

Title	モノクローナル抗体を用いた受精能獲得精子の識別に関する基礎的研究
Author(s)	應, 星
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38770">https://hdl.handle.net/11094/38770</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏 名	應 星
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 3 3 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 6 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用薬学専攻
学 位 論 文 名	モノクローナル抗体を用いた受精能獲得精子の識別に関する基礎的研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 三 村 務 (副査) 教 授 眞 弓 忠 範 教 授 田 中 慶 一 教 授 馬 場 明 道

### 論 文 内 容 の 要 旨

一般に哺乳類では、射精された直後の精子には卵子との融合能がなく、子宮、輸卵管あるいは試験管内の適当な環境下で、精子はcapacitationと呼ばれる生理的な機能変化を起こした後、先体部分の細胞膜が脱落して新たに内先体膜が露出する先体反応を起こし初めて受精能を獲得する。従って先体反応を起こした精子には新しく卵子と相互認識をするための分子が発現すると考えられる。この分子を明らかにすることは受精メカニズム解明に重要であると考えた。そこで、まずヒト先体反応精子に対するモノクローナル抗体を作成し、その抗原を明らかにすると共にその抗体の臨床的応用への基礎研究を行なった。

先体反応を誘発したヒト精子をマウスに免疫し、常法に従い9種類の抗ヒト精子モノクローナル抗体を作成した。これらの抗体と精子の反応性を調べたところ、MH61抗体のみが新鮮な精子とは殆ど反応せず、A23187処理により先体反応を誘発した精子に反応性を有していた。しかもその反応部位は、精子の頭部に限られており、MH61抗体は先体反応精子と結合する可能性が示唆された。そこで、MH61抗体についてさらに検討を行った。ハムスター裸卵に結合しているヒト先体反応精子に対するMH61抗体の反応性を、間接蛍光抗体法を用いて調べたところ、全ての精子が染色され、しかも染色は頭部に局限されていることが認められた。さらに、ヒト精子受精能を評価するハムスターテスト (zona-free hamster egg sperm penetration assay, 以下SPAと略記) において、MH61抗体はヒト精子のハムスター裸卵への融合を阻害した。従って、MH61抗体の認識する抗原は精子と卵子の相互認識に深く関わる分子であることが示された。そこで、この抗体の認識する抗原 (以下MH61抗原と略記) の性質とそのアミノ酸配列について検討を行なった。その結果、MH61抗原の分子量は43kDであることを明らかにした。さらに、精製したMH61抗原のN末端の4番目までの23個のアミノ酸配列を同定したところ、CD46と呼ばれる膜蛋白質のN末端の4番目までの23個のアミノ酸配列と全く同一であることが判明した。

MH61抗原は先体反応を起こした精子の表面に現われ、精子と卵子の融合に深く関与していることから、これを認識するMH61抗体は先体反応精子を検出できることが示唆された。そこで、MH61抗体を結合させた免疫磁気ビーズを作製し、これを用いた先体反応精子の検出について検討を行なった。MH61-ビーズと結合した精子に対して、トリプルステイン法を用いて染色を行ったところ、先体反応を起こしている精子の割合は、選別せずに集めた通常の精子より6倍以上高いことが認められた。さらに、MH61-ビーズと結合した精子は先体反応を終えていることを、走査型電子顕微鏡の観察により確認した。これらのことから、MH61-ビーズを用いて先体反応精子の選別及び濃縮

が可能であることが示された。また、異なる受精能を持つ精子懸濁液について、それぞれ MH61 - ビーズに対する結合性および SPA を同時に行った結果、二つの測定法の高い相関性が認められた。以上の結果より、MH61 - ビーズを用いることにより簡便かつ迅速に精子の受精能が推定でき、従来より精子受精能の診断に用いられてきた、長時間かつ煩雑な操作を必要とする SPA に代わりうるということが示された。

次いで、MH61 - ビーズの臨床応用を目的として、不妊治療への適用に関する基礎的な検討を行なった。近年、不妊治療に顕微受精法が、特に卵胞腔内に精子を注入する精子卵胞腔内注入法が開発され、臨床応用されるようになってきたが、妊娠の成功率がまだ低いのが現状である。その一因には、任意に注入した精子の全てが先体反応を起こせないためであると思われる。もし MH61 - ビーズで選別した先体反応精子を卵胞腔内に注入して、受精率を上昇させることができれば、この技術は完全なものに近づくと思われる。そこで、MH61 - ビーズを用いて選別したヒト精子をハムスター卵子の卵胞腔内に注入した結果、任意に注入した場合に比べ2.5倍以上の融合率の上昇が認められ、MH61 - ビーズの不妊治療への応用の可能性が示された。

以上をまとめると、先体反応を誘発したヒト精子をマウスに免疫し、抗ヒト精子モノクローナル抗体 MH61 を得た。この抗体の認識する抗原は精子と卵子の相互認識に深く関わる分子であり、膜蛋白質 CD46 と同一の N 末端アミノ酸配列を有していることが判明した。また、MH61 抗体を表面に結合させた免疫磁気ビーズは不妊の診断と治療に応用できる可能性が示された。

さらに、受精メカニズムの解明研究の一環として、精子-卵子の融合に影響を及ぼす因子についても検討を行った。通常の SPA では全く融合しなかった、或は低い融合指数を示す不妊患者の精子に対して、正常な精液所見を示すボランティアの精子懸濁液から作製したコンディションドメディウム (CM) を加え SPA を行ったところ、融合の改善が認められた。このことから、CM 中にはハムスター卵子とヒト精子の融合を促進する因子が存在することが示唆された。一方、ウサギの精漿から精製した D2 タンパクの存在下にマウス体外受精を行ったところ、卵子と精子の受精が強く阻害された。しかし、予め D2 タンパクで処理した卵子を用いた場合、つまり、D2 タンパクが精子と直接に接触しなかった場合、受精阻害作用が認められなかった。このことから、D2 タンパクの精子受精能に対する阻害作用が示された。そして、トリプシンで切断した D2 タンパクのトリプシンペプチドの N 末端配列とその構成アミノ酸について検討を行ったところ、胎盤抗凝固性蛋白質であるヒト annexin V と高いホモロジーをもつことが判明した。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は男性不妊の診断と治療の目的として行なわれたもので、以下の知見を得ている。

- (1) 先体反応を起したヒト精子でマウスを免疫し、抗ヒト精子モノクローナル抗体、MH61 を得た。この抗体は先体反応精子と特異的に反応し、ハムスターテストで精子の受精を阻害した。
- (2) MH61 と反応する抗原は膜蛋白質 CD46 と同じ N - 末端アミノ酸配列を有していた。
- (3) MH61 抗体を結合させた免疫磁気ビーズをつくり、これを使えば先体反応精子を集めることが出来、男性不妊患者の精子の受精能を調べることが出来ることが示された。
- (4) MH61 ビーズによって選別された精子を顕微受精に用いると、融合効率を有意に上昇させ、不妊治療への応用が示唆された。

以上の様に本論文は臨床検査薬の開発に大いに寄与するものであり博士論文として価値あるものと認める。