これらの変異原が、ヒトの遺伝毒物としての危険性をどの程度有しているかであるが、この点に関して、マウスやラットによる実験にみられる癌原物質の臓器特異性がヒトでの発癌部位と必ずしも一致しない事実は、重要である(Vogel, 1987)。この事実は、昆虫の性腺で毒性を発揮する変異原が同様に哺乳動物でも、という推論の非科学性を指摘する。実際、マウス精原細胞の変異原はショウジョウバエ精原細胞の変異原でもあるが、その逆は必ずしも真ではない(Table 2 参照)。即ち、ショウジョウバエの生殖細胞変異原のヒトに対する危険性は、哺乳類の生殖細胞を対象とする変異原性試験を通して評価すべきで、伴性劣性致死試験の陽性物質は、哺乳動物における毒性が不明な段階では、単なる in vivo 変異原として扱うべきであろう。

(2) 子孫に伝わらない突然変異

遺伝毒性の問題を考える前にまず、in vivo 変異原性を問題にするならば、別に生殖細胞にこだわる必要はない。体細胞突然変異を指標にして簡便かつ迅速な試験を行えばよい。体細胞突然変異を指標にする試験は、幼虫に検体を投与して、それらが成虫になるのを待って、眼とか翅の表面を観察して目的の変異細胞のクローニングをスポットとして検出する(藤川, 1988)。伴性劣性致死試験は孫の代を調べないと突然変異の検出ができないが、この種の試験は、子孫に伝わらない突然変異を調べるのだから当代限りである。現在、染色体組換えによる翅毛スポット(Graf et al., 1984)や眼色スポット(Becker, 1975)と遺伝子突然変異による眼色復帰変異(Rasmussen et al., 1978)を指標とする体細胞試験が実用に供されている。

WHO の International Programm on Chemical Safetyに基づく国際共同研究でショウジョウバエを担当する研究者達は、検体調整法や処理法を統一して、宿題検体 benz(a)pyrene(BP), pyrene(Py), 2-acetylaminofluorene(2-AAF)および4-acetylaminofluorene(4-AAF)の伴性劣性致死試験と上記の体細胞テストを実施した(Vogel et al., 1988)。その結果、代表的な発癌性変異原BPと2-AAFは、3種の体細胞テスト全てで陽性結果をもたらしたが、伴性劣性致死試験では、いずれも、非発癌物質Pyや4-AAFと同様に、陰性であった。この陰性結果は、4つの研究グループで一致している上に、体細胞テストと同じ処理条件下で得られたので貴重である。生体内に取り込まれた変異原の毒性が性腺よりも体組織で比較的顕著に検出できることを示す好例である。同様な例は他の変異原でも少なからず知られている(Fujikawa, 1982; Fujikawa et al., 1983; Vogel and Zijlstra, 1987; Szabad et al., 1983)。既知の生殖細胞変異原を対象とした試験では、生殖細胞で変異原性を示すものは体細胞でも変異原性を示すことが、経験則として確立されつつある(Würgler and Vogel, 1986; Graf et al., 1989)。マウスでも同様である(Brusick, 1980; Holden, 1982; Adler and Ashby, 1989)。

遺伝毒性に関わる具体例を Table 3 にまとめて

Table 2. ショウジョウバエとマウスにおける化学変異原の突然変異誘発効果
(+, 陽性; -, 險性; ND, 未定)

変異原 ^{a)}	マウス精原細胞		ハエ精原細胞	ハエ体細胞	
	指標: 特定座位 ^{b)}	F ₁ 奇形 ^{c)}	伴性劣性致死 ^{d)}	翅毛スポット ^{e)}	復帰変異 ^{f)}
Mitomycin C (MMC)	+	+	+	+	+
Triethylenemelamine (TEM)	+	+	+	+	+
Ethylnitrosourea (ENU)	+	+	+	+	+
Procarbazine·HCl (PCZ)	+	+	+	+	+
Methylnitrosourea (MNU)	-	+	+	+	+
Urethan	-	+	ND	+	+
7,12-Dimethylbenz(a)-anthracene (DMBA)	-	-	+	+	+
Benz(a)pyrene (BP)	-	ND	-	+	+
Diethylnitrosamine (DEN)	-	ND	+	+	+
Ethyl methanesulfonate (EMS)	-	ND	+	+	+
Hexamethylphosphoramide (HMPA)	-	ND	+	+	+

a) すべて発癌物質。DEN以外はマウス体細胞変異原(Heddle et al., 1983; Russell et al., 1981b; urethanはNomura, 1983)。DENはラット肝臓小核試験で陽性(Tates et al., 1980)。

b) 特定座位法を用いて検出される7座位の劣性可視突然変異(Russell et al., 1981a; urethanとHMPAはRussell, 1984)。

c) 胎仔の形態異常をもたらす優性可視突然変異(MNUはNagao, 1987; urethan, DMBA, ENUはNomura, 1988; その他はNagao and Fujikawa, 1989)。

d) 伴性劣性致死法で検出される突然変異(Lee et al., 1983; BPとHMPAはVogel et al., 1988)。

e) 翅毛変異mwhのヘテロ接合体(mwh+/+)で、染色体組換えの結果生ずる(mwh/mwh)細胞のクローニング(Würgler and Vogel, 1986; urethanは梁・野村, 1988)。

f) Unstable white-zeste(UZ)系統で, w^{+(TE)}の復帰変異の結果生ずるw⁺細胞のクローニング(Würgler and Vogel, 1986), urethanについては, white-ivory四重複系統で, w¹の復帰変異の結果生ずるw⁺細胞のクローニング(梁・野村, 1988)。

Table 3. 精原細胞と体細胞の突然変異感受性の比較
(Green et al., 1986; Fujikawa et al., 1988; 藤川他, 未発表より作成)

処理 ^{a)}	復帰変異頻度 ^{b)}		感受性比 [A/A']
	精原細胞 ^{c)} [A]	体細胞 ^{d)} [A']	
自然	2.2 × 10 ⁻⁵	2.0 × 10 ⁻⁵	1.1
X線 5 Gy	1.4 × 10 ⁻⁴	3.4 × 10 ⁻⁴	0.4
10 Gy	3.3 × 10 ⁻⁴	6.2 × 10 ⁻⁴	0.5
Diepoxybutane (DEB)			
47 mM	0.05 × 10 ⁻³	1.3 × 10 ⁻³	0.04
93 mM	1.3 × 10 ⁻³	3.5 × 10 ⁻³	0.4
Ethylnitrosourea (ENU)			
0.5 mM	0.1 × 10 ⁻⁸	0.3 × 10 ⁻⁸	0.3
1.0 mM	1.4 × 10 ⁻⁸	0.6 × 10 ⁻⁸	2.3
Triethylenemelamine (TEM)			
0.1 mM	1.2 × 10 ⁻⁸	0.2 × 10 ⁻⁸	6.0

a) 眼色変異white-ivory四重複系統Dp(I:I:I:I)w¹の1令幼虫が生育している培地上に変異原水溶液を滴下して処理。X線は3令期に照射。

b) 細胞1個当たりに誘発された復帰変異の数(本文参照)。

c) 成虫期に達した雄個体を、4日間、適当な雌と予備交配させた後、white座の欠失変異のホモ接合体と、10日間、交配させて、F₁雌として採取。

d) 複眼原基細胞。

いる。表中の化学物質はマウスの精原細胞とショウジョウバエの体細胞で変異原性が調べられているものに限った。ショウジョウバエの精原細胞で得られた結果も示している。表示した物質はすべてマウス発癌物質で、それらはすべて、ショウジョウバエでも明瞭な体細胞効果を発現する。そして、その一部がマウス精原細胞で変異原性を示す。この変異原性の指標を特定座位突然変異にした試験と F_1 奇形にした試験で MNU と urethan の結果が矛盾するのは気にかかるが、私は、指標に関わらず、マウスのような哺乳動物の精原細胞で変異原性効果を示すものを、ヒトに遺伝毒物として作用する怖れが最も高いものと考える。このような危険物のなかに PCZ と urethan が含まれるのは特記に値する。これらは、in vitro 系の突然変異を指標とする試験では、陽性効果が認めにくいか全く認められないものである。この事実は、ヒトの遺伝毒物としての危険性が高いものを見逃すことなく、環境化学物質の変異原性を検索するには、in vivo 系による試験が不可欠であることを指摘する。幸い、ショウジョウバエの体細胞テストは染色体組換えによる超毛スポットを指標にしても、遺伝子突然変異による眼色復帰変異を指標にしても、マウス精原細胞の変異原を in vivo 変異原として検出できる (Table 2)。

環境変異原の現実的脅威は、その発癌性にあり、動物個体を丸ごと扱う試験の、現実的な役割は、発癌性が疑われる環境化学物質を in vivo 変異原として検出することにある。ショウジョウバエ体細胞テストのように高感度な in vivo 試験を通して、発癌性が疑われる物質を環境から取り除いたり、環境中に出さないようにする努力は、潜在的脅威の遺伝的障害を未然に防ぐことになる。

4. 遺伝的障害を正当に怖がるために

(1) 精原細胞の突然変異反応の解析

精原細胞を遺伝的障害に関して重視するのは、この細胞が幹細胞として不死であるからである。それ故、精原細胞の環境変異原に対する危険期は、生後から生殖年齢の終わりまで続く。また、そこで一旦生じた突然変異は、個体が生殖年齢にある限り消失せず、次々生産される生殖細胞を通して、

次代に伝わる。このような細胞は、種の遺伝的資質の保全のために、体組織の幹細胞以上に、環境変異原から防御されていると思われる。体細胞で突然変異を起こしても精原細胞で突然変異を起こすとは限らないという、マウスやショウジョウバエでの経験 (Table 2) は、その証左であろう。かかる観点から、私達は、精原細胞と体組織幹細胞の突然変異感受性の比較を試みた。

ショウジョウバエ X 染色体の眼色変異の一例である *white-ivory* (*wⁱ*) は、*white* 座 DNA の一部 2.9 kb が重複したために生じた変異で、この重複片が欠失して *wⁱ* から *w⁺* へ戻ると、眼色を象牙色から正常眼色の赤に復帰させる。自然復帰も、X 線や化学変異原による誘発復帰も、体細胞であれ生殖細胞であれ、この機構によって生ずる (Green et al., 1986)。それ故、*wⁱ* の復帰変異を突然変異の指標にすると、2-(4) に関わる問題に悩まされることはない。しかし、*wⁱ* 系統は、強力な変異原で処理しても、生殖細胞での復帰変異の出現頻度が低くて、目的の研究に使用するのは困難であった。そこで、復帰変異の検出感度を上げるために、*wⁱ* をタンデムに 4 コピー重複しても一つ系統を作成し、この系統の雄幼虫をいろいろな変異原で処理した。体組織幹細胞での復帰変異は、成虫期に達した個体の複眼中で赤色スポットとして検出し、細胞あたりの復帰変異頻度は (スポットに含まれる個眼数の総和/総個眼数) で求めた。精原細胞での復帰変異は、眼色スポット観察後の成虫雄と *white* 座の欠失変異体 (*w⁻/w⁻*) 雌の交配による、 F_1 子孫のなかで赤眼を呈する雌個体として検出した。復帰変異頻度は (赤眼体/総 F_1 雌数) で求めた。

得られた結果の一部を Table 3 に示している。表中の「感受性比」は、復帰変異頻度の比較による精原細胞の相対的突然変異感受性の指標である。この値は、X 線処理では、線量に関わらず、1 以下で、精原細胞が、X 線の突然変異誘発効果に対して、比較的抵抗性であったことがわかる。詳細は省くが、細胞致死に関しては、比較的感受性である (Fujikawa et al., 1988) ので、精原細胞が示した突然変異抵抗性は、すべてではないにしろ、精原細胞集団における比較的効率の良い細胞

置換型修復 (cell-replacement repair, Kondo et al., 1984) を想定すれば、説明できる。

精原細胞は DEB 処理に対しても比較的抵抗性であったが、「感受性比」は、低用量のほうが高用量よりも極端に低くなり、顕著な用量依存性を示した (Table 3)。これは 93 mM まで、体細胞の復帰変異が、用量に対して、ほぼ直線的に増加するのに対して、精原細胞の復帰変異は指数関数的に急上昇していることを反映している。同様な用量・効果関係の違いは、ENU 処理でも見られ、「感受性比」は、低用量域で 0.3、高用量域で 2.3 となつた。これらの結果から、精原細胞は、体細胞以上に効率よく、DEB や低用量の ENU による突然変異損傷を取り除いたことがわかる。高用量域における突然変異頻度の急上昇は、精原細胞に備わっている突然変異防御機構の処理能力以上の量の突然変異損傷が生じたか、変異原によって防御機構自体が破壊された結果であろう。ENU 1.0 mM と TEM 0.1 mM で得られた、1 以上の「感受性比」は、その防御機構が充分に機能しなくなると、精原細胞は、体細胞と同等かそれ以上の突然変異反応を示しうる、ということを教える。

ENU も TEM も、ショウジョウバエのみならず、マウスでも強力な精原細胞変異原である。マウスにおいても、ENU の用量・効果関係は、体細胞では、直線的 (一ツ町, 1987) で、精原細胞の低用量処理では指数関数的 (あるいは閾値型) になる (Russell et al., 1982)。ショウジョウバエ雌雄のいろいろな生殖細胞で劣性致死突然変異の出現様相を調べた研究で、ENU の非直線的用量・効果関係は精原細胞に特異的であることが明らかにされている (Yoshikawa et al., 1984; 吉川勲, 私信)。

ヒトの精原細胞も、マウスやショウジョウバエと同様に、体細胞以上に変異原の脅威から防御されていると考えても問題はない。今後の課題は、その防御機構の実態の解明である。

(2) 突然変異生成機構の研究

遺伝的障害は、もとをただせば、生殖細胞の突然変異であるが、前節や 2-(3) で述べたような問題に関係しない限り、それを体細胞の突然変異と区別する必要はない。体細胞 (正確には成虫原基

細胞) の突然変異を研究する利点は、突然変異誘発の 1 個体あたりの標的細胞数が多いため、定量性に優れていることと、DNA 代謝を盛んに行っているため、DNA 修復と突然変異生成の関係が、比較的容易に解析できることにある。私達は、これらの利点を最大限に生かして、突然変異生成機構の研究を行ってきた。

今までの研究から得られた最も興味ある結果は、DNA 修復能欠損変異の一種 *mei-41* が、遺伝子突然変異の誘発は抑制するが、染色体組換えの誘発は促進するということである。Fig. 2 に具体例として、EMS の処理実験で得られた結果を示している。この図から、野生型と比較して、*mei-41* 変異体で、EMS 誘発遺伝子突然変異の出現率が約半分に減少し、染色体組換えの出現率が約 10 倍増加しているのが判る。同様な結果は X 線でも得られている (Ryo and Kondo, 1986; Yoo et al., 1985)。問題の *mei-41* は、損傷を持

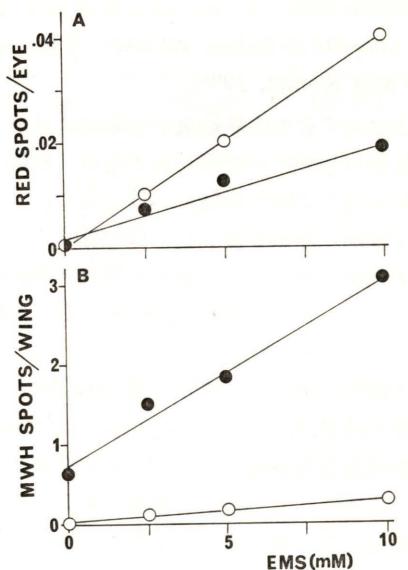


Fig. 2. ショウジョウバエの複製後修復能欠損変異系統 *mei-41* (●) と正常修復能系統 (○) における EMS 誘発体細胞突然変異の出現様相 A. 幼虫期に複眼原基細胞で生ずる眼色変異 UZ 系の *w^{+(TE)}* から *w⁺* への復帰変異のクローニングを、成虫複眼中で赤色スポットとして検出 (Fujikawa and Kondo, 1986 より)。B. 多翅毛変異のヘテロ接合体 (*mwh/+*) 幼虫の翅原基細胞で染色体組換えの結果生ずるホモ接合クローニング (*mwh/mwh*) を、成虫翅表面で多翅毛スポットとして検出 (中村・藤川, 未発表データより)。

つテンプレート上で DNA 合成が進行した結果、娘ストランドに生じたギャップを埋める機能を著しく低下させる複製後修復能欠損変異である (Brown and Boyd, 1981)。この変異が遺伝子突然変異抑制効果を示したのは、ギャップを埋める過程のエラーが突然変異生成に導くことを示唆する。また、染色体組換えを著増させたことは、修復されずに残った単鎖性ギャップ、あるいは、2 本鎖性に拡大されたギャップによって染色体組換えが引き起こされることを示唆する。

mei-41 と同様に *mei-9* も X 線誘発染色体組換えの出現率を上昇させる (Yoo et al., 1985)。しかし、この変異は、DNA の初期損傷を除去修復する機能の完全欠損をもたらすもの (Boyd et al., 1976) で、遺伝子突然変異誘発に抑制効果を示さない (Ayaki et al., 1988)。むしろ、アルキル化剤や BP の処理実験で調べたところ、遺伝子突然変異の誘発に対しては、mutator として働く (Fujikawa and Kondo, 1986; Fujikawa et al., 1988)。紫外線照射実験では、別の除去修復能完全欠損変異 *mus-201* が強力な mutator 効果を示した (Ryo and Kondo, 1986)。

以上述べてきた実験結果を体系的に理解するのに、近藤 (1989) が提唱した下記の「真核生物の DNA 修復の 3 段階経路」が役に立つ。

第 1 段階：除去修復 (主に G1 期)。

第 2 段階：ギャップを埋める修復と姉妹染色体組換え修復が並行して働く複製後修復 (S 期)

第 3 段階：染色体組換え修復 (G2 期)

この第 1 段階は、エラーを起こさず、DNA に生じた初期損傷を修復するので、突然変異防御経路として位置づけることができる。第 2 段階は、エラーを起こし、遺伝子突然変異を生成する経路。姉妹染色体組換え修復のエラーは、ギャップを埋める修復のエラーでは説明できない、例えば、*mei-41* 株での EMS 誘発突然変異 (Fig. 2) の生成に関わっているかもしれないが、今のところ、推論の域をでない。第 3 段階は、真核生物に特有で、相同染色体の組換えによって、DNA の 2 本鎖切断 (あるいはギャップ) を効率良く修復する。染色体組換えが DNA の 2 本鎖切断の修復機構

であることは、主にイーストの研究で明らかにされたこと (Szostak et al., 1983) だが、哺乳動物細胞でも、同様であることが報告されている (Brenner et al., 1986)。ショウジョウバエの体細胞染色体組換えも、DNA の 2 本鎖切断の修復機構であることを示唆する証拠は、すでに得られている (Ayaki et al., 投稿準備中)。染色体組換えが正確に行われるためには、相同染色体の正確な対合が要求されるが、この対合が、なんらかの原因でうまくいかなかったり、対合相手が相同的な染色体でなかったら、染色体異常が生ずるはず。2-(4) で述べた染色体突然変異誘発効率の変異原依存性は、組換え修復におけるエラーの起こし易さが、変異原によって異なることを暗示しているのかもしれない。

ヒトの遺伝的障害に伴う突然変異は遺伝子変化から染色体再配列や異数性まで実に多彩であるが、それらがどのような機構で生成されるのかは、ほとんど分かっていない。ヒトで生ずる突然変異は、実験動物でも生ずる。ショウジョウバエのように遺伝的解析が進んでいる系には、ヒトで生じている突然変異の説明が求められている。

5. 終わりに

ヒトの生殖細胞で環境変異原が突然変異を誘発する証拠は、今のところ、得られていない。しかし、環境変異原による遺伝的障害を未然に防ぐことは、現実的に可能であるし、生体内細胞の突然変異に関わる、いろいろな現象を、より深く理解することは、目に見えない脅威を正当に怖がるのに役立つ。まとめとして、この 2 点を主張したい。

参考文献

- Aaron, C. S., and W. R. Lee (1978) Molecular dosimetry of the mutagen ethyl methanesulfonate in *Drosophila melanogaster*: linear relation of DNA alkylation per sperm cell (dose) to sex-linked recessive lethals, *Mutation Res.*, **49**, 27-44.
- Adler, I.-D., and J. Ashby (1989) The present lack of evidence for unique rodent germ-cell mutagens, *Mutation Res.*, **212**, 55-66.
- Auerbach, C. (1976) *Mutation Research: Problems, Results and Perspective*, Chapman & Hall, London.
- Ayaki, T., K. Ohshima and I. Yoshikawa (1985) Linear relationship between lethal mutation yield and intake of ethyl methanesulfonate in *Drosophila melanogaster*, *Environ. Mutagen.*, **7**, 147-153.
- Ayaki, T., K. Fujikawa and I. Yoshikawa (1988) Comparative analysis of X-ray mutagenesis in somatic cells of *Drosophila melanogaster* strains differing in DNA-repair capacity, *J. Rad. Res.*, **30**, 80.
- Batzer, M. A., B. Tedeschi, N. G. Fossett, A. Tucker, G. Kilroy, P. Arbour and W. R. Lee (1988) Spectra of molecular changes induced in DNA of *Drosophila spermatozoa* by 1-ethyl-1-nitrosourea and X-rays, *Mutation Res.*, **199**, 255-268.
- Becker, H. J. (1975) X-Ray- and TEM-induced mitotic recombination in *Drosophila melanogaster*: unequal and sisterstrand recombination, *Mol. Gen. Genet.*, **138**, 11-24.
- Boyd, J. B., M. D. Golino and R. B. Setlow (1976) The *mei-9^a* mutant of *Drosophila melanogaster* increases mutagen sensitivity and decreases excision repair, *Genetics*, **84**, 527-544.
- Brenner, D. A., A. C. Smigocki and R. D. Camerini-Otero (1986) Double-strand gap repair results in homologous recombination in mouse L cells, *Proc. Natl. Sci. USA.*, **83**, 1762-1766.
- Brown, T. C., and J. B. Boyd (1981) Postreplication repair defects in mutants of *Drosophila melanogaster* fall into two classes, *Mol. Gen. Genet.*, **183**, 356-362.
- Brusick, D. (1980) *Principles of Genetic Toxicology*, Plenum Press, New York.
- Fujikawa, K. (1982) Mutagenicity of furylfuramide in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*, *Japan. J. Genet.*, **57**, 569-574.
- 藤川和男 (1988) ショウジョウバエを用いる化学変異原検出法の新たな展開, 食衛誌, **29**, 115-124.
- Fujikawa, K., T. Ayaki and H. Ryo (1988) Comparative induction of somatic and germline reversion of white-ivory allele in *Drosophila melanogaster* after larval X-ray treatment, *J. Rad. Res.*, **29**, 72.
- Fujikawa, K., and E. Inagaki (1979) Mutagenic effectiveness of 14.1 MeV neutrons and 200 kV X-rays at the *umpy* complex locus of *Drosophila melanogaster*, *Mutation Res.*, **63**, 139-146.
- Fujikawa, K., E. Inagaki, M. Uchibori and S. Kondo (1983) Comparative induction of somatic eye-color mutations and sex-linked recessive lethals in *Drosophila melanogaster* by tryptophane pyrolysates, *Mutation Res.*, **112**, 315-320.
- Fujikawa, K., and S. Kondo (1986) DNA repair dependence of somatic mutagenesis of transposon-caused white alleles in *Drosophila melanogaster* after treatment with alkylating agents, *Genetics*, **112**, 505-522.
- Fujikawa, K., H. Ryo and S. Kondo (1988) Somatic eye-colour reversion assay in *Drosophila melanogaster* using the unstable white-zeste system incorporated with a repair deficient mutation, In: J. Ashby, F. J. de Serres et al (Eds.), *Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens*, Vol. 2, Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 321-325.
- Graf, U., H. Frei, A. Kägi, A. J. Katz and F. E. Würgler (1989) Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test, *Mutation Res.*, **222**, 359-373.
- Graf, U., F. E. Würgler, A. J. Katz, H. Frei, H. Juon, C. B. Hall and P. G. Kale (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Environ. Mutagen.*, **6**, 153-188.
- Green, M. M., T. Todo, H. Ryo and K. Fujikawa (1986) Genetic-molecular basis for a simple *Drosophila melanogaster* somatic system that detects environmental mutagens, *Proc. Natl. Sci. USA.*, **83**, 6667-6671.
- Heddle, J. A., M. Hite, B. Kirkhart, K. Mavournin, J. T. MacGregor, G. W. Newell and M. F. Salamone (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity, *Mutation Res.*, **123**, 61-118.
- 一ツ町晋也 (1987) マウススポットテスト, 環境変異原研究, **9**, 67-72.
- Hochman, B., H. Gloor and M. M. Green (1964) Analysis of chromosome 4 in *Drosophila melanogaster*. I. Spontaneous and X-ray induced lethals, *Genetics*, **35**, 109-126.
- Hochman, B. (1971) Analysis of chromosome 4 in *Drosophila melanogaster*. II. Ethyl methanesulfonate induced lethals, *Genetics*, **67**, 235-252.
- Holden, H. E. (1982) Comparison of somatic and germ cell models for cytogenetic screening, *J. Appl. Toxicol.*, **2**, 196-200.
- Ikeuchi, M. (1982) A quantitative study of translocations induced by ethyl methanesulfonate (EMS) in *Drosophila* sperm with special reference to storage effect, *J. Sci. Hiroshima Univ., Ser. B, Div. 1*, **30**, 271-280.
- 稻垣栄一, 藤川和男 (1983) ショウジョウバエを用いる環境変異原の遺伝毒性検出, 中馬一郎, 近藤宗平, 武部啓(編), 「環境と人体, II」, 東京大学出版会, 東京, pp. 123-136.
- 近藤宗平 (1989) 突然変異の機構—遺伝子・進化・放射線一, 遺伝学雑誌, **64**, 137-163.
- Kondo, S., H. Ryo, K. Fujikawa and A. Fukunaga (1984) The threshold effect in mutagenesis by radiation and chemicals in relation to DNA repair and cell replacement, In: Y. Tazima, S. Kondo and Y. Kuroda (Eds.), *Problems of Threshold in Chemical Mutagenesis*, The Environmental Mutagen Society of Japan, Tokyo, pp. 125-131.
- Lee, W. R., S. Abrahamson, R. Valencia, E. S. von Hall, F. E. Würgler and S. Zimmering (1983) The sex-linked recessive lethal test for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*, *Mutation Res.*, **123**, 183-179.

- Lee, W. R., D. T. Beranek and B. J. Byrne (1989) Dosage-response relationships for methyl methanesulfonate in *Drosophila melanogaster* spermatozoa: DNA methylation per nucleotide vs. sex-linked recessive lethal frequency, *Mutation Res.*, **211**, 243-257.
- Lifschytz, E., and R. Falk (1968) Fine structure analysis of a chromosome segment in *Drosophila melanogaster*. Analysis of X-ray-induced lethals, *Mutation Res.*, **6**, 235-244.
- Lifschytz, E., and R. Falk (1969) Fine structure analysis of a chromosome segment in *Drosophila melanogaster*. Analysis of ethylmethanesulfonate-induced lethals, *Mutation Res.*, **8**, 147-155.
- Lim, J. K., and L. A. Snyder (1974) Cytogenetic and complementation analysis of recessive lethal mutations induced in the X-chromosome of *Drosophila* by three alkylating agents, *Genet. Res.*, **24**, 1-10.
- Muller, H. J. (1927) Artificial transmutation of the gene, *Science*, **66**, 84-87.
- Muller, H. J. (1954a) The manner of production of mutation by radiation, In: A. Hollaender (Ed.), *Radiation Biology*, McGraw-Hill, New York, pp. 351-473.
- Muller, H. J. (1954b) The nature of the genetic effects produced by radiation, In: A. Hollaender (Ed.), *Radiation Biology*, McGraw-Hill, New York, pp. 475-626.
- Nagao, T. (1987) Frequency of congenital defects and dominant lethals in the offspring of male mice treated with methylnitrosourea, *Mutation Res.*, **177**, 171-178.
- Nagao, T. (1988) Congenital defects in the offspring of male mice treated with ethylnitrosourea, *Mutation Res.*, **202**, 25-33.
- Nagao, T. and K. Fujikawa (1989) Genotoxic potency in mouse spermatogonial stem cells of triethylenemelamine, mitomycin C, ethylnitrosourea, procarbazine and propylmethanesulfonate as measured by F₁ congenital defects, *Mutation Res.*, in press.
- Nomura, T. (1983) Comparative inhibiting effects of methylxanthines on urethan-induced tumors, malformations, and presumed somatic mutations in mice, *Cancer Res.*, **43**, 1342-1346.
- Nomura, T. (1988) X-Ray- and chemically induced germ-line mutation causing phenotypical anomalies in mice, *Mutation Res.*, **198**, 309-320.
- Pastink, A., A. P. Schalet, C. Vreeken, E. Paradi and J. C. J. Eeken (1987) The nature of radiation induced mutations at the white locus of *Drosophila melanogaster*, *Mutation Res.*, **177**, 101-115.
- Pastink, A., C. Vreeken and E. W. Vogel (1988) The nature of N-ethyl-N-nitrosourea-induced mutations at the white locus of *Drosophila melanogaster*, *Mutation Res.*, **199**, 47-53.
- Rasmussen, B., H. Svahlin, Å. Rasmussen, I. Montell and H. Olofsson (1978) The use of a mutationaly unstable X-chromosome in *Drosophila melanogaster* for mutagenicity testing, *Mutation Res.*, **54**, 33-38.
- Russell, W. L. (1984) Dose response, repair, and no-effect dose levels in mouse germ-cell mutagenesis, In: Y. Tazima, S. Kondo and Y. Kuroda (Eds.), *Problems of Threshold in Chemical Mutagenesis*, Environmental Mutagen Society of Japan, Tokyo, pp. 153-160.
- Russell, W. L., P. R. Hunsicker, G. D. Raymer, M. H. Steele, K. F. Stelzner and H. M. Thompson (1982) Dose-response curve for ethylnitrosourea-induced specific locus mutations in mouse spermatogonia, *Proc. Natl. Sci. USA.*, **79**, 3589-3591.
- Russell, L. B., P. B. Selby, E. von Hall, W. Sheridan and L. Valcovic (1981a) The mouse specific-locus test with agents other than radiations, Interpretation of data and recommendations for future work, *Mutation Res.*, **86**, 329-354.
- Russell, L. B., P. B. Selby, E. von Hall, W. Sheridan and L. Valcovic (1981b) Use of the mouse spot test in chemical mutagenesis: interpretation of past data and recommendations for future work, *Mutation Res.*, **86**, 355-379.
- Ryo, H., K. Ito and S. Kondo (1981) Increment kinetics of recessive lethal mutations and dominant lethals in offspring of *Drosophila melanogaster* on storage of methyl methanesulfonate-treated sperm in females, *Mutation Res.*, **83**, 179-190.
- Ryo, H., and S. Kondo (1986) Photoreactivation rescue and hypermutability of ultraviolet-irradiated excisionless *Drosophila melanogaster* larvae, *Proc. Natl. Sci. USA.*, **83**, 3366-3370.
- 梁 治子, 野村大成 (1988) ショウジョウバエの体細胞突然変異検出系を用いたウレタンの変異生成機構, 環境変異研究, **10**, 51.
- Sankaranarayanan, K., and F. H. Sobels (1976) Radiation genetics, In: M. Ashburner and E. Novitski (Eds.), *Genetics and Biology of Drosophila*, Vol. 1c, Academic Press, London, pp. 1090-1250.
- Shukla, P. T., K. Sankaranarayanan and F. H. Sobels (1979) Is there a proportionality between the spontaneous and the X-ray-induction rate of mutations?, *Mutation Res.*, **61**, 229-248.
- Smith, P. D., C. F. Baumen and R. L. Dusenberry (1983) Mutagen sensitivity of *Drosophila melanogaster*, VI. Evidence from the excision-defective mei-9^{ATI} mutant for the timing of DNA repair activity during spermatogenesis, *Mutation Res.*, **108**, 175-184.
- Sobels, F. H. and J. J. Broerse (1970) RBE values of 15-MeV neutrons for recessive lethals and translocations in mature spermatozoa and late spermatids of *Drosophila*, *Mutation Res.*, **9**, 395-406.
- Sobels, F. H., and E. Vogel (1976) The capacity of *Drosophila* for detecting relevant genetic damage, *Mutation Res.*, **41**, 95-106.
- Szabad, J., I. Soós, G. Polgár and G. Héjja (1983) Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and the sex-linked recessive lethal tests, *Mutation Res.*, **113**, 117-133.
- Szostak, J. W., T. L. Orr-Weaver, R. J. Rothstein and F. W. Stahl (1983) The double-strand-break repair model in recombination, *Cell*, **33**, 25-35.
- Tates, A. D., I. Neuteboom, M. Hofker and L. den Engelse (1980) A micronucleus technique for detecting clastogenic effects of mutagens/carcinogens (DEN, DMN) in hepatocytes of rat liver in vivo, *Mutation Res.*, **74**, 11-20.
- Valencia, R. M., and J. I. Valencia (1961) Mutations induced in different stages of developing germ cells of *Drosophila melanogaster*, *Rad. Res.*, **14**, 513-514.
- Vogel, E. W. (1987) Evaluation of potential mammalian genotoxins using *Drosophila*: the need for a change in test strategy, *Mutagenesis*, **2**, 161-171.
- Vogel, E. W., W. G. H. Blijlevens, M. J. H. Kortselius and J. A. Zijlstra (1982) A search for some common characteristics of the effects of chemical mutagens in *Drosophila*, *Mutation Res.*, **92**, 69-87.
- Vogel, E. W., V. E. Bulyzhenko, K. Fujikawa, U. Graf, V. I. Ivanov, B. Kilbey, S. Kondo, K. Lainson, J. Magnusson, V. A. Mglinetz, I. Porsch-Hällström, C. Ramel, H. Ryo, R. Valencia and F. H. Würgler (1988) Summary report on the performance of the *Drosophila* assays, In: J. Ashby, F. J. de Serres et al (Eds.), *Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens*, vol. 2, Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 277-285.
- Vogel, E. W., and A. T. Natarajan (1979a) The relation between reaction kinetics and mutagenic action of mono-functional alkylating agents in higher eukaryotic systems, I. Recessive lethal mutations and translocations in *Drosophila*, *Mutation Res.*, **62**, 51-100.
- Vogel, E. W., and A. T. Natarajan (1979b) The relation between reaction kinetics and mutagenic action of mono-functional alkylating agents in higher eukaryotic systems, II. Total and partial sex-chromosome loss in *Drosophila*, *Mutation Res.*, **62**, 101-123.
- Vogel, E. W., and J. A. Zijlstra (1987) Somatic cell mutagenicity in *Drosophila melanogaster* in comparison with genetic damage in early germ cell stage, *Mutation Res.*, **180**, 189-200.
- Würgler, F. H. (1984) Consideration of the threshold problem based on *Drosophila* data, In: Y. Tazima, S. Kondo and Y. Kuroda (Eds.), *Problems of Threshold in Chemical Mutagenesis*, The Environmental Society of Japan, Tokyo, pp. 133-152.
- Würgler, F. H. and E. W. Vogel (1986) In vivo mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*, In: F. J. de Serres (Ed.), *Chemical Mutagens*, vol. 10, Plenum Press, New York, pp. 1-72.
- Yoo, M. A., H. Ryo and S. Kondo (1985) Differential hypersensitivity of *Drosophila melanogaster* strains with mei-9, mei-41 and mei-9 mei-41 alleles to somatic chromosome mutations after larval X-irradiation, *Mutation Res.*, **146**, 257-264.
- Yoshikawa, I., T. Ayaki and K. Ohshima (1984) Comparative studies of dose-response curves for recessive lethal mutations induced by ethylnitrosourea in spermatogonia and in spermatozoa of *Drosophila melanogaster*, *Environ. Mutagen.*, **6**, 489-496.

メダカ生殖細胞の特定座位突然変異と発生過程での淘汰

東京大学理学部 動物学教室放射線生物学講座 嶋 昭絢, 島田敦子

1. 緒 言

生殖細胞に生じた突然変異は、そのかなりのものが修復されたり生殖細胞選択にかかったりはあるものの、残りの変異は継世代的に伝わる。この点で、体細胞突然変異と大きく異なる。このような生殖細胞突然変異のうち、劣性突然変異を次世代で定量的に検出する系として特定座位法がある。この目的に用いられてきた実験動物は、もっぱらマウス、ショウジョウバエ、カイコであった。中でもマウスを使った特定座位法に関しては、Russell 夫妻、Searle, Lyon, Ehling らが長年にわたり研究結果を集積し、非照射（非処理）対照群で約 90 万の仔マウスを調べ、52 個の自然突然変異を検出している (Russell and Kelly, 1982)。

自然突然変異に加えて、環境中の種々の要因が生き物に作用し、自然に起こっている出来事の頻度を高める場合がある。変異原としての電離放射線に関して、上記の研究者達はいくつかの種類の放射線のいくつかの線量を、いろいろな線量率 (90-0.0007 R/min) で照射し、マウス特定座位法を用いて生殖細胞突然変異の線量一効果関係を精力的に調べてきた。マウスで得られたそれらの結果は、ヒトに対する放射線のリスクを推定し、評価するうえでもっとも基礎的なデータとして使われてきた。さらに、放射線以外にも種々の化学物質が生殖細胞に突然変異を起こすことも知られている。この分野の研究でも、マウス特定座位法が継世代的影響を定量的に検出するために広く利用してきた (田島, 1980)。

一方江上らは、放射線や化学物質が生殖細胞に

及ぼす影響を定量的に調べるためにあたって、日本固有の水生実験動物であるメダカを用いた。そして、メダカ胚の優性致死を指標として、環境中の変異原をスクリーニング出来る実験系を開発した (Egami et al., 1983)。私どもはこの方面的研究をさらに進めるために、メダカで特定座位法が使えるか否かの検討を 1986 年 5 月に開始した。約 37 万個のメダカ胚を使った 3 年間の研究の結果、メダカ生殖細胞での劣性突然変異を検出するのに特定座位法が使える見通しがついた。本稿ではメダカでの特定座位法の開発過程と、この方法を使って今までに得た成果の一部を紹介したい。詳細は、準備中の英文原著論文にゆずる。

2. テスターメダカの開発

特定座位法を使うに当たってまず必要なことは、目印にする遺伝子座に関して劣性同型接合である動物、すなわちテスターを開発することである。一つの個体に付ける目印の遺伝子座すなわち標識の数が多ければ多いほど、当該テスターの検出効率がよくなる。そこで相異なる単一の劣性突然変異を持つ個体を交配し、得られる雑種の中からそれぞれの親が持っている劣性突然変異を同型接合として併せ持つ個体を選択する。この様にして得られた個体に、さらに次々と別の劣性突然変異遺伝子を交配により組み入れて行き、最終的に多重劣性同型接合の個体、すなわちテスターが出来上がる。変異体の選択に当たっては、当該変異遺伝子の表現型が見分けやすいものであると共に、見間違いにくいものであることも実際に大切

〒113 東京都文京区本郷 7-3-1

Germ cell mutation and its selection during embryonic development as revealed by a specific-locus method
newly developed using the Medaka, *Oryzias latipes*
Akihiro Shima and Atsuko Shimada

Laboratory of Radiation Biology, Zoological Institute, Faculty of Science, University of Tokyo, Bunkyo-ku,
Tokyo 113, Japan

なことである。したがって、体色や形態に関する突然変異遺伝子が、標識として使われることになる。

マウスでは、Russell によってテスター系統が開発された。標識として使われた遺伝子は、合計 7 個である。*se* は、short ear 即ち耳の長さが短い（短耳）という変異形質を示す。他の 6 遺伝子は、いずれも体色に関する変異遺伝子である (*a*: 黒色, *b*: チョコレート色, *c*: チンチラ, *p*: 淡紅眼・淡色, *d*: 淡色, *s*: 白斑)。劣性変異遺伝子を交配によって次々と同型接合になるように組み入れてゆく過程では、注目する遺伝子以外の遺伝子に関してはある確率で劣性同型接合になってしまふことは避けられない。その結果、生存力や繁殖力が低下する場合が多い。これは、実験動物の近交系を開発する際のもっとも深刻な問題であろう。マウステスター系統の開発に当たって、どのような困難が生じたかを文献的に探ることは今回は出来なかつたが、次に述べる私共のメダカでの経験から、種々の問題があつたに違ひないと推測している。

さて、メダカでは現在約 70 の突然変異が知られている (Tomita, 1982)。これらのうちから、私どもは最初 5 個の突然変異を選んでみた。*Da* (しりびれ逆転) と *pl* (胸びれ欠如) の 2 つは、共にひれの形態異常にに関する突然変異遺伝子であり、*b* (黒色素形成抑制), *gu* (虹色素減少), *r* (黄色素沈着抑制) はいずれも色素細胞の突然変異遺伝子である。私どもは、これらの突然変異メダカを、名古屋大学理学部淡水魚類系統保存実験施設の富田英夫博士から分譲していただいた。記して感謝したい。

さて、2 年ほどかかって、5 個の遺伝子に関する多重劣性同型接合体メダカを得ることには成功した (Shimada et al., 1988)。しかし残念なことに、この 5 標識テスターメダカはいくつかの不都合な点があることがわかつた。すなわち、特に雌で脊柱が背腹方向に湾曲すること、生存力が弱く死にやすいこと、産卵数が少ないと等である。したがって、このテスターメダカの維持に手間がかかる、実験に必要な数の個体を簡単にそろえることが出来ず、以後の本格的な実験に使うには不

適當であろうと考えた。また、後に述べるように胚が孵化する前に突然変異形質が出現しているかどうかを観察してみると（メダカの卵膜は透明なので簡単に胚が見える）、表現型でみた突然変異が想像以上に高い頻度でおきていくことが *b* 座位での実験でわかつた (Shima and Shimada, 1988)。そこで胚発生の比較的早い段階で変異形質を発現する遺伝子座を選ぶほうが、卵生動物であるメダカの特徴を生かすことができるだろうと考えた。そして、胚が孵化したあとになって初めてその表現型が確認できる *pl*, *Da*, *r* の 3 遺伝子はメダカ特定座位法での標識としては向かないと判断した。

とりうる次の手は、標識遺伝子の組み合せを変えるか、標識数を減らすことである。結果的には、標識数を 5 個から 3 個に減らし、かつ標識遺伝子を 1 個取り替えた。すなわち、*b*, *lf*, *gu* という 3 個の遺伝子を最終的な標識とし、(*b/b lf/lf gu/gu*) なる 3 重劣性同型接合メダカを作出した (Shimada and Shima, 投稿準備中)。メダカでは、遺伝子の連鎖関係に関する知見は現在まだ蓄積されつつあるという状態だが、少なくとも *b* と *gu* と *lf* は互いに連鎖関係ないことだけは私どもの最近の研究でわかつている (Naruse et al., 1988; Naruse and Shima, 1989)。この 3 標識テスターメダカは、肉眼的に識別できる形態異常がなく、生存力も正常であり、繁殖力も特に問題はなく、テスターとして使えそうだと判断した。現在は、クローズドコロニーで繁殖させた当該テスターメダカを実験に使っている。同時に、テスターメダカの近交系を作る試みを開始した。近交系と呼べるテスターメダカを得るには、20 世代以上にわたって兄妹交配を繰り返す必要がある。仕事に取りかかって 1 年半たった現在、兄妹交配は 6 代まで進んでいる。このあたりから、兄妹交配に伴う有害な影響が始める場合が多いとの事であるが、現在のところは特に問題は無いようである。

3. 胚発生過程での変異形質の識別と総突然変異

ところで、*b*, *lf*, *gu* という 3 個の遺伝子を標識として選んだ理由として、これらは色素細胞の突然変異遺伝子であり突然変異が可視であるという

こと以外に、可視変異表現型がメダカ胚の発生過程で識別できるという点も強調しておきたい。この選択の結果、総突然変異 (total mutation) という私どもの実験系に特有な指標を提示することになった。

野生型の雄メダカをセシウム 137 のガンマ線で全身照射し、照射しないテスター雌メダカとかけあわせる。日を追って受精卵を採取し、個々の受精卵が識別出来るように、一個づつマイクロタイタープレートの穴に入れてゆく。これらのマイクロタイタープレートを 27~30°C で保温し、受精卵を実体顕微鏡で毎日観察していると、*b* に関しては受精後 1.5 日目に野生型と変異型の表現型を見分けることが出来る。受精後 3 日で、*lf* の表現型の識別ができる。更に受精後 5 日目になると、*gu* に関しても変異表現形質を確定できる。そして受精後 7 日頃になると、一部の胚が孵化はじめ、9 日頃には多くの胚が孵化してしまう。

ところが、例え *b* に関して変異表現型を示した胚の多くは、*gu* の表現型が判定できる発生段階に至ることなく、発生の途中で死んでしまうことがわかつた。また、*lf* で変異表現型が観察できた胚の多くも、あるものは *gu* 表現型を識別することなくまたあるものはそれが識別できたあと、孵化の前後で死んでしまうことにも気がついた。一方、変異表現型が発生途中で確認できた変異胚のあるものは、無事に孵化し性成熟に至り、変異表現形質の遺伝性を確認するための検定交配後も生存し続ける。これらの放射線誘発突然変異体同士を交配して、新しい突然変異をすでにいくつか得ている。

そこで、発生過程で表現形質として確認できる変異体を総突然変異 (total mutation) と呼び、これらのうちで無事に孵化して検定交配まで生存できる変異体を生存突然変異 (viable mutation) と呼ぶことにした (Shima and Shimada, 1988)。厳密にいえば、発生過程で死んでしまう “表現形質で判定した変異胚” は、その遺伝性が確認できないので “突然変異” と呼ぶには証拠不十分である。しかし、個体としては死んでしまうので、検定交配で確認の得ようがない。現在は、瀕死の状態に陥った個々の変異胚を細切して培養し、遊走して

くる体細胞をつかって染色体や適当な DNA プローブにより遺伝子型を後日確認できるよう準備を進めている。

4. 総突然変異と生存突然変異の線量-効果関係

総突然変異と生存突然変異との間に位置する現象として、胚の死がある。これを定量的に表現したのが Fig. 1 に示した優性致死 (dominant lethals) である。生殖細胞に対する変異原の影響評価の指標としてメダカの優性致死が有効であることは既に報告されている (Egami et al., 1983)。Fig. 1 は、1989 年 8 月 10 日までの 3 年数ヵ月で合計約 41 万個の胚の優性致死を精原細胞 (spermatogonia), 精細胞 (spermatids) および精子 (sperm) という雄生殖細胞の 3 つの成熟分化段階別に、詳しく調べた結果のまとめである。分裂終了細胞である精子と精細胞では、ガンマ線の線量の増加につれてより高頻度に優性致死を起こす傷が生じていることがあきらかである。この両者に比べて、精原細胞に生じた優性致死損傷の頻度と程度は、9.5 Gy までの線量では非照射対照群とほとんどかわらないこともうかがえる。これらの違いは、体細胞分裂や減数分裂をおこない成熟分化してのちはじめて受精に参画できるという精原細胞の特性で説明することが可能である。また、

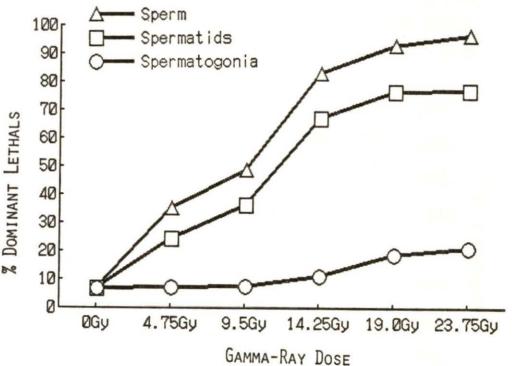


Fig. 1. ガンマ線誘発優性致死率の線量-効果関係。雄メダカに 0 から 23.75 Gy (メダカの LD_{50/50} にはほぼ相当する) までのガンマ線を急照射 (950 mGy/min) し、非照射の雌テスターと交配して得られた胚の致死率を調べた。△: 精子 (照射後 1~3 日に受精に参画した配偶子は、被曝時に精子であったとみなす), □: 精細胞 (照射後 4~9 日), ○: 精原細胞 (照射後 30 日以降)。（未発表データ）

精子のように“動くベクター”として極度に分化した細胞では、染色体DNAの損傷修復能が失われてしまっている可能性も考えられる。おそらく、複数の原因に起因するのであろう。機構の解明は、今後の課題である。

このような違いは、総突然変異頻度(total mutation frequency: TMF)と生存突然変異頻度(viable mutation frequency: VMF)に関してもあきらかにみられる。Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4は、精子、精細胞、精原細胞でのTMFとVMFの線量-効果関係(1989年8月10日までのデータ)を示す。非照射対照群では、306,842座位を調べ

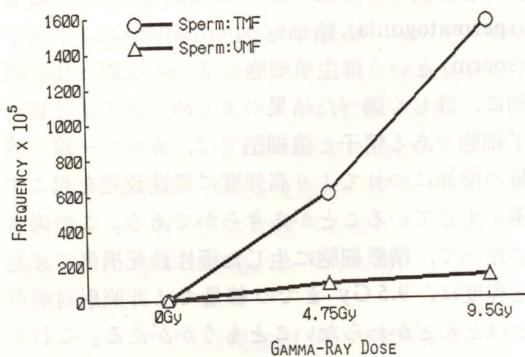


Fig. 2. 精子にガンマ線を急照射(950 mGy/min)した場合の総突然変異頻度(TMF)(○)と生存突然変異頻度(VMF)(△)の線量-効果関係。総突然変異は孵化後4日前に優性致死効果によって死亡した変異個体をも含む。生存突然変異は、総突然変異のうち孵化後4日以上生存したもの。精子における突然変異の感受性は非常に高い。(未発表データ)

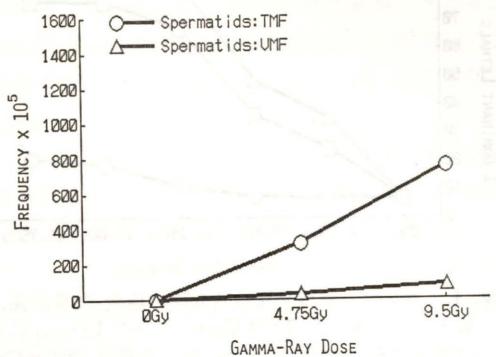


Fig. 3. 精細胞にガンマ線を急照射(950 mGy/min)した場合の総突然変異頻度(TMF)(○)と生存突然変異頻度(VMF)(△)の線量-効果関係。総突然変異も生存突然変異も精子の場合に比べると少し感受性が低い。(未発表データ)

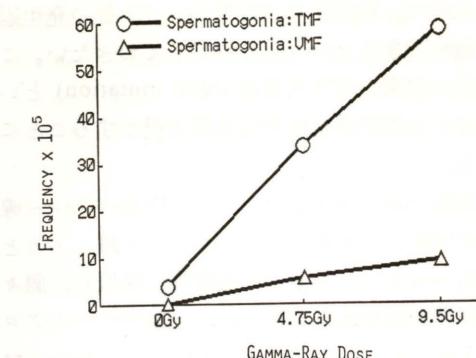


Fig. 4. 精原細胞にガンマ線を急照射(950 mGy/min)した場合の総突然変異頻度(TMF)(○)と生存突然変異頻度(VMF)(△)の線量-効果関係。精子や精細胞の場合と同様に、総突然変異は生存突然変異に比べてやはり高率に出現する。縦軸の最大目盛りは、精子(Fig. 2)や精細胞(Fig. 3)の場合の約1/30である。(未発表データ)

12個の自然突然変異を検出したが、これらの変異胚はすべて発生途中で死亡した。したがって、TMFは $12/306,842 = 3.91 \times 10^{-5}$ であり、VMFは $0/290,021 = 0$ である。

精子(Fig. 2)と精細胞(Fig. 3)のTMFとVMFを示した図の縦軸の目盛りは1,600であるのに対して、精原細胞(Fig. 4)のそれは60である。このことから、精子と精細胞での特定座位突然変異の頻度(とくにTMF)は、精原細胞での値のおよそ10(精細胞)~30(精子)倍高いとの見当がつく。

生殖細胞としての成熟分化段階によるTMFやVMFの大きな違いに比べて、精子、精細胞、精原細胞それぞれのVMF/TMFの比すなわち総突然変異頻度に対する生存突然変異頻度の割合は、驚くほど近い。例えば9.5 Gy照射群の精子では $VMF/TMF = 0.082$ 、精細胞では0.113、精原細胞では0.159というものが、現在のデータから計算した結果である。細かくみるとここでもまた、精原細胞では他の2つの成熟段階とは違った傾向があるが見える。

最後に、私どもが今までに得ているデータをつかって、ガンマ線急照射に対する倍加線量(D_2)を計算してみる。自然生存突然変異頻度(spontaneous viable mutation frequency)がまだゼロなので、生存突然変異については将来の課題

としたい。総突然変異頻度では、精子で2.4 cGy、精細胞で4.9 cGy、そして精原細胞では68 cGyという値が得られる。総突然変異という指標そのものが、私どものメダカ特定座位法に固有のものなので、直接比較できる他のデータはない。しかし、精原細胞での68 cGyという値は、既に報告されている様々な D_2 値と比較して決してべらぼうな値ではない。総突然変異という指標を含めて私どものメダカ特定座位法が、変異原の遺伝リスク推定の一助となることを期待して、更に研究を発展させたい。また、総突然変異が生存突然変異に移行してゆく過程には、発生過程での遺伝情報の時間的かつ空間的な発現の調節機構が間違いない絡んでいると思われる。この問題との取り組みも、ぜひ続けたい。

謝 辞

この研究を始めるきっかけを作ってくれた江上信雄先生に感謝する。また、この研究は主として文部省科学研究費補助金(重点領域:人間-環境系)によって行ってきた。

参 考 文 献

- Egami, N., A. Shimada and A. Hama-Furukawa (1983) Dominant lethal mutation rate after γ -irradiation of the fish, *Oryzias latipes*, Mutation Res., 107, 265-277.
- Naruse, K., A. Shimada and A. Shima (1988) Gene-centromere mapping for 5 visible mutant loci in multiple recessive tester stock of the Medaka (*Oryzias latipes*), Zool. Sci., 5, 489-492.
- Naruse, K. and A. Shima (1989) Linkage relationships of gene loci in the Medaka, *Oryzias latipes* (pisces: Oryziatidae), determined by backcrosses and gynogenesis, Biochem. Genetics, 27, 183-193.
- Russell, W. L. and E. M. Kelly (1982) Mutation frequencies in male mice and the estimation of genetic hazards of radiation in men, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 542-544.
- Shima, A. and A. Shimada (1988) Induction of mutations in males of the fish *Oryzias latipes* at a specific locus after γ -irradiation, Mutation Res., 198, 93-98.
- Shimada, A., A. Shima and N. Egami (1988) Establishment of a multiple recessive tester stock in the fish *Oryzias latipes*, Zool. Sci., 5, 897-900.
- 田島彌太郎(1980)環境変異原総論、田島彌太郎編、環境変異原実験法、講談社サイエンティフィック。
- Tomita, H. (1982) Gene analysis in the Medaka (*Oryzias latipes*), Medaka, 1, 7-9.

チャイニーズハムスターにおける染色体異常とその淘汰

愛知県心身障害者コロニー 発達障害研究所遺伝学部 孫 田 信 一

1. はじめに

染色体異常は、突然変異原を含む多くの原因で誘発される。その染色体異常には、染色体の不分離で生じる数的異常と、染色体の切断に基づく構造的異常がある。これらの異常はどのような細胞でも生じるが、その異常が細胞や個体に及ぼす影響や障害の程度は状況によって異なる。体細胞、例えば皮膚組織の細胞一個に染色体異常が生じ、その細胞が正常な機能を失ったとしても、周囲の正常細胞によってその働きは補われるのでさほど問題にはならないであろう。ところが、全く同じ染色体異常が生殖細胞で生じた場合、その細胞から形成される配偶子が受精に関与し次世代に受け継がれると、すべての細胞がその染色体異常をもつ個体が形成され、重大な障害を被ることになる。したがって、突然変異原の染色体異常による遺伝的影響を考える場合、生殖細胞への影響調査が重要となってくる。

何らかの原因で生じた染色体異常は、すべてが細胞から細胞へ、あるいは親から子へ受け継がれるのであろうか。染色体レベルの障害を受けた生殖細胞には成熟分裂がうまくいかずに停止するものがあったり、異常を持つ配偶子には受精に関与しにくいものも存在する可能性がある。また、異常を持つ胚は発生のきわめて早い段階（着床前）や、着床後の発生段階で死亡することが考えられる。さらに、染色体に特に重大な障害を受けた場合は、細胞としての生存が不可能なものがあるかもしれない。これらの可能性のうち、状況証拠からある程度推察できるものもあるが、まだ充分に分かっていないものが多い。したがって、突然変

異原の影響を検討する場合、これらの事実を明らかにして考慮に入れていく必要がある。ここでは、これらに関して実験哺乳動物であるチャイニーズハムスターの調査から明らかになってきたことを紹介する。

2. 染色体異常配偶子の作製

マウス、ラット、チャイニーズハムスターなどの実験哺乳動物では、生殖細胞や受精卵の段階における自然発生の染色体異常はヒトで推測されている頻度 (Bond and Chandley, 1983) に比べてかなり低い (Ford, 1971; Hansmann and Probeck, 1979)。したがって、自然発生の染色体異常の追跡によって異常精子の受精への関与などの問題を調査することはかなり困難である。そこで、これらの研究に不可欠な点は、特定の染色体異常を持つ配偶子や胚を効率よく作製することである。その一つに転座ヘテロ接合体を用いる方法がある。

(1) 相互転座を用いる方法

相互転座ヘテロ接合体では、その第一成熟分裂において転座染色体（2個）と転座に関わる正常染色体（2個）との間で四価染色体を形成する。この四価染色体からは、模式図 (Fig. 1) に示すように各種の分離様式（交互分離、隣接1型分離、隣接2型分離、3対1分離）によっておもに14とおりの染色体構成の細胞が形成される。このうち、交互分離由来の、正常と均衡型転座の組合せ以外はすべて不均衡な染色体構成となる。それぞれの分離頻度は第二成熟分裂中期細胞の染色体観察によって求められる。

〒480-03 春日井市神屋町 713-8

Selective elimination of chromosomal imbalance in the Chinese hamster
Shin-ichi Sonta

Department of Genetics, Institute for Developmental Research, Aichi Prefectural Colony for the Mentally and Physically Handicapped, Kamiyacho, Kasugai 480-03, Japan

各種の相互転座を持つ系統は、以前からマウスで開発されてきた (Searle, 1981)。しかし、マウスでは染色体の特異性（すべての染色体が端部動原体型であること）のために、長腕間の転座染色体は正常染色体で最大のもの (No. 1) より極端に大きいか、または最小のもの (No. 19) よりさらに小さいものでなければ識別ができない。現在、維持されている転座系統は、いずれも極端に大きいかまたは小さいなどの特徴ある転座染色体を有するものである。しかし、このような転座系統で

も、転座に関わっている正常染色体を他の染色体と通常の染色法では区別できないので、染色体分離比は正確には分からことが多い。

これに対して、チャイニーズハムスターでも相互転座を持つ系統が開発された (Sonta and Oishi, 1982; Sonta *et al.*, 1987) (Table 1)。チャイニーズハムスター染色体は、大きさと形態的特徴によって 4 群と性染色体に分類することができる (Fig. 2)。それらは、A 群 (Nos. 1 と 2; 大形

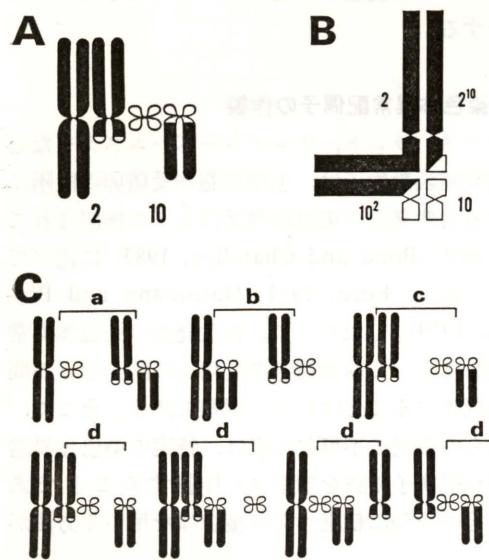


Fig. 1. 相互転座における分離様式模式図。A: 相互転座ヘテロ接合体の部分核型の例。B: 第一成熟分裂における四価染色体。C: 分離様式。a. 交互分離, b. 隣接 1 型分離, c. 隣接 2 型分離, d. 3 対 1 分離。

Table 1. X線照射誘発により作製した相互転座を有するチャイニーズハムスターの系統の例

系統名	切 断 点	ヘテロ接合体の妊娠率 (♀/♂)
T(2; 3)1Idr	t(2; 3) (q24;p13)	+ / +
T(4; 5)2Idr	t(4; 5) (q12;q13)	+ / +
T(2;10)3Idr	t(2;10) (q18;q11)	+ / +
T(1; 4)4Idr	t(1; 4) (q35;p26)	+ / +
T(2; 8)5Idr	t(2; 8) (q24;q17)	+ / +
T(1; 3)7Idr	t(1; 3) (q15;q31)	+ / +
T(1; 3)8Idr	t(1; 3) (p13;p23)	+ / +
T(1; 2)9Idr	t(1; 2) (p210;p23)	+ / +
T(X; 1)11Idr	t(X; 1) (q21;p11)	+ / -
T(1; 2)12Idr	t(1; 2) (q38;p27)	+ / +
T(2; 4)13Idr	t(2; 4) (q33;q28)	+ / +
T(7; 9)16Idr	t(7; 9) (q22;q23)	+ / +
T(1; 5)17Idr	t(1; 5) (q17;q33)	+ / +
T(2; 5)18Idr	t(2; 5) (p13;q33)	+ / +
T(4; 8)19Idr	t(4; 8) (p23;p19)	+ / +
T(2; 3)20Idr	t(2; 3) (q17;q13)	+ / +
T(1; 6)22Idr	t(1; 6) (q22;q29)	+ / +
T(2; 4)24Idr	t(2; 4) (p23;q28)	+ / +
T(3; 9)26Idr	t(3; 9) (p13;p13)	+ / +
T(1; 3)29Idr	t(1; 3) (q17;q31)	+ / +
T(4; 5)31Idr	t(4; 5) (p12;p13)	+ / +

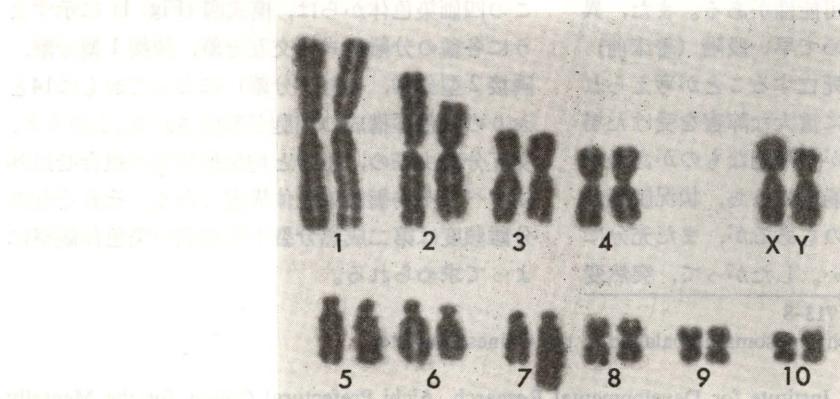


Fig. 2. チャイニーズハムスターの核型例。これは No. 2 と No. 7 の相互転座を持っている。

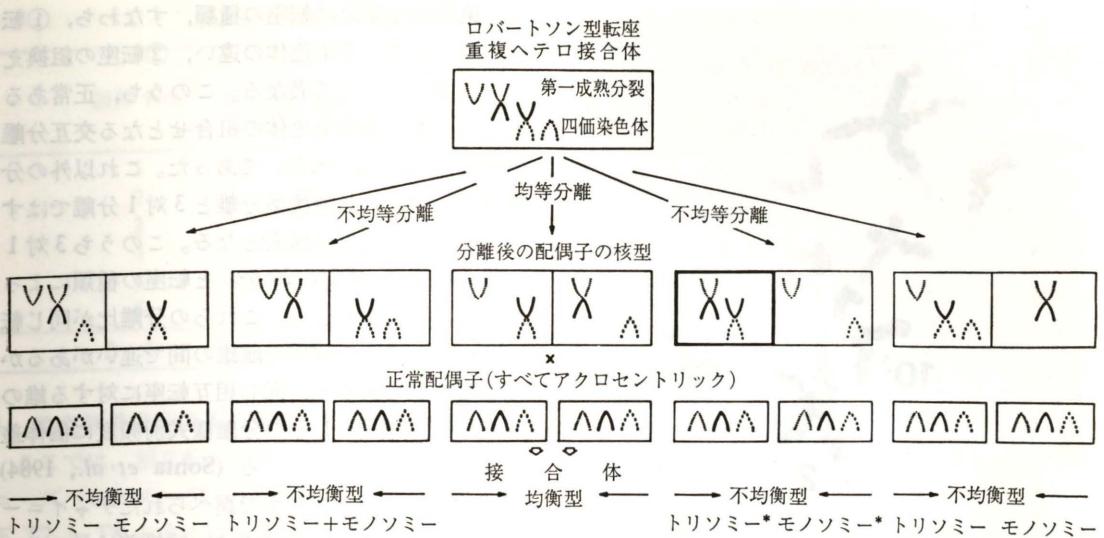


Fig. 3. ロバートソン型転座重複ヘテロ接合体マウスにおける染色体分離と、正常マウスとの交配で得られる異数体の核型模式図 [Gropp *et al.* (1975) より引用]。

の中部・次中部動原体型染色体。No. 1 と No. 2 染色体は大きさと腕比によって区別できる。), B 群 (Nos. 3 と 4: 中形の中部・次中部動原体型染色体。大きさと腕比から No. 3 と No. 4 は区別可能。), C 群 (Nos. 5-7: 中形の端部動原体型染色体。), D 群 (Nos. 8-10: 小形の中部動原体型染色体。きれいな標本ではそれぞれを区別できる。), および性染色体 (X 染色体: 中形の次中部動原体型染色体で、長腕に二次狭帯を持つ。Y 染色体: 中形の次中部染色体であるが、動原体の位置は X や B 群染色体よりも端部にあるので特徴的。)である。性染色体はいずれも第二成熟分裂中期像では他の染色体と異なる凝集性、染色性を示すので容易に判別可能である。これらの特徴によって、転座に関与する正常染色体を他の染色体と識別できるし、完全に識別できない場合でもグループ分けが可能である。これによって各分離様式による染色体構成をそれぞれ区別することができる。

(2) ロバートソン型転座重複ヘテロ接合体を用いる方法

前にも述べたように、マウス染色体はすべて端部動原体型であるため、通常染色では個々の染色体を区別することは困難であるが、ロバートソン型転座によって生じた中部または次中部動原体型染色体の検出にはかえって好都合である。ロバ

ートソン型転座を 1 個だけ持つヘテロ接合体では、その転座に関わる染色体が過剰な状態または欠失した染色体構成の配偶子を得ることができるが、転座に関わる 2 つの染色体のどちらの異常かを区別することは難しい。そこで、ロバートソン型転座の重複ヘテロ接合体（同じ番号の染色体がそれぞれに 1 個ずつ関与している 2 個のロバートソン型転座染色体を持つもので、double heterozygotes という）を用いて、全体の染色体腕の数とロバートソン型転座染色体の数によっていくつかの染色体構成が判別できるという方法が考案された (Gropp *et al.*, 1975) (Fig. 3)。

以上のように、相互転座またはロバートソン型転座ヘテロ接合体は、特定の染色体構成の配偶子や胚を効率よく作製する手段として各種の研究に用いられている。

3. 転座ヘテロ接合体における染色体分離

転座に関与する正常染色体を区別可能な核型を示す動物では、相互転座ヘテロ接合体の第一成熟分裂における多価染色体からの分離様式別頻度を、次の第二成熟分裂中期細胞の染色体分析によって調べることができる (Fig. 4)。それぞれ異なる相互転座を持つ 10 種のチャイニーズハムスターのヘテロ接合雄を用いて分離比を比較してみる。

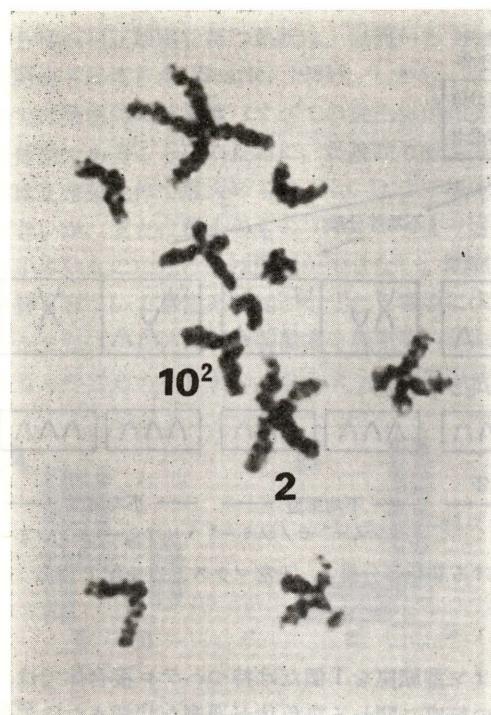


Fig. 4. T(2;10)3Idr 相互転座ヘテロ接合の雄における第二成熟分裂細胞の染色体。11 (2, 10²) の染色体構成であることから、隣接 1 型分離由来であることが分かる。

Table 2. T(2;10)3Idr 転座ヘテロ接合体における MII 細胞の分析結果と各分離様式の頻度 (雌雄の比較)

染色体数	核型	細胞数	
		雌 (%) ^{a)}	雄 (%) ^{a)}
10	(2, 0), (2 ¹⁰ , 0), (0, 10), (0, 10 ²), (2 ¹⁰ , 0) others	25	37
11	(2, 10) (2 ¹⁰ , 10 ²) (2 ¹⁰ , 10 ²), (2 ¹⁰ , 10 ²) (2, 10 ²) (2 ¹⁰ , 10) (2 ¹⁰ , 10), (2, 10 ²) (2, 2 ¹⁰) (10, 10 ²) others	102 90 11 66 72 8 29 34 3	205 209 42 141 143 36 74 75 2
12	(2, 2 ¹⁰ , 10), (2, 2 ¹⁰ , 10 ²) (2, 10, 10 ²), (2 ¹⁰ , 10, 10 ²) (2 ¹⁰ , 2 ¹⁰ , 10) others	13 (5.9) ^{b)}	30 (6.1) ^{b)}
		473	1,016

^{a)} それぞれ交互通離、隣接 1 型分離、隣接 2 型分離、3 対 1 分離を示す。

^{b)} 3 対 1 分離は高倍性細胞数の 2 倍として求めた。

Table 3. T(2;10)3Idr 相互転座ヘテロ雄における染色体分離様式別頻度

個体 No.	分析した MII 紹介	各染色体構成の細胞数 (%)		
		交互通離+隣接 1 型分離由来	隣接 2 型分離由来	3 対 1 分離由来
1	205	159 (76.6)	34 (17.1)	12 (5.9)
2	253	198 (78.3)	39 (15.4)	16 (6.3)
3	260	206 (79.2)	36 (13.8)	18 (6.9)
4	445	347 (78.0)	66 (14.8)	32 (7.2)
5	250	198 (79.2)	36 (18.2)	16 (6.4)
6	302	240 (79.5)	46 (15.2)	16 (5.3)
合計	1715	1348 (78.6)	257 (15.0)	110 (6.4)

4. 染色体異常配偶子の受精への関与

ここでは、相互転座を保有する 2 系統のチャイニーズハムスター [T(1;3)7Idr と T(1;3)8Idr (以下 T7 と T8 とする)] を用いて、精母細胞あるいは卵母細胞と受精卵の直接的な細胞遺伝学的調査を行い、その比較によって特定の染色体異常を持つ配偶子の受精への関与について調べた結果を紹介する。用いた T7 と T8 転座は、ともに No. 1 と No. 3 の不均等な相互転座で、その切断点はそれぞれ 1q15 と 3q31 (T7) と 1p13 と 3p23 (T8) である (Fig. 5)。この転座から派生する転座染色体 (1³ と 3¹) はいずれも他の正常染色体と形態的に明瞭に区別できる。まず、核学的に正常な (+/+) 雄、T7 転座および T8 転座ヘテロ接合 (T7/+、T8/+) の雄を使用し、第二成熟分裂細胞の観察を行った。これらの雄では標本作成の 4 時間前にコルセミド (2 mg/kg bw) を投与、精巣摘出後ハ

ンクス液の中で精細管をしごいて細胞を取り出す。細胞は 0.075 M KCl で 12 分間処理後、3:1 メタノール:氷酢酸液で固定し、空気乾燥して標本を作製する (孫田, 1989)。また、+/+ 雄、T7/+ 雄および T8/+ 雄を用いて、第二成熟分裂卵母細胞の観察も行った。これらの雌ではスメアによつて発情期を確認し、自然排卵後の未受精卵を卵管膨大部から採取する。

一方、1 細胞胚の染色体分析は核学的に正常な (+/+) 雌を複数の転座ヘテロ (T/+) 雄のケージに、また転座ヘテロ雌を複数の正常雄のケージに一晩入れて交配する。これらの雌はあらかじめ腔スメアにより発情前期であることを確認したものである。交尾は plug があるいは腔スメアの精子の存在により確認する。翌朝 (8:30~9:30)、交尾を確認した雌の卵管を貫流して胚を採取する。卵母細胞および発生初期胚の染色体標本作製法は

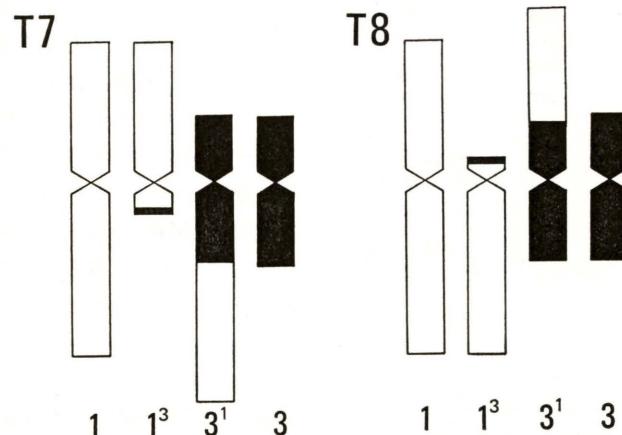


Fig. 5. T(1;3)7Idr および T(1;3)8Idr 相互転座の部分核型模式図。切断点はそれぞれ t(1;3)(q15;q31) と t(1;3)(p13;p23) を示す。

Kamiguchi ら (1976) の方法に準じた。さらに、1 細胞胚を得たときと同じ $+/+ \text{♀} \times T7/+ \text{♂}$ および $T/+ \text{♀} \times +/+ \text{♂}$ の交配から生まれた個体について、litter size, sex, 染色体などを調査した。

$+/+$ 正常雄, $T7/+$ および $T8/+$ 転座ヘテロ雄でそれぞれ第一成熟分裂細胞を観察したところ、 $+/+$ 雄ではすべての MI 細胞は 11 bivalents で構成されていた。一方、 $T7/+$ 雄と $T8/+$ 雄ではいずれも 9 個の bivalents と 1 つの quadivalent から構成されていた。また、 $+/+$, $T7/+$ および $T8/+$ 雄で第二成熟分裂細胞を観察したところ、diploid を除く MII 細胞の染色体数は 6 から 12 であったが、染色体数 9 以下の細胞は broken とみなした。 $T7/+$ 雄で分析した染色体数 10 から 12 までの細胞の観察結果を Table 4 に示した。これから、各分離様式の割合が求められる。

次に、受精卵の第一体細胞分裂の調査結果では、 $+/+ \text{♀} \times +/+ \text{♂}$ の対照の交配から得られる胚の核型分析率は 88.4% であった。これに対して、

Table 4. $T(1;3)7Idr$ 相互転座ヘテロ雄における第二成熟分裂細胞の染色体構成と得られた分離様式別頻度

染色体数	核型	観察した MII 細胞数	分離様式 ^{a)} (%)
10	(1, 0), (1 ⁸ , 0) (0, 3), (0, 3 ¹) (0, 3 ²)	298	
11	(1, 3) (1 ⁸ , 3 ¹) (1 ⁸ , 3) (1, 3 ¹) (1', 3), (1', 3 ¹) (1, 3 ²), (1 ⁸ , 3 ¹) (1, 1 ⁸) (3, 3 ¹)	971 954 657 628 77 788 486 464	交差分離 (43.6) 隣接 1 型分離 (29.2) 隣接 2 型分離 (17.0)
12	(1, 1 ⁸ , 3) (1, 1 ⁸ , 3 ¹) (1, 3, 3 ¹) (1 ⁸ , 3, 3 ¹) その他	81 97 45 42 20	3 対 1 分離 (10.2)
合計		5608	(100.0)

^{a)} cross-over の結果生じる、染色分体が不等長な染色体 (1' または 3') を持つ細胞は、それを含まない細胞を基準に分配して頻度を求めた。また、3 対 1 分離は高倍性細胞の 2 倍として算出した。

Table 5. $+/+ \text{♀} \times T7/+ \text{♂}$ の交配から得た 1 細胞胚の染色体構成

核型	観察数 (期待値) ^{a)}
22(1, 1, 3, 3)	191 (194.0)
22(1, 1 ⁸ , 3, 3 ¹)	197 (194.0)
22(1, 1, 3, 3 ¹)	132 (129.9)
22(1, 1 ⁸ , 3, 3)	109 (129.9)
22(1, 1, 1 ⁸ , 3)	15 (75.7) ^{b)}
22(1, 3, 3, 3 ¹)	57 (75.7)
23(1, 1, 1 ⁸ , 3, 3)	15 (13.4)
23(1, 1, 1 ⁸ , 3, 3 ¹)	17 (16.9)
23(1, 1, 3, 3, 3 ¹)	6 (8.0)
23(1 ⁸ , 3, 3, 3 ¹)	9 (7.1)
その他	17 (35.4) ^{b)}
合計	775 (875.6)

^{a)} 期待値は転座ヘテロ雄の MII 分析結果から求めた。

^{b)} 観察数は期待値と有意な差がある。

$T7/+ \text{♀} \times +/+ \text{♂}$, $+/+ \text{♀} \times T7/+ \text{♂}$, $T8/+ \text{♀} \times +/+ \text{♂}$ および $+/+ \text{♀} \times T8/+ \text{♂}$ の交配で採取した胚の染色体分析率はそれぞれ 86.3%, 88.9%, 84.2% および 87.4% であり、これらは対照と比べ特に差はない。

$T7/+$ 転座ヘテロ動物の交配から得られる胚の染色体分析の例を Table 5 に示した。これには染色体 20 以下の細胞、および転座に無関係な染色体を余分にもつ細胞 (ランダムな染色体不分離による細胞)、および三倍体細胞は除外した。MII 分析から予想される核型の頻度と実際の観察結果を比較してみると、 $+/+ \text{♀} \times T7/+ \text{♂}$ では、予想される核型のうちで実際に観察した胚に期待値に比べかなり低い頻度でしか存在しないものがあった。それらの核型の共通点は No. 1 染色体の部分モノソミーである。また、No. 3 の (ほぼ全体の) モノソミーを示す胚は、期待値に比べ僅かに減少する傾向が見られた。一方、 $T7/+ \text{♀} \times +/+ \text{♂}$ の交配では MII 分析から予想される核型のほとんどすべてが実際に得られた胚に見られることと、それらの核型の胚は期待値とほぼ同じ割合で含まれることがわかった。また、 $T8/+$ 転座ヘテロ接合体の交配から得られた胚の染色体分析結果によると、 $T7/+$ 転座ヘテロ接合体の交配実験と同様に、 $T8/+$ 雄の戻し交配 ($+/+ \text{♀} \times T8/+ \text{♂}$) では予想される核型のうち期待値に比べて有意に

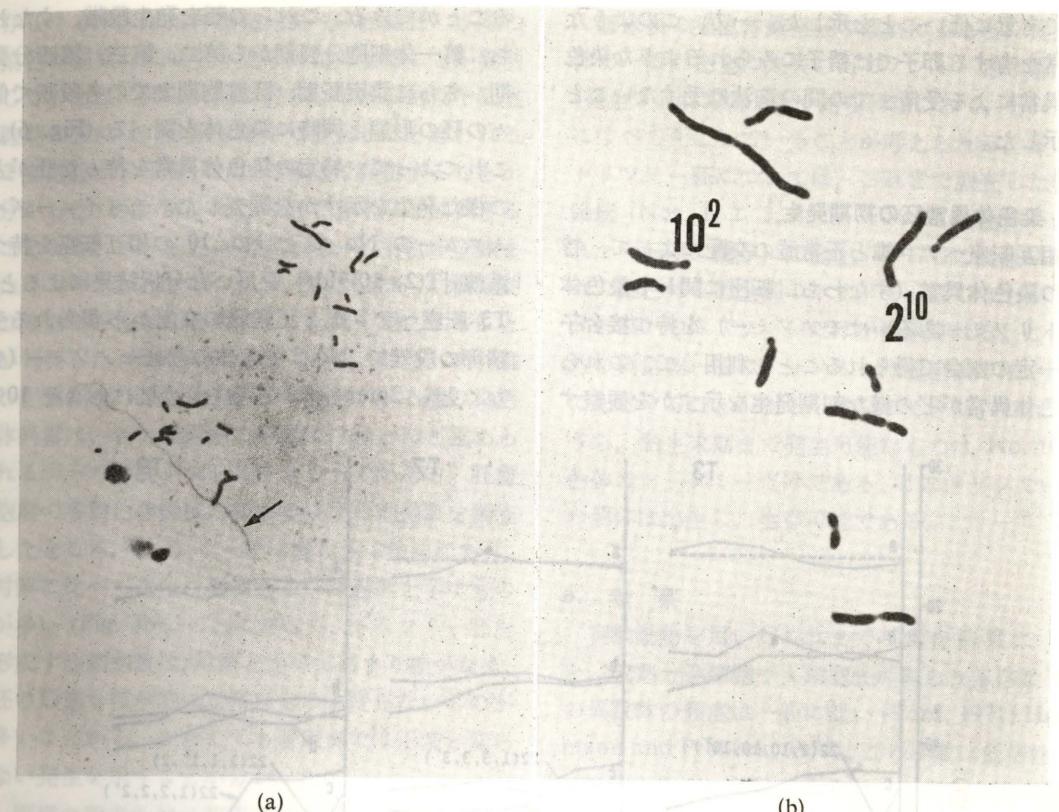


Fig. 6. $+/+ \text{♀} \times T3/+ \text{♂}$ (正常雌と転座ヘテロ雄の交配) から得られた受精卵の染色体標本例。a. 雌雄前核が分離した状態の受精卵の染色体標本が得られている。矢印は、受精に関与した精子の尾部。b. a の雄性前核の拡大図。 $(2^{10}, 10^2)$ の組合せであることから、卵の染色体構成は均衡型転座と分かる。

低い核型があった。これらの核型の共通点も No. 1 染色体の (部分) 欠失である。他の染色体構成の胚の観察された頻度は期待値とほぼ等しい値であった。これに対して、 $T8/+ \text{♀}$ の戻し交配から得られる胚の染色体構成は、 $T8/+ \text{♀}$ の MII カウントから予想されるすべての核型がみられ、その頻度はそれぞれの期待頻度と差がない。

正常および転座ヘテロ接合体の排卵数と出産仔数を比較してみた。それによると $T7/+$ および $T8/+$ 転座ヘテロ接合体が雄の交配の方が転座雌の場合よりも litter size は有意に大きいことが分かった。

$T7$ と $T8$ 転座を用いた以上の実験結果は、No. 1 染色体全部または少なくとも No. 1 の長腕を含む部分ナリソミーの精子は、僅かしか受精に関与しないこと、また No. 3 の (ほぼ全体の) モノソミーを示す精子が受精に関与する割合は期待値に比

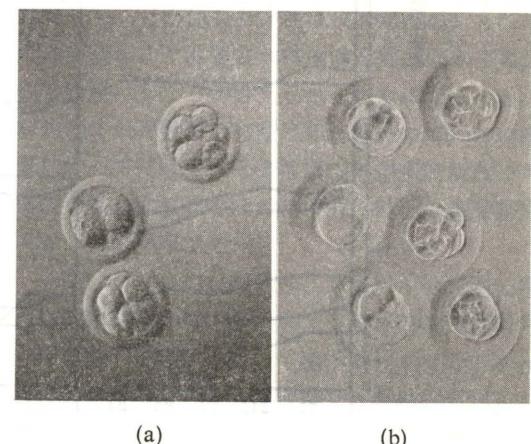


Fig. 7. $+/+ \text{♀} \times T3/+ \text{♂}$ の交配から得られた胚。a. 8 級胞期の段階で採取した同腹の胚。分割停止した 2 級胞胚が見られる。b. 同胚盤胞期。正常発生の胚のほかに、異常な形態を示すものが含まれる。これらの胚は、染色体異常を示す。

べて有意に低いことを示した。一方、このような異常を有する卵子では精子にみられるような染色体異常による受精までの間の淘汰は受けないことを示した。

5. 染色体異常胚の初期発生

相互転座ヘテロ雄と正常雌の交配によって、特定の染色体異常（すなわち、転座に関わる染色体のトリソミーあるいはモノソミー）を持つ接合子が一定の割合で得られることを利用して、これら染色体異常がどの様な初期発生を示すかを観察す

ることができる。これらの胚を発生段階、すなわち、第一体細胞分裂期から第二、第三、第四分裂期、さらに桑実胚期、胚盤胞期までの各段階で個々の胚の形態と同時に染色体を調べる (Fig. 6)。これによって、特定の染色体異常を持った胚がどの様な発生を示すかを調査した。チャイニーズハムスターの No. 2 と No. 10 の相互転座を持つ系統 [T(2; 10)3Idr] を用いた分析結果によると、T3 転座ヘテロ雄と正常雌の交配から得られる受精卵の段階で、No. 2 染色体の部分モノソミー（少なくとも 2pter→q23 を含む）の胚はおよそ 10%

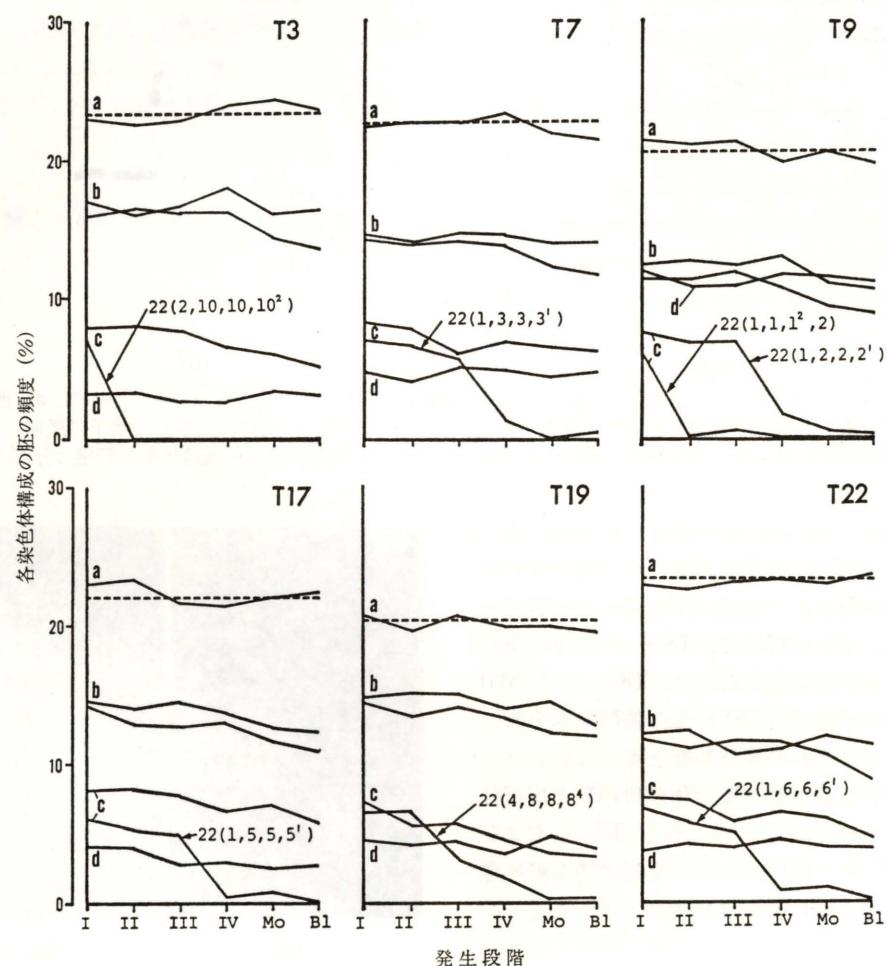


Fig. 8. 相互転座ヘテロ接合体と正常個体との交配から得られる胚のそれぞれの発生段階で見られる各染色体構成比。正常核型の胚は初期発生の段階で淘汰を受けないと仮定して各グループの頻度を補正して示している。図の a~d は、転座ヘテロ接合体の各分離様式で得られる染色体構成別に分けている。a: 交互分離由来、b: 隣接 1 型分離由来、c: 隣接 2 型分離由来、d: 3 対 1 分離由来のうち高倍性のもの。また、発生段階は、I: 1 細胞期、II: 2 細胞期、III: 4 細胞期、IV: 8 細胞期、Mo: 桑実胚期、および Bl: 胚盤胞期をそれぞれ示している。

存在するが、第二体細胞分裂（2 細胞胚）以降の染色体観察時には全く見られなくなることが判明した。また、同じ交配で得られる 8 細胞期や胚盤胞期の胚には、分割を途中で停止したと思われる 2 細胞胚がおよそ 10% の頻度で存在することが分かった (Fig. 7a)。同じ頻度で着床率も減少することから、この染色体異常 (No. 2 染色体全体または No. 2 部分モノソミー) の胚は、2 細胞期で分割を停止し、着床することなく死滅することが判明した (Sonta et al., 1984)。転座ヘテロ雄の生殖細胞の染色体分析から予想される他の染色体異常は、各分割段階の観察ではほとんど認められるがその頻度が少し減少するものがある。胚盤胞期で各染色体構成の胚を形成する細胞数を調査したところ、モノソミー胚は概ね減少傾向にあり、対照に比べて発生の異常あるいは遅延を示すものが多い (Fig. 7b)。これに対して、トリソミー胚を形成する細胞数は、対照と比べてあまり差がない、胚の形態も核学的に正常なものと変わらないものが多いことから、少なくとも着床までは正常と変わらない発生を示すことが分かった。

同様の調査を他の転座系統を用いて実施した。すなわち、転座ヘテロ雄と正常核型の雌との交配から得られる胚について、1 細胞胚の第一体細胞分裂から 2 細胞期、4 細胞期、8 細胞期、桑実胚期、胚盤胞期の各段階で胚の形態的観察と染色体調査を行った。その結果は Fig. 8 に示した。これからも明らかな様に、染色体異常の胚のうち、モノソミー胚の多くは着床前に分割を停止し、死滅していることが確認された。染色体 2 モノソミーの 2 細胞期での淘汰のほかにこれまで明らかになったことは、1 モノソミー胚は 4 細胞期前後で、また染色体 4 と 6 モノソミー胚が 8 細胞期前後でそれぞれ分割を停止し、死滅していることが明らかになっている。

一方、トリソミー胚には、胚盤胞期の段階の観察では核学的に正常な胚と変わらない発生を示すもののかなに、発生の遅延や形態的異常を示すものが見られる。しかし、これらの転座系統の着床率から換算してみると、形態的異常を示すこれらの胚でもそのほとんどは着床することが推測される。

着床後の染色体異常胚の観察によると、常染色体の一個が完全に欠失したモノソミー胚は着床後（発生 9 日目以降）全く見られないで、それ以前にすべて死滅していることが考えられる。また、トリソミー胚については、これまで調査した転座系統 (Nos. 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10 染色体がいずれかの転座に関与) の発生 12 日目の調査結果では、染色体 1 個全部のトリソミー胚のうち染色体 8 と 10 のトリソミーだけが観察される。これ以外の染色体 1 個のトリソミーは着床後の早い段階で死滅することが明らかになってきた。これらのうち、胎生末期まで発生可能なものは No. 10 染色体のトリソミーだけである。このトリソミー 10 の個体は出生し、生存可能である。

6. 考 察

実験動物を用いたこれまでの調査結果によると、成熟分裂細胞や 1 細胞胚にみられる自然発生の異数体の頻度は一般に低い (Ford, 1971; Hansmann and Probeck, 1979)。この半数は低倍性（モノソミーなど）細胞であるが、これらと標本作製過程で出現した低倍性とは区別できない。とくに、Tarkowski (1966) による従来の染色体標本作製方法は、胚の低張処理後、固定液との急激な混合によって細胞膜がこわれやすく、低倍性の標本が多くなった。その後この方法は Kamiguchi らの漸進固定法により改善され技術的な要因による異数体の出現はかなり押さえられるようになったが、自然発生の異数体の頻度は相当低いので、この観察によってだけでは低倍性精子の選択的淘汰の可能性を検討することはできない。他種の実験動物においても同様である。

一方、マウスの相互転座、ロバートソン型転座の実験系を用いて、ナリソミーなどの染色体異常を示す精子の淘汰について調べられてきた。これらの構造異常のヘテロ接合体では比較的高頻度で染色体不均衡の配偶子が形成される。転座マウスを用いた実験では、MII の分析から求めた期待値と、着床数および着床後の生存胎仔の染色体分析結果との間接的な比較に基づくもので、直接的な受精卵での解析はないが、それによると、いわゆる sperm selection に関しては否定的である。

(Ford and Evans, 1973; Epstein and Travis, 1979)。これに対して、今回のチャイニーズハムスターの実験では、染色体異常精子の受精への関与が示された。このこととマウスの結果の違いから、次のことが考えられる。①マウスとハムスターの染色体 1 個当たりの全ゲノムに対する割合が異なる。②マウスでもすべての染色体について調べられていないので、残る染色体の異常が精子の選択淘汰に関与するかもしれないという可能性が考えられる。マウスにおいても直接的な受精卵での分析が望まれる。また、チャイニーズハムスターにおいてすべての染色体の異常について調べられれば、異常精子の選択淘汰が No. 1 と 3 だけが特異的に関与するのか、それとも他の染色体異常も広く関わるかを明らかにすることができよう。

染色体異常胚の初期発生に関してもマウスで一部調べられている。直接的なマウス胚の染色体調査ではマウス染色体 2, 5, 17 のモノソミーはいずれも桑実胚期頃に分割を停止することが分かっている (Baranov, 1983)。このほかに、着床率の計算から着床前の死亡を推定した報告によると、他のいくつかの染色体のモノソミーも着床前に死亡するものが存在することが示唆されているが、発生初期胚の染色体を直接調査したもの以外は、いくつかの疑問点が残されている。

さて、異種間の染色体を比較してみると、遺伝子マッピングやバンドパターンに相同意があることが分かってきたが、マウスとチャイニーズハムスターを比較してみると、マウスの 2 染色体はチャイニーズハムスターの 6 染色体の一部に相当し、マウスの 5 と 17 染色体はチャイニーズハムスターの 1 染色体の一部にそれぞれ相同であることが判明している (Lalley and McKusick, 1985)。これらの染色体のモノソミーを比較してみると、マウスの 2, 5, 17 モノソミーは桑実胚期前後に死亡するが、それに対応するチャイニーズハムスターの 1 と 6 モノソミーはそれぞれ 4 と 8 細胞期前後でそれぞれ発生を停止する。このように相同する染色体のモノソミーが同じ様な初期発生の影響を受けていることから、これらの相同的な染色体上に初期発生に関して重要な遺伝子が共通して存在

している可能性が示唆される。

一方、トリソミー胚について比較してみると、そのほとんどは少なくとも着床まで発生が進行するのはマウスとチャイニーズハムスターで共通している (Epstein, 1986; Sonta et al., 1984; Sonta 未発表)。ところが、着床以降の発生についてはかなり異なっている。トリソミーマウスの発生については、Gropp らを中心とする一連の研究で詳しく調べられている (Epstein, 1986)。それによると、大きく 3 群に分けられ、トリソミー 2~5, 8, 9, 11, 15, 17 は着床後かなり早い段階で死亡し、トリソミー 1, 6, 7, 10, 12 は胎生 15 日前後まで発生が進行し、トリソミー 13, 14, 16, 18, 19 は胎生末期まで生存する。このうち出生後の生存が可能なのはトリソミー 19 だけである。これとチャイニーズハムスターのトリソミーを比較してみると対象的である。これまで調べられたトリソミーについて見ると、着床後で染色体の調査が可能な最も早い段階（胎生 9 日頃）では、トリソミー 8 と 10 を除いて染色体一個全体のトリソミーは既に見られずそれ以前の死亡が推測される。チャイニーズハムスターとマウスのこれらの違いは、種によって発生に何らかの違いがあるためか、あるいはチャイニーズハムスターとマウス染色体当たりの全ゲノムに対する比率が異なる（すなわち、遺伝子の数が多い）ためと考えられる。これについては、チャイニーズハムスターの各種の転座系統を用いて、部分トリソミー個体の発生について詳細な調査が進めば明らかになるかもしれない。

7. おわりに

染色体異常は各種の突然変異原が DNA に及ぼす影響のうち、染色体レベルで可視的に観察できるもので、さらに変異原の影響を染色体異常の数量として現わすことも可能であり、その利用価値は極めて広い。一方、染色体異常はあらゆる細胞で起こり得るが、その障害による影響は、障害の程度のほかに、その状況、すなわち組織、細胞の種類（生殖系列か否かも含めて）、細胞周期、発生段階などによって異なる。そのうち、染色体異常の遺伝的障害を考える場合、生殖細胞に生じた

異常は、配偶子形成や受精に影響を与える、その異常を受継いだ接合子には発生初期で淘汰を受けるものが存在する。すなわち、染色体異常の遺伝的障害を考える場合、これらの点を十分考慮し、どの段階における染色体異常なのかを認識することが必要であろう。

最後に、今回の発表の機会をお与え頂いた環境変異原学会長松島泰次郎先生と、祖父尼俊雄先生ほか幹事の諸先生に深謝致します。

参考文献

- Bond, D. J. and A. C. Chandley (1983) *Aneuploidy*, Oxford University Press, Oxford.
- Epstein, C. J. (1986) *The Consequences of Chromosome Imbalance, Principles, Mechanism, and Models*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Epstein, C. J. and B. Travis (1979) Preimplantation lethality of monosomy for mouse chromosome 19. *Nature*, Lond., **280**, 144-145.
- Ford, C. E. (1971) Genome unbalance and reproductive wastage in man and mammals, *Nord Med.*, **86**, 1545-1548.
- Ford, C. E. and E. P. Evans (1973) Non-expression of genome imbalance in haplophase and early diplophase of the mouse and incidence of karyotypic abnormality in post-implantation embryos, In: A. Boué and C. Chibault (Eds.), *Chromosomal Errors in Relation to Reproductive Failure*, I.N.S.E.R.M., Paris, pp. 271-285.
- Gropp, A., U. Kolbus and D. Giers (1975) Systematic approach to the study of trisomy in the mouse, *Cytogenet. Cell Genet.*, **14**, 42-62.
- Hansmann, I. and Probeck, H. D. (1979) Chromosomal imbalance in ovulated oocytes from Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) and Chinese hamsters (*Criscetus griseus*), *Cytogenet. Cell Genet.*, **23**, 70-76.
- Kamiguchi, Y., K. Funaki and K. Mikamo (1976) A new technique for chromosome preparation of murine oocytes, *Proc. Japan Acad.*, **52**, 316-319.
- Kaseki, H., S. Sonta and Y. Tomoda (1987) Frequency of chromosomally unbalanced gametes in male and female hamsters heterozygous for reciprocal translocation, *Acta Obst. Gynec. Jpn.*, **39**, 675-680.
- Lalley, P. A. and V. A. McKusick (1985) Report of the committee on comparative mapping, Eighth International Workshop on Human Gene Mapping, *Cytogenet. Cell Genet.*, **40**, 536-566.
- Searle, A. (1981) Chromosomal variants, In: M. C. Green (Ed.), *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart and New York, pp. 324-357.
- 孫田信一 (1989) 減数分裂の染色体標本作製法の実際, 臨床病理, 特 **80**, 288-298.
- Sonta, S., K. Fukui and H. Yamamura (1984) Selective elimination of chromosomally unbalanced zygotes at the two-cell stage in the Chinese hamster, *Cytogenet. Cell Genet.*, **38**, 5-13.
- Sonta, S., N. Narita and K. Kitayama (1987) Further Chinese hamster stocks with X-ray-induced chromosome rearrangements and their fertility, *Jpn. J. Genet.*, **62**, 341-348.
- Sonta, S. and H. Oishi (1982) Chinese hamsters with X-ray-induced reciprocal translocations: Their production and fertility, *Cong. Anom.*, **22**, 167-171.
- Tarkowski, A. K. (1966) An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs, *Cytogenetics*, **5**, 394-400.

カニクイザル生殖細胞での遺伝的障害

放射線医学総合研究所 遺伝研究部 戸張巖夫, 松田洋一, 武内豊子

1. 緒言

放射線による遺伝的障害は、突然変異と染色体異常に大別することができる。このうち生殖細胞に生ずる大部分の染色体異常、特に不安定型の構造異常は致死効果を示し、生殖細胞の形成過程において淘汰されると考えられる。しかし致死効果を示さない相称性異常、特に相互転座が生殖細胞に生ずると、接合子の早期流産、早期死産や奇形の発生の原因となることが予測される。したがって放射線被曝によって生殖細胞中に転座型染色体が誘発されると、その一部が次代に伝えられ、奇形児の発生が増加するとともに、転座ヘテロ個体(保因者)が集団中に増加することになる。このことから放射線による染色体異常のヒト集団におけるリスクを推定するためには、転座型染色体の低線量、低線量率照射による誘発率と線量との関係を実験動物の生殖細胞、特に放射線被曝の危険にさらされる機会の最も多い幹精原細胞を用いて調べることが必要である。

精原細胞に相互転座が誘発すると、減数分裂の過程、特に相同染色体の対合および分離の段階で異常が生じ、その結果不均衡な染色体組成(欠失または重複)をもつ精子が形成される。その結果、 $1/4$ は全く正常な染色体組成を、 $1/4$ は均衡型転座を、そして残りの $1/2$ は不均衡な染色体組成をもつ生殖細胞が作られる。不均衡な染色体組成をもつ生殖細胞は精子形成過程で淘汰されるものがあるが、たとえ精子にまで発生が進み正常卵子と受精しても胚発生の初期または後期に死亡するものが大部分で、実際に F_1 個体として出生してくるものはわずかである。ヒトにおける自然流産およ

び新生児の調査(Hook, 1982; Jacobs, 1981)から91%が胚発生過程で死亡し、9%が F_1 個体として産まれてくる(国連科学委員会報告, 1986)。そしておそらく産まれてくる個体は精神的あるいは形態的異常をもっていると考えられる。したがって転座染色体は、半不妊、早期死亡あるいは遺伝的欠陥(先天異常)をもたらす原因となる。

2. 実験材料および方法

相互転座の自然発生頻度を調べる目的で、国立予防衛生研究所・武藏村山分室で飼育されていた6頭のカニクイザル雄を用いた。また照射実験のために当研究所、靈長類実験棟で飼育されたカニクイザル雄を用いた。雄ザルの年齢は推定5歳以上で、全て野外(東南アジア)で捕獲されたものである。

急照射実験では、麻酔した雄ザルの左右の精巢に同時に ^{137}Cs γ 線を照射した。線量率は0.25 Gy/minであった。

緩照射実験では、雄ザルを照射ケージに入れ1日(22 h) 0.024 Gy(0.18×10^{-4} Gy/min)の線量率で γ 線全身照射を行った。線量測定のため照射前に陰のう皮下に3~5本のTLDを包埋し、照射終了後直ちに取り出して生殖腺における蓄積線量を測定した。

幹精原細胞集団の放射線による障害の回復を見るため、急照射、緩照射とともに照射前および照射後、電気刺激によって全てのサルから経時に精液を採取し精子数を調べた。

照射後の回復が充分であることが確認された後、精巢を摘出し、空気乾燥法によって精母細胞

〒260 千葉市穴川 4-9-1

Radiation-induced damage in spermatogonia of the crab-eating monkey

Izuo Tobari, Yoichi Matsuda and Toyoko Takeuchi

Division of Genetics, National Institute of Radiological Sciences, 9-1, Anagawa-4-chome, Chiba, 260, Japan

の染色体標本を作成し、C-バンド染色を行った。転座染色体をもつ精原細胞のクラスターによる実験誤差をできるだけ除くため、一つの組織片について最大 50 の分裂細胞を観察した。

3. 結 果

(1) 相互転座の自然発生頻度

6 頭の非照射雄ザルから 10 の精巢を摘出し、4700 の精母細胞を観察した結果、4 ケの相互転座が検出された。したがって自然発生頻度は 0.09% と推定された。この値はカニクイザルと同じ *Macaca* 属に属するアカゲザルでの自然発生率 (0.08%) (Van Buul, 1980, 1983) と近似している (Matsuda *et al.*, 1984)。

(2) 急照射実験 (線量率: 0.25 Gy/min)

(i) 高線量域における相互転座の線量効果関係

高線量域における相互転座の線量効果関係を得

Table 1. Frequencies of reciprocal translocations in primary spermatocytes after acute (0.25 Gy/min) γ -irradiation to stem spermatogonia

Dose (Gy)	Monkey	Testes	No. of cells observed	No. of translocations	% translocation
1	No. 18	R	500	2	0.4 2.1
		L	500	19	3.8
	No. 20	R	500	9	1.8
		L	500	11	2.2
	No. 29	R	500	6	1.2
		L	500	13	2.6
	No. 33	R	500	13	2.6
		L	500	5	1.0
	Total		3500	65	1.86 ± 0.23
	2				
2	No. 22	R	500	12	2.4 2.5
		L	500	13	2.6
	No. 28	R	500	6	1.2
		L	500	11	2.2
	No. 30	R	500	18	3.6
		L	500	14	2.8
	Total		3000	74	2.47 ± 0.29
	3				
3	No. 24	R	500	11	2.2 1.3
		L	500	2	0.4
	No. 25	R	500	7	1.4
		L	500	7	1.4
	No. 32	R	500	5	1.0
		L	500	8	1.6
	Total		3000	40	1.33 ± 0.21
	Control	6	10	4700	4 0.09 ± 0.04

るため、左右精巢に 1 Gy (4 頭), 2 Gy (3 頭), 3 Gy (3 頭) を急照射した。これら照射サルの生殖細胞形成能は照射後約 9~10 ヶ月でほぼ正常に回復した。

γ 線照射による相互転座の誘発頻度は、1 Gy では 1.9%, 2 Gy では 2.5%, 3 Gy では 1.3% であった。線量効果関係はアカゲザルと同様に、2 Gy に最大頻度をもつ山型の曲線を示した (Table 1)。転座染色体の出現頻度に関する個体差は、1 Gy では 1.2~2.1%, 2 Gy では 1.7~3.2%, 3 Gy では 1.3~1.4% とかなり小さく、また左右精巢間の差異もほとんどなかった。 γ 線によって誘発された転座の染色体構成のタイプを分析した結果、観察された 179 の転座のうち 155 (86.6%) が環状型 (R IV) であり、18 (10.1%) が鎖状型 (C IV) で、残りの 6 転座は X 染色体と常染色体との間の転座 (X-Aut.) であった (Matsuda *et al.*, 1984)。

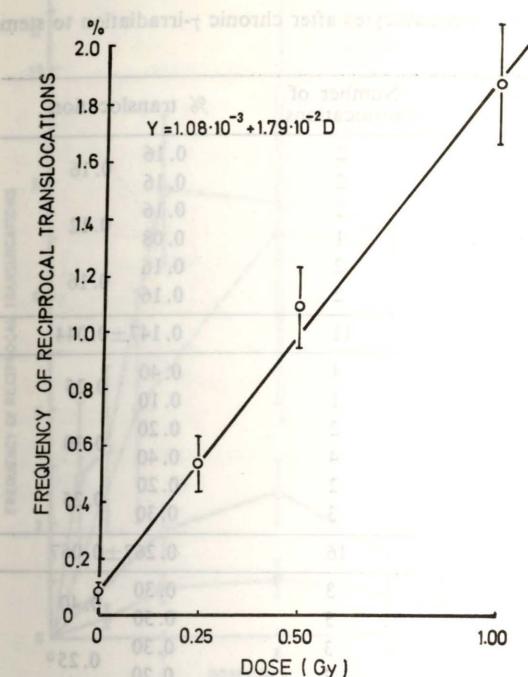


Fig. 1. Dose-response relationship for translocation induction in the crab-eating monkey's spermatogonia at low dose levels. The full line is the fit of $Y=(1.08 \pm 0.45) \cdot 10^{-3} + (1.79 \pm 0.08) \cdot 10^{-2} D$. Vertical lines indicate 95% confidence limits.

(ii) 低線量域における相互転座の線量効果関係

1 Gy 以下の線量域における相互転座の線量効果関係を求めるために、0.25 Gy (3 頭) および 0.5 Gy (3 頭) を左右精巢に急照射した。これら照射サルの生殖細胞形成能は照射後約 4 ヶ月で回復した。

相互転座の誘発頻度は 0.25 Gy では 0.53% (4500 細胞中 24), 0.50 Gy では 1.07% (4500 細胞中 52) であった。自然発生頻度 (0.09%) および 1 Gy での誘発頻度 (1.86%) (Matsuda *et al.*, 1984) と合わせて、0~1 Gy の線量域での線量効果関係を求めた結果、直線式 $Y=1.08 \cdot 10^{-3} + 1.79 \cdot 10^{-2} D$ が得られた。 χ^2 検定の結果、観察値と期待値との間には有意差ではなく、相互転座の誘発頻度は上記直線式に非常によく適合した (Fig. 1) (Matsuda *et al.*, 1985)。

観察された 72 の転座染色体のうち 66 は環状

型転座でそのうち 64 は四価環状型 (R IV), 2 は六価環状型 (R VI) であった。5 が鎖状型転座で残り 1 ヶが X 染色体と常染色体間の転座であった。

(3) 緩照射実験 (線量率: $0.18 \cdot 10^{-4}$ Gy/min)

低線量率 γ 線照射による相互転座誘発頻度の線量効果関係を得るために、13 日間 (3 頭), 32 日間 (3 頭) および 64 日間 (2 頭) 連続全身照射を行った。これら照射サルの生殖腺被曝線量はそれぞれ 0.3 Gy, 1.0 Gy および 1.5 Gy であった。

放射線被曝による幹精原細胞集団の障害は、照射終了後 0.3 Gy では約 5 ヶ月, 1.0 Gy では約 7 ヶ月, 1.5 Gy では約 10 ヶ月後にはほぼ正常の回復がみられた。

γ 線誘発相互転座の頻度を Table 2 に示した。同一線量を被曝したサルの間では誘発頻度の有意な差はみられなかった。細胞当りの転座の誘発頻度は 0.3 Gy では 0.15%, 1.0 Gy では 0.27%, 1.5 Gy では 0.33% で、明らかに線量増加に伴って誘発頻度の増加がみられた。17500 精母細胞中、40 の転座型染色体が観察された。これら全ての転座は四価環状型 (R IV) であった。

この実験で得られた 0.3~1.5 Gy の転座誘発率とすでに得られている自然発生頻度から、低線量率 γ 線照射による転座誘発と線量との間の関係を求めたところ、線量効果関係は $Y=0.94 \cdot 10^{-3} + 0.16 \cdot 10^{-2} D$ の直線式に一致することが明らかとなった (Tobari *et al.*, 1988)。

4. 考 察

(1) 相互転座誘発の線量効果関係

相互転座の出現頻度と線量との関係を最初に明らかにしたのは Léonard と DeKnudt (1967) であった。彼らはマウス精原細胞に 1~6 Gy の X 線を急照射したときの線量効果関係は直線を示すこと、さらに 0~1 Gy の低線量域でも直線関係があるという実験結果を得た (Léonard and DeKnudt, 1968)。しかし放射線によって誘発される相互転座は一飛跡事象 (one-iontrack) と二飛跡事象によって形成されるから、線量効果関係は直線二次モデル (linear quadratic model), $Y=a+bD+cD^2$ に適合すると考えられる (Lea and Catchesid, 1942)。しかし線量効果関係が直線式

Table 2. Frequencies of reciprocal translocations in primary spermatocytes after chronic γ -irradiation to stem spermatogonia of the crab-eating monkey

Dose (Gy)	Monkey	Testes	Number of cells observed	Number of translocations	% translocation
0.3	No. 50	R	1250	2	0.16
		L	1250	2	0.16
	No. 52	R	1250	2	0.16
		L	1250	1	0.08
	No. 54	R	1250	2	0.16
		L	1250	2	0.16
	3	6	7500	11	0.147±0.044
	1.0	No. 48	R	1000	4
			L	1000	1
		No. 53	R	1000	2
			L	1000	4
		No. 55	R	1000	2
			L	1000	3
		3	6	6000	16
		1.5	No. 27	R	1000
			L	1000	5
			No. 38	R	1000
			L	1000	2
2	4	4000	13	0.325±0.090	
Control	6	10	4700	4	0.085±0.043

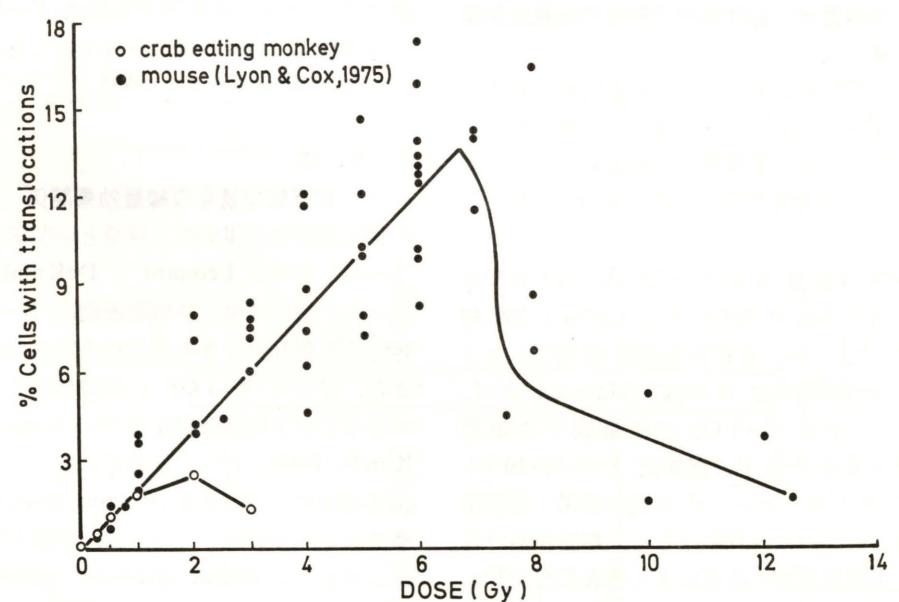


Fig. 2. Dose-response relationship for translocation induction in spermatogonia of the mouse (Lyon and Cox, 1975).

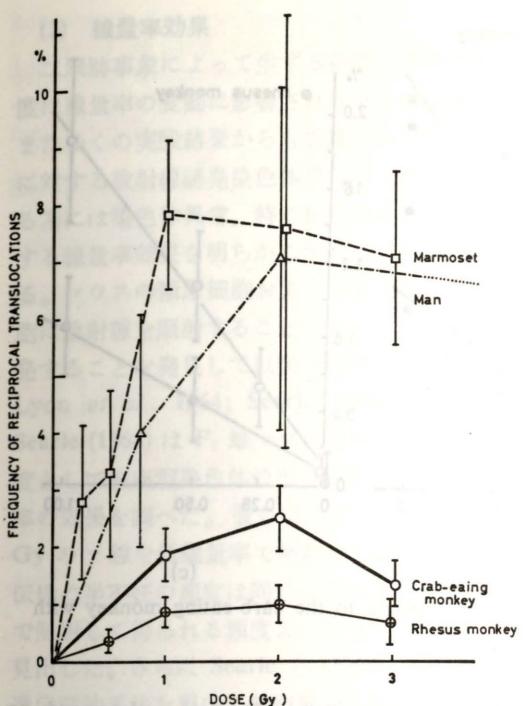


Fig. 3. Dose-response relationships for the yield of translocations in spermatogonia in various mammals. The rhesus monkey data are from van Buul (1980), those on marmoset and man are from Brewen *et al.* (1975) and those on the crab-eating monkey are from Matsuda *et al.* (1984). Vertical lines indicate 95% confidence limits.

に一致するという実験結果から、精原細胞に誘発される相互転座は一飛跡事象によるものと考えられていたが、6 Gy 以上の高線量では、相互転座の出現頻度は、線量増加に伴って急激に減少することが多くの実験によって明らかとなった (Lyon and Cox, 1975)。すなわちマウスの幹精原細胞では 6~7 Gy に相互転座の出現頻度が最大となる山型の線量効果曲線となる (Fig. 2)。幹精原細胞照射によって生ずる山型の線量効果関係は、モルモット、ウサギ、ゴールデンハムスター (Lyon and Cox, 1975) についても報告され、3 Gy に最大誘発頻度がみられている。

さらに Brewen *et al.* (1975) がヒトとマーモセットを用いて、また van Buul (1980) はアカゲザルを用いて Fig. 3 に示すような山型の線量効果関係を報告している。これらの実験動物で得られた山型の線量効果曲線は、幹精原細胞集団が染色体

異常と細胞死の両者に関して放射線感受性の異なる 2 つのタイプの細胞の混合集団であると仮定すれば説明できる。すなわち染色体異常に関して放射線高感受性の細胞は細胞死に関しても同様に高感受性であり、逆に染色体異常をおこしにくい細胞は細胞死についても抵抗性である。したがって転座型染色体を生じ易い幹精原細胞は、線量増加に伴って死滅し、その結果転座型染色体の出現頻度が減少する。したがって線量効果曲線は転座型染色体の誘発率と細胞死による消失率の割合を反映しているものと考えられる。

(2) 相互転座誘発率

相互転座の出現頻度が最大となる線量——すなわち転座誘発率と細胞死に伴なう転座消失率とが釣り合った線量——以下の線量域では、相互転座の出現頻度は線量増加とともに直線的に増加することが、これまでに調べられたほとんどすべての動物で観察された。この線量域内で求められる直線回帰係数 (b) は単位線量当たりの転座型染色体の誘発率の推定値を示すものである。したがって直線回帰係数 (b) を種々の哺乳動物について比較することによって、転座型染色体の誘発に関する放射線感受性の種差を検討することができる。

カニクイザルの精原細胞の転座型染色体の誘発率は 1 Gy 以下の線量域で 0.01 Gy 当り $(1.79 \pm 0.08) \cdot 10^{-2}$ と推定された (Matsuda *et al.*, 1985)。この値は同じマカカ属に属するアカゲザルで得られた $b = (0.79 \pm 0.01) \cdot 10^{-2}$ の値 (van Buul, 1980, 1983) に比べ有意に高かった (Fig. 4-C)。一方転座型染色体の出現頻度が最高になる線量は両者ともに約 2 Gy であることから、カニクイザルの精原細胞の細胞死に関する放射線感受性はアカゲザルとほとんど同じと考えられるが、転座型染色体の誘発に関してはカニクイザルの精原細胞はアカゲザルに比べて著しく放射線高感受性であると思われる。その原因として放射線感受性の細胞集団がアカゲザルよりも高い感受性をもっているか、あるいは遺伝的に高感受性の細胞の割合がアカゲザルに比べて多いのかのいずれかが考えられるが、繁殖周期の違いが両者の違いを反映している可能性もある。すなわちアカゲザルは季節繁殖性の動物で、精子形成能に季節的変動

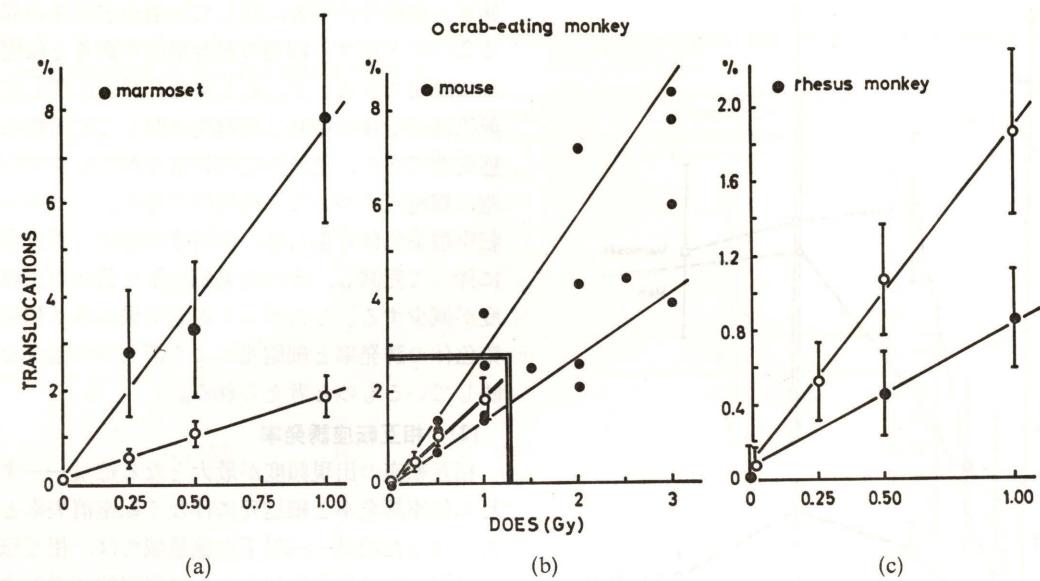


Fig. 4. Comparisons of translocation induction in spermatogonia to the crab-eating monkey with those of marmoset (a), mouse (b) and rhesus monkey (c).

が存在することが知られている (Conaway and Sade, 1965; Sade, 1964; Wjckings and Nigi, 1980)。したがって転座型染色体の出現頻度が低い原因の一つとして照射時における精子形成能が極めて不完全であり、放射線感受性が低下していたと考えられる。一方カニクイザルはいづれの季節を問わず常に繁殖可能であり、精子形成能は一年中活発に行われている (Honjo, et al., 1978)。したがって照射を受けた幹精原細胞は全て活発に分裂していたものと考えられる。

一方マーモセットでは、単位線量当りの誘発率 b は $(7.44 \pm 0.95) \cdot 10^{-2}$ と推定され、他の哺乳動物に比べても極めて高い感受性をもっていると思われる (Fig. 4-a)。さらに最大出現頻度を示す線量 (ほぼ 1 Gy) が低い (Fig. 2) ことから、マーモセットの精原細胞は細胞死に関しても高感受性であると思われる。またヒトの精原細胞における転座誘発率 b は $(3.14 \pm 0.72) \cdot 10^{-2}$ と推定されておりカニクイザルよりも約 2 倍高いが、マーモセット、ヒトのいづれについても C-バンド染色法を用いていないため、またヒトでは観察細胞数が少ない (Brewen et al., 1975) ために必ずしも信頼度の高い推定値が得られたとは思われない。

マウスの精原細胞については種々の系統を用い

て多くの研究が成されているが (Leonard and Deknudt, 1969; Evans et al., 1970; Searle et al., 1971; Muramatsu et al., 1971; Preston and Brewen, 1973; van Buul, 1977)，少くとも転座型染色体の出現頻度が線量增加とともに直線的に増加する線量域内では一この範囲は用いた系統によってかなりの差異がある—単位線量当りの誘発率 b は $(1.39 \sim 2.61) \cdot 10^{-2}$ と推定されカニクイザルの b の値 $(1.79 \cdot 10^{-2})$ と大差ない (Fig. 4-b)。このことからマウス精原細胞における転座型染色体の誘発に関する放射線感受性はカニクイザル精原細胞のそれとほとんど差がないと考えられる。しかし最も顕著な違いは転座型染色体の出現頻度が最高になる線量である。マウスの場合、その線量はほぼ 6~7 Gy (Lyon and Cox, 1975) (Fig. 2) でこれまで調べられた哺乳動物の中でも最も高い線量を示している。この事実はマウス精原細胞の細胞死に対する放射線感受性が非常に低いこと、すなわち放射線に対して極めて抵抗性であることを示唆しているのかもしれない。さらに精原細胞集団中の感受性細胞と抵抗性細胞の割合の違い、あるいは染色体切断および再結合の能力の違いといった要因がマウスと他の哺乳動物との違いを引き起こしているとも考えられる。

(3) 線量率効果

二飛跡事象によって生ずる染色体異常の誘発頻度は線量率の変動に影響されることは理論的にもまた多くの実験結果からも立証されている。ヒトに対する放射線誘発染色体異常のリスクを推定する為には染色体異常、特に相互転座の誘発率に対する線量率効果を明らかにすることが必要である。マウスの精原細胞および減数分裂後の生殖細胞に放射線を照射することによって相互転座が誘発することを発見して以来 (Griffen, 1958, 1964; Lyon et al., 1964; Searle, 1964), Phillips と Searle (1964) は F_1 雄マウスの半不妊の頻度を尺度として転座型染色体の出現頻度における線量率の効果を調べた。彼らはマウス精原細胞に 12 Gy の γ 線を低線量率で照射した結果、生ずる遺伝子の半不妊の頻度は同じ線量の X 線を高線量率で照射して得られる頻度よりも著しく低いことを見出した。さらに Searle ら (1968, 1972) は細胞遺伝学的手法を用いて転座型染色体の出現頻度における γ 線および X 線の線量率効果を明らかにした。すなわち $^{60}\text{Co} \gamma$ 線を用いてマウスの精原細胞に総線量 6 Gy を線量率をいろいろに変えて照射し、転座型染色体の出現頻度を調べた結果、高線量率 (0.83 Gy/分) では 12.08%、低線量率 (0.0002 Gy/分) では 1.37% となり、線量率を高くするにしたがって転座型染色体はほぼ直線的に増加することがわかった。したがって最低の線量率での頻度は最高の線量率での頻度の約 1/10 に低下する。

一方 Brewen ら (1979) はマウスの精原細胞に $0.1 \sim 1 \cdot 10^{-5}$ Gy/分の線量率で $^{60}\text{Co} \gamma$ 線を照射し、転座型染色体の出現頻度を比較した。また同時に 1 Gy/分の線量率で X 線を照射し転座の頻度を調べた結果、線量率が 1 Gy/分から $3.5 \cdot 10^{-5}$ Gy/分に下るにしたがって転座型染色体の頻度は低下するが、 $1.2 \cdot 10^{-5}$ Gy/分と $3.5 \cdot 10^{-5}$ Gy/分の間には有意な差はみられなかった。これらの結果は Pomerantzeva ら (1972, 1975) や Searle ら (1976) の結果と非常に良く近似しており、線量率が非常に低いときには、転座型染色体の頻度の増加はない結論される。 $1.2 \cdot 10^{-5}$ Gy/分の最低の線量率における 0.10 Gy 当りの誘発率は、1 Gy/分の高

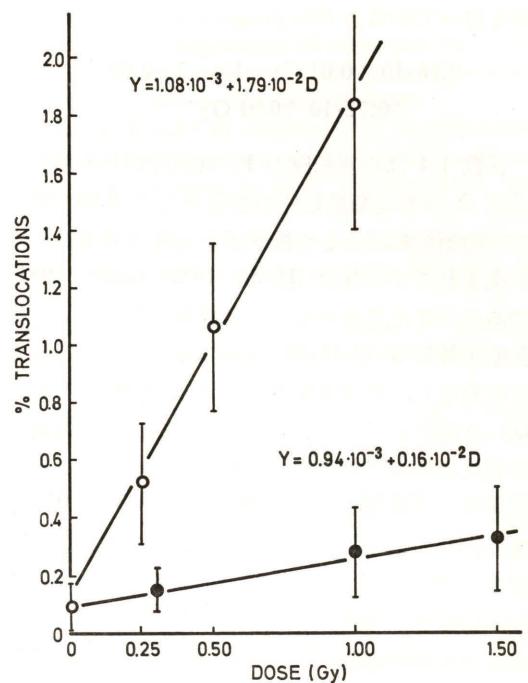


Fig. 5. Comparison of the dose-response curves for translocation induction in spermatogonia of the crab-eating monkey after γ -irradiation at a high dose-rate (○, 0.25 Gy/min) and at a low dose-rate (●, $0.18 \cdot 10^{-4}$ Gy/min). Vertical lines indicate 95% confidence limits.

線量率におけるその 1/15 となり、Searle らが得た結果に近い値を示している。

カニクイザルの精原細胞における相互転座誘発率は、高線量率 (0.25 Gy/分) 照射では 1 Gy 当り 100 細胞当り約 2 個 ($b=1.79 \pm 0.08$) であるのに対し、低線量率 ($0.18 \cdot 10^{-4}$ Gy/分) 照射では 1 Gy 当り 100 細胞当り約 0.2 個 ($b=0.16 \pm 0.07$) であった (Tobari et al., 1988) (Fig. 5)。したがってカニクイザル精原細胞における相互転座の誘発には明らかに線量率効果があり、低線量率照射の誘発率は高線量率照射に比べて約 1/10 に低下することが明らかとなつた。この減少の程度はすでに述べたマウス精原細胞における減少率 (1/10) (Searle, 1972) と全くよく一致している。

1986 年国連科学委員会 (UNSCEAR) では相互転座由来の不均衡型転座による先天異常のリスク推定のための基礎としてカニクイザルの低線量率照射における相互転座誘発率を用いて次の様な計

算を行っている。

$$0.16 \cdot 10^{-4} / 0.01 \text{ Gy} \times 1/4 \times 2 \times 0.09 \\ = 0.72 \cdot 10^{-6} / 0.01 \text{ Gy}$$

係数 1/4 は相互転座が F_1 世代に伝わる割合、係数 2 は不均衡型転座の割合そして 0.09 (9%) は不均衡型転座をもつ配偶子から先天異常の子供が産まれてくる割合 (Hook, 1982; Jacob, 1981) である。またアカゲザルの低線量率照射による相互転座誘発率 ($0.35 \cdot 10^{-4} / 0.01 \text{ Gy}$) を用いて同様の計算をし、先天異常のリスクは $1.62 \cdot 10^{-6} / 0.01 \text{ Gy}$ と推定している。これらの推定値から国連科学委員会は相互転座由来の不均衡型転座による先天異常の下限値として父親被曝の場合、 0.01 Gy 当り 100 万出生児当り 1 人以下としており、上限値としてはヒト、マーモセットのデータを用いて 0.01 Gy 当り 100 出生児当り 15 人と推定している。また母親被曝の場合には 0.01 Gy 当り 100 万人出生児当り 0~5 人と推定している。

国連科学委員会 (1986) では、転座型染色体が次代の子供に伝わる割合を 1/4 と期待しているが、Ford ら (1969) のマウスを用いた実験では、実際に転座型染色体をもつ F_1 個体の頻度は期待値の半分にすぎないことを示しており、このことは Crocker (1982) によって確かめられている。また不均衡型転座をもつ配偶子から先天異常の子供が生まれてくる割合は 9% としているが、Dutrillaux ら (1981) の実験から不均衡な染色体組成をもつ配偶子の 20% から先天異常の子供が生まれてくることを示唆している (Searle, 1983)。したがって遺伝的リスク推定に用いられるこれらの係数の妥当性を実験的に明確にすることが今後に残された重要な課題である。

参考文献

- Brewen, J. G., R. J. Preston and N. Gengozian (1975) Analysis of X-ray-induced chromosomal translocations in human and marmoset spermatogonial cells, *Nature*, **253**, 468-470.
- Brewen, J. G., R. J. Preston and H. E. Luippold (1979) Radiation-induced translocations in spermatogonia III. Effect of long-term chronic exposures to γ -rays, *Mutation Res.*, **61**, 405-409.
- Buul, P. P. W. van (1977) Dose-response relationship for radiation-induced translocations in somatic and germ cells of mice, *Mutation Res.*, **45**, 61-68.
- Buul, P. P. W. van (1980) Dose-response relationship for X-ray induced reciprocal translocations in stem-cell spermatogonia of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*), *Mutation Res.*, **73**, 363-375.
- Buul, P. P. W. van (1983) X-ray induced reciprocal translocations in stem cell spermatogonia of the rhesus monkey: Dose and fractionation responses, *Mutation Res.*, **107**, 337-345.
- Conaway, D. H. and D. S. Sade (1965) The seasonal spermatogenic cycle in free ranging rhesus monkeys, *Folia Primatol.*, **3**, 1-12.
- Crocker, M. (1982) Metaphase I delay as a factor influencing translocation yield from spermatogonial irradiation in mice carrying Robertsonian translocations, *Mutation Res.*, **103**, 339-343.
- Dutrillaux, B., E. Viegas-Pequignet, A. Aurias, M. Prod-Home, M. Sports and M. Prieur (1981) Tentative estimate of the risk of chromosomal disease due to radiation-induced translocation in man, *Mutation Res.*, **82**, 191-200.
- Evans, E. P., C. E. Ford, A. G. Searle and B. J. West (1970) Studies on the induction of translocations in mouse spermatogonia III. Effects of X-irradiation, *Mutation Res.*, **9**, 501-506.
- Ford, C. E., A. G. Searle, E. P. Evans and B. J. West (1969) Differential transmission of translocations induced in spermatogonia of mice by irradiation, *Cytogenet.*, **8**, 447-470.
- Grifin, A. B. (1958) Occurrence of chromosomal aberrations in pre-spermatocytic cells of irradiated male mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **45**, 691-694.
- Grifin, A. B. (1964) The occurrence of chromosomal aberrations in pre-spermatocytic cells, II. Cytological studies of sterile and semisterile F_1 individuals, In: W. D. Carlson and F. X. Gassner (Eds.), *Effects of Ionizing Radiation on the Reproductive System*, Pergamon, Oxford, pp. 175-188.
- Honjo, S., F. Cho, T. Fujiwara, Y. Yoshioka, K. Masuko, K. Kurihara, M. Yabe and Y. Noguchi (1978) Breeding of cynomolgus monkey through successive generations by indoor cage system, *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **31**, 301-310.
- Hook, E. B. (1982) Contribution of chromosome abnormalities to human morbidity and some comments upon surveillance of chromosome mutation rates, In: K. C. Bora et al., (Eds.), *Progress in Mutation Research*, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, pp. 9-38.
- Jacobs, P. A. (1981) Mutation rates of structural chromosome rearrangements in man, *Am. J. Hum. Genet.*, **33**, 44-54.
- Lea, D. E. and D. G. Catchsd (1942) The mechanism of the induction by radiation of chromosome aberrations in *Tradescantia*, *J. Genet.*, **44**, 216.
- Léonard, A. and Gh. Deknudt (1967) Relation between the X-ray dose and the rate of chromosome rearrangements in spermatogonia of mice, *Radiation Res.*, **32**, 35-41.
- Léonard, A. and Gh. Deknudt (1968) Chromosome rearrangements after low X-ray doses given to spermatogonia of mice, *Can. J. Genet. Cytol.*, **10**, 119-124.
- Léonard, A. and Gh. Deknudt (1969) Dose-response relationship for translocations by X-irradiation in spermatogonia of mice, *Radiation Res.*, **40**, 276-284.
- Lyon, M. F. and B. D. Cox (1975) The induction by X-rays of chromosome aberrations in male guinea-pigs, rabbits and golden hamster, *Mutation Res.*, **29**, 407-422.
- Lyon, M. F., R. J. S. Phillips and A. G. Searle (1964) The overall rates of dominant and recessive lethal and visible mutation induced by spermatogonial irradiation of mice, *Genet. Res.*, **5**, 448-467.
- Matsuda, Y., I. Tobari, J. Yamagiwa, T. Utsugi, M. Kitazume and S. Nakai (1984) γ -Ray-induced reciprocal translocations in spermatogonia of the crab-eating monkey (*Macaca fascicularis*), *Mutation Res.*, **129**, 373-380.
- Matsuda, Y., I. Tobari, J. Yamagiwa, T. Utsugi, M. Okamoto and S. Nakai (1985) Dose-response relationship of γ -ray-induced reciprocal translocations at low doses in spermatogonia of the crab-eating monkey (*Macaca fascicularis*), *Mutation Res.*, **151**, 121-127.
- Muramatsu, S., W. Nakamura and H. Eto (1971) Radiation-induced translocations in mouse spermatogonia, *Jpn. J. Genet.*, **46**, 281-283.
- Phillips, P. J. S. and A. G. Searle (1964) The effect of dose-rate on the yield of translocations and dominant lethals following spermatogonial irradiation of mice, *Genet. Res.*, **5**, 468-472.
- Pomerantzeva, M. D., L. K. Ramaiya and V. N. Ivanov (1972) Mutagenic effects of different kinds of radiations on the germ cells of male mice, VII. Frequency of emergence of reciprocal translocations in spermatogonia exposed to gamma-irradiation at different dose rates, *Genetica*, **8**, 128-134.
- Pomerantzeva, M. D., L. K. Ramaiya and V. N. Ivanov (1975) Mutagenic effects of different kinds of radiations on the germ cells of male mice, VIII. Frequency of appearance of reciprocal translocations in spermatogonia of mice subjected to chronic gamma-irradiation, *Genetica*, **11**, 81-86.
- Preston, R. J. and J. G. Brewen (1971) X-ray induced translocations in spermatogonia, I. Dose and fractionation responses in mice, *Mutation Res.*, **19**, 219-223.
- Sade, D. S. (1964) Seasonal cycle in size of testes of free-ranging *Macaca mulatta*, *Folia Primatol.*, **2**, 171-180.
- Searle, A. G. (1964) Genetic effects of spermatogonial X-irradiation on productivity of F_1 female mice, *Mutation Res.*, **1**, 99-108.
- Searle, A. G. (1983) Some growing points in mammalian radiation genetics, *Proceeding of the 7th ICRP*, pp. 367-372.
- Searle, A. G., E. P. Evans, C. E. Ford and B. J. West, with Appendix by D. G. Papworth (1968) Studies on the induction of translocations in mouse spermatogonia, I. The effect of dose-rate, *Mutation Res.*, **6**, 427-436.
- Seale, A. G., C. V. Beechey, E. P. Evans, C. E. Ford and D. G. Papworth (1971) Studies on the induction of translocations in mouse spermatogonia, IV. Effects of acute gamma-irradiation, *Mutation Res.*, **12**, 411-416.
- Searle, A. G., C. V. Beechey, M. J. Corp and D. G. Papworth (1972) A dose rate effect on translocation induction by X-irradiation of mouse spermatogonia, *Mutation Res.*, **15**, 89-91.
- Searle, A. G., C. V. Beechey, D. Green and E. R. Humphreys (1976) Cytogenetic effects of protracted exposures to alpha particles from plutonium-239 and to gamma-rays from cobalt-60 compared in male mice, *Mutation Res.*, **41**, 297-310.
- Tobari, I., Y. Matsuda, G. Xiaohung, J. Yamagiwa, T. Utsugi, M. Kitazume and M. Okamoto (1988) Dose-response relationship for translocation induction in spermatogonia of the crab-eating monkey (*Macaca fascicularis*) by chronic γ -ray-irradiation, *Mutation Res.*, **201**, 81-87.
- Wickings, E. J. and H. Nigi (1980) Seasonality in endocrine and exocrine testicular function of the adult rhesus monkey (*Macaca mulatta*) maintained in a control laboratory environment, *Int. J. Androl.*, **3**, 87-104.

発がん性変異の垂直伝達

大阪大学医学部 放射線基礎医学講座 野 村 大 成

1. はじめに — W. L. Russell 博士と私

私の話を始める前に、このような立派なタイトル、「環境変異原による遺伝的障害を考える」でシンポジウムが開かれましたことを感謝するとともに、その時に忘れてならない偉大なる先駆者の写真を先ずお見せ致します (Fig. 1)。もう何度も午前のセッションで話題になった米国オークリッジ国立研究所の W. L. Russell 博士です。私は 15 年前にオークリッジを訪れました。それまで私は化学物質で、これからお話しするような仕事をしておりました。彼に会って初めて放射線という便利な道具を使うようになったわけです。彼は大変な自然の愛好家で、このような原野に連れて行かれ

ました。写真をとらせてくれと申しましたところ、真正面を向いてポーズをとらずに、はるかかなたを見つめているポーズをとり、「この格好が一番いい」と。今さらながら、はるか彼方に起るだろう遺伝的影響を真剣に見つめる立派な学者の姿が想い出されます。

さて、ヒトに対する放射線の遺伝的影響の程度は、ヒトの疫学的資料では決定的証拠がないため、マウスの生殖細胞に放射線を与えたときの突然変異の頻度から推定されている。その推定のほとんどは、この Russell 博士による特定の毛色遺伝子座に関する劣性変異の放射線による誘発の資料 (Russell et al., 1958, 1960) にもとづいている。



Fig. 1. W. L. Russell 博士. 1974 年 3 月オークリッヂ郊外の原野にて撮影.

〒530 大阪市北区中之島 4 丁目 3-57

Germ-line mutation causing tumors in mice
Taisei Nomura

Department of Radiation Biology, Faculty of Medicine, Osaka University, 3-57 Nakanoshima 4-chome,
Kita-ku, Osaka 530, Japan

最近私は、がんと奇形好発の特性が被ばくマウスの次世代に現われ、それが優性遺伝体質として子孫にも伝わることを発見した (Nomura, 1975, 1978, 1982, 1986)。この優性の発がん性突然変異は、いちじるしく高い頻度で生じるのが大きな特色である。今回は、このうち発がん性突然変異についての概要を述べることにする。

2. 方法と原理 (Nomura, 1975, 1978, 1982)

雄または、雌のマウスに、X線照射あるいは化学変異原を投与した後に、一定の間隔をおいて、無処置のマウスと交配し、子供すなわち F_1 をつくる。この一定の間隔をおくことに、重要な意味がある。照射してすぐ交配すると精子期または卵細胞の成熟期が被ばくしたことになり、オス被ばく後交配までの間隔が長くなるほど、精子細胞期、精原細胞期の被ばくということになる (Nomura, 1978)。

これら被ばくした生殖細胞由来する次代の仔について腫瘍が発生するかどうかを調べる。

3. F_1 での腫瘍発生と生殖細胞の発生段階での感受性の違い

雄 ICR マウスの成熟精子期 (交配の 1~7 日前)、精子細胞期 (交配の 15~21 日前) 及び精原細胞期 (交配の 64 日以上前) に X 線を照射し、非照射の雌マウスと交配した。 F_1 を生後 8 ヶ月で屠殺し、腫瘍を検出した。その結果を、Fig. 2 に示した。誘発された腫瘍の約 90% は肺腫瘍であり、他に卵巣腫瘍、リンパ性白血病などが発生

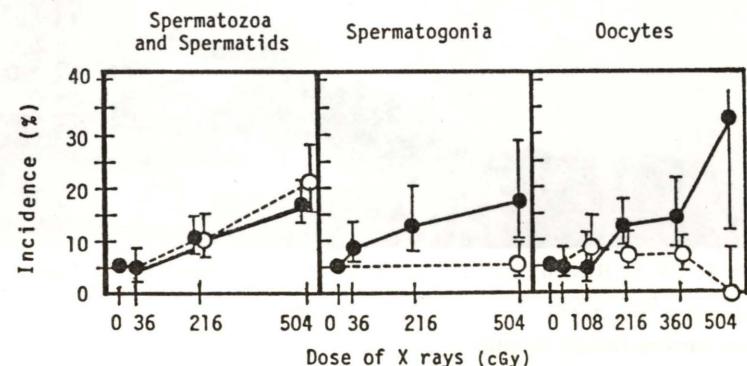


Fig. 2. 父又は母 ICR マウスへの X 線照射による F_1 での腫瘍発生。実線は急照射 (72 cGy/min) を、破線は分割照射 (36 cGy 2 時間間隔) を示す (Nomura, 1978, 1982)。

している。照射線量としては、精子、精子細胞期及び精原細胞期に 36, 216, または 504 cGy の X 線を照射した。 F_1 での腫瘍発生率は、Fig. 2 のごとく、精子、精子細胞期に照射した場合は、直線的に増加し、504 cGy では約 30% の高値を示した。精原細胞期に照射した場合は、精子、精子細胞期ほど、きれいな線量効果曲線を示さなかったが、 F_1 の肺癌発生率は線量とともに上昇している。しかし発生率は減数分裂終了後の精細胞の約 1/2 であり、低い感受性を示した (Nomura, 1978, 1982)。

卵細胞に関しては、排卵よりさかのぼること 4 週間以上たって正常雄と交配しても子供は出来ない。そこで、排卵前 1~7 日の卵細胞に X 線を 36, 108, 216, 360、及び 504 cGy 照射した。 F_1 での腫瘍発生率は Fig. 2 に示したごとく 108 cGy まで非照射の場合と差がなく、成熟卵は、X 線に対し抵抗性を示している。しかし、200 cGy をこえると急激に、腫瘍発生率は上昇した。卵細胞はすべて低線量の X 線に抵抗性を示すのかというと、そうでもない。雌マウスに一定量 (216 cGy) の X 線を急照射し、いろんな間隔で正常雄と交配してみた。もっと若い卵細胞 (排卵前 8~28 日) に照射すると極めて高頻度に、 F_1 に腫瘍を誘発することがわかった (Nomura, 1978)。

4. 生殖細胞の傷の修復能

F_1 での腫瘍発生を基準にして考えると、精原細胞と成熟卵は、何となく X 線に対し抵抗性を示しているようである。これはなぜなのかを知るために

Table 1. マウスでの放射線誘発突然変異と腫瘍との比較 (Nomura, 1978, 1982; Russell et al., 1958 および 1960; Ehling, 1966.)

	腫瘍	突然変異 ^{a)}
感受性		
精子と精子細胞	#	#
精 原 細 胞	+	+
卵 細 胞	#	#
分割効果		
精子と精子細胞	-	-
精 原 細 胞	+	+
卵 細 胞	+	+

^{a)} 特定座位及び優性骨格突然変異

Table 2. X 線、4NQO、およびウレタンにより、次世代 (F_2) に誘発された肺腫瘍の遺伝性 (Nomura, 1982)

親 (F_1) の性質	次世代 (F_2) での肺腫瘍発生率 (%)		
	X 線	4NQO	Urethane
+X-	15/76 (19.7%)	7/28 (25.0)++	4/19 (21.2)
±X-	4/69 (5.8)	5/103 (4.9)	9/113 (8.2)

+ P < 0.05 # P < 0.01

に、無作為に雄、雌を交配し、前もって F_2 を作っておく。 F_2 作成後、その親である F_1 を解剖し肺腫瘍を持つかどうか調べた (Nomura, 1982)。

F_2 をも解剖してみると、親 (F_1) のいずれかが肺腫瘍を持っている場合は、 F_2 に高率に肺腫瘍が発生している (Table 2) が、親 (F_1) のいずれもが肺腫瘍を持っていない場合は、 F_2 の肺腫瘍の頻度は低く、非照射の場合と有意の差がない (Table 2)。X 線のかわりにウレタンや 4 NQO (4-nitroquinoline-1-oxide) を用いた時も同じ結果となった (Table 2)。又、 F_2 オスを正常なマウスと交配し、 F_3 を観察した場合も、 F_2 が肺腫瘍を持っている場合のみ、有意に高率に (22.7%) 肺腫瘍が発生した。以上の結果から、次世代に肺腫瘍をつくる変異は約 40% の浸透率で優性に遺伝していることがわかった (Nomura, 1982)。

本実験では、肺腫瘍の遺伝性を検定したが、それには、二つの理由がある。まず第一に、 F_1 に誘発された腫瘍の 90% が肺腫瘍であり、他のまれな腫瘍では、数的にとても遺伝解析ができなかつたこと。次に、マウス肺腫瘍はウィルス由来性およびホルモン依存性でないとされ、遺伝的な解析が容易であることである。

6. N 5 および LT マウスへの X 線照射による F_1 での腫瘍発生とその遺伝性

この研究の普遍性を知るため、ICR マウス以外の系統として N 5 および LT マウスに X 線照射を行い、 F_1 での腫瘍発生とその遺伝性について研究を行った。ICR マウスの場合と同様に、N 5 マウス雄の精原細胞期に X 線 504 cGy 急照射したところ、 F_1 マウスには、肺腫瘍、卵巣腫瘍、リンパ性白血病等が誘発された。特に肺腫瘍と卵巣

5. 肺腫瘍好発の特性は遺伝する

まず、精子細胞期に X 線 504 cGy を 1 回照射し、正常雌と交配し、 F_1 を作成する。 F_1 には当然ながら高率に腫瘍が発生する。 F_1 を屠殺する前

Table 3. N5 父マウスへの X 線照射 (504 cGy) による F₁ での腫瘍発生 (Nomura, 1986)

照射時期	腫瘍をもつたマウス (%)	肺腫瘍 (%)	白血病 (%)
精原細胞	76/229 (33.2)*	48/229 (21.0)	9/229 (3.9)*
対照	56/244 (23.0)	35/244 (14.3)	1/244 (0.4)

* P<0.05.

Table 4. LT 父マウスへの X 線照射 (504 cGy) による F₁ での腫瘍発生 (Nomura, 1986)

照射時期	腫瘍をもつたマウス (%)	肺腫瘍 (%)	白血病 (%)
精子, 精子細胞	16/75 (21.3)*	17/75 (16.0)*	4/75 (5.3)
対照	37/411 (9.0)	22/411 (5.4)	4/411 (1.0)

* P<0.01.

腫瘍に関しては、その誘発率は、ICR マウスの場合と全く同一であった (Tables 3, 4)。また、肺腫瘍を起こす生殖細胞の変異は、F₂ にも優性に遺伝した。リンパ性白血病については、現在のところ F₁₀ においても、その発生率は高くなっている (Nomura, 1986)。

LT マウス雄の精子、精子細胞期に X 線 504 cGy 急照射した場合も F₁ マウスに有意に肺腫瘍およびリンパ性白血病が誘発された (Nomura, 1986)。LT マウスは X 線に高感受性で 504 cGy 急照射では、生殖能力が殆んど完全に失われるため精原細胞期照射による影響は観察できなかった。504 cGy 照射群では 21.3%，非照射群では 9.0% と F₁ での腫瘍発生率は増加している (Table 4)。

7. 高発がん性変異と oncogenic genes

放射線により次世代に誘発された腫瘍の殆んどは悪性腫瘍である。例えば、N 5 マウスを用いた実験では、肺腫瘍 27 例中 24 例、リンパ性白血病 6 例中 6 例、纖維肉腫 4 例中 4 例、骨肉腫 2 例中 2 例、未分化癌 3 例中 3 例、肝腫瘍 2 例中 0 例、小腸腫瘍 1 例中 0 例が可移植性であった。現在、数百種のこれら可移植性腫瘍を凍結保

存している。その中の 9 例について既知の oncogenic genes の DNA 増幅を調べたところ、3 例に N-ras, K-ras, mos, abl の DNA 増幅が認められた (Nomura, 1989)。DNA 増幅の認められなかった 2 例からは、故角永教授との共同研究で、ゴールデンハムスター SHOK 細胞へのトランスクレクションにより、新しい oncogenic gene 2 つがみつかっている。そのうちの 1 つは、ヒト甲状腺癌より単離された oncogene (*tco*) と hybridization する (Nomura, 1989)。

なお、CQ バンドおよび G バンド法を用い、次世代に誘発された腫瘍と染色体異常の相関を調べている。現在のところ担がんマウス、非担がんマウスともに特異的な染色体変異は見つかっていない。

8. おわりに

催奇性突然変異に関する研究は、直ちに Lyon 女史により追試確認され (Kirk and Lyon, 1984)，またヒトでも類似の疫学調査が報告されるようになったのに反し、がん突然変異に関する研究は、私共以外には、あまりなされることはなかった。昨年レニングラードにおいて、IARC (国際癌研究機構) 主催のシンポジウムがあり、ソヴィエトの Vorobtsova 女史より報告がなされ、私共の仕事の一部は確認された。我々がこの研究に 20 年を要したように、彼女も 10 年の歳月を費したとの事である。やっとこの仕事も、追試確認という長い労力の時代を終え、分子機構の研究とヒトでの疫学調査の時代に入ったものと考えている。

講演の録音テープより本稿を作製して頂いた後藤博子博士に感謝致します。

参考文献

- Ehling, U. H. (1966) Dominant mutations affecting the skeleton in offspring of X-irradiated male mice. *Genetics*, **54**, 1381-1389.
- Kirk, K. M., M. F. Lyon (1984) Induction of congenital malformations in the offspring of male mice treated with X-rays at pre-meiotic and post-meiotic stages. *Mutat. Res.*, **125**, 75-85.
- Nomura, T. (1975) Transmission of tumors and malformations to the next generation of mice subsequent to urethan treatment. *Cancer Res.*, **35**, 264-266.

Nomura, T. (1978) Changed urethan and radiation response of the mouse germ cell to tumor induction. In L. Severi (Ed.), *Tumours of Early Life in Man and Animals*, Perugia Univ. Press, Perugia, pp. 873-891.

Nomura, T. (1982) Parental exposure to X rays and chemicals induces heritable tumours and anomalies in mice. *Nature (London)*, **296**, 575-577.

Nomura, T. (1986) Further studies on X-ray and chemically induced germ-line alterations causing tumors and malformations in mice. In Ramel, C., Lambert, B. and Magnusson, J. (eds.), *Genetic*

Toxicology of Environmental Chemicals

Alan R. Liss, New York, pp. 13-20.

Nomura, T. (1989) Role of radiation-induced mutations in multigeneration carcinogenesis. In *Prenatal and Multigeneration Carcinogenesis*, IARC Sci. Publ. No. 96, pp. 375-387.

Russell, W. L., L. B. Russell and E. M. Kelly (1958) Radiation dose rate and mutation frequency. *Science*, **128**, 1546-1550.

Russell, W. L., Russell, L. B. and Kelly, E. M. (1960) Dependence of mutation rate on radiation intensity. *Int. J. Rad. Biol. (Suppl.)*, 311-322.

ヒト赤血球における GPA 遺伝子突然変異の検出

放射線影響研究所 ¹放射線生物学部 ²遺伝学部 秋山實利¹, 平井裕子¹, 京泉誠之¹
梅木繁子¹, 箱田雅之¹, 中村 典¹
阿波章夫²

1. 緒 言

X線やガンマ線などの電離放射線、紫外線、あるいは様々な化学物質が細胞に突然変異を起こすことはよく知られている。すでにバクテリアから哺乳動物培養細胞に至るまで数多くの測定系が確立され、その性格も明らかにされている。ところがヒトの体内に生じた体細胞突然変異の定量的な検出法は、大変限られており、ほんの数年前までは、末梢血リンパ球の染色体異常を調べるのが唯一の方法であった。周知のごとく、多くの化学変異原は可視的な染色体異常よりも、顕微鏡では見えない遺伝子内の小さな変化を生じ易い。従ってヒトの血液細胞を用いた特定遺伝子座に関する突然変異の検出法の確率が望まれていた。最近になって、主として免疫学の分野での著しい進歩により、特定遺伝子座に関する二つの突然変異検出法が確立された。ひとつは末梢血Tリンパ球を用いて IL-2 存在下でコロニーを形成させ、6-thioguanine 耐性のクローニングの出現頻度を調べるものである。即ちこれは X 染色体上の *hppt* 遺伝子が突然変異を生じると、細胞が 6-thioguanine に耐性になることを利用して、突然変異細胞を選択的に増殖させる方法である (Albertini *et al.*, 1982; Hakoda *et al.*, 1988a; Morley *et al.*, 1983)。

もうひとつは米国 Lawrence Livermore 国立研究所の R. Jensen らのグループにより開発されたもので、赤血球膜上の glycoporphin A (GPA) という糖蛋白質に特異的に反応する蛍光色素標識

モノクローナル抗体を用いて、その蛋白質の発現を失った赤血球の頻度を flow cytometry により測定する方法である (Langlois, 1987)。我々はこれらの新しい方法を用いて原爆被爆者の体細胞における特定遺伝子座の突然変異頻度を調べ、電離放射線の人体に及ぼした影響調査を実施している (Hakoda *et al.*, 1988a; Kyoizumi *et al.*, 1989)。そして *hppt* 欠損 T リンパ球の頻度は健常人では百万個あたり 3-5 個程度とされているが、原爆被爆者では 40 年以上も経た今日でも被爆線量に依存した増加を観察している (Hakoda *et al.*, 1988b)。本稿では、まだ中間報告の段階ではあるが、第二番目の方法である赤血球を用いた調査の結果を中心に述べる。

2. 測定原理

GPA はヒト第 4 染色体上の遺伝子で MN 式血液型を決める抗原分子であり、M 型と N 型の GPA 遺伝子対立遺伝子は共優性に発現している。従ってヒトには MM 型、MN 型及び NN 型の 3 つの血液型がある。

日本人ではそれらの割合は約 3:5:2 である。M 型と N 型の GPA の構造の違いは、N 末端から 1 番目と 5 番目のアミノ酸の違いに起因している。Jensen らは M 又は N 型の GPA に対して特異的に反応するモノクローナル抗体や両方の型の GPA に反応するモノクローナル抗体を作製し、これらを用いて GPA 発現の変異の測定に応

〒732 広島市南区比治山公園 5-2

Detection of mutant erythrocytes at glycophorin a locus

Mitoshi Akiyama¹, Yuko Hirai¹, Seishi Kyoizumi¹, Shigeko Umeki¹, Masayuki Hakoda¹, Nori Nakamura¹, Akio Awa²

¹Department of Radiobiology, ²Genetics Radiation Effects Research Foundation, 5-2 Hijiyama Park, Minami-ku, Hiroshima 734, Japan

用した。

この方法の対象者は MN ヘテロ接合体の人である。Fig. 1 に示すように、この赤血球を 2 種の蛍光色素で標識したモノクローナル抗体と反応さ

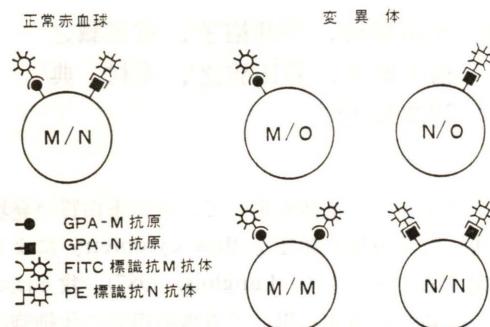


Fig. 1. モノクローナル抗体による赤血球 GPA 変異体の検出。

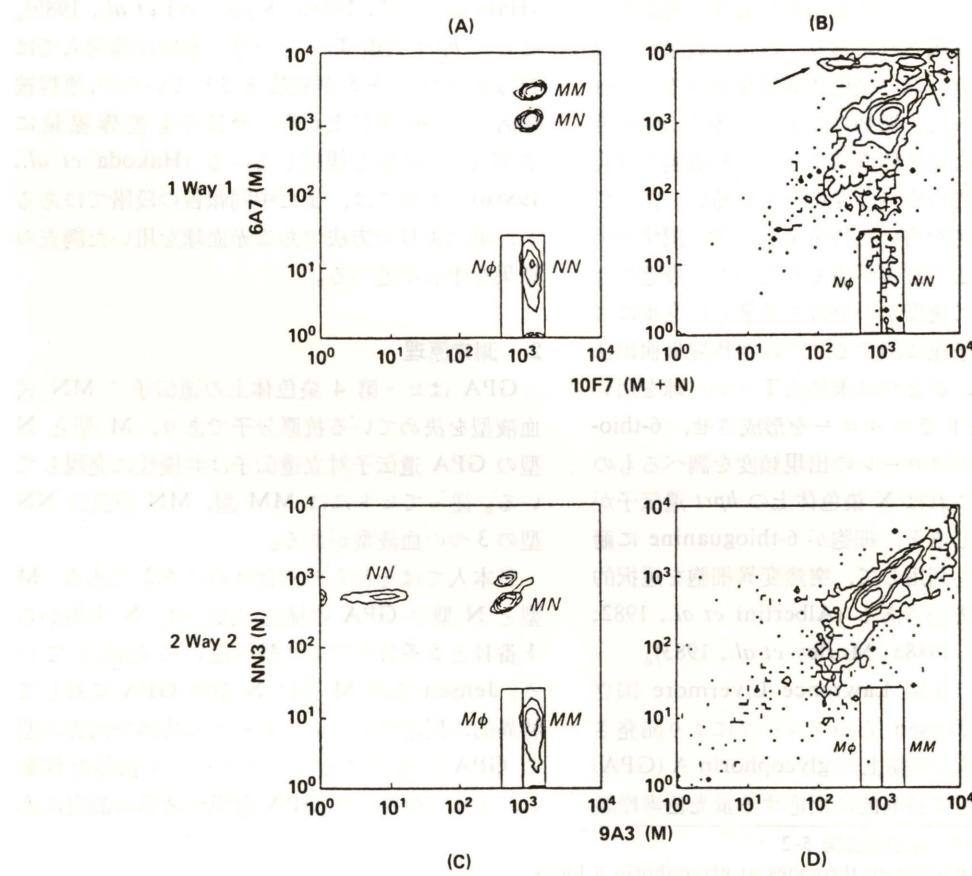


Fig. 2. 赤血球 GPA アッセイの実際。

(A), (C) は MM, MN, NN 型ドナーの正常赤血球を蛍光抗体で染色した。(B), (D) はある被爆者についての測定結果を示す。(A), (B) では M に特異的な抗体 6A7 と, MN に共通な 10F7 抗体を使用した。(C), (D) では N に特異的な NN3 と M に特異的な 9A3 の抗体を使用した。→ は P. I. 染色白血球。

せると、4種のタイプの突然変異、即ちどちらかの対立遺伝子が発現しなくなったもの (MO, NO), および恐らく体細胞組換えに起因すると思われるホモ接合型突然変異細胞 (MM, NN) が検出される。Fig. 2 (A), (C) は MN, MM, NN の人由来の正常赤血球を 2 種の組合せで蛍光抗体染色して flow cytometry で解析した場合の模式 cytogram である。簡単のため Fig. 2 (C) を例にとると横軸は M 抗原特異抗体からの、縦軸は N 抗原特異抗体からの蛍光強度をプロットしてある。MN 型赤血球は両抗体で染色されるが、MM 型及び NN 型赤血球はそれぞれの特異抗体とのみ反応するので cytogram の上でこのような位置に出現する。これから、MN ヘテロの対象者の赤血球を調査した場合の MO や MM 型 (Fig. 2(A)

では NO や NN 型) 変異赤血球の出現する位置を決定する。(ヘミ接合型変異体の赤血球あたりの GPA 量は正常 MN 型の 1/2 になる。ホモ接合型変異体のそれは正常 MM 型や NN 型と同量である)。そしてそこにウインドウを設定して、流したテスト細胞の中で、その中に生じるイベントの割合を求める。

このように、MM 型や NN 型のホモ接合型変異細胞も検出できる訳で、ヒトの体細胞組換えを容易に検出できる実験系は他にはなく、このアッセイ系のもう 1 つのユニークな点でもある。

ドナーが M 又は N のホモ接合型の血液型の場合には質的に同じものの発現量が 50% 減少するだけで、必ず正常細胞がそのような領域に混入するため、現在の技術では、大変まれにしか生じない突然変異を正しく検出することは困難である。

実際に蛍光抗体で染色した赤血球を flow cytometry で分析した際の cytogram を示す。Fig. 2 (B), (D) に示した。予め設定した検出ウインドウに NO, NN 及び MO, MM 型変異体が入ってくる。しかし、この図からもわかるように変異体数は極めて少なく、Propidium Iodide (P. I.) 染色等の、種々の処理をした後でも検出領域内にゴミや白血球等が混入してくることがあり、変異体頻度に影響を与える可能性がある。セルソーターの分取装置でウインドウ内に生じた全イベントをスライドグラス上に採取し、変異赤血球のみを蛍光顕微鏡下で数えて、正しい変異体頻度を求める。

3. GPA 遺伝子突然変異細胞の測定結果

(1) 変異体頻度の再現性

Table 1 は健常人 4 名を計 5 回測定した変異赤血球の頻度を示す。NN ホモ接合型変異体以外の 3 種類の NO, MO, MM 変異体頻度には良好な再現性が認められている。また、遠距離被爆者(被爆放射線量がほとんど 0 の人) 21 名のそれぞれの変異体頻度の平均値ともよく一致している。NN ホモ接合型突然変異頻度測定の再現性に関しては、抗体の認識する抗原決定基の性状のためまだ問題がある。目下、米国 Lawrence Livermore 国立研究所と共同して、新しく作成された

Table 1. 放射線被爆していない一般人の突然変異赤血球頻度

Donor	Variant Frequency ^a ($\times 10^{-6}$)			
	Nφ	Mφ	NN	MM
Standard Healthy Donors				
M.H (N=5) ^b	22 ± 11	12 ± 13	47 ± 35	6 ± 5
T.H (N=5)	20 ± 8	8 ± 3	50 ± 29	7 ± 5
Y.K (N=5)	21 ± 8	15 ± 12	44 ± 40	11 ± 6
N.T (N=3)	10 ± 4	9 ± 5	10 ± 7	16 ± 6
Control Donors				
N=21	22 ± 10	10 ± 9	70 ± 86	12 ± 12

a: Mean ± Standard deviation

b: Number of experiments

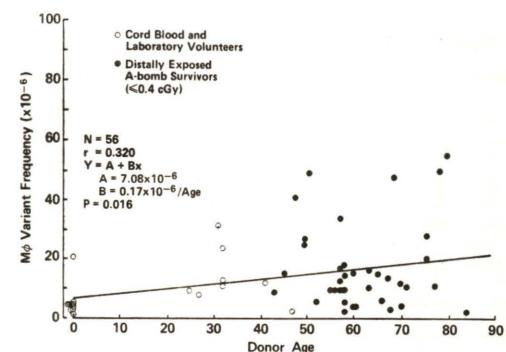


Fig. 3. MO 変異体とドナーの年齢との関係。

抗体について、その有効性を検討中である。このような訳で現時点では NN ホモ接合型変異体頻度を除いて、他の 3 つの変異体 (NO, MO, MM 変異体) 頻度の間には非常に強い正の相関が認められている。

(2) 年齢と突然変異細胞頻度との関係

これら GPA 変異赤血球の頻度と年齢との関係を解析してみた。Fig. 3 は 10 名の胎盤血、8 名の我々研究室職員有志 (平均年齢 33 歳で 25-47 歳の人)、44 名の遠距離被爆者 (平均年齢 62 歳で 43-84 歳の人) の赤血球についての MO ヘミ接合型変異赤血球頻度を示す。大変ゆるやかな勾配ではあるが年齢の増加に依存して変異体頻度の増加が認められた。1 年当りの増加率は 0.17×10^{-6} であった。この Age の影響は現在のところ NN ホモ接合型変異体頻度以外の NO, MM 型変異体頻度でも有意またはその傾向が認められている。

(3) 他の測定系との比較

現在、ヒトの In vivo 体細胞突然変異の頻度

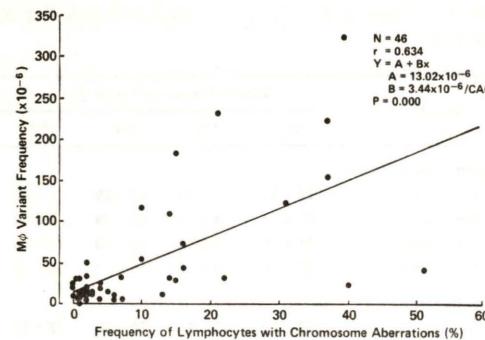


Fig. 4. 46名の原爆被爆者における MO 型変異赤血球頻度とリンパ球の染色体異常頻度の相関関係。

Table 2. 3種類の生物学的指標の間の相関関係

	Chromosome Aberrations in PBL	<i>hprt</i> - T-lymphocytes
GPA mutants in RBC		
(1) Nφ	**	*
(2) Mφ	***	NS
(3) NN	NS	NS
(4) MM	***	NS
(1+2) Deletion type	***	NS
(3+4) Recombination type	***	NS
<i>hprt</i> - T-lymphocytes	*	

NS=not significant, *= $P<0.05$, **= $P<0.01$, ***= $P<0.001$

測定ができる方法は、赤血球 GPA 遺伝子座突然変異の他に最初に述べた T リンパ球 *hprt* 遺伝子の突然変異とリンパ球の染色体異常とがある。Fig. 4 は MO ヘミ接合型変異赤血球頻度とリンパ球の染色体異常頻度との相関を示す。

例数は被爆者 46 例と少ないが、両者間に強い正の相関が認められた。Table 2 は 3種類の体細胞突然変異アッセイ系のエンドポイントを比較したまとめを示す。NN ホモ接合型変異体以外の赤血球 GPA 変異体頻度はリンパ球の染色体異常頻度や *hprt* 欠損 T リンパ球頻度と有意に相関している。しかし、*hprt* 欠損 T リンパ球の頻度とリンパ球の染色体異常頻度の相関は、赤血球 GPA 変異体頻度と染色体異常頻度との相関よりも極めて弱い。

(4) 適用

(i) 原爆被爆者の変異体頻度

今まで総人数として 110 名の被爆者について調査をしている。Fig. 5 上段の NO ヘミ接合型変異体では 10^6 細胞あたり 1000 個以上という極めて高い変異体頻度を示す人が 2 名あり、それら

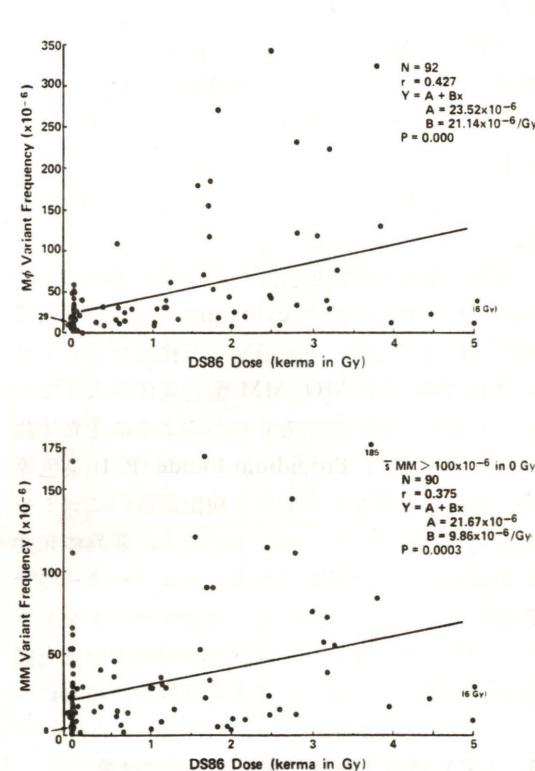
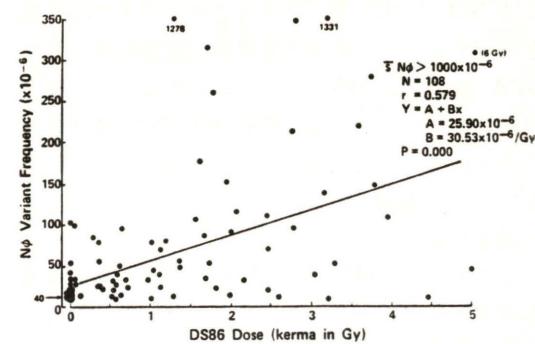


Fig. 5. 原爆被爆者における変異赤血球の線量効果関係上より NO, MO, MM 変異細胞について示す。

を含めるか、含めないかで回帰直線の勾配が 2 倍近く異なる。もし、仮にこの 2 例を含めないで計算すると、NO と中段に示す MO ヘミ接合型変異体頻度の線量効果関係の勾配は、約 $3.0 \times 10^{-5}/\text{Gy}$ で両者は大変近い値になる。下段は MM ホモ接合型の変異体頻度を示している。この場合縦軸の変異体頻度の目盛は、上の 2 つのヘミ接合型の目盛の 2 倍になっている。即ち MM ホモ接合型の変異体頻度は明らかに勾配が緩やかであり、

Table 3. 突然変異生成に関する放射線の倍加線量

Variant Type	(n)	Induction Rate (Gy^{-1})	Doubling Dose (Gy)	Correlation with Dose
GPA mutants in RBC				
(1) Nφ	(108)	31×10^{-6}	0.9	***
(2) Mφ	(92)	21×10^{-6}	1.1	***
(3) NN	(53)			NS
(4) MM	(90)	10×10^{-6}	2.2	***
(1+2) Deletion type	(109)	27×10^{-6}	0.9	***
(3+4) Recombination type	(92)	8×10^{-6}	2.4	***
Chromosome aberrations	(96)	5.8×10^{-2}	0.43	***
<i>hprt</i> - T-lymphocytes	(44)	0.8×10^{-6}	4.7	*

NS=not significant, *= $P<0.05$, **= $P<0.01$, ***= $P<0.001$

NO, MO ヘミ接合型のその約 1/2-1/3 である。なお NO, MO, MM のいずれの変異体頻度も被爆線量と強く相関していた。今回は一次の回帰直線をあてはめたが二次式の方がよいかどうかは、今後もっと調査例数を増やした上で明らかにしたい。

次に突然変異生成に関する放射線の倍加線量を Table 3 に示した。NO, MO 欠失型の変異体では $0.9-1.1 \text{ Gy}$; MM ホモ接合型の変異体では 2.2 Gy となっている。なお 1 Gy 当りの突然変異誘発率は、NO, MO 欠失型変異体で $2.1-3.1 \times 10^{-5}$ であり、MM 型ではその約半分の 1×10^{-5} である。GPA 遺伝子欠損型変異の頻度はヒトの培養細胞を用いた In vitro のデータやマウス精原細胞における突然変異誘発率にかなり近い値である (Searle 1974, Thacker et al., 1975)。一方、*hprt* 欠損 T リンパ球頻度では誘発率は 1 Gy 当り約 1×10^{-6} であり、またこれの倍加線量は大変大きくて 5 Gy 近い値である。これからも分かるように、リンパ球の *hprt* 遺伝子突然変異測定法はバイオロジカル ドシメーターとしてはあまり有効ではないようで、赤血球の突然変異測定の方はかなりよい成績と思われる。これは *hprt* 欠損 T リンパ球の場合、被爆後 40 年以上を経る間に何らかの不利が生じて In vivo で淘汰された可能性が高いと思われる。

(ii) 旧大久野島毒ガス製造工場従事者における突然変異細胞頻度

旧日本陸軍の大久野島毒ガス製造工場では毒ガスとしてアルキル化剤のマスタードガスを主として製造していた。マスタードは X 線に次いで突然変異能力を持つことが明らかになったはじめての化学物質であり (Auerbach et al., 1947) 旧従業員

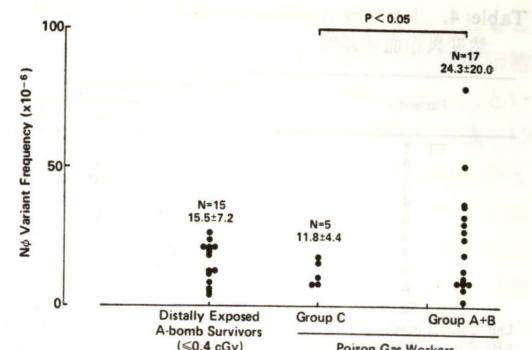


Fig. 6. 旧日本陸軍毒ガス製造従事者における赤血球 GPA 突然変異。

には最初、呼吸器、皮膚の癌の発症が多く認められ、更に、10 年位前からは他臓器癌も多発している (Shigenobu, 1980)。作業従事者はほとんど男性である。これらの人を Fig. 6 に示すような 3 群に分類できる。A 群はマスタードガス製造に直接携わった人、B 群はマスタードガス製造は行わなかったが作業所に立ち入っていた人、C 群はマスタードガス以外のガスの製造従事者や事務員、医師、看護婦などでコントロール群である。Fig. 6 には例数が少ないので、A 群と B 群と一緒にプロットにしてあるが、A+B 群の NO ヘミ接合型変異体頻度は 15 名の遠距離原爆被爆者の値や、C 群の値より平均値は有意に高かった。これら旧毒ガス製造従事者については *hprt* 変異 T リンパ球の頻度も調査しているが、A 群や B 群は Control の C 群よりも有意に高い変異体頻度を示している (Yanagida et al., 1988)。アルキル化剤は X 線と比較すると、染色体の大きな変異を生じることは比較的少なく、また点突然変異を生じるということなどで、放射線とは相違があるが (Auerbach et al., 1976)，突然変異や癌を生じる点では放射線と同様と思われ、興味ある結果と考えられる。

(iii) トロトラスト症患者における突然変異体頻度

トロトラストは 2 酸化トリュウムを主としたすぐれた造影剤で、第 2 次大戦中、主として陸軍病院で傷痍軍人にされた。このトリュウムは α 線を放出する放射線同位元素で、その発癌性の恐れがアメリカで議論されていたが、刺激性が少なく造

Table 4. トロトラスト症患者赤血球における GPA 突然変異赤血球頻度

Patient #	Variant Frequency ($\times 10^{-6}$)			
	Mφ	Nφ	MM	NN
TT 1	10	8	2	44
2	28	6	4	34
3	204*	133*	269*	395*
4	38	42	2	30
5	18	98*	6	33
6	11	33	2	43
7	17	30	5	28
8	49	106*	61*	7
9	5	37	14	23
10	5	41	11	25
Lab. Control (n=6)	12 ± 9	19 ± 10	15 ± 10	14 ± 4
AHS Control (DS86<0.005 Gy) (n=18)	21 ± 16	20 ± 14	25 ± 19	15 ± 14

影効果もすぐれていたので不幸にして使用された。トロトラスト症の人は発癌とくに肝癌や白血病のリスクが大変高くなっていることが(Mori *et al.*, 1983), その後の調査から明らかにされている。Table 4 はトロトラスト症患者 10 名について赤血球 GPA 遺伝子突然変異を測定した結果を示す。

10 名のトロトラスト症患者のうち #3, 5, 8 の 3 名は研究室職員有志の平均値や被爆者の対照群の平均値より有意に高い値を示していた。そのうち #3 患者は白血病, #5 患者は肝臓癌を発症していたことがわかったが, #8 の患者は現在まで悪性腫瘍等を発症していない。

(iv) DNA 修復欠損遺伝病への応用

色素性乾皮症, Ataxia telangiectasia, ファンコニー貧血症, Bloom 症候群等は高い頻度で発癌する遺伝病で染色体切断症候群として知られて

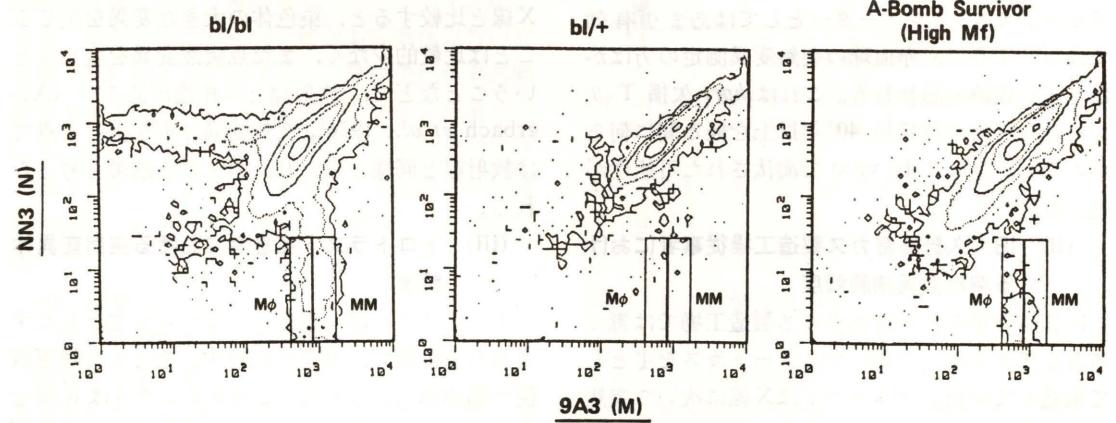


Fig. 7. ブルーム症ホモ(左), ヘテロ(中)及び原爆被爆者で高い赤血球突然変異頻度を示す例(右)のサイトグラム。横軸は抗 M, 縦軸は抗 N 抗体の蛍光強度を対数で示した。

Table 5. ブルーム症ホモ (bl/bl), ヘテロ (bl/+) 及び正常人 (+/+) における GPA 突然変異赤血球頻度

Donors	Genotype	Blood Type	Variant Frequencies ($\times 10^{-6}$)				
			Nφ	Mφ	NN	MM	
Family I	bl/+	MN	42	2	66	12	
	bl/+	MN	56	26	52	32	
	bl/bl	MN	2940	N.D. ^a	1960	N.D.	
	bl/bl	MM	—	—	—	—	
Family II	bl/bl	MN	1399	546	887	1772	
	I	+/+	MN	32	16	88	8
	II	+/+	MN	7	10	4	20
Normal ^c	+/+	MN	22±10	10±9	70±86	12±12	

a. Not done due to heavy aggregation.

b. Variant frequencies for two normal donors who were examined at the same time as BS samples were examined.

c. Mean and standard deviation of variant frequencies of normal donors from the previous study.

いる(Arlett *et al.*, 1978)。これらはDNA修復能に欠損があったり、自然突然変異頻度がかかるたりする。Table 5 は 2 人の Bloom 症患者について赤血球 GPA 遺伝子突然変異頻度を測定した結果を示す。Bloom 症の特徴は姉妹染色体交換(SCE)の頻度が高いとともに、高発癌性である(Arlett *et al.*, 1978)。Family I の患児 A.O 及び Family II の患児 A.S においては欠損型、組換え型のいずれの GPA 遺伝子変異体も 10^6 個の赤血球当り 1000-3000 個の頻度で生じていたが、ヘテロである Family I の両親は Control レベルの値を示した。

Bloom 症患者における赤血球の flow cytometry による cytogram は、Fig. 7 に示すように、一つの GPA 対立遺伝子の発現において、中間的

レベルを示す変異体がスマア様のパターンを呈すというのが特徴的である。この説明としては原爆被爆者の場合には、40年以上も前に受けた放射線の影響であるから、当然、赤血球系の幹細胞に生じた突然変異を、現在見ていることになる。従って、幹細胞から分化してくる途中で GPA の発現が全くない細胞が突然変異として検出されるのであろう。ところが、Bloom 症患者の場合には、幹細胞だけではなくて、すでに GPA を合成はじめたような赤芽細胞においても突然変異が高い頻度で生じているために、こうした中間レベルの GPA 発現をした細胞が生じるのである。以上の結果は、Bloom 症患者の高発癌傾向は自然突然変異だけでなく、体細胞組換え変異体頻度も異常に増加しているためであろうという仮説を強く支持するものであろう。

4. 考察並びに結語

原爆被爆者について、この赤血球 GPA 遺伝子突然変異の調査から、興味をひいた点がある。それは同じ様な推定線量でも突然変異の頻度が個人によって随分と異なることである。Fig. 5 上段に示したように、大変高い線量を受けたと推定されているにもかかわらず、赤血球突然変異頻度が正常値の人とか中間の線量で、先ほどのブルーム症患者の例に匹敵する 10^{-8} という高い頻度を示す人がいる。まず、高線量被曝者の例であるが、これらの人の推定線量が誤っている可能性がある。たしかにこの 2 名のうちの 1 名はリンパ球の染色体異常頻度が 10% であるから、推定線量が高すぎる可能性が高いと思われる。しかし、もう 1 方の方は染色体異常が 45% もあるので、かなり大量の放射線を受けた人であることは間違いないであろう。それにもかかわらず、赤血球の突然変異は正常値であった。このことは恐らく、骨髓幹細胞の数が従来推測されている 10^6 や 10^7 (Cronkite *et al.*, 1976) といった大きな数ではなく、以外に少なくて生存幹細胞の中に突然変異が生じなかっただけを強く示唆している。次に、赤血球突然変異頻度が 10^{-8} 近い人の場合を考えてみる。この場合には幹細胞死は同じように起こっていたけれども、生き残った小数の幹細胞にたまたま突

然変異が生じたと考えると容易である。もしもこれが正しいなら、この人の赤血球系の骨髓幹細胞は、被爆直後には約 1000 個に減少していたということになる。この 2 名は被爆時年齢が 9 歳と 15 歳であるから、大人よりは幹細胞数が少ないとと思われる。骨髓幹細胞の放射線感受性はヒトについては全くわかっていないが、もしマウスの Spleen colony CFU-S と同じと仮定すると、200 rad で 90% が死ぬという計算であるから (McCulloch *et al.*, 1962), 10 歳-15 歳のヒトの赤血球系骨髓幹細胞は 1 万個くらいということになる。20 歳以上の大で、これがどれだけ増えるかは不明であるが、とにかく数万個のオーダーであるとしたら、これは従来推測されてきた値よりかなり少ないことになる。

以上ヒト赤血球 GPA 遺伝子突然変異を中心にして述べたが、体細胞突然変異の持つ生物学的意義については、未だ不明な点が多く残されている。いずれにしても、環境中の変異原物質や職業上の変異原因子に被曝した人の遺伝子変異を検出する方法が確立され、生体がこうむる影響をより細部まで分析できるようになってきた。

これらの研究は、ここ 2-3 年の間に可能になってきたものであるが、今後も色々と新しい方法が開発されることは間違いないと思われる。In vitro の条件とは異なり、In vivo はさまざまな修飾要因がはたらいて、どのようなインディケーターがふさわしいかはやってみないとわからない所が多分にあるよう思われる。幸い、我々の研究室ではモノクローナル抗体や flow cytometry といった免疫学的技法を十分駆使できる条件が整っており、今回述べた赤血球の GPA アッセイの他にすでにいくつかの新しいインディケーターについての予備的調査をはじめている。GPA アッセイの欠点は、調査対象者が MN ヘテロの人に限られることで、これ以外の人についてきちんと定量できる方法を確立することが急務と考えている。

5. 謝辞

今回の研究に協力していただいた放射線影響研究所、放射線生物学部、免疫学研究室の研究員、

技術員の方々、また和文ワープロ原稿作成に援助をいただいた高木延子氏に深謝します。ブルーム症患者の調査で御協力いただいた京都大学の武部啓、巽 純一の両先生、トロトラスト症患者の調査で御協力をいただいた京都大学 佐々木正夫先生並びに放医研 森 武三郎両先生に厚くお礼申し上げます。

参考文献

- Albertini R. J., K. L. Castle and W. R. Borcherding (1982) T-cell cloning to detect the mutant 6-thioguanine-resistant lymphocytes present in human peripheral blood. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), **79**, 6617-6621.
- Arlett, C. F. and A. R. Lehmann (1978) Human disorders showing increased sensitivity to the induction of genetic damage. Ann. Rev. Genet., **12**, 95-115.
- Auerbach, C., J. M. Robson (1947) The production of mutations by chemical substances. Proc. Roy. Soc., Edinburgh B, **62**, 271-283.
- Auerbach, C. (1976) "Mutation Research", Chapman and Hall Ltd., London.
- Cronkite, E. P., L. E. Feinendegen (1976) Notions about human stem cells. Blood Cells, **2**, 269-284.
- Hakoda, M., M. Akiyama, S. Kyoizumi, K. Kobuke, A. A. Awa and M. Yamakido (1988a) Measurement of *in vivo* HGPRT deficient mutant cell frequency using a modified method for cloning human peripheral blood T lymphocytes. Mutation Res., **197**, 161-169.
- Hakoda, M., M. Akiyama, S. Kyoizumi, A. A. Awa, M. Yamakido and M. Otake (1988b) Increased somatic cell mutant frequency in atomic bomb survivors. Mutation Res., **201**, 39-48.
- Kyoizumi, S., N. Nakamura, M. Hakoda, A. A. Awa, M. A. Bean, R. H. Jensen and M. Akiyama (1989) Detection of somatic mutations at the glycophorin A locus in erythrocytes of atomic bomb survivors using a single beam flow sorter. Cancer Res., **49**, 581-588.
- Langlois, R. G., W. L. Bigbee, S. Kyoizumi, N. Nakamura, M. A. Bean, M. Akiyama and R. H. Jensen (1987) Evidence for increased somatic cell mutations at the glycophorin A locus in atomic bomb survivors. Science, **236**, 445-448.
- McCulloch, E. A. and J. E. Till (1962) The sensitivity of cells from normal mouse bone marrow to gamma radiation *in vitro* and *in vivo*. Radiat. Res., **16**, 822-832.
- Mori, T., Y. Kato, T. Kumatori, T. Maruyama and S. Hatakeyama (1983) Epidemiological follow-up study of Japanese Thorotrast cases-1980. Health Physics., **44**, (Suppl. 1), 262-272.
- Morley, A. A., K. J. Trainor, R. Seshadri and R. G. Ryall (1983) Measurement of *in vivo* mutations in human lymphocytes. Nature, **302**, 155-156.
- Searle, A. G. (1974) Mutation induction in mice. Adv. Radiat. Biol., **4**, 131-207.
- Shigenobu, T. (1980) Occupational cancer of lung-cancer of the respiratory tract among workers manufacturing poisonous gases. Jpn. J. Chest Diseases., **18**, 880-885.
- Thacker, J. and R. Cox (1975) Mutation induction and inactivation in mammalian cells exposed to ionizing radiation. Nature, **258**, 429-431. 11.
- Yanagida, J., S. Hozawa, S. Ishioka, H. Maeda, K. Takahashi, T. Oyama, M. Takaishi, M. Hakoda, M. Akiyama and M. Yamakido (1988) Somatic mutation in peripheral lymphocytes of former worker at the Okunojima poison gas factory. Jpn. J. Cancer Res. (Gann), **79**, 1276-1283.

環境変異原研究 **11**: 55-62 (1989)

ヒトの生殖障害について：初期胚淘汰の生殖生物学的考察

旭川医科大学 生物学教室 美 甘 和 哉

1. はじめに

現在地球上には 100 万種以上の動物、30 万種以上の植物が生息しているといわれている。このことは、地球上に最初の生命体が発生して以来、新しい種の進化が絶滅を上回る速度で進行してきたことを物語っている。ところが、最近の数十年間、この関係は全く逆転して年々数多くの種が絶滅している。特に哺乳類や鳥類など高等な生物の中に危機に瀕しているものが多い。生物の絶滅の原因や経緯は種々あっても、結局生殖力の減衰が最終段階における共通の症状である。現に多くの動物がそのような状態にあるが、言うまでもなく、何等かの人間活動がもたらした結果にほかならない。以前は乱獲が主な原因であったが、最近では生息域の大規模な破壊や汚染が重要な原因となってきた。一方人類は、自らの力で環境抵抗を緩和することによって生活圏を拡大し、個体数を増加させて発展してきた。しかし、人類もまた他の生物と同様におびただしい環境変異原に曝露されて生活しているのが現状である。はたして人類は、今後も例外的に、以前と同様の盛んな生殖力を維持して行けるのであろうか。この甚だ重要な問いに答えるには、ヒトの生殖の実態を発生の全過程を通じて明らかにする必要がある。

ヒトでは自然流産率が甚だ高く、臨床的に認知された妊娠の 10%~15% にも及ぶと言われているが、初期発生の段階でどれだけの流産が生じているかを正確に把握することは極めて困難であった。しかし、最近では、これらの時期の発生に色々な角度から研究の光が当てられるようになってきた。その結果、発生初期に淘汰されるヒト胚の

数は認知されるまで発生できる胚の数をはるかに上回るものであることが解ったのである。ここでは、これらの成果を参考にして、ヒトの妊娠障害の現状を生殖生物学的に考察してみる。

2. ヒトの生殖効率

ヒトの卵子は受精の機会を与えられても、多くのものが発生の途上で淘汰され、正常発生するものの割合は非常に低い。この割合（生殖効率）を正確に知るには、受精や初期発生の過程を直接観察しなくてはならないから、体外受精の動物の場合と違ってヒトでは非常に難しい。いわゆる認知された妊娠（臨床的妊娠確認）のうちどれだけ正常出産したかという率は、正確な意味で生殖効率とはいえない。受精期や卵割期まで遡ったところで起こる淘汰もすべて含めて算出しなくてはならないからである。

ヒトの初期発生の実態を明らかにする目的で、着床前後の初期胚を実際に採取して、形態学的に研究した結果、34 個中 13 個 (38%) の胚に発生異常を認めたという報告は有名である (Hertig et al., 1956)。また、ある研究では、ヒトの再生殖に関する統計的資料を多角的に検討した結果、排卵した卵子の 78% が妊娠の失敗に終わるとの推定を行っている (Roberts and Lowe, 1975)。最近では、絨毛性ゴナドトロビン (hCG) の増減を指標に、着床や妊娠の継続状態を調査する方法が最も信頼されている。

Fig. 1 に要約した Edmonds et al. (1982) の研究は、82人の妊娠を希望している正常婦人における 198 回の排卵周期（卵子はすべて精子と接触の

〒078 旭川市西神楽 4 線 5 号 3 番地の 11

Reproductive failure in man: Early embryonic loss viewed from the angle of reproductive biology

Kazuya Mikamo

Department of Biological Sciences, Asahikawa Medical College, 4-5 Nishikagura, Asahikawa 078, Japan

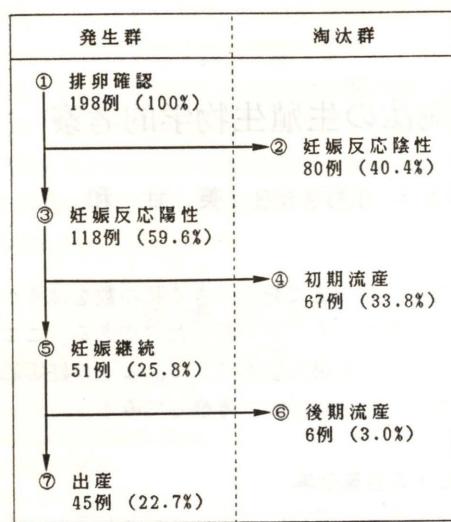


Fig. 1. ヒト妊娠経過の hCG 測定による調査.
(Edmonds et al., 1982)

- ① 血中プロゲステロン値の上昇確認
- ② 尿中 hCG 値陰性、着床前死亡
- ③ 尿中 hCG 値陽性、着床確認
- ④ 尿中 hCG 値陰性転化、着床後早期死亡
- ⑤ 臨床的妊娠確認
- ⑥ いわゆる自然流産

Table 1. 母の年齢別生殖効率
(結婚から妊娠までの排卵周期数)

年 齢	調査人數	排卵周期数 (平均)
20 ^{a)} ~24	17	2.9
25 ~ 29	36	4.0
30 ~ 35 ^{b)}	8	5.5
平均	26.3	3.9

(萬, 未発表)
^{a)} 19 歳 1 名を含む. ^{b)} 39 歳 1 名を含む.

機会が与えられたと考えてよい) の妊娠がたどった経過を hCG の計測で調査したもので、甚だ興味深い。臨床的に妊娠を確認できる以前の初期胚段階で、すでに 74.2% の胚が淘汰されたという驚くべき結果であった。妊娠がさらに進んで自然流産で失われたものを除くと、出産児の割合はわずか 22.7% に過ぎない。この研究は、イギリスのサウサンプトン市で今から 7 年以上も前に行われたものであるが、ヒトの生殖の実態をよく示すものとして高い評価を受けている。

わが国でも方法は簡単であるが、ヒトの生殖効

率をよく反映する調査が最近進められている。札幌市の年間およそ 1,000~1,200 の分娩を取り扱う産院における研究である (Table 1, 萬, 1989, 未発表)。結婚後 1 年以内に臨床的妊娠が確認された婦人について、結婚から妊娠に至るまでの月経周期数 (排卵回数と同義となるように問診で確かめた) を調査した。もちろん、経産婦、婚前性交経験者、避妊経験者等のすべてを除外してある。Table 1 に示す通り、平均の性周期数は 3.9 回であった。すなわち 4 回の排卵周期のうち 1 回の割で妊娠が成立したことになる。正確には 238 回の周期で 61 回の妊娠成立であったから 25.6% の効率となり、Fig. 1 の⑤の妊娠継続 25.8% とよく一致する。この札幌集団でこれからどれだけの自然流産が生じるかはわからないが、一般に臨床的に認知された妊娠の 10%~15% が流産するから、札幌集団の最終的な生殖効率は 23% 程度となり、サウサンプトン集団の生殖効率と殆ど変わらない。ちなみに、サウサンプトン集団では臨床的に認知された妊娠の約 12% が自然流産していた。

3. 哺乳動物の生殖効率

Table 2 は種々の動物で、排卵した卵子がすべて精子と接触したとして、そのうち何パーセントが出産まで発生するかという値、すなわち生殖効率を示したものである。繁殖に必要な諸条件の整った実験動物施設では、マウスやラット、ゴールデンハムスターの生殖効率は 72%~77% である。また選抜交配などの改良によって飼育環境によく

Table 2. 各種哺乳類における胚淘汰と生殖効率

動 物 種	胚淘汰率 (%)	生殖効率 (%)
チャイニーズハムスター (CHA)	14	86
ゴールデンハムスター	23	77
マウス	25	75
ラット	28	72
ヒツジ	30	70
ウシ	37	63
ブタ	40	60
ヒト	77	23

CHA: チャイニーズハムスター旭川コロニー。

適した繁殖コロニーを作れば、85%以上の生殖効率を達成することも可能である (Mikamo and Kamiguchi, 1983a)。これらの数値は出産直前に開腹して黄体数 (排卵数とほぼ同じ)、着床数、生存胎仔数を調査した結果であるから正確な生殖効率を表している。一方家畜では方法上の困難もあって必ずしも正確ではないが、ブタ、ウシ、ヒツジで 60%~70% 程度で、実験動物と比較すると明らかに低いけれども極端な数値ではない。ところが、ヒトの生殖効率が僅かに 23% に過ぎないということは前述の通り、甚だ特異的な現象といわざるを得ない。

4. 生殖障害の主要原因としての染色体異常

そこで、このような極端な胚淘汰の原因は一体何かということが問題となるが、胚の発生障害は種々の原因によって起こるから容易に特定できない場合が多い。しかし、染色体異常だけは自然流産や先天異常の原因としてはっきりと指摘できるものである。染色体異常には異数性や倍数性異常をふくむ数的異常と欠失、重複、逆位、転座などをふくむ構造的異常がある。ヒトではこれらの異常のすべてが生じて流産や先天異常の原因となっている。

新生児では 0.5%~0.8% の染色体異常が生じているが (美甘, 1978), 調査可能な妊娠中期以降のいわゆる自然流産児中では 50%~60% というはるかに高い頻度である (Boué et al., 1975)。しかし、これらの染色体異常も実はほんの一部にすぎず、配偶子や受精卵にははるかに多くが含まれている。染色体異常個体では遺伝子の働きが重大な障害を蒙っているので、大多数のものが発生してもただちに淘汰されてしまう。したがって、いわゆる自然流産児中で検出されるものでもまだ軽症のうちであり、出産後も生き残れるものは極く

稀な例外的なものとみてよい。そのため、実際に染色体異常が生じている割合 (第一次出現頻度) をヒトで明らかにすることはたいへん難しい。つまり、前述した未確認流産の中に大多数の染色体異常が含まれてしまうからである。

Table 3 には、3 種の実験動物で胚淘汰が起る前のすべての胚を用いて調査した第一次染色体異常出現頻度を示してある。それぞれの動物種における胚死亡の計は Table 2 における胚淘汰率の数値と同じである。いずれの動物でも、染色体異常による胚死亡の方が他のすべての原因による胚死亡の総和より明らかに上まわっている。ヒトでも実験動物でも胚淘汰の原因は染色体異常が第一である。とはいものの、実験動物で生じている染色体異常の出現率はヒトと比べてはるかに低いことを見過ごしてはならない。

5. ヒトの卵子・初期胚の染色体研究

数年前からヒトの卵子の染色体研究が行われはじめ、染色体異常の頻度が受精前の第 2 卵母細胞 (第二成熟分裂中期) で報告されている。最近までに発表された 7 つの機関の結果を平均すると、異数性・倍数性異常、構造異常の総計で 34.5% となる (Table 4)。これらの卵子はすべて体外受精・受精卵移植に用いられたものの余剰の卵であるため、質的差異がグループごとに大きいこと、染色体標本作製法も誤差を生じやすい欠点があることなどの理由もあって、結果がまちまちである。したがって、上記の平均値がどれだけ信頼できるものかはかなり疑問の余地を残している。同様な経緯で得られた受精卵についての研究も 3 機関から発表されていて、2 細胞期から 16 細胞期までの 131 例の胚では平均 46.2% の異常が記録されている (Table 5)。第 2 卵母細胞の場合より受精卵の方で染色体異常が高い頻度で生じているのは当

Table 3. 実験動物の胚淘汰とその原因

動 物 種	排卵数 (%)	胚死亡 (%)		
		染色体異常	ほかの原因	計
マウス (数系統の平均)	100	14	11	25
ゴールデンハムスター	100	14	9	23
チャイニーズハムスター	100	8	6	14

Table 4. ヒト第二卵母細胞における染色体異常出現頻度

著者	分析数	染色体異常 (%)			
		異数性	構造異常	倍数性異常	計
Michelmann (1985)	59	3.4	0.0	25.4	28.8
Martin (1986)	50	30.0	4.0	0.0	34.0
Wrampsby (1987)	86	65.1	1.2	2.3	68.6
Veiga (1987)	117	11.1	4.3	6.8	22.2
Plachot (1988)	316	24.1	—	1.9	26.0
Bongso (1988)	251	21.1	0.4	2.0	23.5
Djalali (1988)	96	27.1	0.0	11.5	38.6
平均 34.5					

Table 5. ヒト初期胚における染色体異常出現頻度

著者	発生段階	分析数	染色体異常出現頻度 (%)			
			異数性	構造異常	倍数性	計
Plachot (1987)	2-8細胞	68	2.9	2.9	30.9	36.7
Papadopoulos (1989)	4-5細胞	35	21.1	25.7	8.6	55.4
Angell (1986)	8-16細胞	28	25.0	3.6	17.9	46.5
平均 46.2						

然である。卵子の第2成熟分裂時の染色体不分離による異常、精子側から持ち込まれる異常（後述、平均 14%）、さらに受精時に生じる種々の倍数性異常、さらには卵割期のモザイク生成など、かなりの染色体異常が加わるからである。いずれにしても、これらの染色体異常の大多数が初期胚段階で死亡する運命にあるから、約 75% に及ぶ初期胚淘汰（Fig. 1 参照）の約 3 分の 2 は染色体異常を原因として起こったことになる。ヒトの卵子や初期胚の染色体研究は、ヒトの胚淘汰の原因を決定するうえで重要な決め手となるものであるから、今後より正確な情報が提供されることが強く望まれる。

6. ヒトの精子染色体研究

精子の染色体は、受精後卵内で雄性前核染色体として形成される。当然、同種の卵子でなければ受精が成立しないので、ヒト卵子を必要とする。ヒト卵子をこの目的で多数入手することは不可能に近いので、精子染色体研究は全く行われていなかった。しかし、ゴールデンハムスターの卵子をヒト卵子の代用としてヒト精子を侵入させることができた（Yanagimachi *et al.*, 1980; Ishikiriyama

1976），ヒト精子染色体の研究も自由に行えるようになった（Fig. 2）。われわれも日本人男性の染色体研究を始めて数年になるが（Kamiguchi and Mikamo, 1986），最近までの精子染色体異常自然発生率研究の結果を Table 6 に示してある（Mikamo *et al.*, 1989）。染色体異常をもつ精子の発生率は人によって大きく異なり、3%～22% の個人差がみられる。しかし、平均値は 14%～15% で、研究開始当初からほとんど変わっていない。異数性の精子出現率は低く（1.4%），構造的異常をもつ精子の頻度が甚だ高いのが際立った特徴である。構造的異常の約 90% は切断と断片である。このような異常をもつ精子が受精した場合、胚は染色体の部分を欠失することになるから、多くの場合、発生初期のうちに淘汰されてしまう。ただし、欠失が微小であれば生き残って出産することもあるが、ほとんどは先天異常となるであろう。実際、精度の高い分染法が発達してきた結果、従来原因不明とされていた先天異常が、実は染色体の微小部分の欠失によるものであったという例が数多く報告されるようになった。しかも、それらの大多数が精子由来の異常であることが分かってきた（Chamberlin and Magenis, 1980; Ishikiriyama

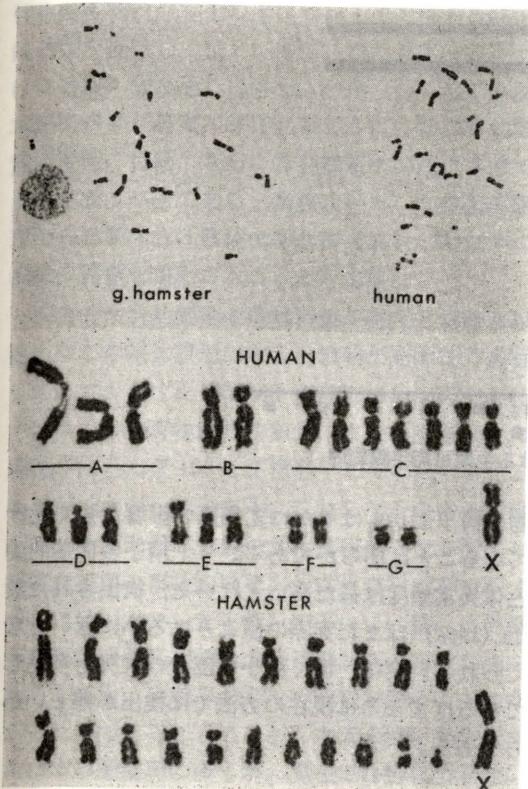


Fig. 2. ヒト精子によって受精されたハムスター卵の1細胞期染色体標本（左：ハムスター卵子由来の核板、右：ヒト精子由来の核板）およびそれらの核型。

Table 6. ヒト精子における染色体異常自然発生率

個体数	分析精子数	染色体異常 (%)		
		高数性	低数性	構造異常
26	9280	63 (0.7±0.6)	62 (0.6±0.5)	1357 (13.9±4.2)

et al., 1986）。

この精子染色体研究は、放射線や化学物質の配偶子レベルにおける影響の検討にも応用されるようになり、試験管内での実験研究も自由に行えるように発展している（美甘ら, 1987; Kamiguchi *et al.*, 1987）。その結果、以下のような重要な事実が明らかになった。

1) 構造的異常の大多数は、第2成熟分裂以降射精までの約 40～50 日の間に生じた DNA 障害に起因するものである。

2) 精子頭部内の DNA 障害は修復されるこ

となしに蓄積されるから、変異原の影響が正確に染色体異常として反映される。

3) ヒト精子の構造的染色体異常出現率は、実験動物の場合（0.9%～1.4%）よりはるかに高い（14%～15%）。

4) ヒト精子染色体は実験動物のそれより 2～6 倍も放射線高感受性である。また化学物質に対しても高い感受性をもっている。

7. ヒトで染色体異常が多発する理由

ヒトの生殖の際立った特徴は初期胚淘汰が多発していて、その原因の多くが染色体異常であることである。このことを理解するために、上述の染色体研究の成果を踏まえて、染色体異常の種類別の成因や生成起源を整理してみると、以下の 1)～3) に要約することができる。

1) 異数性：大多数は卵子の成熟分裂の染色体不分離で生ずる。精子形成過程では異数性は淘汰されて、精子まで発達できるものは少ない。

2) 倍数性異常：卵子の極体放出抑制にもよるが、多精子受精が主因である。多精子受精は卵子の防柵機構の欠陥や卵管受精部位の精子数の増加などによるから、眞の原因は卵子側または母体側にある。

3) 構造的異常：大多数は精子側に原因がある。精細胞期（第2成熟分裂以後）から後で生じた DNA の傷害が原因となる。卵子内では DNA 傷害の修復機構がよく働くので、卵子側からもたらされるものは少数である。

異数体を生じさせる染色体不分離の最も重要な原因是母体の加齢や遅延排卵、遅延受精などによる卵子のエイジングである（Mikamo, 1968, 1976, 1978; Mikamo and Hamaguchi, 1975）。後の二者は倍数性異常の主因でもある。卵子のエイジングは生殖にとって極めて不利な現象であるのに、ヒトでは非常に頻繁に起こっていると考えられる。ヒトの生殖生物学的特性として性行動が生殖そのものとは無関係に行われる事が大きな理由である。高等な靈長類のなかでは生殖目的以外の交尾行動が観察されることもあるが、自然状態の動物では性行動は生殖のための合目的的行為として行われるものである。エイジングによって

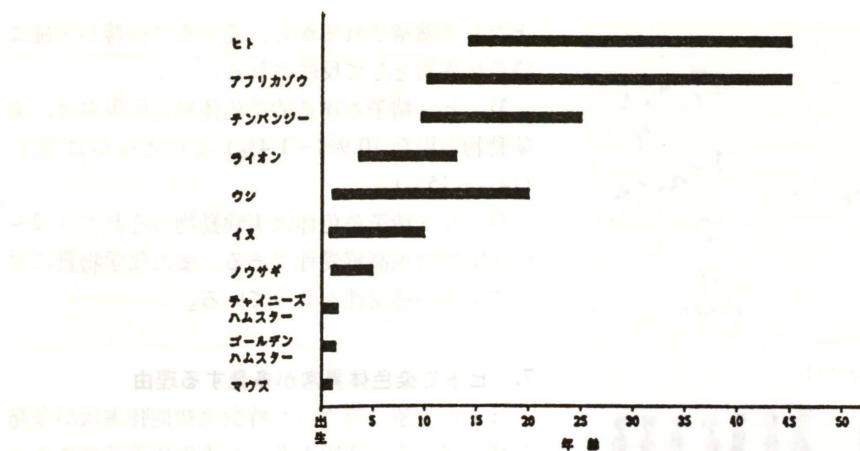


Fig. 3. 哺乳動物の雌における生殖可能年齢範囲.

退行変性した卵子が受精するようなことは、後述する様に、有性生殖の基本原理に全く合わないことである。

ヒトはアフリカ象とともに哺乳類中で雌性成熟に要する年月と生殖可能年限とが最も長い (Fig. 3)。したがって、網糸期卵子の貯蔵期間も最も長いことになり、加齢による卵子の退行変性だけでなく、環境変異原の卵子への影響の蓄積もまた哺乳類中で最大となることがよく理解できる。一方、ゲッ歯類では母体加齢による染色体異常の増加はヒトにおけるほど顕著ではない。ゲッ歯類は僅か2~3ヶ月齢で排卵を開始し、1~2年齢で生殖を終了するから卵子の貯蔵期間は非常に短くて、加齢の影響も環境変異原の影響もヒト卵子よりも少ないと想定される。家畜の場合も成熟までに要する年月は一年を越すものは殆どなく (Fig. 3)、雌の生殖可能年限も意外に短いものが多い。また経済性の観点から加齢動物による生産が人為的に抑制されている点も、結果的に生殖効率を高く保つことに働いている (Table 2)。

精子側が主因となる構造的染色体異常の自然発生率は、マウス、ハムスターなどでは 0.9%~1.4% (Mikamo and Kamiguchi, 1983b; Matsuda *et al.*, 1983) であるのに対してヒト精子では 14%~15% と桁違いに高い (Mikamo *et al.*, 1989)。また、放射線感受性でもヒト精子の方が2~6倍も多い (美甘ら, 1987)。染色体の切断が変異原による DNA 傷害をもとに生ずることは十分に証明されていることで、ヒト精子が、実験動

物の精子よりもはるかに変異原の影響を強く受けていることは明らかである。ヒト精子の構造的染色体異常頻度はまだ高いとはいえるが、検出された数値 (14%) はまだ実際の値よりはるかに低いと考えられる。実は、極く微小な部分の欠失も多発しているはずなのに現在の方法では検出が難しいからである。

8. 有性生殖の進化とその基本戦略を侵す環境変異原

生物はすべて自然淘汰と適応の結果、それぞれの種が独自の生殖法を発達させて来ているが、すべて最も高い効率で正常な子孫を生産し得るように進化してきたものである。現存の生物は皆この子孫繁栄の戦略を勝ち取ってきたものであるから、生存圏の条件が正常範囲に保たれていれば生態系のバランスのなかで繁殖はほぼ不变に維持されているはずである。

有性生殖は、単純な増殖法である無性生殖と違って、生物進化の機会を豊かにする生殖法としてそれ自体が大いに進化発展したので、単純なものから極めて複雑精緻なものまで甚だ多種多様である。如何に多様とはいっても、有性生殖には共通・不变の基本的原理がある。それは、第一に正常な雌性配偶子と雄性配偶子を形成すること、第二にこれらが必ず正しいタイミングで邂逅することの二つである。これらの条件が確実にみたされれば、受精卵は種としての、また個体としての遺伝的プログラムに従って発生を進行させる。すべての有

性生殖生物は、進化の過程で種々の形態的・機能的改変を経験して来ているが、この基本的原理だけは着実に守り通してきた。いや、むしろこの基本原理がより着実に守られるように生物自身の形態、機能、行動、さらに社会構造まで進化させてきたと云うべきである。当然ながら、この基本原理から逸脱すれば個体であれ種であれ、ただちに淘汰の運命を負わされることになる。

人為的な自然破壊や環境汚染が甚だしくなる以前にはこの基本原理に則った戦略が支障なく進行していく、わずか 30~40 年前さえ山野や海辺では多くの無脊椎動物や魚類、また両生類などの卵塊がほとんど 100% 正常発生していたのを見ることができたものである。これらはそのまま孵化して、おびただしい数の幼生や稚魚となり天敵の犠牲や不測の事故をのぞいては生存をおびやかすものは殆どなかったと云ってよい。勿論、より高等な鳥類や哺乳類でも食物連鎖関連の犠牲があったとしても、生殖そのものが障害を蒙ることはなかったのである。ところが、本来 100% 発生できたはずの受精卵の多くが、現在では孵化できない卵、出産できない胚として死滅しているため、野生生物の繁殖の効率は全般的に甚だしく低下している。

本稿では、ヒトの生殖効率が他の哺乳動物と比べて非常に低い理由として、初期胚の淘汰とその主原因である染色体異常が頻発しているという事実を具体的に示した。さらに、ヒトの卵子も精子も他の動物のものと比べて環境変異原の影響をより強く受け、染色体異常が生じ易い性質を持っていることを指摘した。生態系のなかでは、高次の消費者（肉食動物）ほど環境汚染の濃縮の悪影響を受け易いものである。ヒトの生殖効率の甚だしく低い数値をみるとかぎりでは、絶滅しつつある哺乳動物のそれに近いもののような印象さえ受けれる。

生物は環境汚染のないところで進化してきた。その過程では、ヒトの生殖可能年齢範囲が高年齢域に移動してきたことや (Fig. 3) 生態系内により高次の消費者に発達してきたことなどの変化自体は、生殖上不利な問題を起す原因にはならなかつたはずである。たしかに、次第に環境変異原から

の影響を受け易い性質に傾いてきたことは事実であるが、危険な変異原が殆どない環境では生殖の基本戦略が侵されるほどの害は生じなかつたであろう。

9. おわりに

人類は他のすべての生物と異なり環境抵抗を自らの力で緩和するという特殊能力を駆使して発展してきた。その結果はかえって巨大人口をかかえることになって苦慮しているところであるが、発展途上国の人口増を抑制できるまでにはなお長い時間を要するであろう。ところが一方、先進諸国ではすでに人口増加率の低下を憂えているところも少なくない。しかも、先進諸国の生活環境には物理的、化学的変異原が急速に増加しつつあるから、これが胚淘汰の頻度を上昇させる結果、生殖効率はさらに低下する可能性が大きい。これら人口再生産にかかる 2 つの相反する現象をいかに制御して行くかは、人類の今後の大きな課題である。ただし、ここで取り上げた染色体異常による胚淘汰は環境汚染を軽減させることで減少する可能性があるから、ヒトの生殖効率の低下は決して不可逆的な性質のものではないという解釈が出来る。環境問題における人類の叡知に期待したい。

参考文献

- Angell, R. R., A. A. Templeton and R. J. Aitken (1986) Chromosome studies in human *in vitro* fertilization, *Hum. Genet.*, **72**, 333-339.
- Bongso, A., S. N. Ng, S. Retnam, H. Sathananthan and P. C. Wong (1988) Chromosome anomalies in human oocytes failing to fertilize after insemination *in vitro*, *Human Reprod.*, **3**, 645-649.
- Boué, J., A. Boué and P. Lazar (1975) The epidemiology of human spontaneous abortions with chromosomal anomalies, In: R. J. Blandau (Ed.), *Aging Gametes*, Karger, Basel, pp. 330-348.
- Chamberlin, J. and R. E. Magenis (1980) Parental origin of de novo chromosome rearrangements, *Hum. Genet.*, **53**, 343-347.
- Djalali, M., B. Rosenbusch, M. Wolf and K. Sterzik (1988) Cytogenetics of unfertilized human oocytes, *J. Reprod. Fert.*, **84**, 647-652.
- Edmonds, D. K., K. S. Lindsay, J. F. Miller, E. Williamson and P. J. Wood (1982) Early embryonic mortality in women, *Fertil. Steril.*, **38**, 447-453.
- Hertig, A. T., J. Rock and E. C. Adams (1956) A

- description of 34 human ova within the first 17 days of development, Amer. J. Anat., **98**, 435-494.
- Ishikiriyama, S., T. Kamei and N. Niikawa (1986) Origin of de novo chromosome rearrangements, Jpn. J. Human Genet., **31**, 149.
- Kamiguchi, Y. and K. Mikamo (1986) An improved, efficient method for analyzing human sperm chromosomes using zona-free hamster ova, Am. J. Hum. Genet., **38**, 724-740.
- Kamiguchi, Y., H. Tateno, M. Shimada and K. Mikamo (1987) X-ray-induced chromosome aberrations in human spermatozoa, In: H. Mohri (Ed.), New Horizons in Sperm Cell Research, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, pp. 117-123.
- Martin, R. H., M. M. Mahadevan, P. J. Taylor, K. Hildebrand, L. Long-Simpson, D. Peterson, J. Yamamoto and J. Fleetham (1986) Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes, J. Reprod. Fert., **78**, 673-678.
- Matsuda, Y., T. Yamada and I. Tobari (1985) Studies on chromosome aberrations in the eggs of mice fertilized *in vitro* after X-irradiation, Mutat. Res., **148**, 113-117.
- Michelmann, H. W. and L. Mettler (1985) Cytogenetic investigation on human oocytes and early human embryonic stages, Fertil. Steril., **43**, 320-322.
- Mikamo, K. (1968) Intrafollicular overripeness and teratologic development, Cytogenetics, **7**, 212-233.
- 美甘和哉 (1976) 卵子のエイジングと染色体異常, 医学のあゆみ, **97**, 459-463.
- 美甘和哉 (1978) 染色体異常の発生要因, 外村晶編, 染色体異常一ヒトの細胞遺伝学, 朝倉書店, pp. 195-220.
- 美甘和哉 (1978) 生殖細胞のエイジング, 代謝, **15**, 3-11.
- Mikamo, K. and H. Hamaguchi (1975) Chromosomal disorder caused by preovulatory overripeness of oocytes, In: R. J. Blandau (Ed.), Aging Gametes, Karger, Basel, pp. 72-97.
- Mikamo, K. and Y. Kamiguchi (1983a) A new assessment system for chromosomal mutagenicity using oocytes and early zygotes of the Chinese hamster, In: T. Ishihara, M. S. Sasaki (Eds.), Radiation-Induced Chromosome Damage in Man, Alan R. Liss Inc., New York, pp. 411-432.

- Mikamo, K. and Y. Kamiguchi (1983b) Primary incidences of spontaneous chromosomal anomalies and their origins and causal mechanisms in the Chinese hamster, Mutat. Res., **108**, 265-278.
- Mikamo, K., Y. Kamiguchi and H. Tateno (1989) Spontaneous and *in vitro* radiation-induced chromosome aberrations in human spermatozoa: Application of a new method, Environ. Mol. Mutagen., in press.
- 美甘和哉, 上口勇次郎, 立野裕幸, 島田昌幸 (1987) ヒト配偶子における放射線誘発染色体異常の数量化, 石原隆昭・戸張巣夫編, 染色体研究の新しい展開—ヒトの染色体を中心として一, 放射線医学総合研究所, pp. 64-73.
- Papadopoulos, G., A. A. Templeton, N. Fisk and J. Randall (1989) The frequency of chromosome anomalies in human preimplantation embryos after *in vitro* fertilization, Human Reprod., **4**, 91-98.
- Plachot, M., A.-M. Junca, J. Mandelbaum, J. de Grouchy, J. Salat-Baroux and J. Cohen (1987) Chromosome investigations in early life. II. Human preimplantation embryos, Human Reprod., **2**, 29-35.
- Plachot, M., A. Veiga, J. Montagut, J. de Grouchy, G. Calderon, S. Lepretre, A.-M. Junca, J. Santalo, E. Carles, J. Mandelbaum, P. Barri, J. Degoy, J. Cohen, J. Egozcue, J. C. Sabatier and J. Salat-Baroux (1988) Are clinical and biological IVF parameters correlated with chromosomal disorders in early life: A multicentric study, Human Reprod., **3**, 627-635.
- Roberts, C. J. and C. R. Lowe (1975) Where have all the conceptions gone? Lancet, **1**, 498-499.
- Veiga, A., G. Calderon, J. Santalo, P. N. Barri and J. Egozcue (1987) Chromosome studies in oocytes and zygotes from an IVF, Human Reprod., **2**, 425-430.
- Wrambsy, H. (1987) Chromosome analysis of human oocytes and cleavage stage ova: A study within a clinical *in vitro* fertilization program, Ph. D. thesis, Lund University, Malmö.
- Yanagimachi, R., H. Yanagimachi and B. J. Rogers (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.

マウス優性致死と特定座位

国立遺伝学研究所 土川清

Table 1 に与えられたテーマである優性致死法 (Dominant-lethal test) と、特定座位法 (Specific-locus test) の概要を示しました。はじめに特定座位法からお話ししますと、すでに午前中に行われました講演の中で、ショウジョウバエとメダカにおける例が示されました。マウスを用いる特定座位法では、突然変異の指標として、毛色や眼色などのように外観から識別できる可視的マーカーを使用するものと、ヘモグロビン型やアイソザイムなどの生化学的マーカーを用いるほかに、皮膚移植の成否による組織移植に関する抗原性の突然変異を対象にする 3 つの方法があります。これらのうち最も多くの変異原のデータが蓄積されてきているのは、毛色などの可視的マーカーを用いる特定座位法であって、遺伝子突然変異と小欠失を検出でき、Russell や Ehling らによって多くのデータがえられてきております。彼等は当初放射線の突然変異誘起作用をしらべるため、101 と C3H 系統との交雑による F₁ マウスに照射しておいて、PT テスターと交配する方法によって突然変異を検出し、その後化学物質についても同じ交配法を用いてきました。放射線についてはその種類や照射の条件の効果、また生殖細胞の分化段階に対する突然変異効果などを手わけしてしらべ、遺伝におよぼす影響を検討し評価する上で、同一の系統を用いてえられたデータが必要であったと考えます。しかし化学物質の場合には、しばしばその生体内代謝が動物の系統間で異なるため、ちがう系統を使用してえられたデータも必要であり、あとで渋谷さんの、Russell らとは異なる系統を用いた実験のお話がありますが、今後環境変異原の遺伝への影響を評価する上で考慮すべき点であろうと考えます。

次に優性致死法についてお話しします。この方法では初期死胚の増加を指標にして、検体の染色体

切断、再配列や分離の誤りなど、染色体異常の誘起性を検出できると云われております。しかし変異原によって精子に生じた染色体の損傷が、受精後に卵内において修復されることがあります。しかもその修復能には系統差もみられ (Generoso ら, 1971), さらに或ときには修復能が増強されることもある (土川, 1980), 優性致死の出現率が著しく変動するため、優性致死法よりも染色体の相互転座を検出する遺伝性転座 (試験) 法 [Heritable translocation test] が、より感度がよいと云われております。Russell らも遺伝障害を評価する上で、特定座位法と遺伝性転座法が、哺乳動物の生殖細胞に対する、変異原のスタンダードテストとして有意義であろうと云っております。

これに関連して、野村先生の先程のウレタンのお話にふれたいとおもいます。ウレタンはいわゆる催奇形物質であり、肺癌も誘発します。ところが主として哺乳動物による変異原性試験の結果を Table 2 に示しましたが、最近 Russell が報告している特定座位法では陰性であり、優性致死法の結果は Bateman が最初に報告し、つづいて演者は 2 系統のマウス、すなわちウレタンによって奇形がほとんど誘発されない CBA 系統と、同じ投与量で誘発率の高い C3H の亜系を用いて行なったのですが、結果はすべて陰性でした。その後、野村先生も ICR 系を使用して試験を行なわれていますが、優性致死法の結果はやはり陰性になっております。また精子の形態異常試験でも、使用された系統間に差異が無く、結果は陰性でした。さらにマウスのスポットテストと、特定座位法による結果は、よく合致すると云われておりますが、演者のスポットテストの結果は、特定座位法におけると同様に陰性でした。しかし野村先生のスポットテストの結果は陽性になっております。他方、野村先生がショウジョウバエを用い

Table 1. Outlines of specific-locus test, dominant-lethal test and heritable translocation test

Method	Diagnostic phenotype	Primary genetic lesion(s)
<i>Specific-locus test</i>		
with visible markers	External features	Intragenic mutations, small deficiencies
with biochemical markers	Electrophoretic pattern	
with immunological markers	Skin-graft rejection	
<i>Dominant-lethal test</i>	Early embryonic death	Breakage, rearrangement, mis-segregation
<i>Heritable translocation test</i>	Productivity disturbance	Reciprocal translocation
SLT, HTT: Mammalian germ-line standard tests.		

Table 2. Negative results of mutagenicity experiments with urethane

Specific-locus test: Russell et al., 1987 (102×C3H)
Dominant-lethal test: Bateman, 1967; Tufikawa, 1968 (CBA, C3H ₆ B/Fe); Nomura, 1982 (ICR)
Sperm-head anomaly test: Wyrobek et al, 1975; Bruce et al, 1979 ((C57BL/6×C3H)F ₁), Topham, 1980 ((BALB/c×CBA)F ₁)
Drosophila
Sex-linked recessive lethal test, translocation test: Nomura, 1979
Mouse spot test: Tufikawa and Harada, 1972
SCE in mouse spermatogonia (Roberts et al. 1980)
Testicular DNA synthesis (Seiler, 1977)

て、伴性劣性致死と転座の誘発をしらべておられます。結果はいずれも陰性でした。そのほか Table 2 の欄外に、マウスの精原細胞における SCE と、精巣の DNA 合成をみた結果、両者とも陽性であったという報告があることを示しました。なお Table 2 の特定座位法での使用系統が 102×C3H となっておりますが、これは Russell らが 101 として用いてきた系統が、実は C3H と交雑していたらしいことが最近になってわかったため、系統名が 102 に変更されています。

以上にウレタンの変異原性に関する、これまで

の報告の概要をお話しましたが、このように種々な試験結果が陰性であるにもかかわらず、ウレタンが癌や奇形の発現に関与する遺伝性の変化を、生殖細胞に誘起するという実験結果は、本シンポジウムのテーマでもある、変異原による遺伝障害を考える際に、拠りどころとなる特定座位法を含む従来のスタンダードテストおよび、それに準じた試験法または、それらの方法によってえられた結果に問題があるのか、それとも別の理由によるものか、後刻この点について皆さん方の御討論がいただけたらとおもいます。

N-Ethyl-N-nitrosourea によるマウス始原生殖細胞の突然変異誘発

(財)食品薬品安全センター秦野研究所 遺伝学研究室 濱谷 徹, *室田哲郎
堀谷尚古, 松田 洋
原 巧

1. はじめに

1979 年に W. L. Russell はマウス特定座位試験によって、N-ethyl-N-nitrosourea; ENU が、マウス精祖細胞に対して高頻度に劣性可視突然変異を誘発することを発見した (Russell et al., 1979)。そしてこの発見を契機として多くの研究者によって、マウス生殖細胞における突然変異誘発についての研究が、主として ENU を用いて、活発に実施され始めている。しかし、これらのすべてではマウス成体の生殖細胞に対して、ENU を作用させたもので、胎仔期の生殖細胞 (始原生殖細胞, primordial germ cells; PGC) に対して化学物質を用いた研究例はない。

PGC はこれまでほとんど突然変異誘発についての研究対象とされていなかったが、生殖細胞の形成過程において最も根幹に位置する細胞で、また雄と雌とではその発生過程が大きく異なることが知られている (Mintz, 1960; Heath, 1978)。また、ヒトとマウスでは PGC の発生過程には基本的な違いは認められない (Monk and McLaren, 1981)。そのためマウス PGC での突然変異誘発についての結果は化学物質のヒトへの遺伝毒性を考える場合に重要であると考えられる。一方、著者らはマウススポットテストで ENU を含むアルキルニトロソ尿素を胎生 10.5 日に投与し、これらのアルキルニトロソ尿素は投用量に依存して、またアルキル鎖が短い程、体細

胞突然変異を強く誘発することを認めた (Shibuya et al., 1982)。またこの際、これらのアルキルニトロソ尿素は出生した F₁ 雄における精巣重量の増加抑制作用もあり、この作用も投用量に依存し、またアルキル鎖が短い程、強く現れることが認められた (Fig. 1 および 2)。これらの結果はマウスの胎生 10.5 日に経胎盤的に投与されたアルキルニトロソ尿素が、発生中のマウス胎仔において、マウスの毛色の色素を作る細胞の幹細胞であるメラノblastに対して突然変異を誘発することと、生殖細胞の幹細胞である始原生殖細胞に細胞死を生じた結果であると考えられた。これらの結果がよく対応したため、ENU が PGC に対して突然変異を誘発する可能性が予測された。

そこで、マウスの PGC に対する ENU の突然

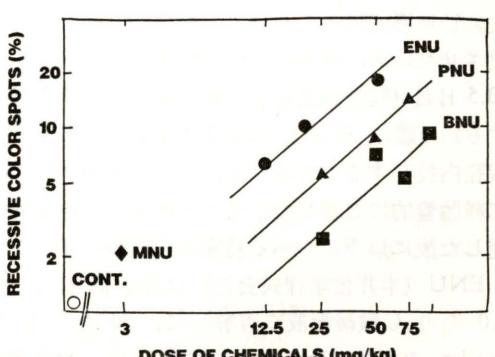


Fig. 1. Induction of recessive color spots with various alkylnitrosoureas in mouse spot test.

〒257 秦野市落合 729-5

* 現三菱化成株式会社総合研究所, 〒227 横浜市緑区鶴居町 1000

Induction of recessive mutation in mouse primordial germ cells by N-ethyl-N-nitrosourea
Tohru Shibuya, Tetsuro Murota, Nahoko Horiya, Hiroshi Matsuda and Takumi Hara
Hatano Research Institute, Food and Safety Center, Hadano-shi, Kanagawa 257, Japan

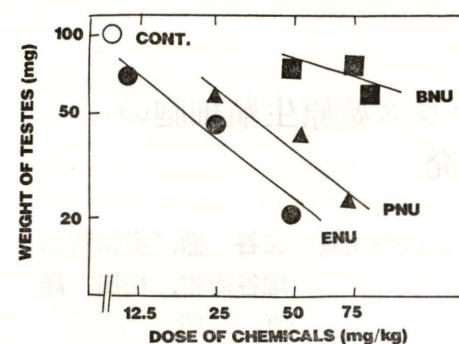


Fig. 2. Weight of testes in male mice transplacentally treated with various alkylnitrosoureas.

変異誘発能についての実験を胎生の 8.5, 10.5 および 13.5 日の異なる 3 つの発生時期で行い、またそれから得られた結果とこれまでに報告された Russell *et al.* (1979) の結果や当研究室で実施した ENU によるマウス精祖細胞期での特定座位試験の結果 (Murota and Shibuya, 1983)との比較もあわせて行い、これらの異なる生殖細胞の時期における ENU の突然変異誘発能の相違やヒトへの遺伝的影響についての検討を行った。

2. 実験材料および方法

(1) 使用動物および投与方法

用いたマウスは 9 から 10 週齢の C3H/He(A/A, B/B, C/P/C/P, D Se/D Se) の雄および雌 (静岡実験動物協同組合より購入) を用い、それらを交配させたのち、得られた妊娠 8.5, 10.5 および 13.5 日目 (腔栓確認日の午後 1 時を妊娠 1/2 日とする) の雌に 30 あるいは 50 mg/kg の ENU を腹腔内投与することにより、マウス胎仔の PGC に経胎盤的に処理した。そして出産仔が性成熟に達した後に以下に述べる特定座位試験に用いた。

ENU (半井化学株式会社) は投与直前に pH 6.0 のりん酸緩衝液に溶解して、30 ないし 50 mg/kg の用量になるように調製した。投与容量は 10 ml/kg とし、腹腔内に投与した。なお ENU の溶解から投与までの作業を 15 分以内に完了するように留意した。

(2) 特定座位試験

各々の出生仔について、出生時には外表奇形の有無について調べ、離乳時に腹部の白斑や性別に

ついて調べた。性成熟後に雄は 9 週齢以上の PW 雌 (*a/a, b/b, c^{ch} p/c^{ch} p, d se/d se*) と、雌 C3H は PW 雄と交配させた。このテスター系統のマウスは Tutikawa *et al.* (1986) によって近交系として樹立されたもので、静岡実験動物協同組合より購入して使用した。これらの交配から得られた F₁ は離乳時に毛色、性別、外表奇形などについて調べ、そのうち毛色や耳の外形から突然変異が疑われるものについては、さらに交配実験を行い、Searle の記載 (Searle, 1984) にしたがって突然変異をした遺伝子座を確認し、さらにそれらがホモの場合の生存性について調査した。毛色が C3H タイプ (アグチ、野性色) の個体は父親あるいは母親の PGC に突然変異が誘発されなかつものとみなし、カウントした後、淘汰した。

これらの結果について異なる発生時期および同用量の ENU 処理によって得られた、雄親あるいは雌親由来の F₁ 群ごとに集計した。なお 8.5 日齢については 50 mg/kg 群のみについて実施し、また 13.5 日齢の 30 mg/kg の雌については実験を行わなかった。

これらの誘発突然変異率の計算にあたっては、Engles (1979) に従い、観察された独立の突然変異数ではなく、クラスター突然変異を含めた突然変異個体の合計を基準として算定した。また対照群として、これまでに当研究室で蓄積している無処理の C3H 雄と PW 雌との交配によって得られた F₁ の結果を用いた。

3. 結果

(1) 妊性

ENU 投与による妊性の低下は PGC の細胞死によるものと考えられるが、妊性の低下は雄よりも雌において顕著に認められた。

雌については 8.5 日齢では 50 mg/kg 群で約 80% の個体に妊性が認められたが、発生時期が進むとともに低下し、10.5 日齢では 30 mg/kg でも約 30%, 50 mg/kg では 15% となった。さらに 13.5 日齢では 30 mg/kg 群は交配を行わなかったので妊性は不明であるが、50 mg/kg 群では全く不妊となった。

雄では発生日齢による明らかな妊性の低下は、

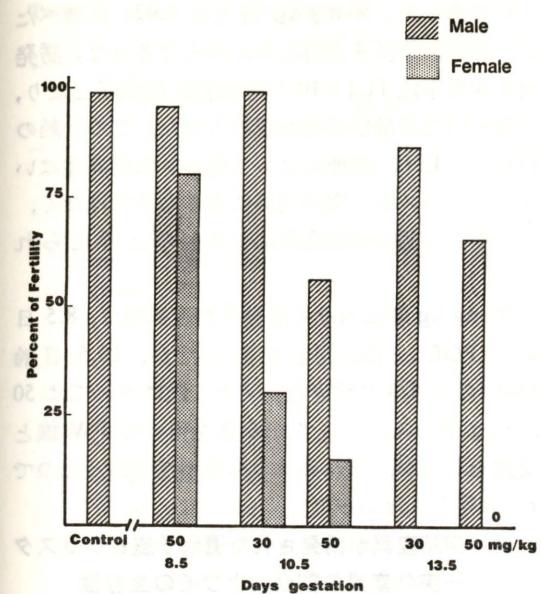


Fig. 3. Fertility of F₁ male and female mice treated with ENU.

雌における場合に比べてそれほど明らかではなかったが、発生の日齢とともに妊性が低下する傾向を示し、10.5 および 13.5 日齢のいずれにおいても妊性は ENU の用量に依存して低下した。

おのおのの発生日齢の PGC の ENU 処理による出生仔の妊性については Fig. 3 に示した。

(2) 誘発突然変異率

ENU による PGC のおのおのの発生時期における誘発突然変異率については Table 1 にまとめた。

Table 1. Induced mutation frequency in mouse primordial germ cells treated with N-ethyl-N-nitrosourea

Dose of ENU (mg/kg)	Sex	Developmental stage of PGC (days)		
		8.5	10.5	13.5
Non-treated control	0.0 (0/17,876)			
30	Male	—	10.1 ^{a)} (3/4,975)	6.3 (3 ^{b)/7,882)}
	Female	—	0.0 (0/118)	—
50	Male	18.1 (7/6,440)	69.0 (22/5,314)	11.1 (4/6,024)
	Female	13.7 (2/2,441)	101.6 (1/164)	Infertile
Stem-cell spermatogonia	150	57.2 (10/2,916)		

^{a)} Induced mutation frequency × 10³/locus/gamete
(No. of mutants/No. offspring observed)

^{b)} contains 1 mosaic mutant

て示した。対照群においては、これまでに 17,876 匹の F₁ について調べたが、突然変異体は得られていない。そのため、自然突然変異率は 0.0 × 10⁻³/遺伝子座/配偶子となり、各群の突然変異率をそのまま誘発突然変異率とみなした。

(i) 8.5 日齢 PGC

8.5 日齢では 50 mg/kg の雄および雌についてのみ実験をした。雄では 6,640 匹を調べ、7 匹の変異個体が得られた。そのうちの 3 匹は同一の雄から得られ、突然変異が同じ遺伝子座に認められたのでクラスター突然変異によるものと判断した。そのため、この群では 4 回の独立の突然変異が誘発されたものと判断した。誘発突然変異率は得られた変異個体を基にして計算すると 18.1 × 10⁻³/遺伝子座/配偶子となった。

雌については 2,441 匹について調べたが、突然変異個体は se 遺伝子座のみで 2 匹得られ、これらはクラスター突然変異であると判断された。誘発突然変異率は 6.8 × 10⁻³/遺伝子座/配偶子となつた。

以上の結果から 8.5 日齢においては雌のサンプル数がやや少ないので、誘発突然変異率には雄と雌の間で大きな差はないものと考えられた。

(ii) 10.5 日齢 PGC

10.5 日齢の PGC については雄雌ともに 30 および 50 mg/kg について実験を行った。雄では 30 mg/kg 群では 4,975 匹を調べ、3 匹の突然変異個

体が回収された。そのうちの 2 匹はクラスター突然変異によるものであった。誘発突然変異率は 10.1×10^{-5} /遺伝子座/配偶子となった。

50 mg/kg 群では 30 mg/kg 群の結果とは大きく異なり、多数の突然変異体が得られた。すなわち、この群では 5,314 匹中の 22 匹が変異体マウスであった。またこれらの約半数はクラスター突然変異によって出現したものと推定された。誘発突然変異率は 69.0×10^{-5} /遺伝子座/配偶子となり、同用量の 8.5 日齢の PGC に比べ極めて高い値を示した。

以上の結果から、雄の 10.5 日齢 PGC においては ENU の 30 と 50 mg/kg との間で誘発突然変異率に大きな差があることが認められた。

雌では妊性が低いため、調査した F_1 の数は限られていた。すなわち、30 mg/kg 群では調べた 118 匹中で変異体は認められなかったが、50 mg/kg 群においては 164 匹中に 1 匹の突然変異体が認められた。50 mg/kg 群における誘発突然変異率は 101.6×10^{-5} /遺伝子座/配偶子となり、同用量の雄に比べかなり高い値となった。しかし雌での値についてはサンプル数が少ないので絶対視は出来ず、雄雌の間に大きな相違があるとは言えない。

(iii) 13.5 日齢 PGC

雄については 30 および 50 mg/kg での実験を行った。30 mg/kg 群では 7,882 匹について調べたが突然変異体は 3 匹得られたのみであった。誘発突然変異率は 6.3×10^{-5} /遺伝子座/配偶子と低

い値であった。50 mg/kg 群でも 6,024 匹調べたが、変異個体は 4 匹得られたのみであった。誘発突然変異率は 11.1×10^{-5} /遺伝子座/配偶子となり、両群の間で用量依存性が認められた。この日齢の PGC の ENU 处理によって得られた変異体はいずれもクラスター突然変異によるものではなく、それぞれ別個の突然変異によるものと考えられた。

50 mg/kg 群における誘発突然変異率は、8.5 日齢の PGC とほぼ同じであったが、10.5 日齢 PGC の約 1/3 にすぎなかつた。雌については 50 mg/kg 群のみについて、96 匹を用いて PW 雄と交配をしたが、それらはすべて不妊であったので F_1 は得られなかつた。

(3) 突然変異が誘発された遺伝子座とクラスター突然変異の割合およびその生存性

(i) 誘発突然変異の遺伝子座における分布

ENU によるマウス PGC に対する突然変異の誘発は、マーカーとして用いたすべての遺伝子座において認められた。

これまでの結果では、この試験から得られた突然変異体数は 25 である。そのうち、独立に突然変異が誘発された遺伝子座は、d 遺伝子座がもっとも多く 12 例、次に p 遺伝子座が 5 例、b および c 遺伝子座が 3 例、a および se 遺伝子座がそれぞれ 1 例であった。以上の結果から、ENU によるマウス PGC の突然変異は d 遺伝子座に最も多く誘発され、p 遺伝子座がこれに次いで多い結果となった (Table 2)。しかし、変異体の数が限

Table 2. Summary of induced mutation on mouse primordial germ cells treated with N-ethyl-N-nitrosourea

Stage of PGC (days)	Group	Mutation Locus at						Proportion of cluster mutation
		Dose of ENU (mg/kg)	a	b	c	d	p	
Male								
8.5		50	0	0	0	1	3	0
10.5		30	0	0	0	2	0	0
10.5		50	1	1	2	6	1	0
13.5		30	0	0	0	2	0	0
13.5		50	0	2	1	1	0	0
Female								
8.5		50	0	0	0	0	0	1
10.5		50	0	0	0	0	1	0
Total			1	3	3	12	5	1
								10/25

Table 3. Results of allelism test and viability under homozygous condition in mouse mutants induced by N-ethyl-N-nitrosourea at various germ stages

Germ cell stages Dose (mg/kg)	Viability	Numbers in mutants at locus								
		a	b	c	p	d	se	Hba	Hbb	Total
PGC (10.5 day) 30 and 50	viable	1	—	1	1	5	—	—	—	8
	lethal ^{a)}	0	—	0	0	0	—	—	—	8
	Total	1	0	1	1	5	0	—	—	8
Stem-cell Spermatogonia	viable	—	2	1	2	2	—	1	1	9
	lethal ^{a)}	—	1	0	0	0	—	0	0	1
	not tested	—	0	1	0	1	—	0	0	2
	Total	0	3	2	2	3	0	1	1	12

^{a)} lethal at homozygous condition in embryonic stage

られているので、ENU によってマウス PGC に対して、突然変異が誘発された遺伝子座の特異性については結論出来ない。

(ii) 突然変異に占めるクラスター突然変異の割合

ENU 处理によって、マウス PGC ではクラスター突然変異が多発した (Table 2)。クラスター突然変異の割合を雄について、PGC の発生時期別に集計すると、8.5 日齢 PGC では 4 例中 2 例 (50%)、10.5 日齢 PGC では 13 例中 7 例 (54%)、さらに 13.5 日齢 PGC では 6 例中 0 匹 (0%) であった。雌については例数は少ないが 8.5 日齢 PGC の 1 例がクラスター突然変異によるものであったが、10.5 日齢 PGC での 1 例はそれによるものではなかった。

以上の結果からマウス PGC において、ENU によって誘発された突然変異の中でクラスター突然変異の占める割合は PGC の発生時期が早いほど、その頻度が高い傾向が認められた。またクラスター突然変異がどの遺伝子座で多発するかについては明らかな特徴は認められなかった。

(iii) 誘発変異遺伝子のホモでの生存性

誘発された変異遺伝子をホモにした場合の生存性についての検定は現在進行中である。しかし、これまでの結果では 10.5 日齢 PGC において誘発された突然変異体 8 例のすべてが、ホモの状態にした場合に生存性であることが認められている (Table 3)。

4. 論議

ENU は W. L. Russell (1979) によってマウス

精祖細胞に高頻度に突然変異を誘発することが認められた。著者らはマウススポットテストで ENU が体細胞突然変異誘発作用とともに、PGC の細胞死を引き起こす作用があることを認めた (Shibuya et al., 1982) ために、ENU によるマウス PGC の特定座位試験を実施した。

その結果、PGC の発生時期による誘発突然変異率の変化については 10.5 日齢において、その誘発突然変異率が非常に高く、8.5 および 13.5 日齢 PGC ではほとんど同じ誘発率を示した。しかし、10.5 日齢 PGC では 30 および 50 mg/kg 群との間で誘発突然変異率は大きく異なる、50 mg/kg 群で顕著に高い誘発率となった。

雄および雌における誘発突然変異率は雌の場合、すべての日齢の 2 つの用量群で実験しておらず、またサンプル数が雄にくらべいちじるしく小さいため、結論は出来ないが、PGC に対する ENU の突然変異誘発に関して明らかな雌雄差はないものと考えられた。

F_1 雌における妊性は 10.5 および 13.5 日齢 PGC において極端に低く、とくに 13.5 日齢 PGC では、その妊性は完全になかった。胎生の 8.5 日では雄雌の間に大きな差は認められないが、10.5 日胚からは PGC の発生段階は雄と雌において大きく異なる。10.5 日胚の PGC は盛んに分裂しながら、生殖隆起に移動しつつある時期である。そして雌では胎生の 13 日頃から減数分裂に入り、出生時にはほとんど第一減数分裂が完了している (Monk and McLaren, 1981)。一方、雄では精祖細胞を形成するのは出生後である。雄と雌の間で妊性が大きく異なるのはこれら

の PGC の発生における雌雄差の反映であろう。

ENU による誘発突然変異率を用量単位 (ENU の 1 mg/kg) で計算すると、すべての日齢において精祖細胞の場合と同等あるいはそれ以上に突然変異が誘発されることになり、特に 10.5 日の 50 mg/kg 群については精祖細胞の 4 倍程度の高い誘発突然変異率であった。

経胎盤的に投与された ENU がどの程度、胎仔 PGC に到達しているかについては、今後 RIなどを用いた実験によって明らかにする必要があるが、ENU に対して発生 10.5 日胚の PGC が突然変異誘発において感受性の高い時期であることはほぼ間違いないものと思われる。しかし、PGC、特に 10.5 日齢 PGC が ENU による突然変異誘発性に対して感受性が高い点に対する明確な説明は出来ない。今後、ENU を用いて異なる発生時期の PGC に投与したり、他の変異原物質を用いて同様の実験をするなどして、この問題を解明してゆきたい。

PGC の特定座位試験については、Searle and Phillips (1971) は中性子をマウスの妊娠 12 日まで 1 週間にわたって照射し、特定座位試験を実施している。その結果、中性子を精祖細胞を緩照射した場合と比べて、その誘発突然変異率は約半分であった。また、突然変異の誘発に関して明らかな雌雄差は認められず、突然変異体の多くはクラスター突然変異であった。低 LET 放射線を用いて 13.5 日および 17.5 日のマウス胚について Carter ら (Carter et al., 1960) は、この時期の PGC は精祖細胞期に比べて突然変異の誘発率がかなり低いことを報告している。Selby (1973) はマウス雄新生仔に X 線を照射し、特定座位試験を実施したが、同線量での精祖細胞での結果に比べて誘発変異率がかなり低いことを報告している。このようにこれまでに種々の放射線を用いた結果からは PGC は精祖細胞に比べて突然変異に関して感受性が低いことが定説になっていた。

しかし、本実験では PGC、特に 10.5 日齢 PGC は ENU に関して感受性が高いという結果が得られた。また Russell ら (私信) も現在、13.5 日齢 PGC について、ENU を用いて実験中であるが、誘発突然変異率は精祖細胞と用量単位で比べる

と、両者の間には大きな差のない結果を得ている。マウス胎仔の PGC はこのように ENU に対しての感受性は高いらしい。

ENU を経胎盤的に投与した場合に、PGC においてクラスター突然変異が多く出現したことは興味深い結果である。前述の Searle and Phillips (1971) も中性子をマウス PGC に照射した場合にクラスター突然変異が多発したことを報告している。本実験の結果から ENU 处理によって、PGC の DNA 塩基のアルキル化が効率良く起き、その結果、多くの PGC は細胞死をするが、細胞死を免れた PGC のあるものに突然変異が誘発され、その突然変異した PGC に由来する精子の集団が突然変異を保持していることによるものと推察される。

マウス胚の正常発生における PGC 数については、橋本 (1988) がアルカリフィオスマターゼ染色で好染するものを PGC とみなしてマウス胎仔の連続切片でその数を算定している。その結果、PGC は倍加時間約 17 時間で対数的に増殖しており、その数は 8.5 日胚においては 100 個以下、10.5 日胚では数百個、さらに 10.5 日胚では 4000 個に達することを報告している。

ENU による細胞死については、生後 30 日齢の雄マウスの組織切片の観察からも裏付けられている。すなわち、無処理の F₁ 雄ではほとんど全ての精細管で正常な精子形成が認められるが、ENU 处理群ではその投与用量とともに、精子形成が認められない精細管の割合が増加している (Shibuya et al., 1989)。この点についても今後、ENU 处理後の PGC の生存数を組織化学的手法によって測定し、PGC におけるクラスター突然変異の成因について検討してみたい。

これまでに精祖細胞に ENU で誘発した 10 の突然変異した遺伝子について、それらをホモにした場合の生存性を調べたが、そのうちの 9 つは生存性であった (Murota and Shibuya, 1983)。この中にはヘモグロビン遺伝子座に誘発された 2 つの変異体も含まれている (Murota et al., 1982)。

PGC に ENU を処理した場合の変異遺伝子がホモになった場合の生存性についての解析は、現在進行中であるが、これまでに調べた 8 例のすべ

てが生存性であった。これらの結果は処理した生殖細胞時期が異なっても、ENU による突然変異は DNA の狭い領域に誘発されたものであることが推測される。

これまでにマウス精祖細胞で放射線の照射によって得られた d-se 遺伝子座領域の変異体のほとんどすべてはホモの状態で神経症状の緊張性後弓反射 (opisthotonic compulsion) を伴っていることが知られている (Russell, 1971; Rinchik et al., 1986)。しかし、私達が ENU を精祖細胞や PGC に処理して得た d 遺伝子座の変異体ではこのような神経症状を伴わないものも低い割合ではあるが得られている。これらのこととは ENU が放射線と異なり、DNA の狭い領域での突然変異を誘発しやすいことの反映であるかも知れない。

この点については、これらの実験から得られたマウスの d 遺伝子座の変異体のほとんどを継代して維持しているので、今後これらのマウスを用いて、ENU によって変異した d 遺伝子座の DNA の塩基配列を調べることなどにより、ENU のマウス生殖細胞の突然変異の成因について調べてみたい。

マウススポットテストの結果から、経胎盤投与した場合、PGC に細胞死を引き起こす化学物質は ENU, PNU, BNU などのアルキルニトロソ尿素のほかに dimethylbenz(a)anthracene などの多環芳香族化合物がある (Shibuya and Murota, 1984)。これらの DNA に対してその反応が異なる化学物質が、今後、これらの化学物質を異なる PGC に時期に処理して、化学物質がマウス PGC に与える遺伝的影響について調べたい。

ヒトにおける PGC の発生過程は基本的にはマウスとほとんど同じである。PGC は生殖細胞の根幹に位置する細胞であるので、一度、それに突然変異が誘発されれば、その細胞子孫である生殖細胞のすべてが突然変異体となる。PGC は ENU によって比較的容易に突然変異が誘発された。そのため種々の化学物質によってマウス PGC の突然変異誘発について研究することはヒトの PGC への化学物質の遺伝的影響を考えるために貴重なデータとなるものと考えられる。さらに現在医薬品の毒性試験で義務づけられている生殖試験の

Segment 2 の有用な検討材料ともなるであろう。

謝辞

この論説をまとめにあたって、W. L. Russell 先生 (Oak Ridge National Laboratory, U.S.A.), 土川 清先生 (国立遺伝学研究所), および藤川和男博士 (武田薬品工業株式会社, 中央研究所) の方々から有益なコメントをいただきました。これらの方々に深甚な謝意を表します。

また、この実験を遂行するにあたり、秦野研究所動物飼育管理室の皆様にも御世話になりました。あわせて感謝いたします。

この研究は厚生科学研究費補助研究事業によつて行われました。当研究所の発足以来、この研究の主任者でありました岩原繁雄先生は 10 月 1 日に逝去されました。小論を先生に捧げます。

参考文献

- Carter, T. C., M. F. Lyon and R. J. S. Phillips (1960) The genetic sensitivity to X-rays of mouse foetal gonads, *Genet. Res.*, **1**, 351-355.
Engels, W. R. (1979) The estimation of mutation rates when premeiotic events are involved, *Envirn. Mutag.*, **1**, 37-43.
橋本有弘 (1988) 哺乳類の始原生殖細胞, *細胞*, **20**, 551-554.
Heath, J. K. (1978) Mammalian primordial germ cells, in: M. H. Johnson (ed). *Development in Mammals*. North-Holland, Amsterdam, pp. 267-298.
Mintz, B. (1960) Embryological phases of mammalian gametogenesis, *J. Cell. comp. Physiol.*, **56**, (Suppl. 1), 31-47.
Monk, M. and A. McLaren (1981) X-chromosome activity in foetal germ cells of the mouse, *J. Embryo. Exp. Morph.*, **63**, 75-84.
Murota, T., T. Shibuya and K. Tutikawa (1982) Genetic analysis of an N-ethyl-N-nitrosourea-induced mutation at the hemoglobin beta-chain locus in mice. *Mutation Res.*, **104**, 317-321.
Murota, T. and T. Shibuya (1983) Genetic analysis of mutants in mice induced by N-ethyl-N-nitrosourea, *Jpn. J. Genetics*, **58**, 263-267.
Oakberg, E. F. (1984) Germ cell toxicity: Significance in genetic and fertility effects of radiation and chemicals. in *Proceedings of the "International Workshop on the Principle of Environmental Mutagenesis, Carcinogenesis and Teratogenesis"* Plenum Press, New York., pp. 549-590.
Rinchik, E. M., L. B. Russell, N. G. Copeland and

- N. A. Jenkins (1986) Molecular genetic analysis of the *dilute-short ear* (*D-Se*) region of the mouse, *Genetics*, **112**, 321-342.
- Russell, L. B. (1971) Definition of functional units in a small chromosomal segment of the mouse and its use in interpreting the nature of radiation mutations, *Mutation Res.*, **11**, 107-123.
- Russell, W. L., E. M. Kelly, P. R. Hunsicker, J. W. W. Bangham, S. C. Maddux and E. L. Phipps (1979) Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5818-5819.
- Russell, W. L., 私信.
- Searle, A. G. and R. J. S. Phillips (1971) The mutagenic effectiveness of fast neutrons in male and female mice. *Mutation Res.*, **11**, 97-105.
- Searle, A. G. (1984) The specific locus test in the mouse, in: *Handbook of mutagenicity tests procedures* (Kilby B. J., M. Legator, W. Nichols and C. Ramel eds) Elsevier, Amsterdam, pp. 371-391.
- Selby, P. B. (1973) X-ray-induced specific locus mutation rate in newborn male mice, *Mutation Res.*, **18**, 63-75.
- Shibuya, T., T. Murota and K. Tutikawa (1982) Mouse spot tests with alkylnitrosoureas, *Mutation Res.*, **103**, 311-315.
- Shibuya, T. and T. Murota (1984) Mouse spot tests with dimethylbenz(a)anthracene with and without phenobarbital pretreatment, *Mutation Res.*, **141**, 105-108.
- 瀧谷 徹, 堀谷尚古, 原 巧, 室田哲郎 (1988) アルキルニトロソ尿素によって誘発されたマウス突然変異体の遺伝的特性(要約), *遺伝学雑誌*, **63**, 594.
- Shibuya, T., N. Horiya, H. Matsuda, T. Hara, M. Katoh and T. Murota (1989) N-ethyl-N-nitrosourea induced recessive mutations in mouse primordial germ cells (abstract), *Envir. Molec. Mutag.*, **14** (S 15), 185.
- Tutikawa, K., Y. Harada and K. Moriwaki (1986) Origin and genetic background of three substrains in inbred PW mouse strain, *Ann. Rep. Natl. Inst. Genetics*, **36**, 68-69.

環境変異原研究 **11**: 73-80 (1989)

ヒト生殖細胞の突然変異—原爆被爆者の子供の遺伝生化学調査

放射線影響研究所 遺伝学部 佐藤千代子

1. 緒 言

当研究所における原爆放射線の遺伝的影響に関する研究計画は、1946年に立案され、その後それぞれの時代に使用可能な研究方法を採用しつつ、継続的に行われてきた。初期には先天性奇形、性比、流早産、子供の死亡に関するデータが集められ (Neel and Schull 1956; Neel *et al.*, 1974; Schull *et al.*, 1981, 1982; Satoh *et al.*, 1982), 1968年からは染色体調査が開始された (Awa *et al.*, 1988)。1972年から1975年には、放射線の生殖細胞における遺伝子突然変異率に関する影響を、蛋白質レベルで究明する遺伝生化学調査のための試行調査が行われ、ついで1976年から1984年にわたって本調査が行われた (Neel *et al.*, 1980, 1986, 1988; Satoh and Neel 1988)。現在では、更に進んでDNAレベルで遺伝子の変異を検出するための準備が行われている (Satoh *et al.*, 1989)。今回は、蛋白質レベルで行われた調査の結果とDNAレベルの調査計画について述べる。

2. 突然変異の指標

蛋白質レベルの調査においては、突然変異検出のための指標として次の2種を用いた。第一は、電気泳動法で、移動度が正常型とは異なる血液蛋白質の変異型のうち、“まれな変異型”と規定するもので、表現型の頻度が集団中で1%未満(対立遺伝子頻度として0.005)のもの、第二は、活性値が正常値の66%未満を示す赤血球酵素の活性減少変異型である。前者は、遺伝子のエクソンにお

ける塩基置換、あるいは小さな塩基欠失、挿入を反映し、後者は、遺伝子の一部または全部の欠失、ならびにサラセミア遺伝子の例に見られるような、点突然変異によって正常な転写が行われない場合、あるいは正常機能を持った酵素が产生されない場合に検出される。

放射線は哺乳類の生殖細胞において染色体傷害を誘発し、遺伝子の欠失をもたらすと考えられている。従って、放射線に被曝した個体では、流早産の頻度が上昇し、その子供には、先天性奇形、寿命短縮等をもたらすものと考えられる。初期の遺伝学調査は、まさにこの影響を検出すべく行われたものであったが、統計学的に有意な影響は認められなかった。現在では、突然変異を分子レベルで理解すべく、Southern blottingによる分析が多数報告されている。生殖細胞、体細胞において、hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT), adenine phosphoribosyltransferase (APRT), thymidine kinase (TK), Duchenne muscular dystrophy (DMD) 等をコードする遺伝子座に生じた自然突然変異の20-40%は、この方法でバンド長の変化として検出される程度の大規模なDNAのリアレンジメント(欠失、挿入、相互変換、逆位、増幅)であるが、この種の変異は、体細胞におけるこれら遺伝子座に生じたX線誘発突然変異の、16-80%を占めているとされている (Albertini *et al.*, 1985; Stout and Caskey 1985; Turner *et al.*, 1985; Grosovsky *et al.*, 1986; Liber *et al.*, 1986; van Ommen *et al.*,

〒732 広島市南区比治山公園 5-2

Human germ cell mutations—The biochemical genetic study on the children of atomic bomb survivors

Chiyoko Satoh

Radiation Effects Research Foundation, 5-2, Hijiyama Park, Minami-ku, Hiroshima 732, Japan

1986; Wilson *et al.*, 1986; Yandell *et al.*, 1986; Gibbs and Caskey 1987; Monaco *et al.*, 1987)。頻度は、研究者によっても遺伝子座によっても大きく異なっている。しかし、Southern blotting では、制限酵素認識部位の外に生じた塩基置換は検出されないばかりでなく、5-10 キロベース (Kb) のバンドを検出する場合、約 100 塩基対 (bp) 以下の小さな欠失、挿入等は検出不能である。しかし、このような小さな変異であっても、また、サラセミア遺伝子でよく知られているように、1 個の塩基置換のみであっても、電気泳動法で検出可能な、遺伝子産物の產生が行われなくなることもある。更に、これらの研究においては、遺伝子産物の活性が全く、または殆ど全く零のミュータントのみが検出されるような選択をかけている。従って、遺伝子産物の活性に殆ど変化を与えないような塩基置換、小さな欠失等の突然変異は、全く検出できないシステムである。しかし、この種の見落とされた突然変異遺伝子の産物で、電気泳動移動度が変化する可能性がある。前述の選択をかけたシステムを用いた場合にも、チャイニーズハムスターの卵巣細胞株から得られた、 γ -線誘発 APRT⁻ ミュータントの場合には、その ≈84% は Southern blotting では検出されない小さな“点突然変異”であった (Grosovsky *et al.*, 1986)。そのうちの塩基配列の決定された 16 例中 11 例には塩基置換が認められており、APRT⁻ ミュータントの 58% は塩基置換に由来すると計算される (Grosovsky *et al.*, 1988)。更に、X-線照射したヒト培養細胞 (TK6) から、選択をかけたシステムで得られた HPRT ミュータントの 54% は遺伝子の一部または全部の欠失が Southern blotting で検出されたが、18% には HPRT 酵素活性が残存していたことから点突然変異によるミュータントが生じたと考えられる報告もある (Liber *et al.*, 1987)。

X-線誘発突然変異の性質に関しては、Liber *et al.* (1986) の研究がある。1983 年に Liber らは、X-線がヒト培養細胞 (TK6) にウツバイン抵抗性ミュータントを誘発しないことを報告した。ウツバイン抵抗性は、Na⁺/K⁺-ATPase のウツバイン結合部位に生じた“点”突然変異を反映するもの

と考えられるので、この結果から X-線は塩基置換突然変異を誘発しないと推論された。しかし、1986 年、彼らは TK6 細胞を用いて X-線が mRNA 合成遺伝子における 5,6-dichlororibofuranosylbenzimidazole (DRB) 抵抗性ミュータント、tubulin 遺伝子における podophyllotoxin (PPT) 抵抗性ミュータントを誘発することを報告した。これらの抵抗性ミュータントは“点”突然変異によって生じると考えられることから、彼らは X-線は“点”突然変異を誘発すると推論した。この場合、“点”突然変異には塩基置換のみならず小数塩基の欠失、挿入も含まれる。ウツバイン抵抗性が生じなかった理由は解明されてはいないが、Liber らは X-線で誘発された点突然変異の特殊性 (X-線の誘発した塩基置換がウツバイン結合部位を不活性化する種類の塩基置換ではなかった可能性) をあげている。

電離放射線の誘発する突然変異のうちの何割が電気泳動法で検出されるような突然変異であるかという点に関しては、蛋白質レベル調査開始時には明らかではなかったし、現在でも前述のような分子生物学的研究の結果を検討しても、依然として明らかではない。調査開始時に、大規模な調査に使用し得る蛋白質検査法としては、電気泳動法が唯一のものであった。遺伝学調査においては、結果解明のために少しでも有効と考えられる指標は全て使用する、という大前提があるため、我々はでんぶんゲル電気泳動法を用いて調査を開始した。その後、遺伝子の欠失、挿入等の検出にはより有効と考えられる、赤血球酵素の活性測定法を導入し、赤血球酵素の活性値が正常値の 66% 未満の子供を指標とした調査も行った。

3. 調査対象者

この調査の対象者は、従来から行われている“原爆被爆者の子供の寿命調査” (Kato *et al.*, 1966; Neel *et al.*, 1974; Schull *et al.*, 1982) の対象者の一部で、次の二つのグループに属する子供であった。

1) 被爆群 (近距離被爆者の子供) — 広島、長崎で爆心地からは 2,000 m 未満のところで被爆した人を両親または片親として、1946 年 6 月 1 日

から 1971 年 4 月 1 日までに生まれた子供のうち、広島、長崎に居住していた 16,702 人に對し調査協力を依頼した。そのうち 13,052 人 (78.1%) が調査に協力した。

2) 対照群 (遠距離被爆者の子供) — 広島、長崎で爆心地から 2,500 m 以遠で被爆した人を両親または片親として、被爆群と同じ時期に生まれた子供のうち、性、年齢を被爆群と一致させるように選んだ子供 13,993 人に調査を依頼した。10,609 人 (75.8%) が調査に協力した。

4. 線量

当研究所においては、対象となる原爆被爆者の線量は T65DR と呼ばれる推定線量 (Milton and Shohoji 1968; Auxier 1975; Hashizume and Maruyama 1975) を用いてきたが、最近、線量の見直しが行われ、新しい計算方式に基づき、DS86 線量 (Woolson *et al.*, 1987) が算出された。この DS86 線量では、臓器線量が計算される。遺伝子化学調査対象者の子供の母親については卵巣線量、父親については睾丸線量を算出した。しかし、親の一部については DS86 線量が計算されていないので、これらの親については、Neel *et al.* (1988) の方法に従って DS86 相当線量を計算した。両親は、 γ 線と中性子線に被曝しているので中性子線の生物学的効果比 (RBE) を 20 として両親の平均合計線量を計算すると、広島では 0.495 シーベルト (Sv, 1 Sv = 100 rem), 長崎では 0.459 シーベルト、両市平均では 0.477 シーベルトであった。

5. 突然変異検出法

(1) 試料

これらの子供達から、ACD を抗凝固剤として約 7 ml の血液を得た。血漿と赤血球層を遠心分離し、別々に液体窒素中に保存した (Ferrell *et al.*, 1977)。赤血球層の一部は、酵素活性測定用試料として Beutler (1975) の方法に従い、セルロースカラムを通して白血球と血小板を除いた後に、液体窒素中に保存した。これらを 1 日 ~ 2 ヶ月後に取り出して検査した。液体窒素中に保存した試料中の蛋白質、酵素は安定で、電気泳動法の場合、

染色度の弱い変異型のバンドも 10 年後に明らかに検出された。検査した 9 種の酵素に関しては、その活性は 2 年間は変化しなかった。

(2) でんぶんゲル電気泳動法による変異蛋白質の検出

血漿および溶赤血球液 (1:1 希釈) を用いて、血清蛋白質 30 種 (初期には 22 種、その後 8 種を追加) について電気泳動法による検査を行い、“まれな変異型”を検出した。検査蛋白質は、次の 30 種であった。アルブミン (ALB), セルロプラスミン (CP), ハプトグロビン (HP), トランスフェリン (TF), ヘモグロビン-A1, -A2 (HB A1, HB A2), 酸性ホスファターゼ-1 (ACP1), アデノシンデアミナーゼ (ADA), アデニレートキナーゼ-1 (AK1), 炭酸脱水酵素-1, -2 (CA1, CA2), エステラーゼ A, B, D (ESA, ESB, ESD), グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PD), グルコースリン酸イソメラーゼ (GPI), 細胞質グルタミン酸-オキザロ酢酸トランスマニナーゼ (GOT1), 細胞質グルタミン酸-ピルビン酸トランスマニナーゼ (GPT1), 細胞質 NADP 依存イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (IDH1), 乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH), リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MDH), スクレオシドホスホリーゼ (NP), ペプチダーゼ A (PEPA), ペプチダーゼ B (PEPB), ホスホグルコムターゼ-1, -2, -3 (PGM1, PGM2, PGM3), 6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ (PGD), トリオースリン酸イソメラーゼ (TPI), ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK)。

変異型相互の比較検討には、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、ポリアクリルアミド薄層ゲル等電点分離法を用い、移動度、等電点の差異を明らかにした。また、酵素活性、熱安定性、Km 値等の生化学的特性の比較も行った。

(3) 活性減少変異酵素の検出

溶赤血球液 (1:19 希釈) 中の 9 種の酵素活性を測定し、活性値が平均値の 66% 未満の活性減少変異型を検出した (Satoh *et al.*, 1983)。それらは、AK1, GPI, GOT1, LDH, PGD, PGK1, TPI, ヘキソキナーゼ (HK), グリセラルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ (GAPD) であった。測定法は、原則的には、Beutler (1975) および Beutler *et al.*

(1977) の方法に従ったもので、Aminco 社の Rotochem IIa/36 を用いて測定した。

(4) 両親の蛋白質、酵素の検査

子供に “まれな変異型” または活性減少変異酵素が検出されると、両親についても前 2 項、3 項に記した全蛋白質の検査を行った。親と子の、多型を示す蛋白質の表現型は、次項の親子関係の確認に利用した。

(5) 親子関係の確認

子供と両親について、ABO, Rh, MNSs, Duffy 血液型、30 種の蛋白質のうち多型を示す HP, ACP1, ADA, ESD, GOT1, GPT1, PGM1, PGM3, PGD の表現型と α_1 -antitrypsin (PI) の表現型、HLA (A, B, C 座) のタイプおよび染色体の検査を行い、生物学的親子関係を確認した。

6. 結 果

(1) 電気泳動の移動度を変化させる突然変異

でんぶんゲル電気泳動法による検査で得られた結果を Table 1 にまとめた。被爆群では 13,052 人、コントロール群では 10,609 人の子供を検査し、まれな変異型を、それぞれ 700 例と 533 例ずつ検出した。この中には、TF D_{CHI} 変異型 (対立遺伝子頻度 0.006), CP C_{NG1} 変異型 (対立遺伝子頻度 0.009) は含まれていない。まれな変異型の検出頻度は、電気泳動法による検査 1,000 件当たり被爆群、コントロール群について、それぞれ、2.02 と 1.84 であった。まれな変異型の検出された子供のうち、その両親を検査できたのは、被爆群で 567 例 (81%), コントロール群で 397 例 (74%) で、その大部分においては、子供と同じ変異型が、少なくとも片親に検出され、遺伝的変異型であることが明らかとなった。しかし、子供に

検出された変異型が両親の何れにも検出されない場合が、被爆群で 5 例、対照群で 6 例あった。

親子関係の確認を行ったところ、5 例では少なくとも 2 種類の形質の型判定で親子関係に矛盾が生じた。結局、被爆群に 3 例 (GPT1, PGM2, NP にそれぞれ 1 例)、対照群にも 3 例 (HP, PGD, ADA にそれぞれ 1 例) の “新しい” 突然変異、すなわち、親の生殖細胞に生じたと考えられる突然変異を検出した。何れも突然変異によって生じたミュータントポリペプチドと、正常型ポリペプチドより成るヘテロ接合変異型として観察された。被爆群で、突然変異の検出された 3 人の子供の両親の、生殖腺被曝線量は次の通りであった: i) 母親は広島で γ 線 0.03 Gy を被曝、父親は非被曝 (GPT1 の場合), ii) 長崎で母親は γ 線 0.74 Gy、父親は γ 線 0.05 Gy (PGM2 の場合), iii) 両親ともに 0 Gy (NP の場合)。第 3 例では、両親は爆心より 2,000 m 未満で被爆したが、放射線からは十分に遮蔽されていた。

両群で検査された遺伝子座数 (遺伝子座相当数) は、蛋白質を構成する個々のペプチドごとに、次のようにして算出した後合計した。即ち、あるペプチドが a 個の遺伝子によってコードされる場合は、そのペプチドについて子供 n 人を検査することにより、両親由来の $2an$ 個の遺伝子座を検査することになる。但し、父親の X 染色体上の遺伝子座については、男の子供では an となる。検出された変異型が突然変異か否かを知るために、両親を検査する必要があるが、全例において両親を検査できたわけではない。そこで、変異型のうちで、両親の検査が可能であった変異型数の、全変異型数に対する割合を、 $2an$ (または an) に乗じて補正し、遺伝子座相当数とした。Table 1 に示

Table 2. 原爆被爆者の子供に検出された赤血球酵素活性突然変異

	被爆群	対照群	合計
検査した子供	4,989	5,026	10,015
まれな変異型	26	21	47
両親の検査された変異型	24	18	42
遺伝子座相当数	60,529	61,741	122,270
突然変異	1	0	1
突然変異率/遺伝子座/世代	1.65×10^{-5}	0	0.82×10^{-5}
／上限	0.04×10^{-5}	0	0.02×10^{-5}
95% 信頼限界／下限	9.20×10^{-6}	4.85×10^{-5}	4.56×10^{-5}

したように、被爆群では 667,404 遺伝子座相当数を検査し、3 例の突然変異を検出したので、突然変異率は 0.45×10^{-5} /遺伝子座/世代 (95% 信頼区間は $0.1 \times 10^{-5} \sim 1.3 \times 10^{-5}$ /遺伝子座/世代)、対照群では 466,881 遺伝子座を検査し、3 例の突然変異を検出し、突然変異率は 0.64×10^{-5} /遺伝子座/世代 (95% 信頼区間 $0.1 \times 10^{-5} \sim 1.9 \times 10^{-5}$ /遺伝子座/世代) となり、両群の間に有意差は認められなかった。

(2) 酵素活性を減少させる突然変異

前項の、電気泳動法による検査を行った子供達のうち、被爆群の 4,989 人、対照群の 5,026 人について、1 人につき最大 9 種の赤血球酵素の活性を測定し、結果を Table 2 にまとめた。

活性値の変動係数 [coefficient of variation = 標準偏差 (SD) の平均値に対する割合を % で表現した値] が 11% 未満の酵素であれば、平均値の 66% 以下の活性値を示す酵素を変異型とする、活性値が零の変異型酵素と正常型酵素を持つヘテロ接合体は理論的に検出可能である (Satoh et al., 1983)。実際に、予備的実験において、9 種の酵素では変異型の活性値は、平均値より 4SD 以上低かった。被爆群で 26 例、コントロール群で 21 例の活性減少変異型が検出され、そのうち合計 42 例については、両親を検査することができた。1 例を例外として、子供と同じ程度の活性減少が少なくとも片親に認められ、活性減少変異型は、遺伝的形質として、親から子へと伝えられたものであることが明らかになった。

子供には TPI の活性減少変異型が観察されたにもかかわらず、その両親が正常活性を示した家族の TPI 活性値は、1960 年生まれの発端者では、平均値の 65%，母は 92%，父は 100%，弟は

104% であった。全員の TPI の電気泳動上の移動度は正常、熱安定性も正常であった。父親は長崎で被爆 (γ 線 0.03 Gy) しているが、母親は非被爆であった。親子関係に矛盾は認められなかったので、子どもに検出された活性減少変異型は、突然変異によるものと考えられる。

両群で検査した遺伝子座数 (遺伝子座相当数) は、電気泳動法による検査の場合と同様に計算した。被爆群では 60,529 遺伝子座を検査し、1 例の突然変異を検出したので、酵素活性を減少させるような変異を引き起こす突然変異の頻度は、 1.7×10^{-5} /遺伝子座/世代となる。対照群では、61,741 遺伝子座を検査し、突然変異は検出されなかった。

7. 考 察

二つの指標を用いて行われた蛋白質レベルの調査において、被爆群と対照群の突然変異率の間に有意差は無く、原爆放射線の遺伝的影響を検出することはできなかった。両親の被曝線量を考慮すると、このような結果となる可能性は、調査開始時から想定されていた。しかし、この調査から得られた結果は、現在まで 40 年間にわたって行われた遺伝学調査の重要な一部として、放射線のリスク決定のデータとして利用し得る。

この調査で得られたデータの大部分は、電気泳動で移動度の変化する変異型という第一の指標を用いて得られたものである。遺伝子の欠失、挿入等を検出することのできる第二の指標、即ち赤血球酵素の活性値が正常値の 1/2 を示す変異型を検出するために行われた、酵素活性測定法で得られたデータは、第一の指標で得られたデータの約 1/10 に過ぎなかった。赤血球酵素の活性測定は、電気泳動法に比べて、はるかに複雑で時間がかかる。

Table 1. 原爆被爆者の子供に検出された突然変異: 電気泳動上の移動度の変化したミュータント

	被爆群	対照群	合計
検査した子供	13,052	10,609	23,661
まれな変異型	700	533	1,233
両親の検査された変異型	567	397	964
遺伝子座相当数	667,404	466,881	1,134,285
突然変異	3	3	6
突然変異率/遺伝子座/世代	0.45×10^{-5}	0.64×10^{-5}	0.53×10^{-5}
／上限	0.09×10^{-5}	0.13×10^{-5}	0.19×10^{-5}
95% 信頼限界／下限	1.31×10^{-6}	1.88×10^{-5}	1.15×10^{-5}

るため、自動測定装置無しにはスクリーニングは不可能であった。この自動測定装置が開発され、利用できるようになった時には、既に調査開始後3年を経過していた。この時までに検査されていなかった約半数の対象者からは、新鮮な血液試料を得て活性測定を行ったが、既に電気泳動法による検査の終了していた約半数の対象者の血液試料は、液体窒素中に保存されていたものを使用した。しかし、液体窒素中に数年間保存された血液中では、活性値が減少する酵素もあって、検査項目とする酵素数に制限が生じた。更に、個体間で活性値に変化が大きく、変動係数が11%以上の酵素では、活性減少変異型酵素と、正常型酵素を持つヘテロ接合体を検出することが困難である。遺伝学的に純一ではないヒト集団では、このような酵素がかなり多かった。これらの制限のために、この指標を使用して検査することのできた遺伝子座相当数は、両群ともに約60,000で、これ以上検査数を増大させることは不可能であった。Charles and Pretsch (1986) は、雄マウスにX線を6.0 Gyまたは10.2 Gy照射(半量ずつ24時間間隔で分割照射)し、無処理の雌マウスと交配させた後、生まれた子マウスの、10種の赤血球酵素(12遺伝子座によってコードされる)の活性を測定した。活性変異ミュータントは、精原細胞時期に父親が6.0 Gy照射された3,388匹の子マウス(検査遺伝子座数は40,656)には1例、10.2 Gy照射の場合は3,187匹の子マウス(検査遺伝子座数は38,244)に5例検出されたが、無処理の父親から生まれた子マウスには零であった。6.0 Gy照射の1例は統計的に有意ではなく、10.2 Gy照射の5例は有意な差であった。我々の調査した被爆群の子供の両親の合計平均生殖腺線量は0.5 Gy未満で、マウスの実験例の1/10以下であることを考えると、約60,000遺伝子座の検査では有意差の出ないことは当然であろう。

8. DNA レベルの遺伝生化学調査

分子遺伝学の発展により、ヒトゲノムの全塩基配列決定プロジェクトが、各国で開始されようとしている。我々の遺伝生化学調査においても、DNA レベルで、原爆放射線の遺伝子への影響を

検索すべく、1985年から準備を開始した。被爆者の老齢化と、子供達の成長による進学就職に伴い、調査に協力可能な対象者の数は減少してきていた。そこで、将来のDNA レベルの研究に用いるDNA 試料を、確保するためのプロジェクトを開始した。このプロジェクトでは、近距離被爆者とその配偶者および子供から成る家族、およびその対照となる遠距離被爆者の家族を併せ、合計約1,000家族について、Bリンパ球を Epstein-Barrウイルス(EBV)を用いて永久細胞株化して増殖させ、1人につき約 5×10^8 細胞を液体窒素中に保存する。EBVの影響を考慮して、家族構成員1人につき10 mlの末梢血から採取したリンパ球の、半数からは永久細胞株を作り、半数は無処理のまま液体窒素中に保存する。対象家族は、蛋白質レベルの遺伝生化学調査に協力した子供を構成員とする、約15,000家族のうちから約1,500家族を選定した。協力率約70%を予定している。現在までに、約450家族、1,600人の細胞株を樹立した。今後も年間150~120家族の割合で細胞株を樹立する計画である。

DNA の分析法は、塩基配列決定法、制限酵素断片長の多型をマーカーとする方法をはじめとして、一定長のDNA 断片中の塩基置換、欠失、挿入を検出する各種の方法(Landegren et al., 1988)が報告されている。我々は、塩基置換、欠失、挿入を一度の実験で容易に多数検出できる上に、多数の試料のスクリーニングに好適な方法を求めて検討した。現在のところ、polymerase chain reaction (PCR) 法(Saiki et al., 1985; Mullis and Faloona 1987)で增幅したDNA 断片を、Lerman et al. (1986)の変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法で分析する方法が、塩基置換、小さな欠失、挿入の検出には最も効率が良いのではないかと考え、極く小規模な試行調査を開始した。大きなDNA 断片の欠失、挿入の検出には、³²P-標識 RNA プローブとDNA 断片から作ったRNA:DNA デュプレックスを、2次元ベータ・スキャナーで検査する方法を考慮している。

蛋白質レベルの遺伝生化学調査の対照群において検査された、赤血球酵素、血漿蛋白質をコードする遺伝子座数と3例の突然変異、同じく、電気

泳動法を用いて、イギリス、アメリカ、ドイツ等で行われた、他の6種の調査において検査された遺伝子座数、および検出された1例の突然変異の数を基礎として、これらの遺伝子のエクソンにおける塩基置換突然変異率は、 1×10^{-8} /塩基/世代と計算された(Neel et al., 1986)。挿入/欠失/リコンビネーション(I/D/R)に対する突然変異率は不明であるが、塩基置換突然変異率と同頻度と仮定すると、全突然変異率は、 2×10^{-8} /塩基/世代と仮定される。被爆群の親の合計線量は約0.5 Svであり、当研究所における遺伝学調査で用いられた5つの指標(流早産率、被爆者の子供の、死亡率、発癌率、性染色体異常、蛋白質の突然変異)から推定された接合体倍加線量は1.68~2.22 Svである(Neel et al., 投稿準備中)。真の倍加線量が、この最小値の1.68 Svであるとしても、被爆群の子供の両親は、倍加線量の約1/3を被爆したに過ぎないことになる。これらの値に基づいて計算すると、DNA レベルの調査において、統計的有意差のある突然変異を検出するためには、両群の何れにおいても 7×10^8 塩基の検査をすることが必要になる(Satoh et al., 1989)。しかし、電離放射線によって誘発される突然変異の中では、I/D/R 突然変異の割合が多いと考えられるので、この数は縮小され得るだろう。また、DNA レベルの研究のみで、結論の出せるに十分な検査ができなくても、そのデータを、既に得られている遺伝学調査のデータに加えることによって、ヒトの倍加線量の推定値を、より精度の高いものにすることが可能になるであろう。

参考文献

- Albertini, R. J., J. P. O'Neill, J. A. Nicklass, N. H. Heintz and P. C. Kelleher (1985) Alterations of the Hprt gene in human *in vivo*-derived 6-thioguanine-resistant T lymphocytes, *Nature*, **316**, 369-371.
- Auxier, J. A. (1975) Physical dose estimates for a-bomb survivors—studies at Oak Ridge, U.S.A., *J. Radiat. Res. (Tokyo)* [Suppl.], **16**, 1-11.
- Awa, A. A., T. Honda, S. Neriishi, T. Sofuni, H. Shimba, K. Otaki, M. Nakano, Y. Kodama, M. Itoh and H. B. Hamilton (1988) Cytogenetic study of the offspring of atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki, RERF Tech. Rep., 1-20.
- Beutler, E. (1975) Red cell metabolism, a manual of biochemical methods, 2nd ed. New York, Grune & Stratton.
- Beutler, E., K. G. Blume, J. C. Kaplan, G. W. Löhr, B. Ramot, W. N. Valentine (1977) International Committee for Standardization in Haematology: recommended methods for red-cell enzyme analysis, *Br. J. Haematol.*, **35** (Suppl.), 331-340.
- Charles, D. J. and W. Pretsch (1986) Enzyme-activity mutations detected in mice after paternal fractionated irradiation, *Mutation Res.*, **160**, 243-248.
- Ferrell, R. E., N. Ueda, C. Satoh, R. J. Tanis, J. V. Neel, H. B. Hamilton, T. Inamizu and K. Baba (1977) The frequency in Japanese of genetic variants of 22 proteins. I. Albumin, ceruloplasmin, haptoglobin, and transferrin, *Ann Hum. Genet.*, **40**, 407-418.
- Gibbs, R. A. and C. T. Caskey (1987) Identification and localization of mutations at the Lesch-Nyhan locus by ribonuclease A cleavage, *Science*, **236**, 303-305.
- Grosovsky, A. J., E. A. Drobetsky, P. J. de Jong and B. W. Glickman (1986) Southern analysis of genomic alterations in gamma-ray-induced APRT⁻ hamster cell mutants, *Genetics*, **113**, 405-415.
- Grosovsky, A. J., J. G. de Boer, P. J. de Jong, E. A. Drobetsky and B. W. Glickman (1988) Base substitutions, frameshifts, and small deletions comprise ionizing radiation induced point mutations in mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 185-188.
- Hashizume, T. and T. Maruyama (1975) Physical dose estimates for a-bomb survivors—studies at Chiba, Japan, *J. Radiat. Res. [Suppl.]*, **16**, 12-23.
- Kato, H., W. J. Schull and J. V. Neel (1966) A cohort-type study of survival in the children of parents exposed to atomic bombings, *Am. J. Hum. Genet.*, **16**, 214-230.
- Landegren, U., R. Kaiser, C. T. Caskey and L. Hood (1988) DNA diagnostics—Molecular techniques and automation, *Science*, **242**, 229-237.
- Liber, H. L., P. K. Le Motte and J. B. Little (1983) Toxicity and mutagenicity of X-rays and [¹²⁵I]dUrd or [³H]TdR incorporated in the DNA of human lymphoblast cells.
- Liber, H. L., P. H. Leong, V. H. Terry and J. B. Little (1986) X-rays mutate human lymphoblast cells at genetic loci that showed response only to point mutagens, *Mutation Res.*, **163**, 91-97.
- Liber, H. L., K. M. Call and J. B. Little (1987) Molecular and biochemical analysis of spontaneous and X-ray induced mutants in human lymphoblastoid cells, *Mutation Res.*, **178**, 143-153.
- Lerman, L. S., K. Silverstein and E. Grinfeld (1986) Searching for gene defects by denaturing gradient gel electrophoresis, *Cold Spring Harbor Symposia*

- on Quantitative biology, **LI**, 285-297.
- Milton, R. C. and T. Shohoji (1968) Tentative 1965 radiation dose estimation for atomic bomb survivors, ABCC Tech. Rep., 1-68.
- Monaco, A. P., C. J. Bertelson, C. Colletti-Feener and L. M. Kunkel (1987) Localization and cloning of Xp21 deletion breakpoints in muscular dystrophy, Human. Genet., **75**, 221-227.
- Mullis, K. B. and F. Falloona (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction, Meth. Enzymol., **155**, 335-350.
- Neel, J. V. and W. J. Schull (1956) The effect of exposure to the atomic bombs on pregnancy termination in Hiroshima and Nagasaki, Publ., 461, National Academy of Sciences—National Research Council, Washington, DC.
- Neel, J. V., H. Kato and W. J. Schull (1974) Mortality in the children of atomic bomb survivors and controls, Genetics, **76**, 311-326.
- Neel, J. V., C. Satoh, H. B. Hamilton, M. Otake, K. Goriki, T. Kageoka, M. Fujita, S. Neriishi and J. Asakawa (1980) Search for mutations affecting protein structure in children of atomic bomb survivors: preliminary report, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 4221-4225.
- Neel, J. V., C. Satoh, K. Goriki, M. Fujita, N. Takahashi, J. Asakawa and R. Hazama (1986) The rate with which spontaneous mutation alters the electrophoretic mobility of proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 389-393.
- Neel, J. V., C. Satoh, K. Goriki, J. Asakawa, M. Fujita, N. Takahashi, T. Kageoka and R. Hazama (1988) Search for mutations altering protein charge and/or function in children of atomic bomb survivors: Final report, Am. J. Hum. Genet., **42**, 663-676.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Falloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, Science, **230**, 1350-1354.
- Satoh, C., A. A. Awa, J. V. Neel, W. J. Schull, H. Kato, H. B. Hamilton, M. Otake and K. Goriki (1982) Genetic effects of atomic bombs, In: B. Bonne-Tamir (Ed.), Human genetics, Part A: The unfolding genome, Alan R. Liss, New York, pp. 267-276.
- Satoh, C., J. V. Neel, A. Yamashita, K. Goriki, M. Fujita and H. B. Hamilton (1983) The frequency among Japanese of heterozygotes for deficiency variants of 11 enzymes, Am. J. Hum. Genet., **35**, 656-674.
- Satoh, C. and J. V. Neel (1988) Biochemical mutations in the children of atomic bomb survivors, Gann Monograph on Cancer Research, **35**, 191-208.
- Satoh, C., K. Hiyama, N. Takahashi, M. Kodaira and J. V. Neel (1989) Approaches to DNA methods for the detection of heritable mutations in humans, 5th International Conference on Environmental Mutagens, July, 1989, Cleveland, USA.
- Schull, W. J., M. Otake and J. V. Neel (1981) Genetic effects of the atomic bombs: a reappraisal. Science, **213**, 1220-1227.
- Schull, W. J., J. V. Neel, M. Otake, A. Awa, C. Satoh and H. B. Hamilton (1982) Hiroshima and Nagasaki: three and a half decades of genetic screening, In: T. Sugimura and S. Kondo, (Eds.), Environmental mutagens and carcinogens, Alan R. Liss, New York, pp. 687-700.
- Stout, J. T. and C. T. Caskey (1985) HPRT: gene structure, expression, and mutation, Ann. Rev. Genet., **19**, 127-148.
- Turner, D. R., A. A. Morley, M. Haliandros, R. Kutlaca and B. J. San Jerson (1985) *In vivo* somatic mutations in human lymphocytes frequently result from major gene alterations, Nature, **315**, 343-345.
- van Ommen, G. J. B., J. M. H. Verkerk, M. H. Hofker, A. P. Monaco, L. M. Kunkel, P. Ray, R. Worton, B. Wieringa, E. Bakker and P. L. Pearson (1986) A physical map of 4 million bp around the Duchenne muscular dystrophy gene on the human X-chromosome, Cell, **47**, 499-504.
- Wilson, J. M., J. T. Stout, T. D. Palella, B. L. Davidson, W. N. Kelley and C. T. Caskey (1986) A molecular survey of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency in man, J. Clin. Invest., **77**, 188-195.
- Woolson, W. A., S. D. Egbert and M. L. Gritzner (1987) Dosimetry system 1986, In: W. C. Roesch (Ed.), US-Japan joint reassessment of atomic bomb radiation dosimetry in Hiroshima and Nagasaki, Radiation Effects Research Foundation, Hiroshima, pp. 405-431.
- Yandell, D. W., T. P. Dryja and J. B. Little (1986) Somatic mutations at a heterozygous autosomal locus in human cells occur more frequently by allele loss than by intragenic structural alterations, Somatic Cell Mol. Genet., **12**, 255-263.

環境変異原研究 **11**: 81-88 (1989)

ヒト・リンパ球の突然変異：定量的検出指標の問題点

京都大学医学部 異 紘一

1. はじめに

私達は、ヒトから採取できる体細胞材料のうち末梢血リンパ球のいくつかの利点に着目して、*in vitro* 突然変異誘発に EB ウィルスで無限増殖化した B リンパ芽球様細胞を、また *in vivo* 突然変異体存在頻度の測定には T リンパ球を用いて、ヒト体細胞における突然変異を解析してきた(異, 1988)。これは、環境変異原のヒトに対する危険度の評価に、細菌や齧歯類動物細胞ではなく、ヒト細胞で得られた資料が用いられるべきであるとの考えに基づいている。

線維芽細胞初代培養の代わりに T リンパ球やリンパ芽球様細胞を利用することによって、多数の被検者について繰り返し生体内変異体存在頻度を測定したり、大量の細胞を取り扱えることから十分に高い統計学的精度で突然変異誘発頻度を求めることができるようになった。

その過程で、ただ一つの突然変異指標で得られた結果に基づいて変異原の変異誘発作用の強さを評価したり、逆に体細胞の突然変異感受性の差異について結論することには根本的に無理があることが一層はっきりしてきた。さらに、遺伝子クローニングをはじめ最近の分子生物学的手法の導入によって、指標を選ぶ遺伝子座位が違うと、なぜ突然変異体出現頻度が大きく異なるかが少しづつ理解できるようになってきた。そこで本稿では、ヒト細胞の遺伝子突然変異を定量的に検出する場合に現在利用できるいくつかの検出指標の問題点と、変異体における当該遺伝子の構造変化解析の現状を紹介したい。

2. 6 チオ・グアニン抵抗性変異

ヒトを含め動物体細胞は一般に正2倍体であり、常染色体上の遺伝子は allele (対立遺伝子) として2個存在するから、野生型から劣性形質への前進突然変異は二重の変異を必要とする。このためホモ欠損の頻度は極めて低く、これを定量的に検出しようとするには膨大な細胞数を要し、あまり実際的でない。そこで X 染色体上の HPRT (ヒポキサンチン・グアニン・フォスフォリボシリルトランスクレラーゼ) 遺伝子の欠損変異を検出する 6 チオ・グアニン抵抗性がマーカー (標識) としてよく使われてきた。HPRT はプリンのサルベージ経路でヒポキサンチンとグアニンのリン酸化を触媒するが、プリンの de novo 生合成経路が働くかぎり、少なくとも培養細胞では生存に必須の酵素ではない。雄由来の細胞は X 染色体を 1 本だけ持つ (monosomy)，雌由来細胞中の 2 本の X 染色体の内 1 本は遺伝的に不活性 (Lyonization) であるから、何れにしろ X 染色体上の遺伝子は半数性である。従って HPRT 欠損は一回の変異で起こり、 10^{-6} 以上の頻度で自然にも観察される。このように検出は比較的容易だが、後に述べるごとく遺伝子損傷が HPRT 座位にとどまらず近接の必須遺伝子に及ぶ場合には、それらが半数性であるため変異体が生存できない場合も考えられる。

ヒト HPRT 遺伝子は 9 つのエクソンからなる全長約 42 kb の大きな遺伝子で Xq₂₈-Xq₂₇ に位置し、染色体 3, 5 番に 1 つずつ、11 番に 2 つ、計 4 つの偽遺伝子がある。HPRT 遺伝子がクローニングされてから、欠損変異細胞について、

〒606 京都市左京区吉田近衛町

Mutations in human lymphocytes: Genetic markers for quantitative detection

Kouichi Tatsumi

Department of Molecular Oncology, Faculty of Medicine, Kyoto University, Yoshida Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

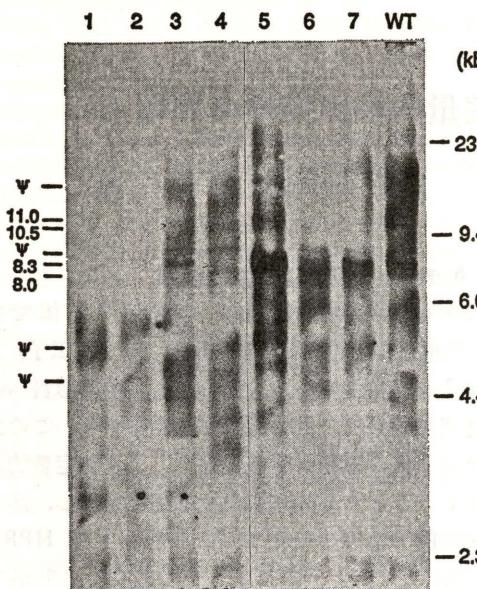


Fig. 1. TK6 細胞の自然 HPRT⁻ 変異体のサザンプロットによる遺伝子構造解析。細胞ゲノム DNA を EcoRI 消化のち泳動し、フィルター転写後 HPRTcDNA をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。ψ: 偽遺伝子 (Tachibana et al. Mutat. Res., in press).

cDNA 全長をプローブとしたサザン・プロットハイブリダイゼーションをおこなって、大まかに遺伝子構造変化の大小が区別できるようになった。例えばゲノム DNA を制限酵素 EcoRI で消化した場合には、野生型細胞では偽遺伝子の 4 本のバンドの他に X 染色体上の真の HPRT 遺伝子が 11.0, 10.5, 8.3, 8.0 kb のバンドとして検出される。突然変異細胞では、点突然変異や極めて小さい DNA 変化 (数十 bp 以下) はサザン・プロット上のバンドの違いとしては見分けられないが、大きな DNA の欠失、挿入などはバンドの位置変化、バンドの消失、新たなバンドの出現などとして検出できる (Fig. 1)。6 チオ・グアニンの選択濃度 30 μ M でリンパ芽球様細胞 TK6 について得られた自発 6 チオ・グアニン抵抗性突然変異体ではバンドの消失が約 30% にみられた。一方、 γ 線誘発変異体ではほぼ 50% でバンドの消失を検出した (Table 1)。同様の検討は他の研究グループでも行われており (Turner et al., 1985), バンド変化を示す変異体の比率は動物細胞の種類や報告者によりまちまちだが、私達の実験条件では、

Table 1. 正常人由来リンパ芽球様細胞 TK6 の 6 チオ・グアニン抵抗性変異体における欠失変異の割合 (Tachibana et al. Mutat. Res., in press)

Treatment	Number of deletion mutants/ Number of clones analysed
Spontaneous	5/17
UV	0/14
γ	7/16

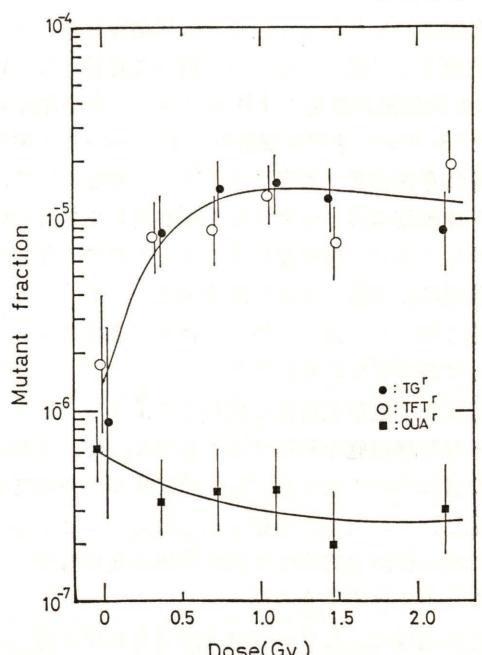


Fig. 2. ヒト・リンパ芽球様細胞 TK6 における ^{137}Cs γ 線 (4 Gy/分) 誘発突然変異。
TG^R, 6 チオ・グアニン抵抗性変異; TFT^R, トリフルオロチミジン抵抗性変異; OUA^R, ウアバイン抵抗性変異。(異, 未発表).

自発突然変異によって HPRT 遺伝子上に比較的高頻度で DNA の欠失が生じており、 γ 線照射によって、さらに高頻度で欠失が生じるものと解釈できる。これに対し紫外線誘発変異では、14 クローニ解析した内にバンドの変化したものは見られず対照的であった (Tachibana et al., in press)。HPRT が細胞増殖に必須の遺伝子産物ではないので、点突然変異からかなり大きな欠失まで検出される遺伝子構造変化のスペクトルが広いこともこのマーカーが有用である理由の一つである。しかしこの TK6 細胞の γ 線誘発 6 チオ・グアニン抵抗性変異の出現頻度を観察すると、比較的低

線量で飽和する (Fig. 2)。これは高線量による大きい欠失を持った変異体の回収率が低いことが原因かも知れない。

一方、ヒト生殖細胞に生じる HPRT 欠損変異、すなわちレッシュ・ナイハン病患者の HPRT 遺伝子についても患者のリンパ芽球様細胞で構造が解析され、点突然変異から大きな欠失まで様々な変異が病因となっていることが判ってきた。

Caskey らのグループでは 29 症例中 6 例に遺伝子全体、3' 末端、中央部の欠失、エクソン 2, 3 の重複、挿入変異などの DNA 構造変化を認めている (Yang et al., 1984; Stout and Caskey, 1985)。さらに多数の症例で解析が進めば、HPRT 欠損自然突然変異の型について培養細胞と生体内生殖細胞とがどの程度異なっているかが明らかになるはずである。

3. ウアバイン抵抗性変異

Na^+/K^+ ATPase は動物細胞の原形質膜に組み込まれて普遍的に存在する Na ポンプで、ATP の加水分解によって遊離されるエネルギーで

Na^+ を細胞外に、 K^+ を細胞内に能動輸送し、細胞のイオン環境を維持して栄養物質の輸送や、興奮性の維持を担う必須の酵素である。強心配糖体のウアバインは細胞膜の外側から酵素 α サブユニットの特定部位に結合して、ATPase 活性とポンプ活性を特異的に阻害する。細胞がこのウアバイン結合性だけを喪失して酵素活性を保持するような優進変異がウアバイン抵抗性変異である。すなわち構造遺伝子のウアバイン結合部位をコードする部分に生じたミスセンス塩基置換だけが検出されるマーカーである。フレームシフトや欠失で遺伝子構造変化が ATPase 自体の失活に至ると変異体は生存できないので回収されない。

Fig. 2 ■印に示されるように、自発変異頻度は 6 チオ・グアニン抵抗性変異に比べてほぼ 1 衍低く、変異の標的が小さいことや変異のスペクトルの狭さを反映している。また γ 線によって新たなウアバイン抵抗性変異は全く誘発されない。紫外線やアルキル化剤とは対照的に、電離放射線の照射では塩基置換型の変異がほとんど生じないことが示唆される (Arlett et al., 1975; Thacker et

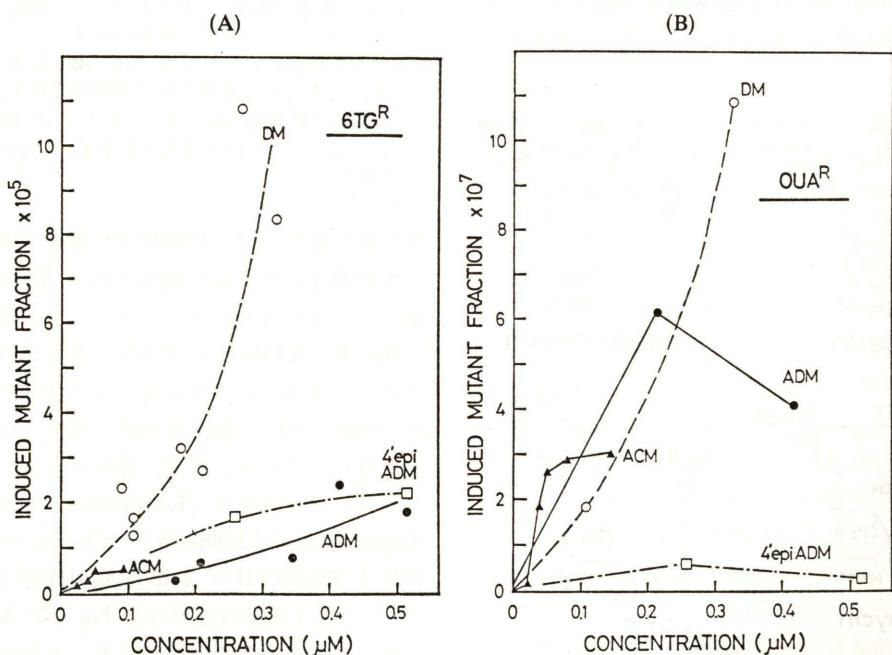


Fig. 3. リンパ芽球様細胞 TK6 におけるアンスラサイクリン制がん抗生物質類縁体の変異原性の比較
(異, 未発表).
(A) 6 チオ・グアニン抵抗性, (B) ウアバイン抵抗性
○, ダウノマイシン; ●, アドリアマイシン; ▲, アクラシノマイシン; □, 4' エピアドリアマイシン

al., 1978)。アンスラサイクリン系制がん抗生物質のうち、ダウノマイシン、アドリアマイシン、4'エピアドリアマイシン、アクラシノマイシンの4つについてTK6細胞における変異誘発作用を6チオ・グアニン抵抗性とウアバイン抵抗性の二つの座位で比較すると、アクラシノマイシンとアドリアマイシンが、6チオ・グアニン抵抗性ではダウノマイシンより遙かに作用が弱く見えるのに、ウアバイン抵抗性ではほぼ同等であった(Fig. 3)。4つの薬剤は互いに化学構造が酷似している(Fig. 4)が、遺伝子傷害作用の詳細では異なっているために変異誘発のスペクトルが違うのであろう。

皮膚がんを好発する遺伝病の色素性乾皮症では患者由来のリンパ芽球様細胞が正常人由来細胞にくらべて、紫外線の細胞致死作用と変異誘発作用により感受性が高くなっている。色素性乾皮症のなかでも相補性A群とC群では6チオ・グアニン抵抗性を指標とした場合、変異体の出現頻度はA群の方が遙かに高い(Tatsumi et al., 1987)が、ウアバイン抵抗性指標ではその差はずっと小さくなる(Fig. 5)。A群色素性乾皮症ではウアバイン抵抗性で検出されないような遺伝子変化がC

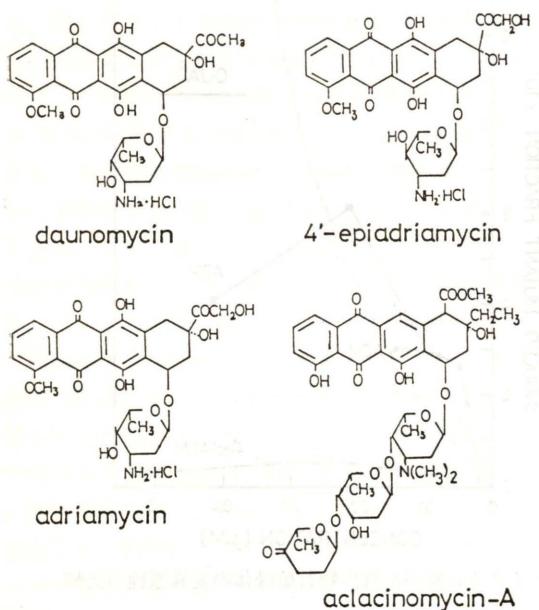


Fig. 4. アンスラサイクリン制がん抗生物質の化学構造

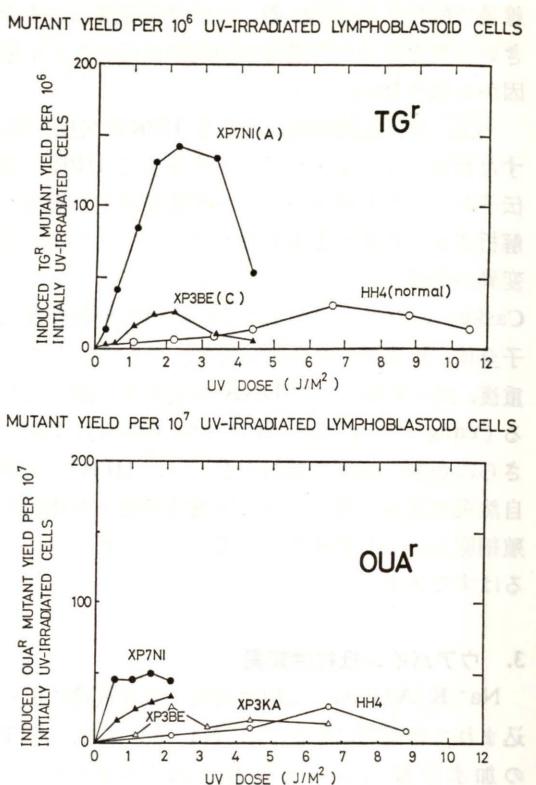


Fig. 5. 紫外線誘発6チオ・グアニン抵抗性変異(上パネル)とウアバイン抵抗性変異(下パネル)における色素性乾皮症相補性A群(●), C群(▲, △)患者、正常人(○)由来リンパ芽球感受性の比較。縦軸は照射10⁶細胞(上パネル)または10⁷細胞(下パネル)当りの生存回収変異体細胞数。(Tatsumi et al., 1987)。

群色素性乾皮症や正常細胞より高率に紫外線によって誘発されている可能性がある。現在のところ、極めて小さい欠失かフレームシフトが疑わしい。

Na^+/K^+ ATPaseには少なくとも3つのアイソザイムがあり、 β サブユニットは共通で αI が心臓、腎臓、 αII が脳、骨格筋、脂肪、 αIII が脳だけに分布している。最近、各サブユニット遺伝子がクローニングされ(Kawakami et al., 1985; Noguchi et al., 1986)、 α サブユニットはIが染色体1番短腕、IIが1番長腕、IIIが19番長腕にマップされた。ヒトや羊の Na^+/K^+ ATPaseはウアバインに感受性が高く、ラットやマウスとの差は1000倍以上である。この感受性の種差は αI サブユニットのN末端寄りにある最初の細胞外ドメインH1-H2のたった二つのアミノ酸置換で

規定されていることがin vitro部位指定突然変異実験で示された(Price and Lingrel, 1988)。ヒト・リンパ芽球様細胞のウアバイン抵抗性変異も同様にこの場所のミスセンス変異にのみ由来するのか、膜貫通部や細胞内ドメインでの変異も関与するのかが興味深い。ウアバイン抵抗性変異の塩基配列特異性が明らかになるのは間近いものと期待される。

4. トリフルオロチミジン抵抗性変異

1982年LiberとThillyは苦労をしてヒト・リンパ芽球様細胞からTK(チミジンカイナース)異型欠損株TK6を作成し、トリフルオロチミジン抵抗性をマーカーとする前進突然変異検出系を開発した。TKはチミジンをリン酸化するサルベージ経路の酵素である。そこで彼らが様々な変異原について調べてみた結果、TK6細胞ではチオ・グアニン抵抗性とトリフルオロチミジン抵抗性の両マーカー間で変異誘発頻度に大きい差異は認められなかった(Liber and Thilly, 1982)。私達の検討でもFig. 2○印の様に γ 線がとくにトリフルオロチミジン抵抗性をより効率よく誘発することはなかった。ところが、その後Yandellらは異型欠損株の通常の増殖速度に比べ2倍以上増殖の遅い変異体が、それまで私達が観察していた通常増殖速度の変異体とは別に存在することを、薬剤選択の時期を著しく早める事によって見い出した。

さらにこの増殖の遅い変異体の多くが TK^+ alleleを全長にわたって失っており、 TK^- alleleの半接合体か、または同型接合体であることがザザーン・プロット解析から明らかになった(Yandel et al., 1986)。続いてLiberらはアルキル化剤のEMSやフレームシフトをおこすICR191では増殖の遅いトリフルオロチミジン抵抗性変異体がそれほど誘発されないのでに対して、X線では通常増殖速度変異体の5-6倍の効率で緩徐増殖変異体が誘発されることを観察した(Liber et al., 1989)。しかし自然変異による緩徐増殖変異体の出現頻度は $4\sim6\times10^{-6}$ で通常増殖変異体の2倍であり、私達の追試確認実験では最大発現の期間が一定しないために再現性のむずかしい変異指標と考えられた。

5. 2,6ジアミノプリン抵抗性変異

染色体17番長腕に位置するTK遺伝子では、理由は不明だが、TK欠損症が疾患として存在しないので、検定株としての異型欠損細胞を得るのに培養リンパ芽球様細胞から拾った同型欠損株に復帰変異を起こさせて作成しなければならなかった(Liber and Thilly, 1982)。一方、16番長腕に遺伝子があるAPRT(アデニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ)の場合には劣性遺伝病として2,6ジハイドロキシアデニン尿路結石症が知られており(Kamatani et al., 1987)、この保因者(両親)から容易にAPRT異型欠損リンパ芽球様細胞が樹立できる。これを検定株として2,6ジアミノプリン抵抗性を指標に同型欠損への前進突然変異が検出できる(Tatsumi et al., submitted)。

この場合自然突然変異出現頻度が 10^{-5} 以上で6チオ・グアニン抵抗性にくらべて十倍近く高く、Luria-Delbrück彷徨試験によって測定した自然突然変異率も $16.5\times10^{-7}/\text{細胞/世代}$ で6チオ・グアニン抵抗性指標の約十倍高値であった。さらに γ 線照射による誘発増加も 2.4×10^{-4} (2Gy)まで認められ(Fig. 6)、誘発頻度の絶対増加は同時に測定した6チオ・グアニン抵抗性よりもはり約6倍以上高かった(Fig. 7)。

6チオ・グアニン抵抗性変異体の構造解析(Table 1)からも明らかなように、自然突然変異や電離放射線による誘発突然変異には欠失の関与が多いので、欠失の大きさが標的遺伝子内にとどまらず、隣接の遺伝子をも巻き込むほど広範である場合(multilocus mutation)を考えられる。この場合にはHPRT遺伝子のあるX染色体は半接合だから、欠失が近傍の増殖に必須の遺伝子に及べば変異体として回収されない。ところが相同染色体のある常染色体上の遺伝子においては、遺伝子量効果が無視できる場合には変異体として生存できる可能性がある(Fig. 8)。さらに常染色体の異型接合体細胞では野生型alleleに新しく突然変異が起こる場合以外に、相同染色体の間での遺伝子乗り換えや組換えによっても異型欠損接合体から同型欠損変異体が生まれる場合も考えられる。

私達が選び出した保因者由来リンパ芽球様細胞はAPRT遺伝子近傍の制限酵素認識部位の多型

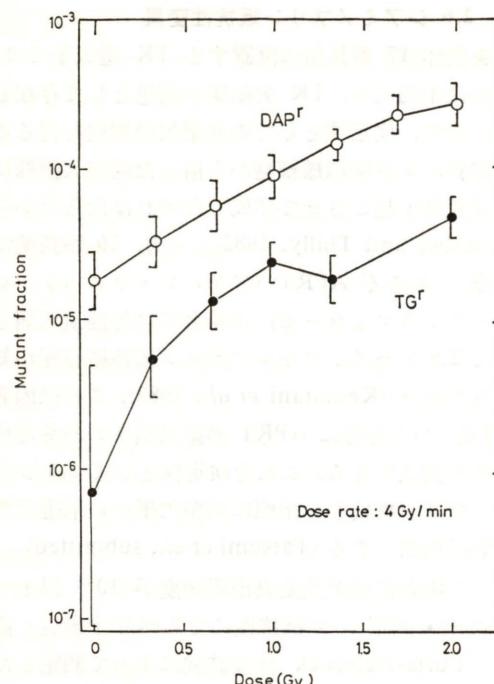


Fig. 6. 2,8 ジハイドロキシアデニン尿路結石症保因者由来リンパ芽球における γ 線誘発変異の 2 座位間の比較。
DAP^r: 2,6 ジアミノプリン抵抗性, 自然出現頻度 $\sim 2 \times 10^{-5}$, TG^r: 6 チオグアニン抵抗性, 自然出現頻度 $\sim 1 \times 10^{-6}$. 縦軸は対数目盛。(Tatsumi et al. submitted).

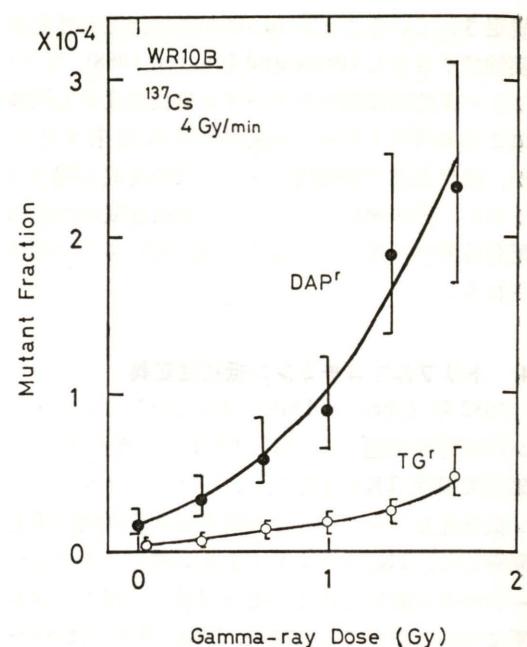


Fig. 7. 2,8 ジハイドロキシアデニン尿路結石症保因者由来リンパ芽球における γ 線誘発変異の 2 座位間の比較。
DAP^r: 2,6 ジアミノプリン抵抗性変異 (●) および 2,6 ジアミノプリン抵抗性突然変異 (○), 縦軸は対数目盛。

POSSIBLE MUTATIONAL EVENTS AT THREE LOCI

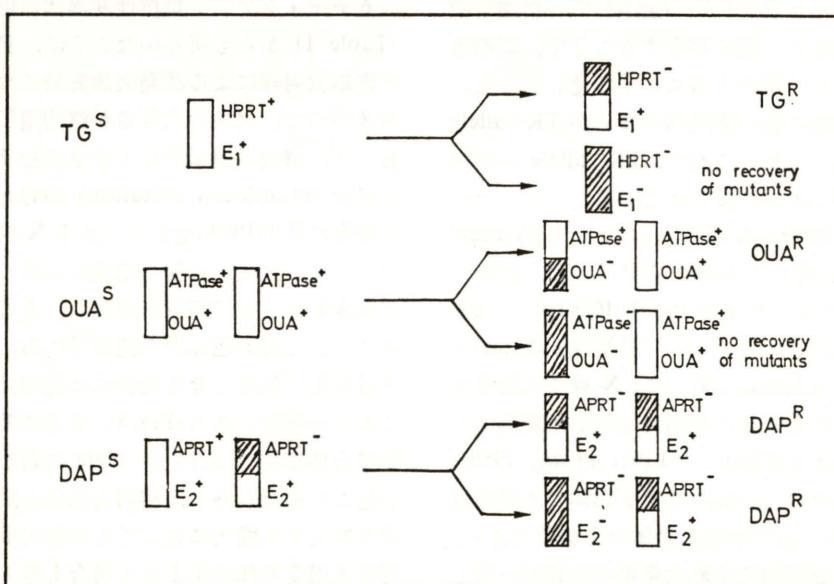


Fig. 8. 3つの突然変異検出マーカーの特性。
(斜線部分は遺伝子損傷の大きさを表わし E_1 と E_2 は仮想の隣接必須遺伝子を表わす)

(RFLP) に関しても異型接合体なので, allele loss を指標に現在, 解析を進めている。予備的検索では自然突然変異, 電離放射線誘発変異とともに allele loss を示す変異体の比率が 90% を超えている。2,6 ジアミノプリン抵抗性変異が何故 6 チオグアニン抵抗性変異より高率に検出されるのか, 上記の幾つかの可能性のうち何れが正しいかが明らかになるものと期待している。

6. おわりに

以上眺めてきたように, ヒトリンパ芽球様細胞の突然変異においても, 用いる検出指標の相違によって変異体出現頻度は大きく変わる。

この要因として, ①当該変異原の誘発する DNA 損傷の塩基特異性と標識遺伝子の標的塩基配列および隣接の塩基配列, ②必須遺伝子か否か, ③変異体検出における薬剤選択条件の厳密さの相違, ④標識遺伝子が異型接合か半接合か, ⑤標識遺伝子近傍に必須遺伝子が存在するか否か, ⑥標識遺伝子が染色体再配列の切断点にどれほど近いか, 等が考えられる。

ヒトの体細胞突然変異検定は目的とする生物学的終結点につながる突然変異の型と部位が類同の検出指標を選ぶことによって一層その価値を高められる。たとえばミスセンス塩基置換による発がん遺伝子の活性化は優性突然変異のウアバイン抵抗性変異と一面で類似し, 癌抑制遺伝子の失活は網膜芽細胞腫で観察されているように, allele loss を引き起こしやすい 2,6 ジアミノプリン抵抗性変異が極めて近い。

生殖細胞に生ずる突然変異, すなわち狭義の遺伝的障害を考える上でも, HPRT 変異や APRT 変異について, さらに遺伝子構造解析を進めることによって体細胞突然変異との変異スペクトルの異同があきらかになり, ヒトの継世代突然変異における環境変異原の関与について有益な示唆が得られるものと思われる。

謝辞

本稿に紹介した実験結果は立花 章, 有田 泉, 藤森 亮の諸氏との共同研究の成果である。その一部は文部省科学研究費補助金環境科学特別研

究, 科学技術庁原子力平和利用委託研究および日本科学振興財団の援助を受けた。

参考文献

- Arlett, C. F., D. Turnbull, S. A. Harcourt, A. R. Lehmann and C. M. Collela (1975) A comparison of the 8-azaguanine and ouabain-resistance systems for the selection of induced mutant Chinese hamster cells, *Mutat. Res.*, **33**, 261-278.
- Kamatani, N., C. Terai, S. Kuroshima, K. Nishioka and K. Mikanagi (1987) Genetic and clinical studies on 19 families with adenine phosphoribosyltransferase deficiencies, *Human Genetics*, **75**, 163-168.
- Kawakami, K., S. Noguchi, M. Noda, H. Takahashi, T. Ohta, M. Kawamura, H. Nojima, K. Nagano, T. Hitose, S. Inayama, H. Hayashida, T. Miyata and S. Numa (1985) *Nature*, **316**, 733-736.
- Liber, H. L. and W. G. Thilly (1982) Mutation assay at the thymidine kinase locus in diploid human lymphoblasts, *Mutat. Res.*, **94**, 467-485.
- Liber, H. L., D. W. Yandell and J. B. Little (1989) A comparison of mutation induction at the tk and hgprt loci in human lympho-blastoid cells; Quantitative differences are due to an additional class of mutations at the autosomal tk locus, *Mutat. Res.*, **216**, 9-17.
- Noguchi, S., M. Noda, H. Takahashi, K. Kawakami, T. Ohta, K. Nagano, T. Hitose, S. Inayama, M. Kawamura and S. Numa (1986) *FEBS Lett.*, **196**, 315-320.
- Price, E. M. and J. B. Lingrel (1988) Structure-function relationships in the Na, K-ATPase α subunit: Site-directed mutagenesis of glutamine-111 to arginine and asparagine-122 to aspartic acid generates a ouabain-resistant enzyme, *Biochemistry*, **27**, 8400-8408.
- Stout, J. T. and C. T. Caskey (1985) HPRT: gene structure, expression and mutation, *Ann. Res. Genet.*, **19**, 127-148.
- Tachibana, A., T. Ohbayashi, H. Takebe and K. Tatsumi, *Mutat. Res.*, in press.
- Tatsumi, K., M. Toyoda, T. Hashimoto, J. Furuyama, T. Kurihara, M. Inoue and H. Takebe (1987) Differential hypersensitivity of xeroderma pigmentosum lymphoblastoid cell lines to ultraviolet light mutagenesis, *Carcinogenesis*, **8**, 53-57.
- 異紘一 (1988) ヒト細胞の突然変異, 環境変異原研究, **10**, 43-52.
- Thacker, J., M. A. Stephens and A. Stretch (1978) Mutation to ouabain-resistance in Chinese hamster cells, Induction by ethyl-methanesulphonate and lack of induction by ionizing radiation, *Mutat. Res.*, **51**, 255-270.
- Turner, D. R., A. A. Morley, M. Haliandros, R.

Kutlaca and B. T. Sanderson (1985) *In vivo* somatic mutations in human lymphocytes frequently result from major gene alterations, *Nature*, **315**, 343-345.

Yandel, D. W., T. P. Dryja and J. B. Little (1986) Somatic mutations at a heterozygous autosomal locus in human cells occur more frequently by

allele loss than by intragenic structural alterations, *Somatic Cell Mol. Genet.*, **12**, 255-263.

Yang, T. P., P. I. Patel, A. C. Chinault, J. T. Stout, L. G. Jackson, B. M. Hildebrand and C. T. Caskey (1984) Molecular evidence for new mutations in the HPRT locus in Lesch-Nyhan patients, *Nature*, **310**, 412-414.

環境変異原研究 **11**: 89-93 (1989)

環境変異原による遺伝的障害を考える

—遺伝疫学の立場から—

国立遺伝学研究所 松永英

1. 疾病異常の原因としての突然変異

遺伝物質、すなわち遺伝子 DNA とそれを担う染色体は、細胞分裂のたびにきわめて正確に複製されるが、まれに突然変異する能力を具えている。遺伝物質のもつこの若干の不安定性こそ、遺伝する変異を生み出す原動力であり、この変異に自然淘汰が働いて地球上に多種多様な生物が生じたのであるが、新しい突然変異によって、これまで以上に有利な遺伝物質の產生されるチャンスはゼロに近い。

突然変異を起こした体細胞のあるものは、がん化の初発変化を受けた細胞として後に悪性腫瘍に発展することがあるが、その影響は一代限りである。これに対して、生殖細胞（配偶子）に生じた突然変異は子孫に伝えられ、さまざまな染色体異常や遺伝子異常による病気を表わしていく可能性がある。もちろん突然変異のなかには健康に影響しない（中立）と思われるものもあるが、遺伝物質の異常に起因する病気の種類はきわめて多く、メンデル遺伝性の単因子病だけでも 4000 種類近い座位が知られている (McKusick, 1988)。

日本人の一般集団で調査されたデータに基づいて推定すると、新生児コーポートの少なくとも 0.5% は生涯の間に何らかの単因子病を発症し、他の 0.5% は年ごろになるまでに何らかの染色体異常症を発現していく (Matsunaga, 1987)。染色体異常の約 3/4 と重い単因子病の一部は父または母の配偶子に生じた新生突然変異によるが、それ以外のものも源をさかのぼれば、すべて祖先の代の突

然変異に由来しているのである。したがって突然変異の発生に関する種々の要因を究明することは、学問上の挑戦であるばかりでなく、公衆衛生上の重要な課題でもある。

2. 自然突然変異と誘発突然変異—どのように検出するか

突然変異は、“自然に”起こるものと、何らかの変異原によって誘発されたものとに分けられる。前者はその作用因子が不明というだけのこと、宇宙線や大地からの放射性物質、日常摂取する食物中の未知の変異原や代謝物質、あるいはある種のウイルスなどによるものもあるかも知れない。

今日発がん性が認められている物質は、少数の例外を除き、培養細胞を用いたテスト系で変異原性が証明されているから、それらは生体内でがん化に結びつく体細胞突然変異を誘発することは疑いない。一方、(配偶子における) 遺伝する突然変異に関しては、放射線や化学変異原をショウジョウバエやマウスなどの性腺に作用させた実験で陽性の結果が得られているが、人類集団ではまだ確認された例がない。しかし標的である DNA はすべての生物で共通しているから、ヒトを例外的存在とみなす根拠はどこにもない。

配偶子における突然変異を直接検出する系としては、旭川医大・美甘和哉教授のもとで活発に行われているチャイニーズ・ハムスター卵子を用いたヒト精子の染色体観察が、現在可能な唯一の方法である。それによると正常男子から採取した精

〒411 静岡県三島市谷田 1,111

Possible genetic hazards by environmental mutagens in human populations—A genetic-epidemiologist's view—

E: Matsunaga

National Institute of Genetics, Yata 1,111 Mishima, Shizuoka-ken, 411 Japan

子は、平均して約 15% が何らかの構造異常を示し、1.3% が数の異常を持っているという（シンポジウムの講演による）。欠失などの構造異常を持った精子のはほとんどは、たとえ受精したとしても発生初期に消滅するものと思われる。

接合体での新生突然変異を検出するためには、新生児等の一般集団について、1) 特定座位の蛋白または DNA の変異、2) 染色体異常、3) 表現型の異常（例：網膜芽細胞腫や軟骨異常症のような致死的な優性遺伝病）を発見し、それらの特徴が両親のいずれにも存在しないことを確認しなければならない。ここで根本的な難題は、自然突然変異も誘発突然変異もその最終結果からは区別がつかないことがある。同じことは、体細胞突然変異についても言える。原爆に被曝した集団では白血病や甲状腺がん、乳がんなどの発生率が対照に比べて有意に高いが、個々の症例では非被曝者に発生した同種のがんから区別できないのである。

ただしこれには例外がある。アスベストに曝露されると肺がんのほかに肋膜や腹膜に血管中皮腫を生じ、塩化ビニールによって肝に血管肉腫を生ずるが、これらは特異性がきわめて高い。それは、血管中皮腫や血管肉腫が“自然に”発生することは、極端にまれだからである。

3. 広島・長崎における調査結果の意味

原爆の遺伝的影響に関する調査は、ミシガン大学の Neel 教授を中心とする日米協力事業として 1948 年に開始され、今日まで 40 年間にわたって続けられてきたもので、世界で最も大規模かつ用意周到な疫学調査である。対象は両親の一方または双方が爆心地から 2000 m 以内で被曝した者（性腺の被曝推定線量の平均はガンマ線が 0.437 Gy、中性子が 0.002 Gy）から生まれた子供と、適当な対照群である。これらについて 1. 死産、先天奇形、新生児死亡の頻度、2. 17 歳までの死亡率、3. 性染色体異数体と均衡型の常染色体構造再配列などの出現頻度、4. 血液蛋白・酵素の電気泳動上の突然変異体と酵素活性値異常の頻度を比較した結果、両群に有意差が全く認められなかった（Schull *et al.*, 1981; Awa *et al.*, 1987; Neel *et al.*, 1988）。

この所見から、もちろん被曝の遺伝的影響が全くなかったと結論できるわけではない。結果が陰性となった主な理由として、少なくも 3 つのことが考えられる。第 1 は、放射線によって誘発されやすい染色体切断や欠失をもった配偶子は、たとえ受精に関与したとしても、妊娠初期に淘汰されてしまうので、検出できなかった可能性である。第 2 は、有害効果をもたらす新生突然変異（例えれば酵素活性値を低下させるもの）の大多数は劣性で、F₁ 集団では表明されない。第 3 に、電気泳動上の突然変異体の出現はまれなので、検査の対象となった集団の大きさと座位の数（33）からみて、統計的に有意差を証明するのは恐らく無理だったのではないかと思われる。

いざれにせよ、イオン化放射線は環境変異原の最たるものであるが、その急照射を受けた人類集団でみるべき遺伝的影響を検出しえなかつことは、問題の解明がいかにむずかしいかを物語っている。

4. 自然突然変異のケース研究—網膜芽細胞腫（RB）を例として

RB は新生児コーポートの 16,000 人に一人の割で発生する悪性腫瘍であるが、ヒトで“自然に”生起している体細胞並びに配偶子突然変異を研究するのに、きわめて好都合なマーカーである（Matsunaga and Minoda, 1988）。それは RB の 95% が散発性に発生し、両眼例のすべては配偶子突然変異によるが、片眼例の約 90% は非遺伝性で、こちらは一個の網膜芽細胞におこった突然変異に由来することがわかっているからである。RB の座位は 13q14 バンド上にあり、その微細欠失ないしはこの座を含むより大きな欠失が、突然変異の本態と考えられている。なお、この突然変異が起こっただけでは細胞はまだ悪性化せず、何らかの染色体機構によって相同染色体に変化が起これり、この座位に関するホモ又はヘミ接合性の招来されることが、腫瘍発生の必要条件とされている（Murphree and Benedict, 1984）。

さて、ここで問題なのは、RB 座の突然変異（第 1 ヒット）を誘発する環境要因は何かということ

Table 1. Distribution of 753 children with sporadic unilateral retinoblastoma by month of birth

Month of birth	Obs. no.	Exp. no.	Difference Obs.-Exp.
January	74	65.4	8.6
February	62	59.4	2.6
March	56	62.7	- 6.7
April	52	62.6	- 10.6
May	57	63.4	- 6.4
June	67	60.8	6.2
July	63	66.4	- 3.4
August	66	65.9	0.1
September	60	63.5	- 3.5
October	67	62.3	4.7
November	60	58.2	1.8
December	69	62.5	6.5
Total	753	753.1	- 0.1

である。非遺伝性 RB の体細胞突然変異を誘発する環境因子としては、胎芽期から出生前後にかけて作用するイオン化放射線と向神経性の化学変異原やウイルスが疑われるが、これを本格的に調査した疫学研究はまだない。それは RB がまれな疾患であるため、充分な数の症例を集めることがむずかしいからである。

動物実験では、例えはニトロソ化合物は、経胎盤ないし新生仔期の投与によって、高率に中枢神経腫瘍を誘発する（Druckrey *et al.*, 1966）し、ヒトのアデノウイルス 12 は眼球内注射によって Rb 様腫瘍を生ずる（Mukai *et al.*, 1980）ことが知られている。また最近では、Rb 遺伝子の産物である p105-RB が、アデノウイルス E1A 蛋白などと安定した複合体を作ることが報告されている（Whyte *et al.*, 1988）。ニトロソ化合物の体内産生やアデノウイルス 12 の活動は、季節変動を受ける可能性が強い。

そこで私たちは、網膜芽細胞腫全国登録資料に基づいて、1965-1982 年に生まれた散発性片眼例 753 例の出生月の変動を分析した。これらの症例の約 90% では、胎児期または出生後の早い時期に体細胞突然変異が生じたと考えられる。対照は人口動態統計を用い、患者出生年によって補正した。Table 1 に示す通り、患者の分布は出生月によって多少変動するが、一般集団のそれとよく一致している。これから、非遺伝性 RB の体細胞突

然変異を誘発する環境因子がもしあるとすれば、それは季節変動の影響を受けにくい性質のものであることが示唆される（Matsunaga *et al.*, 1989）。

次に配偶子突然変異であるが、軟骨異常症などある種の常染色体優性遺伝病をきたす突然変異の発生は、父年齢と共に著明に増加することが知られている。RB についてこの点を検討した研究はこれまでにいくつかあり、配偶子突然変異によると考えられる散発性両眼例では、父年齢の平均が片眼例もしくは対照よりもわずかながら有意に高いことが報告されている（Vogel and Rathenberg, 1975）。しかし、どの報告も症例数が少なかったり、必ずしも適切な対照を用いているとはいえない。人口動態統計で、父年齢に関するデータが利用できる場合はむしろまれだからである。例えば、Pellie *et al.* (1973) のデータでは、対照に 1956 年フランスの人口動態値を用いているが、155 例の両眼性患者の出生年は、1951-1960 年にわたっており、その間に一般集団の父年齢分布が少しずつ推移した可能性が高い。因みに日本の人口動態統計では、父年齢の平均は 1975 年以降次第に高くなっている。

そこで私たちは、人口動態統計で父母年齢分布が公表されている 1965-1968 年および 1975-1982 年の期間に生まれた散発性両眼例 225 例について父母年齢を分析し、これを患児出生年によって補正した全国平均値と比べた。ところが Table 2 に示す通り、患児の父母年齢の平均は、対照と全く差がなかった。さらに、13q14 バンドを含む異常染色体が父由来であることの判明している 10 例の症例（Sasaki, 1989）について、両親の年齢を分析したところ、ここでも対照と全く差がなかった（Table 3）。わが国では、近年夫婦が子供をうむ年齢分布は夫 30 歳、妻 27 歳の近辺に集中し、変異の幅が著しく減少してきたから、以前に比べて父母の年齢効果は一般に検出しにくくなってきた。したがって、この所見は、軽度の父年齢効果の存在を否定するものではないが、父年齢に伴って増加する放射線や化学変異原の被曝は、RB 座の欠失を含む配偶子突然変異の発生に重要な役割を果たしていないことが示唆される。

私たちの行った散発性 RB の発生要因に関する

Table 2. Parental age distribution, observed and expected, for 225 children with sporadic bilateral retinoblastoma

Age (in years)	Paternal age			Maternal age		
	Obs	Exp	Obs/Exp	Obs	Exp	Obs/Exp
-19	1	0.4		1	1.9	
20-24	17	16.9		53	48.4	
25-29	89	90.6		114	119.6	
30-34	90	86.2		52	45.9	
35-39	19	25.1		5	8.1	
40-44	7	4.7		0	1.0	
45-49	2	0.9		0	0	
50-	0	0.2		0	0	
Total	225	225.0	1.0	225	224.9	1.0
Mean age	30.2	30.1		27.3	27.3	
Variance	20.6	20.3		12.6	15.9	

Table 3. Parental ages at the birth of children with sporadic retinoblastoma associated with chromosome abnormality of paternal origin (Data from Dr. M. S. Sasaki)

Patient No.	Sex	Laterality (B or U)	Chromosome abnormality	Age in years	
				Father	Mother
1	F	B	del(13) (q12q22)	23	24
2	M	B	del(13) (q14)	26	23
3	F	B	t(13;10) (q14;q22)	26	24
4	F	B	del(13) (q14q21)	36	26
5	M	B	t(13;6) (q14;q13)	35	32
6	M	U	del(13) (q12q14)	34	29
7	F	B	del(13) (q14q21)	29	24
8	F	B	t(13;X) (q13q22)	22	23
9	M	U	del(13) (q12q14)	41	33
10 ^{a)}	F	B	t(13;X) (q12.3;p11.21)	30	30
				Average	30.2
				Controls	26.8
					27.5

^{a)} Patient 10 was previously reported by Kajii et al. (1985).

疫学調査の特色は、患者の全国登録に基づいて被験者の数が（従来の調査に比べて）きわめて多いこと、患児並びに両親の生年月日に関する情報は役場を通して得たので正確なこと、対照に人口動態統計資料を利用し、患児の出生年によって補正した点などである。それにも拘らず、何らかの変異原によって、体細胞または配偶子突然変異が誘発されていることを疑わせる疫学的手掛りは全くつかめなかった。この所見に加えて、RBの頻度が世界的にみてかなり一様なパターンを示している (Parkin et al., 1988) ことから、散発性RBのほとんど全部は、万人に共通する何らかの細胞生物学的機構のゆらぎに伴うものであり、時代と場

所によって変動する環境変異原に帰すべき分画は、たとえあったとしても僅かなものであることが示唆される。

5. むすび

広島・長崎での被爆2世を対照とした大規模な調査の結果から、環境変異原の遺伝的影響を人類集団で検出することがいかにもむずかしいかが判る。この点に関し、何らかの技術的打開が望まれるところである。

また RB 座位を例とした疫学調査の結果からは、人類集団で生じている突然変異のほとんど全部は、環境変異原と無関係に発生していること

が示唆される。

参考文献

- Awa, A. A., T. Honda, S. Neriishi, T. Sofuni, H. Shimba, K. Ohtaki, M. Nakano, Y. Kodama, M. Itoh and H. B. Hamilton (1987) Cytogenetic study of the offspring of atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki, In: G. Obe and A. Basler (Eds.), *Cytogenetics: Basic and Applied Aspects*, Springer, Berlin, pp. 166-183.
 Druckrey, H., S. Ivankovic and R. Preussmann (1966) Teratogenic and carcinogenic effects in the offspring after single injection of ethylnitrosourea to pregnant rats, *Nature*, **210**, 1378-1379.
 Matsunaga, E. (1987) Incidence of genetic disease in Japan, In: F. Vogel and K. Sperling (Eds.), *Human Genetics*, Springer, Berlin, pp. 540-546.
 Matsunaga, E. and K. Minoda (1988) Use of retinoblastoma and Wilms' tumor as sentinel phenotypes for population surveillance, In: H. Takebe and J. Utsunomiya (Eds.), *Genetics of Human Tumors in Japan*, Gann Monograph on Cancer Research, **35**, 127-133.
 Matsunaga, E., K. Minoda and M. S. Sasaki (1989) Parental age and seasonal variation in the births of children with sporadic retinoblastoma: A mutation-epidemiologic study, *Hum. Genet.*, in press.
 McKusick, V. A. (1988) *Mendelian Inheritance in Man*, 8th edn., Johns Hopkins University Press, Baltimore.
 Mukai, N., S. S. Kalter, L. B. Cummins and V. A. Vogel, F. and R. Rathenberg (1975) Spontaneous mutation in man, *Adv. Hum. Genet.*, **5**, 223-318.
 Whyte, P., K. J. Buchkovich, J. M. Horowitz, S. H. Friend, M. Raybuck, R. A. Weinberg and E. Harlow (1988) Association between an oncogene and an antioncogene: The adenovirus E1A protein binds to the retinoblastoma gene product, *Nature*, **334**, 124-129.
 Neel, J. V., C. Satoh, K. Goriki, J. Asakawa, M. Fujita, N. Takahashi, T. Kageoka and R. Hazama (1988) Search for mutations altering protein charge and/or function in children of atomic bomb survivors: Final report, *Am. J. Hum. Genet.*, **42**, 663-676.
 Parkin, D. M., C. A. Stiller, G. J. Draper and C. A. Bieber (1988) The international incidence of childhood cancer, *Int. J. Cancer*, **42**, 511-520.
 Pellié, C., M. L. Briard, J. Feingold and J. Frézal (1973) Parental age in retinoblastoma, *Human Genet.*, **20**, 59-62.
 Sasaki, M. S. (1989) Cytogenetic aspects of cancer-predisposing genes, *Jpn. J. Hum. Genet.*, **34**, 1-16.
 Schull, W. J., M. Otake and J. V. Neel (1981) Genetic effects of the atomic bombs: A reappraisal, *Science*, **215**, 1220-1227.

「ヒト・ゲノム・プロジェクトの推進について(勧告)」を採択

平成元年11月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議は、去る10月18日から20日まで第108回総会（第14期4回目の総会）を開催しました。今回の日本学術会議だよりでは、その総会で採択された勧告を中心に、同総会の議事内容等について、お知らせいたします。

日本学術会議第108回総会報告

第108回総会の主な議事概要は次のとおりであった。

第1日（10月18日）の午前。まず、会長から、前回総会以後の経過報告が行われ、続いて、各部・委員会の報告が行われた。さらに、今回総会に提案されている3案件についてそれぞれ提案説明がなされた後、質疑応答が行われた。

第1日の午後。各部会が開催され、午前中に提案説明された総会提案案件等の審議が行われた。

第2日（10月19日）の午前。前日提案された案件の審議・採決が順次行われた。

まず、第7部の専門別の会員定数の変更並びに同部世話担当の研究連絡委員会の再編成（統合3件、分割2件、新設1件、名称変更6件）を内容とする、会則の一部改正が採択された。

続いて、第4部及び第7部の「会員の推薦に係る研究連絡委員会」の指定の変更を内容とする、関係規則の一部改正が採択された。

これらの改正は、具体的には第15期からの組織・活動に係るものである。

さらに、生命科学と生命工学特別委員会の提案による「ヒト・ゲノム・プロジェクトの推進について(勧告)」が採択された。なお、この件の審議の際には、研究成果公開の原則とプライバシー保護等の問題、「プロジェクト・チェック機構(仮称)」の果たす具体的役割等について、討議が行われた。この勧告は、同日午後直ちに内閣総理大臣に提出され、関係省庁に送付された(この勧告の詳細は、別掲参照)。

また、本総会においては、会長から、日本学術会議の移転問題に関し、前回総会以降の主な動きとして、①去る8月「国の行政機関等移転推進連絡会議」において、本会議の移転先が横浜市「みなとみらい21地区」となったこと、②これに対し三役及び運営審議会のとった対応、などについて報告があった。種々質疑応答が行われた後、これまでの三役及び運営審議会の対応については、基本的な了承がなされた。また、今後の移転に関する諸問題については、当面、三役及び運営審議会にその処理を一任することで了承された。

第2日の午後。「地球環境問題」について、活発な自由討議が行われた(この自由討議の詳細は、別掲参照)。

第3日（10月20日）午前には各常置委員会が、午後には各特別委員会が、それぞれ開催されさ。

ヒト・ゲノム・プロジェクトの推進について(勧告)

(勧告本文)

ヒト・ゲノムの全DNA塩基配列決定を主たる目標とするヒト・ゲノム・プロジェクトは、関連諸分野の学術研究に極めて大きなインパクトを与えると期待され、我が国として早急かつ重点的に推進すべきである。

そのためには、ヒト・ゲノム・プロジェクト推進組織(仮称)を設け、基本計画の立案、実施計画の策定、省庁間などの協議、国際協力、データ・ベースとレポジトリの整備などを総合的に行うべきである。

また、この推進組織との緊密な連携のもとに、研究計画の実施に伴う社会的、法律的及び倫理的諸問題を客観的かつ公正に判断するとともに、これらの諸問題に適正に対処することを目的とするプロジェクト・チェック機構(仮称)を設立し全体として調和のとれた施策を進める必要がある。

よって、日本学術会議は我が国における本プロジェクトの推進を図りそのために必要な措置を講ずるよう勧告する。

(説明) [要旨]

1 ヒト・ゲノム・プロジェクトは、人類の遺伝情報の解読と遺伝子機能の解明を目指した研究計画であり、早急かつ重点的に推進すべきである。このプロジェクトによって生命科学等の領域の技術開発が進めば、人類福祉に貢献することは疑いない。

2 ヒト・ゲノム・プロジェクトを推進するため、ヒト・ゲノム・プロジェクト推進組織(仮称)を設置する。その主たる目的は勧告本文のとおりである。

この組織は、研究の進展に弾力的に対処できるものとし、具体的問題の処理のため委員会等を設ける。運営に当たっては個々の研究者とその集団の自主性を最大限に尊重すべきである。

3 このプロジェクトの実施に伴って生じる社会的、法律的及び倫理的諸問題に適切に対処するために、プロジェクト・チェック機構(仮称)を設立する。その主たる目的は、検体提供者の保護のための基準を作成すること、情報の管理、研究計画と成果の一般への公開の基準を作成すること、知的所有権問題についての方針を作成すること、研究成果の応用段階における倫理的問題についての指針を作成することであり、目的達成のための必要な権限が与えられるべきである。

総会中の自由討議—地球環境問題—

本会議総会中の重要な行事である、自由討議が、総会2日目の10月19日の午後1時から3時間にわたって開催された。この総会中の自由討議は、会員のための一連の勉強会で、その時々の学術上の重要課題を取り上げて行われている。今回は「地球環境問題」という課題のもとに行われた。

自由討議は、渡辺格副会長の司会のもとに、5人の会員による意見発表があり、さらにこれらの意見発表をもとに会員間で活発な討議が行われた。

今回の自由討議の概要は次のとおりである。

[5人の会員による意見発表]

まず、近藤次郎第5部会員から、9月の「地球環境保全に関する東京会議」の出席報告として、①環境保全と発展途上国の資源開発、産業振興等との関わりについての討議状況、②ソ連における環境問題、③大気中の炭酸ガスの増加に伴う温暖化による地球環境への影響に関する注目すべき研究結果の発表等について紹介があった。

次に、吉野正敏第4部会員から、「環境」というもののとらえ方、考え方について、人文・社会科学的な立場からの例をも引いて意見が述べられ、また、IGBPについて、同計画は、様々な環境問題を基礎科学分野としてとらえるものであり、その実施の結果、直ちに、環境問題が全て明らかになるものではない等の発言があった。

次いで、大谷茂盛第5部会員から、同会員が委員長を務めている化学工学研究連絡委員会が新たに提唱した「地球生態工学」に関し、提唱に至った経緯及びその学問内容等について説明がなされるとともに、この件に関連する、関係学会及び関係省庁における動きについて説明が行われた。

続いて、大島康行第4部会員から、生物界と地球環境との関わりについて、①生物を媒介にした人間への影響の問題をどう捉えるかが、地球環境問題を考えていく上で非常に重要な観点である。②環境汚染が生物資源に与える影響は非常に大きく、様々な問題を生じ、結局、これが人間にねかえってくる等の発言があった。

最後に稻田誠一第3部会員から、経済活動特に生産活動あるいは技術革新と環境問題との関わりについて意見が述べられ、環境問題を考える際には、人間社会が様々な技術をどのように使用するかという、人間社会の仕組みの問題が最も重要な問題である等の発言があった。

[討議]

5人の会員による意見発表の後行われた討議では、第1部から第7部まですべての部にわたる20人を超える会員より、それぞれ専門の立場から活発な発言がなされた。

この討議の中で述べられた意見は多岐多様にわたったが、その主なものを項目にして列挙すると、「コジネレーションによるエネルギーの有効利用」、「IGBPへの人文・社会科学の関わり方」、「海洋と環境問題」、「畜産廃棄物の処理問題」、「微生物利用による都市河川、下水の浄化システム」、「環境問題と人間性との関わり」、「環境問題に対する学術会議の体制及び取り組み方」、「地球環境に関する国際協力事業についての学術会議が果たすべき役割」等であった。

なお、この総会の自由討議の内容については、後日、日本学双書として出版される予定である。

「委員会報告」3件を発表

本会議では、その意思の表出の形態の一つとして、各部・各委員会がその審議結果をとりまとめたものを、総会又は運営審議会の承認を得て、外部に発表する「報告」(通称「対外報告」と言っている)というものがある。

この日本学術会議だよりも、今までに、この対外報告を紹介してきたが、今回、最近発表されたもののうち、まだ紹介していない3件を、次に紹介する。

電子工学の体系化に向けて—電子・通信工学研究連絡委員会報告(要旨)

電子工学はそれを基礎にした通信工学や情報工学、制御工学などの急激な進展に伴って、これらの技術分野・工学分野の相互関係が極めて複雑になって来ているので、電子工学の学問・技術体系の根幹、電子工学の基盤となっている方法論、通信工学、情報工学等の応用工学とのかかわりを明らかにするために方法論的体系化を試みた。

即ち電子工学を共通基礎理論、基礎電子工学、電子デバイス・回路工学、電子装置・システム工学、応用分野と階層化し、さらに「集積回路」と「光エレクトロニクス」が電子工学の中心分野を形成しつつある重要な技術領域であるとの認識に立ち電子工学の技術要素と通信工学、情報工学との相互関連を検討した。

また電子工学体系の範囲を大学学部での教育対象分野および大学院での教育を含む研究対象分野に分類した。

「国際防災の十年」—災害科学研究者からの提言—災害工学研究連絡委員会報告(要旨)

1987年、第42回国連総会で決議された「国際防災の十年」(IDNDR)のスタートがいよいよ迫ってきた。

行政レベルでは、内閣総理大臣を本部長とする推進本部が設けられているが、この実施には科学者、研究者の各専門領域からの積極的な関与が不可欠である。国連決議に先立ち、災害工学研究連絡委員会ではこの活動の支持を表明し、またその後も米国アカデミーや国連諸機関の活動に協力してきたが、スタートに当たり、わが国の関係科学者、研究者のなすべき、あるいは行う得る事柄を提言という形で表明したものである。その内容は、①「国際防災の十年」で何をするのか、②国際共同研究の展開、③基礎研究の推進、④「国際防災の十年」の実現に向けて、より成っている。今後はその実現に向けて積極的な運動を進めていきたい。

電圧、抵抗および温度の維持方式の1990年1月1日からの変更について—標準研究連絡委員会報告(要旨)

第77回国際度量衡委員会(1988年10月開催)は、電圧、抵抗の各標準の維持方式の変更と、温度目盛の変更の3つの勧告を採択し、1990年初頭からの実施を求めた。この変更を国内に事前に周知するため、関心の高い9学会に、勧告の要旨を掲載した。以下に勧告の骨子を記す。

電圧標準はジョセフソン効果で実現し、電圧周波数係数をK_Jと記号し、その値を483 597.9 GHz/Vと定義した。抵抗標準は量子ホール効果で実現し、量子化ホール抵抗をR_Kと記号し、その値を25 812.807 Ωと定義した。温度スケールは、IPTS-68に変わり、ITS-90(1990年国際温度目盛)を定義した。変更は多岐に亘るので、詳細は関連学会誌を参照されたい。

以上の変更により、電磁気計測の精度と国際的整合性が著しく改善され、温度計測の熱力学温度との一致と低温域への拡張が達成される。

御意見・お問い合わせ等がありましたら、下記までお寄せください。

〒106 東京都港区六本木7-22-34

日本学術会議広報委員会 電話03(403)6291

日本学術会議だより №.16

公開講演会盛会裡に終了

平成2年2月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議は、平成元年度に主催の公開講演会を3回開催しました。今回の日本学術会議だよりでは、その公開講演会の概要に加えて、本会議が実施している国際的活動などについて、お知らせいたします。

日本学術会議主催公開講演会

本会議では、科学の向上発達を図り、行政、産業及び国民生活に科学を反映浸透させるという本会議の設置目的に沿うための活動の一環として、毎年、公開講演会を開催している。この講演会は、本会議会員が講師となり、学術的香気が高く、かつ、時宜にかなったテーマを選定して開催している。

今年度も3回の公開講演会を開催したので、その概要を以下に紹介する。

I. 公開講演会「人間は地球とともに生きられるか」

標記講演会は、去る平成元年10月27日(金)13時30分~17時に、本会議講堂で約280人の参加を得て開催された。

最初に、吉野正敏・第4部会員(筑波大学地球科学系教授)が、「地球の温暖化とその影響」と題して、大気中の二酸化炭素とフロン・メタンなどの増加による気温の上昇に伴う、農林水産業をはじめ人間の社会経済にもたらす大きな影響などについて述べた。

続いて、久馬一剛・第6部会員(京都大学農学部教授)が、「地球環境と農業のかかわり」と題して、人口の増加、消費水準の向上などが世界中で農業そのものの変貌を余儀なくしており、その中で土壤侵食や塩類化などによる生产力の退化(砂漠化)や、水質汚濁・土壤汚染などを引き起こしていることを指摘し、農業のあるべき姿について述べた。

最後に、藤井隆・第3部会員(名古屋大学経済学部教授)が、「地球環境の経営と人間社会の発展」と題して、地球環境の経営は、地球環境の科学的研究に加えて、人間社会の運行との相関についての研究が必要であることを指摘し、人間社会の持続的発展を考えいくための視点について述べた。

II. 公開講演会「人権の歩み」から何を学ぶか—フランス人権宣言200年を記念して—

標記講演会は、去る平成元年11月18日(土)13時30分~17時に、本会議講堂で約250人の参加を得て開催された。

最初に、弓削達・第1部会員(フェリス女学院大学長)が、「人権以前の世界」と題して、人権思想のなかったギリシャ・ローマ時代における人権思想の萌芽とも言うべきものについて、同時代の一哲学者の奴隸等をめぐる精神的苦闘を例にとって述べた。↗

次いで、大石嘉一郎・第3部会員(明治学院大学経済学部教授)が、「近代日本の人権思想—自由民権運動の人権論を中心に—」と題して、主として、明治時代の自由民権運動における人権論について、その特徴、特徴の起因となった当時の社会的条件、それが与えた影響などについて述べた。

続いて、杉本大一郎・第4部会員(東京大学教養学部教授)が、「科学技術と人権」と題して、近年の著しい科学技術の発展によってもたらされた、広い意味での「人権と自由」の様々な様相について、それらの事情と問題点などについて述べた。

最後に、南博方・第2部会員(一橋大学法学院教授)が、「人権の進化と創造」と題して、現在までの人の進化の跡を回顧するとともに、最近における人権立法や人権思想を紹介しながら、今日生成しつつある現代型の新しい人権について述べた。

III. 公開講演会「くらしと学問の近未来—これからのかくしと学問—」

標記講演会は、去る平成元年12月8日(金)13時~17時に、仙台市の勾当台会館で約70人の参加を得て開催された。

この講演会の開催に当たっては、東北大、宮城県教育委員会、仙台市教育委員会、河北新報社の後援を受けた。

最初に、藤咲謹・第7部会員(東北大名誉教授)が、「長寿社会の条件—長生きを支える医学と医療」と題して、健康を阻害する危険や長生きできるための条件を充足するには厳しい現実があることを指摘し、長生きを支える医学と医療にとっての問題点を指摘し、それらの解決策について述べた。

続いて、澤登俊雄・第2部会員(国学院大学法学院教授)が、「犯罪現象への多様な接近」と題して、犯罪抑止や犯罪者の社会復帰などのための施策の推進には犯罪や犯罪者をつくりあげていくプロセスの分析など多様な視点からの検討が不可欠であることなどについて述べた。

最後に、上飯坂實・第6部会員(東京農業大学農学部教授)が、「森とむらと都市の共生」と題して、健全な森林づくりのために都市の住民と山村の住民が連携することは、新しい人間尺度の文化の創造につながることを、日本と外国との場合を対比させて述べた。

(なお、これらの講演会の講演要旨は、「日学双書」として、(財)日本学術協力財團から出版されます。)

地球環境問題における工学研究の在り方について—第5部報告

このたび、本会議の第5部は、標記報告をとりまとめ、本会議運営審議会の承認を得て公表した。

(要旨)

近年における人間活動の大規模化は、地球環境に急速な変化をもたらし、その変化が人類の生存基盤そのものさえも脅かすようになってきた。そのため、次の世紀に向けて人類が総力を上げて取り組むべき、極めて重要かつ緊急の課題として地球環境問題が広く国際的な関心を集めているのは周知のとおりである。

元来、この問題は、時間的にも空間的にも極めてスケールが大きく、かつ、気圧、水圏、地圏及び生物圏全体にわたる相互干渉の結果として現れるものだけに、対応策を選択するに当たって、従来とは異なった長期的、学術的かつ国際的視野に立ち、持続的に取り組む必要がある。また、局所的な現象に目を奪われた一時的な対応や規制ではなく、地球全体における持続的な発展という観点から、地球を一つのシステムとして捉え、自然環境と人間活動とをいかなる価値観に基づいて調和させていくべきかという視点から、総合的に取り組むべき問題である。

地球環境問題が人間活動の結果として現出したことを考えると、今なすべきことは、地球環境に配慮した健全な人間活動のために新しい工学的基準を導入するなどにより、人間活動と地球環境の調和に役立つ広く新しい学問領域を開拓することである。

それは、地球環境と人間活動とを総合して一つのシステムとして捉え、そこにおける物質・エネルギー循環・エネルギー収支のあるべき姿を定量的に評価できる手法を開発し、人類が生存し得る新しい技術体系を構築する学問領域である。このような地球システムの工学を「地球システム工学」と呼ぶことにする。

このような新たな学問領域創出と新たな技術体系確立のためには、既往の学問分野からの協力により速やかに研究体制を構築する必要がある。このためには、当面、研究プロジェクトを設定することにより強力な研究推進を行う必要がある。我が国がかかる学問領域を率先して創造し、国内外の研究者とともに地球環境問題解決に取り組むことは、研究開発力、技術力に対する海外の期待というものを考えた時、我が国の責務と考えられる。

平成2年(1990年)度共同主催国際会議

本会議は、昭和28年以降おおむね4件の学術関係国際会議を関係学術研究団体と共同主催してきたが、平成2年(1990年)度には、2件増えて、次の6国際会議を開催する。

■国際土壤科学会議

開催期間 平成2年8月12日～18日
開催場所 国立京都国際会館(京都市)
参加者数 国外1,000人、国内500人、計1,500人
共催団体 (社)日本土壤肥料学会

■第22回国際応用心理学会議

開催期間 平成2年7月22日～27日
開催場所 国立京都国際会館(京都市)
参加者数 国外450人、国内550人、計1,000人
共催団体 日本心理学会

- 第15回国際微生物学会議
開催期間 平成2年9月13日～22日
開催場所 大阪城ホール外(大阪市)
参加者数 国外2,000人、国内3,500人、計5,500人
共催団体 日本微生物学協会
- 第11回国際数学連合総会及び第21回国際数学者会議
開催期間 平成2年8月18日～29日
開催場所 神戸国際会議場(神戸市)外
参加者数 国外1,500人、国内2,000人、計3,500人
共催団体 (社)日本数学会外6学会
- 第11回国際神経病理学会議
開催期間 平成2年9月2日～8日
開催場所 国立京都国際会館(京都市)
参加者数 国外600人、国内900人、計1,500人
共催団体 日本神経病理学会
- 第5回国際生態学会議
開催期間 平成2年8月23日～30日
開催場所 横浜プリンスホテル(横浜市)
参加者数 国外900人、国内1,000人、計1,900人
共催団体 日本生態学会

二国間学術交流事業

日本学術会議では、二国間学術交流事業として、毎年2つの代表団を外国に派遣し、各訪問国の科学者等と学術上の諸問題について意見交換を行って、相互理解の促進を図る事業を行っている。

平成元年度には、①10月25日から11月4日まで、イタリア及びイスラエルへ、渡邊格副会長以下5名の会員から成る代表団を、②12月4日から12日まで、インドへ、大石泰彦副会長以下6名の会員から成る代表団をそれぞれ派遣した。

イタリア及びイスラエル派遣代表団は、イタリアでは、イタリア学術研究会議、大学・科学技術研究省、ローマ大学、ローマ日本文化会館など、イスラエルでは、イスラエル学術会議、連邦内務省教育・科学局、イスラエル科学財團、ベルン大学、チューリッヒ大学などを訪問した。

各訪問先では、関係者との間で、それぞれの国の学術研究体制や科学技術政策などをめぐって意見交換が行われたが、特に、イタリアでは、研究行政の一本化を図るために、大学を文部省の管轄からはずして、大学・科学技術研究省を設置していることについて、また、イスラエルでは、連邦政府とともに、強い権限を持つ州政府が存在する同国の行政の仕組みと学術行政との関連について、それぞれ熱心に意見の交換がなされた。

インド派遣代表団は、インド国家科学アカデミー、科学産業研究会議、計画委員会、科学技術庁、ネルー大学、デリー大学、タタ基礎研究所などを訪問した。

各訪問先では、関係者との間で、科学技術振興方策及び両国間の今後の積極的な学術交流などをめぐって意見交換が行われ、また、政変の直後ということもあって、選挙の話から、経済力の向上、中産階級の躍進などの政治、経済の問題などについて熱心に意見の交換がなされた。

御意見・お問い合わせ等がありましたら、下記までお寄せください。
〒106 東京都港区六本木7-22-34
日本学術会議広報委員会 電話03(403)6291

日本環境変異原学会会則

第1条 本会は日本環境変異原学会(The Environmental Mutagen Society of Japan)と称する。

第2条 本会は人間環境における突然変異原、とくに公衆の健康に重大な関係を有する突然変異原の研究を推進することを目的とする。

第3条 本会の会員は、正会員、学生会員および賛助会員とする。正会員は本会の趣旨に賛同し、環境変異原の研究に必要な知識と経験を有し、定められた会費を納入した者とする。学生会員は、大学、または大学院に在籍し、毎年所定の手続を経て、定められた会費を納入した者とする。賛助会員はこの学会の事業を後援し、定められた会費を納入した個人または法人とする。

第4条 本会に入会を希望するものは、1名以上の評議員の推せん書とともに所定の申込書に記入の上、本会事務所に申込むものとする。

第5条 会員は毎年会費を納入しなければならない。次年度の年会費の額は評議員会において審議し総会において定める。

第6条 本会はその目的を達成するために次の事業を行う。

1. 年1回大会を開催し、学術上の研究成果の発表および知識の交換を行う。
2. 奨励賞を設け、環境変異原の分野ですぐれた研究を行い、将来の成果が期待される研究者(原則として会員)に授与する。
3. Mutation Research誌の特別巻を特価で購入配付する。
4. 国際環境変異原学会連合に加入し、国際協力に必要な活動を行う。
5. その他本会の目的を達成するために必要な活動を行う。

第7条 本会に次のとおり役員および評議員を置く。

会長 1名 庶務幹事 1名
会計幹事 1名 國際交流幹事 1名
編集幹事 1名 会計監査 2名
および評議員若干名。

評議員は正会員の投票により選ぶ。

会長は評議員の互選によって定める。

庶務幹事、会計幹事、国際交流幹事、編集幹事および会計監査は会長が委嘱する。この他会長は必要な場合には会員の中より若干名を指名し総会の承諾を得て、評議員に加えることができる。

役員および評議員の任期は2年とする。役員が同じ任務に引続いて就任する場合には2期をもって限度とする。

第8条 評議員会は会員を代表し、事業計画、経費の収支、予算決算およびその他の重要な事項について審議する。

第9条 本会は年1回総会を開く。

総会において会則の改廃制定、予算・決算の承認、その他評議員会において審議した重要な事項の承認を行う。

第10条 本会の事務執行機関は会長および4名の幹事をもって構成する。

会長は執行機関の長となり、また本会を代表する。

第11条 本会の事務は暦年による。

第12条 本会に名誉会員をおく。

附記

1. 本会則は平成2年1月1日より施行する。
 2. 本会は事務所を静岡県三島市谷田1,111番地に置く。
 3. 正会員、学生会員および賛助会員の会費は、それぞれ年額5,000円、3,000円および1口20,000円とする。
- ただし、Mutation Research誌の特別巻の配付を希望するものは、会費の他に別途定める購読料を本会へ前納するものとする。

日本環境変異原学会平成2年～3年度役員名簿

日本環境変異原学会平成2年～3年度評議員名簿

(五十音順)

会長	早津 彦哉
庶務幹事	祖父尼 俊雄
会計幹事	渋谷 徹
国際交流幹事	長尾 美奈子
編集幹事	佐藤 茂秋

会計監査	高山 昭三
"	加藤 隆一

賞等選考委員	大西 克成
	長尾 美奈子
	土川 清
	祖父尼 俊雄
	菊池 康基

編集委員	島田 弘康
	後藤 純雄
	菊川 清見
	林 真

企画委員	大西 克成
	菊池 康基
	若林 敬二

氏名	所属
乾 直道	日本たばこ産業株医薬研究所
大西 克成	徳島大学医学部
菊川 清見	東京薬科大学
菊池 康基	武田薬品工業株研究開発本部
黒木 登志夫	東京大学医科学研究所
黒田 行昭	国立遺伝学研究所
近藤 宗平	近畿大学原子力研究所
佐々木 正夫	京都大学放射線生物研究センター
定家 義人	国立遺伝学研究所
佐藤 茂秋	富山県衛生研究所
渋谷 徹	財食品薬品安全センター秦野研究所
島田 弘康	第一製薬株中央研究所
清水 英佑	東京慈恵会医科大学
白須 泰彦	財残留農薬研究所
瀬野 悍二	国立遺伝学研究所
祖父尼 俊雄	国立衛生試験所
常盤 寛	福岡県衛生公害センター
長尾 美奈子	国立がんセンター研究所
西岡 一	同志社大学工学部
林 真	国立衛生試験所
早津 彦哉	岡山大学薬学部
松下 秀鶴	国立公衆衛生院
松島 泰次郎	東京大学医科学研究所
山添 康	慶應義塾大学医学部
吉川 邦衛	三菱化成工業株総合研究所
若林 敬二	国立がんセンター研究所

日本環境変異原学会入会申込書

平成 年 月 日

日本環境変異原学会長 殿

貴学会に入会いたしましたく評議員の推薦を添えて申し込みます。

フリガナ			
氏名	印		
ローマ字つづり			
生年月日、性別	年	月	日
	男	女	

所属機関 部局 職名	(和)		
	(英)		
所属機関 所在地	〒	電話	内線
	(和)	(英)	
自宅 住所	〒	電話	内線
	(和)	(英)	
会誌送付先	① 所属機関	② 自宅	

学年	学部	学部学校名	卒業年次	年
歴	大学院	課程学校名	修了年次	年
学位			取得年	年
研究領域 (下記にあてはまる項の2, 3を○で囲んでください)				
1. 変異原 2. 検出系 3. 毒性 4. 発生異常 5. 汚染 6. 疫学 7. 遺伝 8. がん 9. 微生物 10. 高等動物 11. 高等植物 12. 食品 13. 気体・粉じん 14. 医薬品 15. 農薬 16. 代謝 17. 分子機構 18. その他()				

研究歴 (現在行っている研究の動向や興味の点について数行記入のこと)

加入学会名 (本学会以外の)

推薦者 (日本環境変異原学会評議員)

氏名(署名)

印

入会申込者との関係 (数行ご記入ください)

環境変異原研究 第 11 卷 第 3 号 1989 年

平成元年 12 月 25 日 印 刷

平成元年 12 月 25 日 発 行

発 行 者 日本環境変異原学会

編集責任者 松 島 泰次郎

東京大学医科学研究所

癌生物学研究部

〒108 東京都港区白金台 4-6-1

T E L 03-443-8111 内 506

印 刷 所 三造写真工業株式会社

〒105 東京都港区新橋 5-23-7

T E L 03-433-1869

ISSN 0910—0865