

体外受精における多精子受精の生成機序の解明及びその予防に
関する基礎的研究（家兎）

研究課題番号 60570764

昭和61年度科学研究費補助金（一般研究C）

研究成果報告書

昭和62年3月

研究代表者

浅川竹仁

（旭川医科大学医学部助手）

はしがき

体外受精 (IVF) 一胚移植 (ET) による胎児の出生は霊長類、人を含む多くの哺乳動物で達成されている (Brackett, 1979)。 I V F - E T の応用は幅広く各々の分野にて目的を異とするが、産科医にとり臨床的には卵管性不妊症患者の挙児希望を実現するための一方法として応用されている。 英国で初めて体外受精児の出生が報告されて以来、約数千名の体外受精児が生誕している。 しかし、 I V F - E T の成功率はいまだ低く、一部の施設を除き、約 5 - 10 % とされている。 卵子の体外受精率はほぼ 90 % 以上であることを考えると、この両者間の比率の差異は何を生ずるのか？ 現在この問題を解明するために世界各国の体外受精研究施設で多数の研究が実施されている。 原因として大きく母体側 (着床側) の因子と卵子側の因子に分類されるが、この問題の解明のため 1982 年よりミシガン州立大学内分泌研究所の Pro.W.RICHARD DUKELOW の指導の下、霊長類の一種であるリス猿 (Saimiri sciureus) を使用し体外受精卵の細胞遺伝学的研究を行ってきた。 その結果、リス猿では多精子受精による三倍体の発生頻度が 16.7% と高値を示し、体外受精での卵子側の因子につき指摘した。 1976 年、Fraser 等のスイスの発表でも、体外受精卵の三倍体の高頻度発生が報告されている。 一般的にヒトにおいては、体外受精卵は 2 - 8 細胞期に胚移植されるため、これらの倍数体も移植される可能性は大きいと推定される。 以上から I V F - E T の成功率の向上のため体外受精システムでは多精子受精の予防は重要であると考え、今回の研究では家兎 (Japanese white) を使用し Polyspermy の発生と予防に関する検討を目的とした。

目的

- 1) . 家兎 (Japanese white) の卵子と精子を体外受精させ、その受精卵の正常性につき染色体分析を行った。特に polyspermy の頻度につき分析した。
- 2) . 排卵誘発剤の PMS は polyspermy に対し Dose effect がある (Mice) ため、PMS と polyspermy の発生頻度につき検討した。
- 3) . 排卵された家兎卵は厚い Mucin layer を有するという特徴がある。Mucin layer は受精防止のメカニズムに寄与しているか否かにつき検討した。
- 4) . polyspermy 防止のため、培養液の pH 及び媒精精子濃度と polyspermy の発生頻度につき検討した。

(1) . 研究組織

研究代表者：浅川竹仁 (旭川医科大学医学部産婦人科助手)

(2) . 研究経費

昭和60年度	1000千円
昭和61年度	300千円
計	1300千円

(3) . 研究発表

(A) . 学会雑誌等

- 1) . 浅川竹仁 : Chromosomal analysis after in vitro fertilization of Rabbit(Japanese white) oocytes, 日本産科婦人科学会雑誌, 37巻, 昭和60年11月.
- 2) . 高田久士 : マウス未受精卵および受精卵の凍結融解後の生存性に関する検討, 日本不妊学会誌, 31巻, 昭和61年10月1日.
- 3) . T.Asakawa et al: Chromosomal normality of in vitro fertilized rabbit oocytes, *Bilo & Repro.* 投稿中.

(B) . 口頭発表

- 1) . 浅川竹仁 : chromosomal analysis Rabbit (Japanese white) oocytes, 第37回日本産科婦人科学会, 昭和60年4月3日.
- 2) . 高田久士 : マウス未受精卵および受精卵の凍結融解後の生存性に関する検討, 第31回日本不妊学会学術講演会 昭和61年10月17日.

研究成果

1. Chromosomal analysis and the incidence of Polyspermy of Squirrel monkey (*Saimiri scureus*) oocytes fertilized in vitro.

ヒトの体外受精一胚移植の成績はいまだ充分ではなく、今後に残されている課題は多い。そのひとつに受精卵の正常性の問題がある。細胞遺伝学的検討の場合、ヒトの卵子を使用することは社会的・倫理的・宗教的な問題があり、その取扱いは慎重であらねばならない。他の哺乳動物であるマウス・家兎などが実験動物として使用されているが、モデルとしてはヒトに近い霊長類が最も適当と考えられる。我々の教室では Michigan State University の Endocrine Research Unit のリス猿のコロニーを使用し、体外受精卵の細胞遺伝学的検討を1982年より行ってきた。その結果、受精卵を first cleavage metaphase で分析すると、染色体正常率は73.3%で、triploidy は16.6%にみとめられた。いままでに報告された mice などの場合と同様体外受精では、ployspermy による倍数体卵子の予防が最も大切なことのひとつであることが示唆された。

2. The chromosomal normality and the incidence of polyspermy of iv vitro fertilized rabbit (Japanese white) oocytes.

目的；

家兎 (Japanese white) を用い、体外受精卵の染色体分析を行い、正常性及び polyspermic fertilization の頻度につき検討した。

結果；

(1) . 体外受精後、2-8細胞まで development した率は71.4%であった。

(2) . 体外受精卵 (2-8細胞期) の77.7%は正常 diploidy ($2n=44$) であり、5%は aneuploidy であった。

(3) . polyploidy dueto polyspermic fertilization の率は、16.5%で体内受精卵の比率 (9.0%) に比較し高値を示した。 triploidy は、16.6%にみとめられた。

いままでに報告された mice などの場合と同様体外受精では、 polyspermy による倍数体卵子の予防が最も大切なことのひとつであることが示唆された。

3. The effect of PMS on the incidence of polyspermy in the rabbit (Japanese white) embryos fertilized in vitro.

Abstract

The analysis of in vitro fertilized rabbit embryos revealed that the incidence of polyploidy (polyspermy) was not effected on by PMS 100 i.u. given to the female.

1974年 Pahlavan & Deukelow はウサギに外因性ゴナドトロピンを投与し排卵誘発を施行し染色体分析をおこなった。その結果、初期胚 (Blastocyst) の染色体異常の発生頻度が有意に高値を示したことを報告した。又、Boue & Boue (1973) 等のレポートでもヒトの初期流産例の染色体分析の結果、trisomy の頻度が有意に増加したことを報告している。Maudlin 等は mice に PMSG を投与後卵子を採取し、体外受精をさせ染色体分析を行い、その結果、polyploidy の発生は PMSG の投与量に proportional に増加したため PMS と多受精若起の相関について報告した。

今回の実験では PMS (帝国臓器、セロトロピン) 100 i.u. 投与した群と非投与群 (交尾のみにより排卵誘発) から採卵された卵子を共に体外受精させ初期胚 (2 - 8細胞) の段階で染色体分析し、PMS 投与と polyspermy の発生との相関につき検討した (表)。

結果；

PMS 投与群の polyspermy の発生率は 14.0% で、非投与群の 12.5% に比較し高値を示したが、両者間に有意の差はみられなかった。以上から、家兎では 100 i.u. PMS の投与と polyspermy の発生には相関はないと考える。

Shaver 等の過剰 hCG 投与も染色体に影響を与えるとの報告もあり、今後は hCG、PMS の dose response との相関につき検討を要する。

3. The effect of PMS on the incidence of polyploidy
in rabbit embryos fertilized in vitro

	No. of Animals	No. of Analyzed oocytes	Diploid and near	Polyloid and near
PMS 投与群	3	50	43	7 (14.0%)
PMS 非投与群	3	24	21	3 (12.5%)

4. Mucin layer は polyspermic fertilization の防止に有効な機能を有しているか。

一般的に卵子は排卵後、受精から着床時のハッチングの段階まで最外層膜として透明帯を有している。さらに、ウサギ・ウマなどの卵子は透明帯の外層に Mucin layer (糖蛋白質層) を付着させている。ウサギでは排卵後数時間、すなわち受精時にはこの Mucin layer は観察される。Mucin layer は強い酸性ムコ蛋白質で生殖生理学上の機能は不明である。

そこで、今回の実験では polyspermic fertilization の予防という観点から分析を行った。Mucin layer の付着のない卵子(成熟卵胞より採取し、その後にヒアルロニダーゼにて顆粒膜細胞を除去した卵子)と自然排卵させた Mucin layer を有する卵子を共に受精させ受精卵を分析した。

結果；

PMS使用後体内受精した群(with Mucin layer)と体外受精した群(without Mucin layer)の polyspermy の頻度は 11.3% v.s. 13.2%で Mucin layer を有する場合のほうが polyspermy の頻度は低値を示したが、家兎の場合でも体外受精の場合には多受精の頻度が高くなることを考えると、この両者の間にはほとんど差がないと考えられ、家兎での Mucin layer は多精子受精の防止の上で重要な役割を担っているとは考えにくい。

4. The relationship between the Mucin layer and the incidence of polyspermy in vitro.

	No. of Animals	No. of Analyzed oocytes	Diploid and near	Polyploid and near
with Mucin layer	3	35	31	4 (11.3%)
with out Mucin layer	3	61	53	8 (13.2%)

5. The relationship between sperm concentration and the incidence of polyspermic fertilization in vitro of rabbit (Japanese white)

Abstract

A 1000 fold range of capacitated sperm concentrations (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 /ml) has been tested to determine whether there is a relationship between the capacitated sperm concentration and the incidence of polyspermic fertilization in vitro of rabbit(Japanese white) oocytes. While low concentration (10^3 /ml) resulted in low fertilization (9.3 %), those in the range of 10^4 - 10^6 /ml gave fertilization rates of 69.3-72.8 percent. The frequency of polyploidy (polyspermy) was dependent on the sperm concentration. The rate of polyspermy with the 10^4 /ml spermatozoa was the lowest (9.3 %), compared to 14.2 % with 10^5 /ml and 13.2 % with 10^6 /ml. However, there was no significant difference between the frequencies of polyploidy recorded in this series.

5. The relationship between the sperm concentration and the polyspermic fertilization

Sperm Concentration	No. of Animals	No. of Analyzed oocytes	Diploid and near	Polyploid and near
10^4 /ml	3	43	39	4 (9.3%)
10^5 /ml	3	35	30	5 (14.2%)
10^6 /ml	12	113	97	15 (13.2%)

6. 培養液 pH と polyspermy の頻度に関する検討

培養液 (Brackett & Oliphant) の pH を 7.0, 7.2, 7.4, 7.6 の 4 段階に調製し、精子濃度 $10^3 - 10^6 / \text{ml}$ にて受精させ polyspermic fertilization につき検討した。受精率では個々の実験で大きな差がみられたが、polyspermy の頻度には差はみられなかった。しかし、PH の変化が媒精時間 (3 - 6 時間内) で大きいため、この点の改良により pH の維持が重要であり、今後も検討を続ける予定である。