

Title	Acrosome reaction induced in a limited population of human spermatozoa by progesterone (Ca <sup>2+</sup> -dependent) and ATP (Ca <sup>2+</sup> -independent)
Author(s)	富山, 達大
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40369">https://hdl.handle.net/11094/40369</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	とみ 富 やま 山 たつ 達 ひろ 大
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 7 3 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 11 月 1 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Acrosome reaction induced in a limited population of human spermatozoa by progesterone (Ca <sup>2+</sup> -dependent) and ATP (Ca <sup>2+</sup> -independent) (プロゲステロン, ATP により先体反応を誘起される精子群の検討)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 村 田 雄 二 (副査) 教 授 濱 岡 利 之 教 授 奥 山 明 彦

## 論 文 内 容 の 要 旨

### [目 的]

精子先体反応は受精における必須の現象であり、細胞外カルシウム依存性と非依存性の 2 種類の誘起方法が存在するが、その機序は未だ十分に解明されていない。本研究では、先体反応精子上に発現する CD46 に対するモノクローナル抗体を用いた先体反応の有無による精子の選別方法を開発し、2 種類の先体反応誘起をうける精子の特徴について検討を加えた。

### [方法ならびに成績]

#### 1. 対象

妊孕性の証明された 4 人の男性より、3～5 日の禁欲の後、提供された精液で、WHO の基準で正常域を示す検体を用いた。

#### 2. 精子浮遊液の調節

精液は採取後、液化のため室温にて 30 分間放置した。液化した精液より swim-up 法を用いて運動精子を回収し、3.5% ヒト血清アルブミンを含む m-BWW 培養液中に浮遊させ、37°C・5% CO<sub>2</sub> 中で培養した。

#### 3. 精子の先体反応の判定

各条件下で培養した精子は、遠沈した後、リン酸緩衝液 (PBS) にて 2 回洗浄の後、95% エタノールで 30～60 分間固定した。固定した精子ペレットをほぐし、スライドガラス上に風乾した後、100 μg/ml の FITC-PSA で 10 分間染色した。スライドガラスを蒸留水にて洗浄の上、蛍光顕微鏡下で 200 以上の精子を判定し、先体反応率を決定した。

#### 4. 精子先体反応の誘起及び培養時間経過

細胞外カルシウム依存性先体反応誘起物質としてプロゲステロン、非依存性のものとして ATP を用いた。各物質は 3.5% ヒト血清アルブミンを含む m-BWW 培養液中に混和し、プロゲステロンは 1 μg/ml で 10 分間、ATP は 2.5 mM で 60 分間作用させた。

3.5% ヒト血清アルブミン添加 m-BWW 培養液中で精子は培養時間経過に伴い先体反応を起こし、培養 24 時間後

には12.6~16.3の精子が先体反応を終了していた。細胞外カルシウム依存性先体反応誘起物質であるプロゲステロンは、培養12時間までは先体反応を誘起出来ず、培養24時間後で6.8%から12.5%の精子に先体反応を誘起した。一方、細胞外カルシウム非依存性先体反応誘起物質である ATP は、培養 6 時間後で7.4%から13.3%の精子に先体反応を起こすことが反応であった。培養12時間、24時間の時点でもほぼ同程度の先体反応誘起率を示した。

#### 5. 抗 CD46モノクローナル抗体結合磁性ビーズ (MH61ビーズ) を用いた先体反応終了精子の除去

先体反応終了精子頭部に発現する CD46を用いて先体反応終了精子の選別を行った。6×10<sup>5</sup> 個の MH61ビーズと 3×10<sup>5</sup> の運動精子を100μl の培養液の入った試験管内で 1 時間、37°Cの条件下で共培養した。試験管を磁石上に静置し、磁性ビーズを管底に固定させ、上清を回収した。この操作を 2 度行うことによって先体反応終了精子を除去した。

#### 6. プロゲステロン, ATP により先体反応を誘起される精子集団の同定

各時間培養した精子をプロゲステロンと ATP を交互に作用させ、先体反応誘起率について検討した。第 1 の物質を作用させ先体反応を誘起した後、MH61ビーズを用いて先体反応終了精子を除き、次いで第 2 の物質を作用させた。

##### ① 12時間培養後の精子

プロゲステロンを作用させても先体反応は誘起されず(7.2±0.2% >6.7%±0.1%)先体反応終了精子を除いた後 ATP を作用させると、さらに9.0%の先体反応誘起率を示した。

一方、先に ATP を作用させると、12.9%の精子が先体反応を起こしたが残りの精子はプロゲステロンに反応しなかった。

##### ② 24時間培養後の精子

プロゲステロン, ATP はそれぞれ22.4±1.6%, 24.4±2.0%の先体反応誘起を示した。先体反応誘起精子を除いた後の精子は ATP, プロゲステロンをそれぞれ作用させても、全く先体反応を起こさなかった。

#### [総括]

1. プロゲステロンによる先体反応の誘起には24時間の3.5%ヒト血清アルブミン添加 m-BWW 培養液中での前培養が必要であり、一方、ATP による先体反応の誘起には 6 時間の前培養で十分である。
2. プロゲステロン, ATP は先体反応を起こす作用機序は異なっているが、これらにより先体反応を誘起される精子群は、運動精子の一部であり、重複した精子群であった。

## 論文審査の結果の要旨

本論文において、細胞外カルシウムに依存して精子先体反応を誘起するプロゲステロンと、細胞外カルシウムに依存せずに精子先体反応を誘起する ATP を用いて、おのおの先体反応を誘起される精子群を検討した結果、以下の 2 つの結論を得た。

- (1) プロゲステロンによる先体反応の誘起には24時間の前培養が必要であり,ATP による先体反応の誘起には 6 時間の前培養時間で十分であった。
- (2) プロゲステロン, ATP により精子に反応性が出現する前培養時間は異なるが、その精子群は重複した精子群であり、運動精子の20%から30%であった。

精子先体反応は、精子が卵に受精するのに必要な現象であにかかわらず、いまだ不明な点が多く残っている。先体反応を起こす精子群の特徴を明らかにした本論文は、男性不妊の原因の中で、受精機能障害を解明するために重要な知見であり、学位を授与されるに値するものと認める。