

マイクロカプセル化による凍結原始卵胞の同種および異種間移植に関する基礎的研究

(研究課題番号：10671510)

平成10年度—平成11年度科学研究費補助金

(基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 千石一雄

(旭川医科大学医学部助教授)

悪性腫瘍により化学療法、骨髄移植、放射線療法を余儀なくされる思春期女子の妊孕能の温存が急務の課題となってきた。本研究は有用性の高い生殖細胞の source として原始卵胞、1次卵胞に注目し、原始卵胞の凍結保存法の確立ならびに凍結融解後の原始卵胞をアルギンビーズにてマイクロカプセル化した後、同種間または異種間動物の腹腔内に移植し、移植卵胞より成熟卵を獲得し、得られた成熟卵の受精能・胚発育能ならびに胎仔産制生能に関し検討するとともに、原始卵胞の発育評価法として GDF-9 mRNA の発現の検討から原始卵胞の発育機構を解明することを目的として検討した。

研究組織

研究代表者： 千石一雄（旭川医科大学医学部産婦人科助教授）

研究分担者： 玉手健一（旭川医科大学医学部産婦人科講師）

研究経費

平成10年度： 1, 200千円

平成11年度： 900千円

計： 2, 100千円

研究発表

(1) 学会誌等

石川睦男、千石一雄：

婦人科内分泌検査法

日本産婦人科学会誌 50：N 27-30、1998

千石一雄他：

新しい排卵誘発法— GnRH アゴニスト併用療法

産婦人科の世界 50：173—179、1998

宮本敏伸、千石一雄他：

刷り込み候補遺伝子であるヒト ASCL2 のクローニング、および染色体マッピング

日本受精着床学会誌 15 : 116 - 118, 1998

碁石勝利、市原和夫、堀川道晴、岡田力哉、玉手健一、千石一雄他
体外受精における牛車腎気丸の使用経験
産婦人科漢方研究の歩み 15 : 102 - 105, 1998

Sengoku, K. Tamate, T. et al.

Effects of low concentrations of nitric oxide on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa

Fertility Sterility 69: 522-527, 1998

T. Miyamoto, Y. Jinno, K. Miura, K. Sengoku, et al:

A SacII polymorphism in the human ASCL2 (HASH2) gene region

J Hum Genet 43:69-70, 1998

石川睦男、玉手健一、千石一雄:

妊産婦の感染症治療の手引き産褥子宮内感染、感染流産、産褥乳腺炎
バンメヂカル 49 - 58, 1998

千石一雄 :

子宮奇形

臨床婦人科産科 53:70-72 1999

K. Sengoku, K. Tamate, et al:

Requirement of sperm-oocyte plasma membrane fusion for establishment of the plasma membrane block to polyspermy in human pronuclear oocytes

Mol Reprod Dev 52:183-188, 1999

千石一雄、石川睦男:

男性精子と NO-男性生殖における NO の役割

Hormone frontier in gynecology

6:71-75 1999

玉手健一、槌谷恵子他：
GnRH アゴニストの脂質代謝における影響
Hormone frontier in gynecology 6: 77-81 1999

K.Sengoku, K.Tamate, et al:
The clinical efficacy of low-dose step-up follicle stimulating hormone administration
for treatment of unexplained infertility
Hum Reprod 14: 349-353 1999

堀川通晴、市原和夫、玉手健一、千石一雄他：
産褥期の浮腫に対するツムラ五苓散の使用経験
産婦人科漢方研究の歩み 16: 95-97 1999

千石一雄：
前期破水の管理
臨床婦人科産科 53: 737-742 1999

千石一雄、石川睦男：
体重減少性無月経の重症化因子
産婦人科の世界 51:489-495 1999

石川睦男、玉手健一、千石一雄：
複数臓器に關与する病態と細胞死におけるフリーラジカルの役割—産婦人科疾患—
現代医療 31:2579-2585 1999

千石一雄：
産褥の異常と対策-マタニティブルーズ
臨床婦人科産科 53: 1481-1483 1999

(2) 口頭発表

齋藤裕司、柳沼裕二、宮本敏伸、小森春美、北村晋逸、林博章、千石一雄、石川睦男

[子宮癌における Bax および survivin 遺伝子の解析]

日本産婦人科学会 1998, 4 (仙台)

宮本敏伸、陣野吉廣、林博章、柳沼裕二、北村晋逸、齋藤裕司、小森春美、千石一雄、他 [ヒト ASCL2 遺伝子領域における cDNA 単離、およびその発現、多型解析に関する検討]

日本産婦人科学会 1998,4 (仙台)

碁石勝利、堀川道晴、千石一雄、石川睦男

[初期胚発生における HB-EGF の細胞間シグナル伝達機構の解析]

日本産婦人科学会 1998,4 (仙台)

千石一雄、吉田俊明、和田恵子、堀川道晴、碁石勝利、岡田力哉、高岡康男 他

[ヒト ICSI 卵および単為発生卵細胞膜の多精子受精防御機構に関する検討]

日本産婦人科学会 1998,4 (仙台)

柳沼裕二、林博章、齋藤裕司、宮本敏伸、小森春美、北村晋逸、千石一雄、石川睦男

[婦人科腫瘍における腫瘍拒絶抗原 MAGE、BAGE、GAGE 遺伝子とその発現誘導]

日本産婦人科学会 1998,4 (仙台)

堀川道晴、碁石勝利、千石一雄、谷口直之、石川睦男

[胎児期の心臓の発生、分化における HB-EGF の発現および機能解析]

日本産婦人科学会 1998,4 (仙台)

千立志、柳沼裕二、玉手健一、千石一雄、石川睦男

[ラット黄体における MnSOD と NO の関連性に関する検討]

日本産婦人科学会 1998,4 (仙台)

高岡康男、吉田俊明、田熊直之、碁石勝利、玉手健一、千石一雄、石川睦男

[唾液中プロゲステロン及びエストラジオール 17- β 酵素免疫法による測定の意義]

日本産婦人科学会 1998,4 (仙台)

碁石勝利、堀川通晴、千石一雄、石川睦男

初期胚発生におけるヘパリン結合性 EGF 様増殖因子の細胞間シグナル伝達機構

第39回日本哺乳動物卵子学会 (神戸)

千石一雄、槌谷恵子、小森春美、堀川道晴、碁石勝利、岡田力哉 他

[有機溶媒、有機リン酸化合物の卵子受精、胚発育能に及ぼす影響]

第7回日本臨床環境学会 1998,6 (旭川)

堀川道晴、千石一雄、槌谷恵子、碁石勝利、岡田力哉、高岡康男、他

ヒト単為発生卵の核における経時的変化に関する検討

第16回日本受精着床学会 1998,7 (大阪)

高岡康男、玉手健一、千石一雄、石川睦男

Evaluation of measurement of salivary progesterone and estradiol for assessment of ovarian function

第4回日本産婦人科卵巣機能学会 1998, 8 (札幌)

堀川道晴、碁石勝利、千石一雄、谷口直之、石川睦男

[胎児期の心臓の発生、分化における HB-EGF の発現および機能解析]

第7回日本産婦人科内分泌分子学会 1998,8 (札幌)

小森春美、千石一雄、石川睦男

[フリーラジカルによる脳性小児麻痺発症機構に関する研究]

第25回日母産婦人科大会 1998,10 (三重)

碁石勝利、玉手健一、千石一雄、石川睦男

[Management of pregnancy and delivery in a patient with corrected transposition of the preat arteries, dextrocardia, and Wolff-Parkinson-White syndrome; a case report]

第11回国際妊娠中毒症会議 1998,10 (神戸)

玉手健一、千立志、槌谷恵子、小森春美、堀川道晴、石郷岡哲郎

碁石勝利、岡田力哉、高岡康男、千石一雄、石川睦男

[ラット黄体機能におけるMn-SODおよびNOの関連性について]

日本不妊症学会 1998, 11 (鹿児島)

碁石勝利、槌谷恵子、小森春美、堀川道晴、岡田力哉、高岡康男

井上亮一、玉手健一、千石一雄、石川睦男

[初期胚発生におけるヘパリン結合性PGF様増殖因子(HB-EGF)の細胞間シグナル伝達機構の解析]

日本不妊学会 1998,11 (鹿児島)

玉手健一、千立志、千石一雄、石川睦男

[黄体機能調節におけるMn-SODとNOの相互作用に関する検討]

日本産婦人科学会 1999,4 (東京)

加藤育民、柳沼裕二、林博章、山下剛、齋藤裕司、森崎篤、石谷敬之

青野亜美、千石一雄、石川睦男

[子宮癌におけるPTEN遺伝子の解析]

日本産婦人科学会 1999,4 (東京)

齋藤裕司、柳沼裕二、佐藤祐一、加藤育民、森崎篤、石谷敬之、山下剛

林博章、千石一雄、石川睦男

[子宮癌における Apoptosis 関連遺伝子 Bcl-2, bAX および survivin の解析]

日本産婦人科学会 1999,4 (東京)

高岡康男、深井義久、堀川道晴、玉手健一、千石一雄、石川睦男

[唾液中エストロジオール 17- β 酵素免疫法による測定の意義]

日本産婦人科学会 1999,4 (東京)

堀川道晴、碁石勝利、千石一雄、石川睦男

[Vero 細胞とマウス初期胚共培養系における EGF レセプター刺激因子の解析]

日本産婦人科学会 1999,4 (東京)

堀川通晴、碁石勝利、千石一雄、石川睦男

Vero 細胞株とマウス初期胚共培養系における EGF レセプター刺激因子の解析

第 40 回日本哺乳動物卵子学会 1999,5 (東京)

水上明保、玉手健一、千石一雄、石川睦男

ヒト一次卵胞培養系における FSH および EGF の作用に関する検討

第 17 回日本受精着床学会 1999,7 (熊本)

槌谷恵子、小森春美、堀川通晴、碁石勝利、田熊直之、水上明保、玉手健一、千石一雄、石川睦男

ヒト卵の老化が単位発生に及ぼす影響に関する検討

第 17 回日本受精着床学会 1999,7 (熊本)

千石一雄

生殖医療の現状と展望

第 79 回北海道医学大会 1999,9 (札幌)

小森春美、堀川道晴、田熊直之、高岡康男、玉手健一、千石一雄、石川睦男

[唾液中エストラジオール 17- β 酵素免疫法による測定の検討]
第 44 回日本不妊学会 1999,11 (東京)

水上明保、千石一雄、石川睦男
[生殖医学における凍結保存技術の進歩と展望]
第 26 回日本低温医学会 1999,11 (福岡)

(3) 出版物

石川睦男、千石一雄、玉手健一：
不妊症の診断と治療
真興交易医書出版部 1998

K. Sengoku, K. Tamate, M. Ishikawa :
Transvaginal sonography in infertility- Vaginosonography of normal
and abnormal follicular development
Rotunda Med. Tec. Pvt Ltd 29-37 1998 (Edited by G. Allahbadia)

石川睦男、千石一雄：
女性と感染症—真菌症
新女性医学大系 10 中山書店 161-166, 1999

千石一雄、石川睦男：
産科婦人科学—人工授精と体外受精・胚移植
ヘルス出版 577-581 1999 (監修：加藤宏一)

研究成果

1. 研究目的

悪性腫瘍により化学療法、骨髄移植、放射線療法を余儀なくされる思春期女子の妊孕能の温存が急務の課題となってきた。本研究はマウスを使用し、有用性の高い生殖細胞の source として原始卵胞、1次卵胞に着目し、原始卵胞の凍結保存法の確立ならびに凍結融解後の原始卵胞をアルギンビーズにてマイクロカプセル化した後、同種間または異種間動物の腹腔内に移植し、移植卵胞より成熟卵を獲得する事を第一の目的とする。また、得られた成熟卵の受精能・胚発育能ならびに胎仔産制生能に関し検討するとともに、原始卵胞の発育評価法として GDF-9 mRNA の発現の検討から原始卵胞の発育機構の一端を解明することを第二の目的とする。

2. 研究成績

(1) マイクロカプセル化による凍結原始卵胞の同種および異種間移植に関する基礎的研究

原始卵胞の凍結保存、その後の卵成熟、受精能、胚発育能に関する研究は緒についたばかりであり、原始卵胞の活性化、胚発育に関しても In vitro, In vivo 両面において未解明な点が多い。原始卵胞の保存は取得可能な生殖細胞数の膨大さからも極めて有用性が高く、マイクロカプセル化による簡便な異種間移植が可能になれば、卵巣摘出、また悪性腫瘍による化学療法、放射線療法、骨髄移植を受ける若年婦人の妊孕能の温存が可能となる。今回、マウス卵巣を酵素処理して得られる原始卵胞の凍結保存法、また凍結融解後の In vivo における卵胞の発育能に関して、アルギンビーズを用いマイクロカプセル化した卵胞の同種間、異種間移植実験から検討した。さらに卵胞成熟機構の一端を明らかにすべく、凍結融解後の原始卵胞の発育に関し GDF-9 の mRNA の発現を中心に検討した。

研究方法

C57B L xCBA F1 マウス卵巣をコラゲナーゼ、DNA エースで処理し原始卵胞、卵胞腔形成前の1次卵胞を採取した。得られた卵胞を 1.5 M propandiol, 0.2 M sucrose を耐凍剤とした 5 step dilution 法による緩徐凍結プログラムミングにより凍結し、凍結融解後の生存性を propidium Iodide と carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester の2重染色法を用い生存率

を検討した。さらに、凍結原始卵胞を融解後、塩化アルギンマイクロカプセル内に封入し成熟マウス腹腔内に移植し回収後の発育率を検討した。同様に、異種間移植実験としてマイクロカプセル化した原始卵胞をラット腹腔内に移植し生存率・発育率を検討した。移植後得られた発育卵胞を各種成長因子添加培養液中で培養し、至適培養条件の検討を行った。卵胞発育能は RT-PCR 法による GDF-9 mRNA の発現を指標として検討した。

研究成績

イ) 原始卵胞の凍結条件に関しては、propandiol, sucrose を耐凍剤とした、5 step dilution 緩徐プログラムで 50% 以上の融解後の生存率が得られた。さらに、活性酸素の消去酵素である、SOD (5 - 50 unit) および一酸化窒素 (NO) の消去剤である Hb (1 μ g) の凍結溶液の添加により 81.5% と有意に高い生存率がえられた。

ロ) 塩化アルギンビーズに原始卵胞を 10 - 20 個封入後、マウス腹腔内に移植し過排卵処置した場合の、その後の卵胞の回収率は 40% であった。卵胞径の増大、組織学的にも顆粒膜細胞の重層化が認められたが、卵胞腔形成まで発育した卵胞は認められなかった。

ラット腹腔内への異種間移植実験では、大部分が移植後 1 週間以内に変成し、生存が確認された卵胞は 10% 以下であり、卵胞の成長も確認できなかった。

ハ) In vitro 培養実験では、原始卵胞の 10 日間の長期培養の生存性は 82% と高率であり、FSH の添加により濃度依存的に卵胞径の増大、卵胞細胞の重層化が確認された。しかし、卵胞腔形成までの発育は認められなかった。また、EGF と FSH の同時添加では EGF の卵胞発育促進作用は認められなかった。

ニ) 原始卵胞卵および In vitro 培養後卵胞細胞の重層化を認めた 1 次卵胞卵および 2 次卵胞卵のすべてに GDF-9 mRNA の発現を確認可能であったが、発現量の定量には至らなかった。

考察

1.5 M propandiol, 0.2 M sucrose を用いた緩徐凍結プログラミングにより高率に原始卵胞の凍結保存・融解後の生存性が確認され、原始卵胞の凍結保存が可能であることを見いだした。さらに、SOD および Hb の同時添加により良好な生存率がえられたことより、凍結時の活性酸素、NO などのフリーラジカルによる卵細胞膜の障害が凍結障害の一要因であり、凍結時のフリーラジカルの消去により融解後の生存率が高まることが示唆された。また、アルギンビーズ

マイクロカプセルを用いた同種移植により In vivo での原始卵胞の発育が確認され、したがって、マイクロカプセルを用いた簡易な凍結保存原始卵胞からの成熟卵獲得の可能性が示唆された。しかし、卵胞腔形成以上の発育卵胞は得られず、ラットを用いた異種間移植では生存卵胞がごく少数であったことから、移植後の gonadotropine 投与方法、免疫抑制法などの検討の必要性が示された。In vitro 培養系による原始卵胞の発育に関しては、FSH の促進作用が認められたが、EGF の促進作用は確認されず、IGF, HB-EGF など他の成長因子を含めた、至適培養条件に関する詳細な検討が今後必要であると考えられる。さらに、卵胞卵子の GDF-9 mRNA の発現は確認されたが、GDF-9mRNA の発現量と卵胞発育の関連性に関しては不明であり、これら oocyte factor の卵胞成熟機構に関する役割に関しより詳細な検討が必要であると考えられた。

(2) フリーラジカルスカベンジャーのマウス未受精卵凍結保存に及ぼす影響

卵子・初期胚の凍結障害に凍結過程で発生する各種フリーラジカルが関与している可能性が示唆されている。したがって、フリーラジカルの消去が凍結融解後の胚発生に及ぼす影響に関し検討を加えた。

研究方法

マウス未受精卵 (Metaphase II) を最終濃度 1.5M PROH, 0.1M sucrose を耐凍剤として緩徐凍結、急速融解法により凍結保存した。凍結時および融解時に各種濃度の NO 発生剤 (SNP)、NOS 阻害剤 (L-NAME), NO 消去剤 (Hb) および活性酸素消去酵素 (SOD)、catalase を添加し融解後の生存率、受精率に関し検討した。

研究成績

NO 消去剤である Hb(1 μ g and 0.1 μ g/ml) の添加により対照群に比し有意に高い生存率、受精率が得られた (50.3%, 48.2% VS 49.5%, 29.0%)。また、同様に活性酸素消去酵素 SOD 50 IU 添加により生存率、受精率の向上を認めた。一方、SNP の添加は濃度依存性に生存率を低下させ、L-NAME の添加は生存率、受精率に影響を及ぼさなかった。

考察

凍結・融解時の活性酸素の発生が卵細胞膜脂質の過酸化をもたらし、これらによる卵細胞膜の障害が凍結時の細胞障害の要因になりうることを示唆され、

SOD の添加が細胞膜障害を抑制すると推測された。また、卵丘細胞および卵
子に NOS が存在することが明らかにされており、産生される NO と活性酸素
により生じるパーオキシナイトライトは極めて強い細胞障害作用を有するこ
とが知られている。NO 発生剤の投与が生存率の低下を招き、逆に NO 消去剤の
添加により生存率が向上する結果より、パーオキシナイトライトの発生および
これらによる細胞障害が凍結障害に関与することが示唆された。SOD および
H b の添加が細胞障害を抑制する結果は、原始卵胞の至適凍結保存法の確立に
寄与するものと考えられる。

(3) マウス初期胚発生におけるヘパリン結合性 EGF 様増殖因子(HB-EGF) の細胞間シグナル伝達機構に関する検討

近年、HB-EGF が生殖生理に関与している知見が集積されており、特に、初期
胚に EGF レセプターが存在することより、EGF ファミリーが胚発育に影響を
及ぼす可能性が示唆されている。今回、マウス初期胚発生における HB-EGF
の機能と作用機構の解析を行った。

研究方法

recombinant H B-EGF を合成材料上に固相化し EGF 依存性細胞株 EP170.7
を培養した juxtacrine 活性と、培養液中に recHB-EGF を添加した paracrine
活性とを EP170.7 細胞の DNA 合成促進活性を指標に比較検討した。Vero 細
胞と Vero 細胞にヒト HB-EGF c DNA をトランスフェクトして得た膜結合型
HB-EGF 高発現細胞株 VeroH を用いて、これらと EP170.7 との共培養によ
る juxtacrine 活性の測定方法を作成し検討した。ICR 雌マウスを過排卵処置し、
同系雄と交配させ得られた 2 細胞期胚を Vero, VeroH 細胞と共培養し、また、
Vero, VeroH 細胞を固定化し同様に共培養し胚発育を検討した。また、E G F
レセプターのリン酸化抑制剤である AG1478 の胚発育に及ぼす影響に関し検討
した。

研究成績

1) HB-EGF を用いた場合、paracrine は juxtacrine の 20 倍の増殖活性を
示した。また、Vero, VeroH 細胞を固相化して EP170.7 と共培養した場合、
細胞膜上の HB-EGF の発現と一致した増殖活性を示した。

2) 2 細胞期胚の発育は Vero, VeroH と共培養した場合ハッチング率が各々

25%、50%と対照群の0%と比較し高率であった。しかし、細胞を固相化した場合のハッチング率は0%であった。また、recHB-EGFの添加により16%がハッチングを示した。

3) VeroH細胞との共培養にAG1478を添加した場合、ハッチング率は非添加群の58%に対して14.3%と抑制された。

考察

HB-EGF産生能を持つVero cellがマウス胚のhatchingを促進し、また、HB-EGF高発現細胞株VeroHがさらにhatchingを促進することよりHB-EGFがマウス初期胚の発育、とくにhatchingに対して促進効果を示すことが明らかとなった。また、また細胞株の固定化によりその促進作用が消失しrecHB-EGFの添加が促進作用を有することより、その作用機構はHB-EGFのparacrine機構を介しものであることが示された。さらに、veroH細胞株との共培養による促進効果がEGFレセプターリン酸化阻害剤により抑制されることはHB-EGFが初期胚発育においてEGFレセプター刺激因子としての中心的役割を果たしていることを示す結果であると考えられる。

(4) 体外成熟マウス卵顕微授精法の染色体正常性に関する検討

未成熟卵を体外培養し得られた成熟卵(Metaphase II)を体外受精し、生児を獲得する方法は、従来の体外受精では必須である排卵誘発を必要とせず、極めて有用性の高い生殖技術であるといえる。しかし、ヒトにおいては未だ妊娠率は極めて低率であり、その安全性も確立されていない状況にある。また、体外培養により透明帯のHardningが生じ、安定した受精を得るには、顕微授精法が必要である。顕微授精法は広く臨床に応用されているが、顕微授精により得られる初期胚の染色体正常性に関しては十分な結果が得られていない。その観点から、マウス未熟卵(germinal vesicle stage)を使用し、体外成熟自体の卵子染色体に与える影響および、顕微授精後の第一分割中期の染色体異常発現率に関し検討した。

研究方法

B6D2F1マウスを使用し、過排卵処置48時間後の卵胞卵子(germinal vesicle stage)をHTF培養液中で18時間体外培養し得られた成熟卵(Metaphase II)の染色体標本を作製し、排卵卵子(体内成熟卵)と比較検討した。また、

体外成熟卵、体内成熟卵細胞質内にはヒト精子を注入し第1卵割中期卵の染色体分析を行った。染色体標本は gradual fixation method を用い、またヒト精子はインフォームドコンセントを得て使用した。

研究成績

イ) 排卵卵子(体内成熟卵)の93.4%(157/168)がMIIを示したのに対し体外成熟卵のMII到達率は52.1%(134/257)であった。

ロ) 排卵卵子にICSIを施行した場合97.2%(141/145)が活性化を示したのに対し、体内成熟卵の活性化率は69.9%(188/269)と低率であった。また、活性化した卵のその後の発育率は各々79.6%、69.7%と両群間に差は認められなかった。

ハ) 体外成熟卵子MIIおよび体外成熟卵子MIIの染色体異常率は各々0.8%、1.8%と差は認められず、また、ICSI施行後の第一卵割中期の染色体異常率も体外成熟/ICSI群17.5%(異数性異常2.9%、倍数性異常12.6%、構造異常2.0%)、体内成熟/ICSI群11.6%(異数性異常3.6%、倍数性異常8.0%、構造異常0%)であり、両群間に有意差は認められなかった。さらに、ヒト精子の染色体も体外成熟による変化は認められず、体外成熟自体は染色体異常の誘因にならないものと考えられた。

考察

マウスgerminal vesicle stage卵の体外成熟率は約50%と低値を示したことより、至適培養条件の検討の必要性が示された。また、体外成熟卵子MIIの染色体異常率は、排卵卵子と差が認められず、さらに、ICSI後の染色体異常も増加しないことより、体外成熟の染色体レベルでの安全性が確認された。しかし、ICSI後の倍数性異常が約10%と高率に認められ、すべてが第2極体の放出不全に起因するものと推定されることより、ICSI自体の染色体に及ぼす影響に関しさらなる検討が必要であることが示唆された。

以上の成績の詳細は添付した以下の別冊を参照されたい。

Tsuchiya K, Kamiguchi Y, Sengoku K, Ishikawa M.

A cytogenetic study of In-vitro matured murine oocytes after Intracytoplasmic sperm Injection. (資料1)

(5) ヒト卵細胞膜の多精子受精防御機構に関する検討

受精機構の解明の観点からも多精子受精防御機構の詳細を明らかにすることは重要な課題である。ヒト卵の多精子受精防御に関し透明帯が主要な役割を演じていることは報告されているが、卵細胞膜の多精子受精防御に関しては十分に解明されていない。今回、正常受精卵、単為発生卵、顕微受精卵（ICSI）の比較検討から、ヒト卵子細胞膜の多精子受精防御機構の解明を試みた。

研究方法

体外受精時に得られた 1-day old 未受精卵を calcium Ionophore と puromycin で活性化した単為発生卵、また、同様に未受精卵に ICSI を施行して得られた前核期卵を用い透明帯除去後媒精し、卵細胞膜への精子結合および融合状態に関し検討した。未受精卵の透明帯を除去後、媒精し得られた前核期卵に再媒精した群を対照として比較検討し、卵細胞膜多精子受精防御成立における卵細胞膜と精子細胞膜の融合の必要性を解析した。さらに、単為発生、ICSI および対照前核期卵を FITC-LCA を用い蛍光染色し、表層粒の放出動態と卵細胞膜多精子受精防御の関連に関し検討した。

研究成績

通常の媒精により受精した透明帯除去前核期卵（対照）では 35 卵中 2 卵のみに精子侵入が認められ、結合精子数も 0.2 ± 0.1 であったのに対し、ICSI および単為発生前核期卵の平均侵入精子数は 3.0 で、結合精子数も 4.3 ± 0.6 , 3.8 ± 0.4 と有意に増加した。また、ICSI 卵、単為発生卵の平均表層粒数は各々 3.8, $3.3/100 \mu m^2$ で対照群 (3.1) と同程度に認められ、しかも未受精卵の約 10 分の 1 であった。

考察

正常受精前核期卵では結合精子および融合精子数の著明な減少が認められ、卵細胞膜での多精子受精防御の存在を確認した。一方、卵細胞膜と精子細胞膜の融合をバイパスした単為発生、ICSI による前核期卵では卵細胞膜での精子結合・融合が阻害されず、卵細胞膜での多精子受精防御機構の成立には卵細胞膜と精子細胞膜との融合が不可欠であることが明らかとなった。また、表層粒の放出に伴う卵細胞膜の変化が多精子受精防御に関与するとする報告が認められるが本実験では、多精子受精防御が認められない ICSI および単為発生卵においても正常受精と同様な表層粒の放出が認められ、ヒトにおいては表層粒の放出が直接卵細胞膜多精子受精防御に関与しないことが示唆された。

以上の成績の詳細は添付した以下の別冊を参照されたい

Requirement of sperm-oocyte plasma membrane fusion for establishment of the plasma membrane block to polyspermy in human pronuclear oocytes.

Mol. Reprod. Dev. 52: 183-188, 1999. (資料2)

まとめ

1. 有用性の高い生殖細胞の source として原始卵胞、1次卵胞に着目し、原始卵胞の凍結保存法の確立ならびに凍結融解後の原始卵胞をアルギンビーズにてマイクロカプセル化した後、同種間または異種間動物の腹腔内に移植し、移植卵胞より成熟卵を獲得する事、ならびに、これらの方法で得られた成熟卵の受精能・胚発育能ならびに胎仔産生能に関し検討するとともに、原始卵胞の発育評価法として GDF-9 mRNA の発現の検討から原始卵胞の発育機構の一端を解明することを目的として基礎的研究を行った。

その結果、propandiol, sucrose を耐凍剤とした、5 step dilution 緩徐プログラムで原始卵胞の凍結保存に成功した。さらに、活性酸素の消去酵素である、SOD (5 - 50 unit) および一酸化窒素 (NO) の消去剤である Hb (1 μ g) の添加が凍結融解後の生存率の向上に寄与することを明らかにした。また、塩化アルギンビーズを用いたマイクロカプセルによる原始卵胞のマウス腹腔内移植により、その後の卵胞発育が観察されたが、卵胞腔形成まで発育した卵胞は得られなかった。一方、ラット腹腔内への異種間移植実験では、大部分が移植後1週間以内に変成し、生存が確認された卵胞は10%以下であり、卵胞の成長も確認できなかった。また、原始卵胞の In vitro での長期の培養に成功し、FSH が卵胞発育に促進作用を有すること、一方、EGF に卵胞発育促進作用も認めない結果をえた。さらに、原始卵胞卵、1次卵胞卵子および2次卵胞卵子のすべてに GDF-9 mRNA の発現が確認可能であった。この結果は、原始卵胞の凍結保存が高率に可能であることを示唆するものであるが、マイクロカプセルによる卵胞発育法に関しては、マイクロカプセルの素材、至適卵胞発育刺激法などさらなる研究の必要性を示すものである。また、原始卵胞の体外培養における成長因子の役割、GDF-9 と卵発育の相互作用に関しても今後も基礎的検討が必要であると考えられる。

2. 卵子の凍結保存に関するフリーラジカルの作用に関し、マウス未受精卵 (Metaphase II) を用い詳細な検討を行った。マウス未受精卵の凍結保存に関しても、原始卵胞と同様に活性酸素消去剤である SOD, NO 消去剤である Hb が凍結融解後の生存生、その後の受精に促進作用を示すことを明らかにした。この結果は、フリーラジカルによる細胞障害、特に卵細胞膜過酸化が凍結融解過程での卵子の障害に関与することを明らかにし、フリーラジカル発生の抑制が凍結保存の成功率の向上に寄与することを示唆するものである。

3. 成長因子の卵子・胚発育への関与を明らかにするため、マウス初期胚 (2 cell) を用い HB-EGF を中心に解析した。HB-EGF はマウス胚の発育に促進作用を有し、その作用機序は HB-EGF の soluble form による paracrine 作用によることを明らかにした。さらに、促進作用は EGF レセプターのリン酸化を介することが示唆され、原始卵胞卵の発育に関しても HB-EGF の詳細な解析の必要性を示す結果であった。

4. 凍結融解卵子は透明帯の硬化をもたらし、効率の良い受精には顕微授精法が必要であることは良く知られた事実である。顕微授精法の細胞遺伝学的安全性の検討から、体外成熟卵子 MII の染色体異常率は、排卵卵子と差が認められず、また、ICSI 後の染色体異常も増加しないことを確認した。この結果は体外成熟卵子、顕微授精の染色体レベルでの一応の安全性を示すものであるが、ICSI 後の倍数性異常が約 10% と高率に認められ、すべてが第 2 極体の放出不全に起因するものと推定されることより、ICSI 自体の染色体に及ぼす影響に関しさらに厳密な検討の必要性が示唆された。

5. 体外受精時の多精子受精防止は正常受精の成立にとって必須の条件である。ヒト卵細胞膜の多精子受精防御機構の解明を目的として、卵細胞膜と精子細胞膜の融合に着目し検討した。卵子・精子細胞膜の融合をバイパスしたモデルとして単為発生卵、ICSI 卵と通常の媒精卵との卵細胞膜の多精子受精の比較検討から、表層粒の放出を認めるものの、単為発生卵、ICSI 卵では多精子受精防御機構が発動しないことを明らかにした。この結果は卵細胞膜の多精子受精防御メカニズムの成立に卵子および精子細胞膜の融合が必要であることを示すとともに、これらをバイパスする ICSI 卵のさらなる詳細な検討は受精現象の解明の一端に寄与する可能性を示すものである。

以上に記した研究結果より、初期の目的の基礎的部分は達成されたものと思われる。しかし、マイクロカプセルを応用した同種・異種間移植による成熟卵胞・

卵子の取得には至っておらず、原始卵胞の体外培養、oocyte factor による卵胞発育評価に関しては緒についたばかりである。今後上記の成績を踏まえ、マイクロカプセルの素材、カプセル化の方法、異種間移植の際の免疫抑制法などに関しさらなる基礎的検討を加えていく必要がある。