

Title	マウス体外受精に関する基礎的研究とその応用
Author(s)	岡部, 勝
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32262
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	岡 部 勝
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 4 3 8 1 号
学位授与の日付	昭 和 53 年 9 月 12 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	マウス体外受精に関する基礎的研究とその応用
論文審査委員	(主査) 教 授 青 沼 繁 (副査) 教 授 上 原 喜 八 郎 教 授 岩 田 平 太 郎 教 授 近 藤 雅 臣

論 文 内 容 の 要 旨

緒 論

一般に哺乳類の精子は射精されたままの状態では受精する能力を有しておらず、雌性生殖路内において一定期間滞留する間に何らかの生理的機能変化をとげ初めて受精能を獲得する。この現象はcapacitationと呼ばれ、capacitationした精子は精漿等とincubationを行なうことによりその受精能を消失すること(decapacitation)も知られている。これは精漿中に存在するdecapacitation factor (DF)の影響と考えられるが最近著者らは、DFが精子自身に含まれることを示し、精子capacitationという現象は、このDFが精子より遊離することによりおこることを示唆した。精子capacitationの有無を判定する方法として間接的には、acrosome reactionの観察や、精子呼吸、解糖能の測定があげられるが、直接的には受精を行なわせてその受精能を観察する以外にはない。これまで行なわれてきた方法は、種々の状態の精子を雌性生殖路内に注入し、その受精能をみるものであり、実際の受精条件に近いという利点はあるが、雌性生殖路内の種々の因子の存在を考える時、必ずしもこの方法が精子自身の受精能の検討に適しているとはいえない。著者は、in vitroにおいて受精を行なわせることができれば、雌性側の複雑な因子を除いて精子の受精能を測定できると考え、また、in vitroにおいて、受精を詳細に検討すれば、精子capacitationの解明、ひいては、受精現象の解明につながると考え、こうした観点から、capacitationしやすいといわれるマウスをとりあげ、その体外受精を試み、基礎的な検討を加えると共に、その応用として、この系を用い、ラット睾丸より精子capacitationを抑制する物質の抽出精製を試みた。

本 論

第一章 体外受精を行なわせる基礎的條件の検討

可能なかぎり簡単な組成のmedium中において再現性よく体外受精を行なわせるという観点から、mediumには卵胞液や血清の添加をしないものを採用し実験を行なった。副睪丸頭より得た精子は受精能を持たず、副睪丸尾および輸精管からのもののみで受精可能であった。また、精子濃度は 1.5×10^8 sperm/mlで最も良い結果が得られた。この系における受精の時間的経過はFig. 1に示される通りであり、受精の各時期の写真をPlate 1~5に示す。精子の卵zona pellucida内へのpenetrationがおこったものは、その後、ほとんどが2卵割卵へ進むことが認められた。

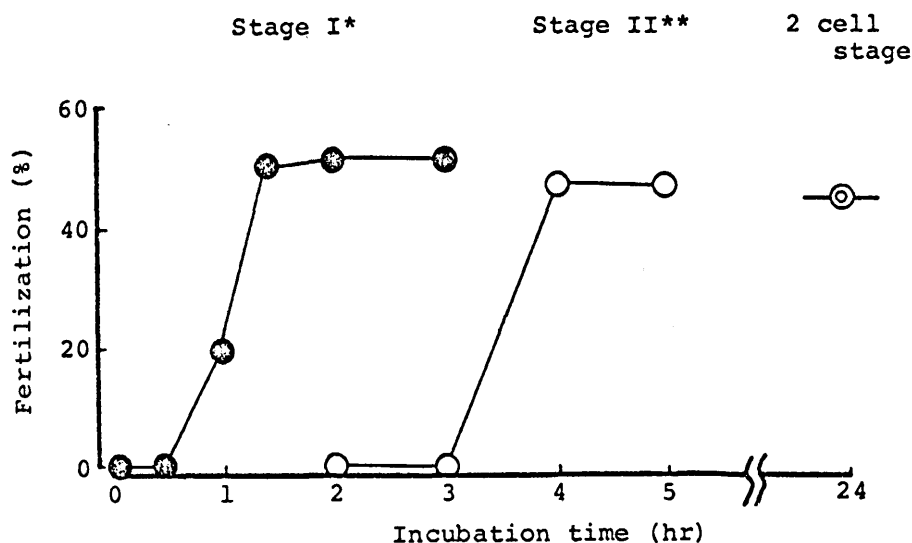


Fig. 1 Time Course of *in Vitro* Fertilization of Mouse Ova

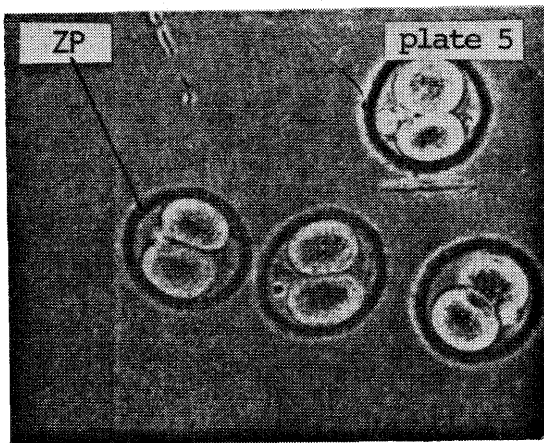
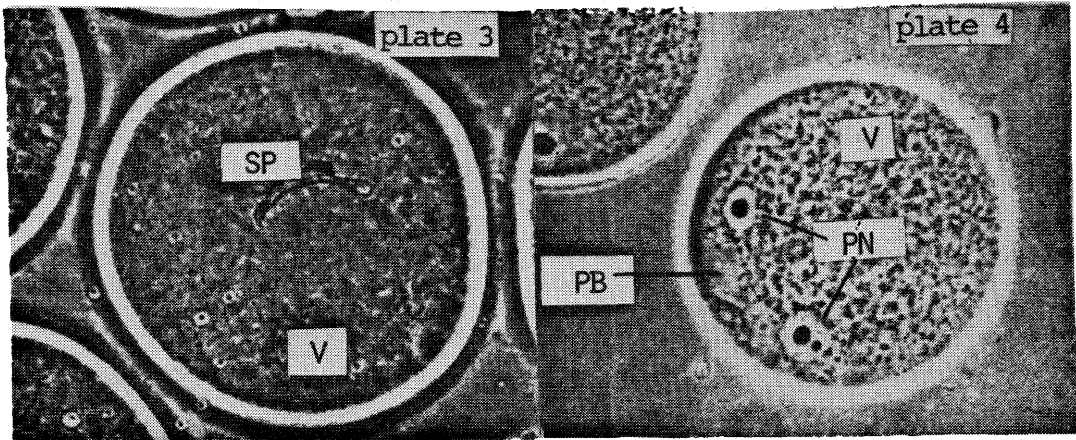
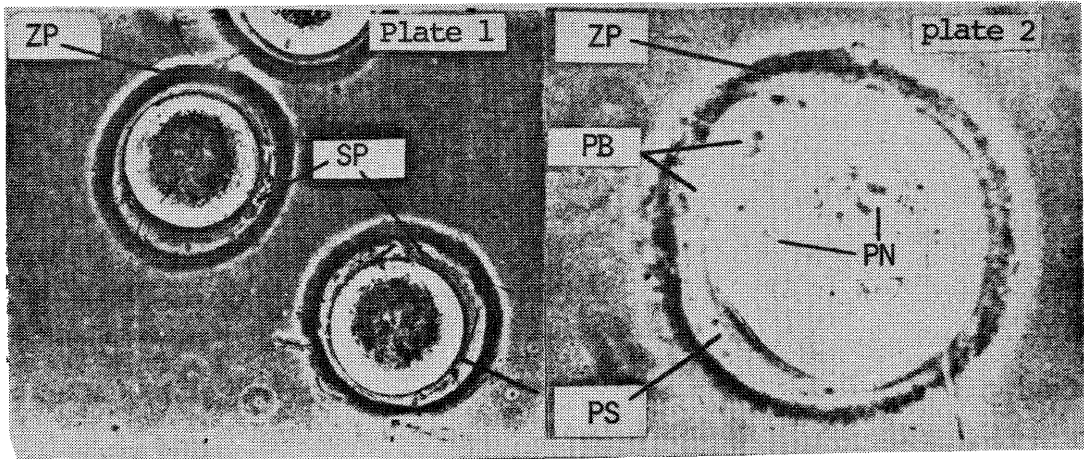
* ova with penetrated sperm in perivitelline space

** ova with male and female pronuclei

mediumのpHは、受精率に大きく影響を与え、pH 8.0において最も高い受精率が得られた。また、良好な受精率の得られるpHでは、精子の卵zona pellucida内への侵入の速度も速いことが示された。マウス体外受精の系において、精子は一定の時間を経て初めて卵内に侵入することができた。精子のpreincubationはこの時間を短縮し、マウス精子においてもcapacitationが必要であること、及び、それに要する時間は35~40分であることが示された (Fig. 2)。

第二章 Zona pellucidaのproteaseに対する感受性の変化と卵の受精能

卵をproteaseにより処理すると、その外層を形成するzona pellucidaが隔解することは知られていたが、m-KRB中においては一部の卵のzona pellucidaはproteaseに対して抵抗性を示すことが認められた。protease処理を行なった後もzona pellucidaを有する卵を集め体外受精の系に供したが、このような卵は受精能を持たなかった。卵の受精能の持続期間を検討したところ、排卵後12時間を経過したものは、ほとんど受精能を消失していることが認められた。そこで、排卵後の種々の時間に卵を輸卵管より採取し、その受精能及びproteaseに対するzona pellucidaの感受性を検討した。尚、



Explanation for the plate

- Plate 1. Ova with sperm in perivitelline space (stage I). ($\times 200$)
- Plate 2. Ova in stage I (gently pressed under cover glass). ($\times 400$)
- Plate 3. Ova with male and female pronuclei (stage II). ($\times 400$)
- Plate 4. Ova in stage II (gently pressed under cover glass). ($\times 400$)
- Plate 5. 2-cell ova observed 24 hr after cultivation. ($\times 160$)

ZP: zona pellucida PS: perivitelline space
 V: vitellus PN: pronuclei PB: polarbody SP: sperm

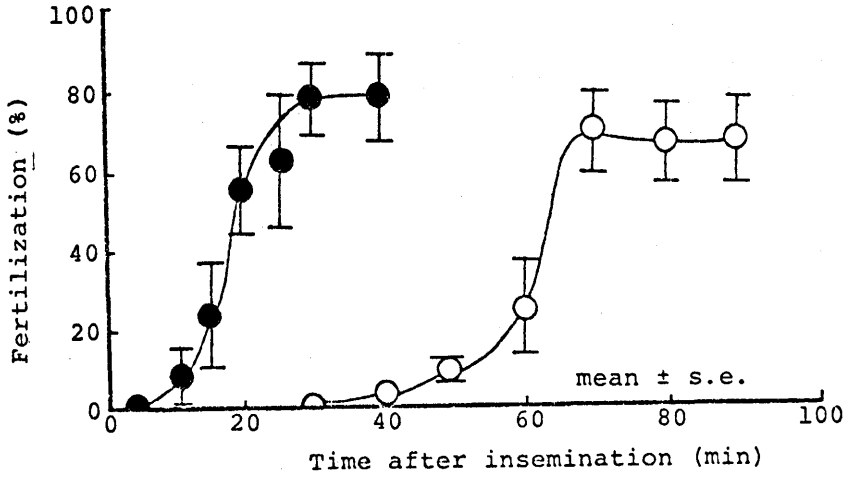


Fig.2 Effect of Sperm Preincubation on the Time Course of *in Vitro* Fertilization of Mouse Ova

- control sperm (epididymal sperm were inseminated within 3 min after preparation)
- preincubated sperm (epididymal sperm were incubated at 37C for 60 min in m-KRB medium at the concentration of $1-1.5 \times 10^6$ sperm/ml prior insemination)

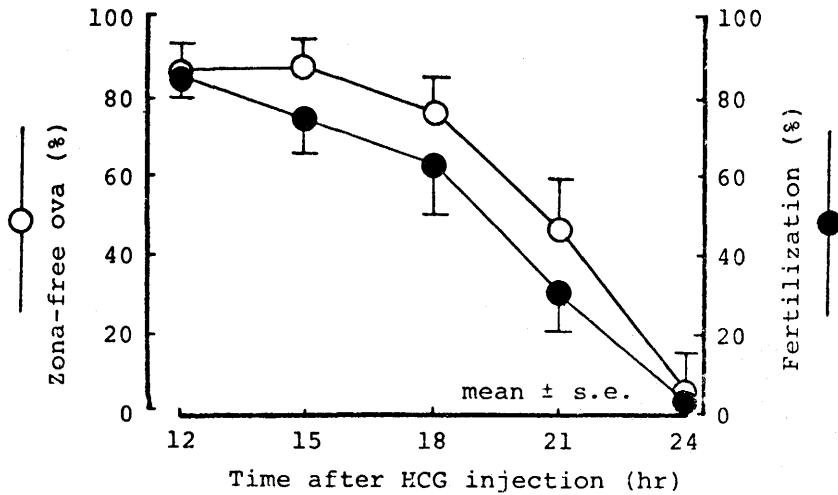


Fig.3 Change in Sensitivity of Zona Pellucida to Chymotrypsin in Oviduct Female mouse were induced to superovulate by *ip.* injection of 5 IU of PMS 48 hr before an *ip.* injection of 5 IU of HCG and the ova were collected from oviduct at various time after injection of HCG.

proteaseとしてはchymotrypsinを用いた。その結果、Fig. 3に示されるようにzona pellucidaは、排卵後、受精能が低下してゆくのに伴ない、そのproteaseに対する感受性が減少してゆくことが明らかとなった。しかし、排卵後直ちに卵を採取し、*in vitro*において培養を行なった場合や、排卵直後にPMSの投与を行なったの（Fig. 5）では時間の経過に伴う受精能の低下やzona pellucidaのproteaseに対する感受性の減少は認められなかった。下垂体—卵巢の系を介して雌性は性周期を発現し、排卵をおこし、その後、着床の準備として子宮内膜の肥厚や黄体の形成を行なうことはよく知られているが、今回の実験において、下垂体—卵巢の系は、雌性生殖路内を受精に適した環境に保つだけでなく、卵の受精能をもcontrolしていることが示唆され、不妊等の関連において興味深い知見と考えられた。

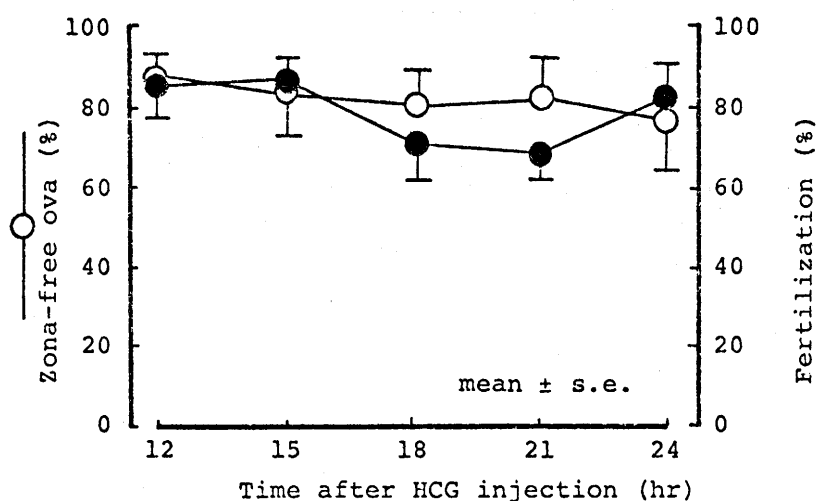


Fig. 4 Change in Sensitivity of Zona Pellucida to Chymotrypsin *in Vitro*
Ova were collected from female induced superovulation in conventionally 12 hr after HCG injection and transferred to culture medium

卵のzona pellucidaは受精時に変化し、それ以上の精子が侵入するのを抑える働きを持つ。そこで、受精の前後においても、このようなzona pellucidaの変化を検討し、proteaseに対する感受性に有意な差を認めた。zona pellucidaは雌性生殖路内においては徐々に、また受精時には急激にproteaseに対する感受性を消失し、受精の制御を行なうことが示された。

第三章 受精阻害物質の検定手段としてのマウス体外受精の応用

decapacitation factor (DF)には種特異性がないことが報告されていることより、モルモット精子より得られるDFがマウス体外受精の系に有効であるか、また、このDFの酵素処理安定性について検討を行なった。その結果、マウス体外受精はDFの検定手段となり得ること、また、モルモット精子より得られるDFは、 β -amylase処理により失活することが判明した。

次にラット睾丸を原料としてマウス体外受精の系を用い受精阻害因子の抽出精製を行なった。Fig.

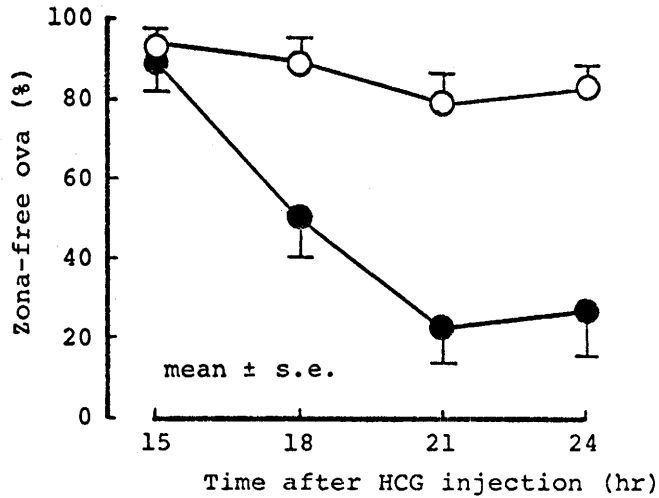


Fig. 5 Effect of PMS and HCG Injection on the Decrease of Sensitivity of Zona Pellucida to Chymotrypsin. PMS (5IU) or HCG (5IU) were injected to superovulated female 12 hr and 18 hr after HCG injection. Ova collected from oviduct at various time were incubated in medium containing chymotrypsin ($25 \mu\text{g/ml}$).

—○—PMS injection —●—HCG injection

6に示す方法により得られた物質は、disc電気泳動、アンフォラインカラム電気泳動において単一であり、分子量はSDS-ポリアクリルアミド電気泳動により7500と算定された。このものは、マウス精子がcapacitationすることを抑制する作用を有するが、capacitation精子の受精能には影響を及ぼさなかった。このものの作用—用量曲線はFig. 7に示すとうりであった。

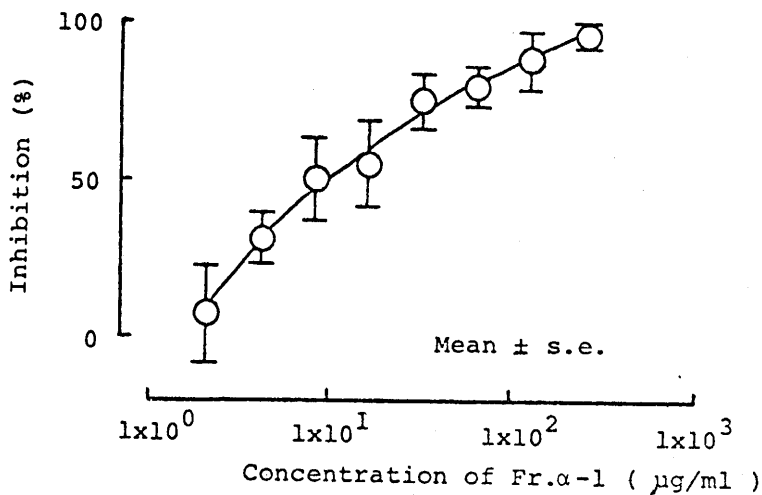


Fig. 7 Dose Response Curve of Fertilization Inhibitory Effect of Fr. α -1

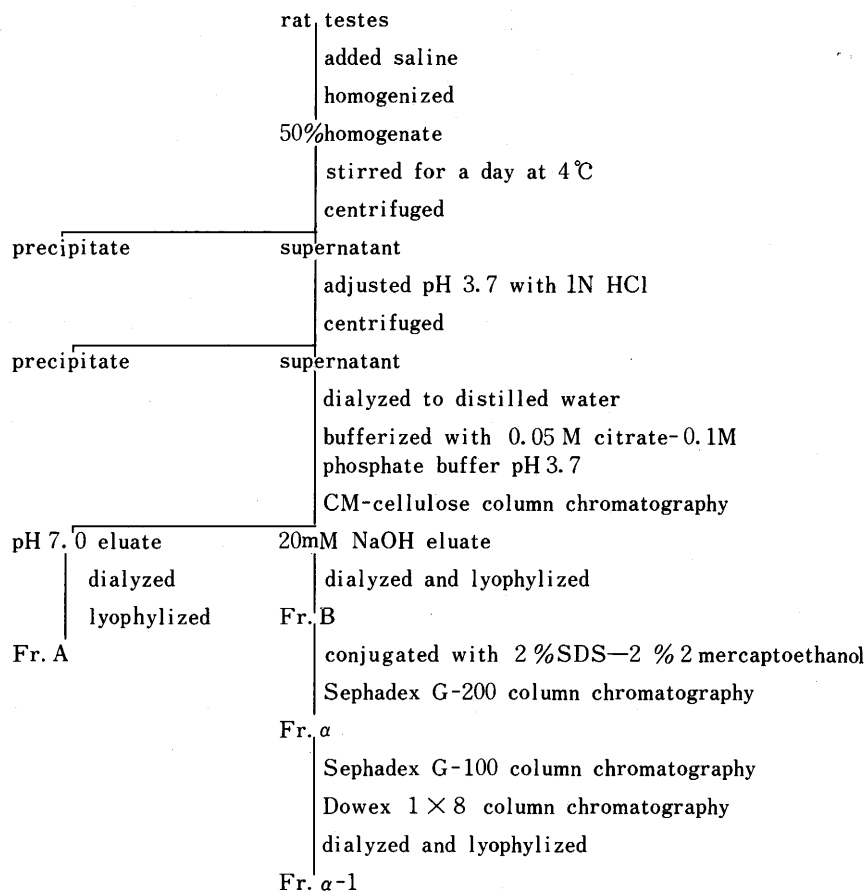


Fig. 6 Flow Diagram for Mouse in Vitro Fertilization Inhibitory Substance Isolation

本物質はTable I に示される物理化学的性状を有していた。また、アミノ酸組成はTable II に示されるものであった。

Table I Physicochemical Properties of Fr. α -1

Composition		
protein	92%	(biuret method)
sugar	4%	(phenol-sulfuric acid method)
Molecular weight	7500	(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)
Isoelectric point	pH 4.9	(electrofocusing on carrier ampholite)
[1% 1 cm, 280 nm	15.3	(in formic acid, acetic acid, water-25:87:888)

結 論

1) 体外受精に用いる精子は副睾丸尾ないしは、輸精管よりのものが適当であり、精子濃度は $1.5 \times$

Table II Amino Acid Composition of Fr. α -1

Amino acid	Mole %	Amino acid residues/mole of protein	Amino acid	Mole %	Amino acid residues/mole of protein
Asp	8.08	4	Met	2.29	1
Thr	4.89	3	Ile	5.33	3
Ser	6.26	3	Leu	10.03	6
Glu	10.67	6	Tyr	4.21	2
Pro	4.52	3	Phe	5.07	3
Gly	8.22	5	Trp*	2.19	1
Ala	6.97	4	Lys	5.84	3
Val	7.07	4	His	2.20	1
1/2 Cys	1.80	1	Arg	3.95	2

* By ultraviolet absorption method

10⁵ sperm/ml が最適であった。マウスにおいても明らかに精子はcapacitationを必要としており、それに要する時間は35~40分であることを認めた。mediumのpHは受精率に大きく影響し、最適 pH は8.0であった。しかし、pHによってcapacitationは影響を受けておらず、精子のzona pellucida通過速度がregulateされていることが判明した。また、精子insemination後に卵の受精能が消失することや、卵採取時間によっては、受精能を持たないものが存在することも明らかとなり、再現性のよいマウス体外受精の系を確立した。

2) 排卵後、時間の経過に伴ない、卵の受精能は次第に減弱し、ついには消失することを認めた。しかし、ovum donorにPMSを追加投与した場合や*in vitro*に卵を培養する間には、受精能は保持されることより、この受精能の消失は単なる卵のagingではなく、内分泌系の支配を受ける受精の制御反応であることを明らかにした。さらに、この制御はzona pellucidaのproteaseに対する感受性の消失に基づき行なわれており、多精子受精も同様の機構で阻止されていることが示唆され、卵の受精能解明の端緒を開いた。

3) ラット辜丸よりマウス精子のcapacitationを抑制する物質の抽出精製を試み、分子量7500、等電点pH 4.9、4%の糖を含む蛋白質を単離した。このものは、一旦capacitationした精子の受精能は抑制しないが、精子capacitationをrepressする性質を有していた。

論文の審査結果の要旨

マウス体外受精の基礎的な検討を行い併せて、その系を用いラット辜丸より精子capacitationを抑制する物質の抽出精製を行い、分子量7500、等電点pH 4.9、4%の糖を含む蛋白質を単離した。

よって本論文は薬学博士の価値あるものと認める。