

**26) 細胞膜コレステロールを除去した精子利用による
チャイニーズハムスター体外受精法の確立**

研究代表者 立野 裕幸

[研究の背景と目的]

チャイニーズハムスターは、染色体数が 22 本と少なく、その形態的特長も明瞭なため、染色体研究の有用なモデル動物である。この動物を利用して、配偶子(卵子・精子)や受精卵における染色体異常の生成機序について多くの成果が報告されている。

これまでの研究では、受精卵作製のために体内受精法が用いられてきた。この方法では、通常、雌 1 匹あたり 10 個程度の受精卵しか採取できず、十分なデー

タを集めるためには多数の動物を使用しなければならない。そのため、研究効率だけでなく実験動物の適正使用という点からも、一度に多数の受精卵作製が可能な、簡便で成功率の高い体外受精法の開発が求められてきた。

体外受精の成功の鍵は、精子に受精能獲得を誘起し、先体反応を確実に起こさせることである。多くの研究によって、受精能獲得は、精子頭部の細胞膜からのコレステロールの遊離が引き金となって起こることが明らかになっている。実際に、マウス精子をメチル- β -シクロデキストリン ($M\beta CD$) で処理し、細胞膜のコレステロールを除去すると比較的容易に先体反応が誘起され、体外受精が成立する。

本研究の目的は、 $M\beta CD$ による精子細胞膜のコレステロール除去法を利用してチャイニーズハムスターの体外受精法を確立し、この動物をモデルに、配偶子や受精卵の染色体研究をさらに発展させるための技術基盤をつくることである。

【研究方法】

実験には、本学で繁殖・維持されているチャイニーズハムスター (旭川コロニー: CHA) を使用した。成熟雄 (4 ~ 6 月齢) の精管から精子を採取し、1 mM の $M\beta CD$ を含む培養液 (TYH) 中で 2 時間培養 (37°C、5%CO₂) した。精子の処理に合わせ、生殖腺刺激ホルモン (PMSG-hCG) によって過排卵処理された成熟雌 (同齢) の卵管膨大部から顆粒膜細胞に包まれた卵子を採取した。それらを TYH 培養液中に移し、ただちに $M\beta CD$ 処理精子を媒精した。媒精後 4 時間目に第二極体の放出を確認し、30 時間目に 2 細胞期への発生を調査して受精の成否を判定した。同時に、顆粒膜細胞の受精に及ぼす影響を調査するために、ヒアルロニダーゼ酵素によって顆粒膜細胞を取り外した卵子に対しても同様に媒精を行った。また、精子 DNA に対する $M\beta CD$ の影響を調査するために、 $M\beta CD$ 処理精子に由来する受精卵の染色体分析を行った。

【研究結果】

チャイニーズハムスター精子の先体は比較的大きいため、特別な染色をせずに位相差顕微鏡下で容易に識別できる (図 1 A)。 $M\beta CD$ で処理した精子の多くでは、

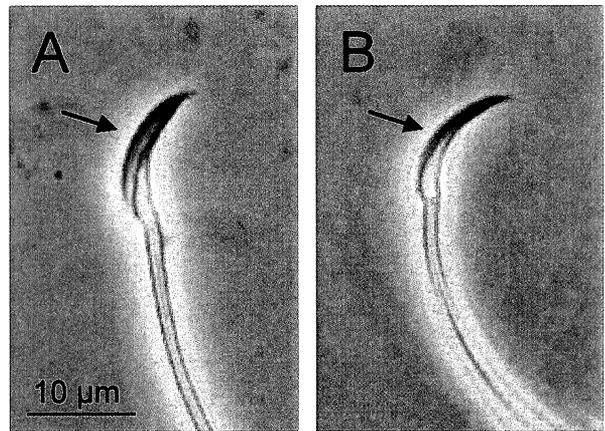


図 1 ハムスター精子頭部 (矢印は先体を示す)

A : 未処理精子

B : $M\beta CD$ 処理精子

先体がかなり薄くなっており、先体反応を起こしていることが明らかになった (図 1 B)。

顆粒膜細胞で包まれた卵子に対する $M\beta CD$ 処理精子の受精成績は極めて良好で、その受精率 (96.6% : $n=116$) は未処理精子を利用した対照群の結果 (36.3% : $n=91$) に比べて明らかに高かった (図 2 A)。一方、顆粒膜細胞を取り外した卵子を使った場合には、対照群、 $M\beta CD$ 処理群ともに受精卵は得られなかった。 $M\beta CD$ 処理精子に由来する受精卵は正常に分割して 2 細胞期へ発生し、その形態も正常であった (図 2 B)。

$M\beta CD$ 処理精子に由来する受精卵 ($n=101$) の染色体を分析した結果、構造的染色体異常と異数性異常の頻度はともに 5% であった。これらの頻度は、体内受精法で作製した受精卵の染色体異常頻度 (構造異常: 2.8%、異数性: 3.2%) と同様であった。この結果から、 $M\beta CD$ の精子 DNA に及ぼす影響はほとんど無いと考えられる。

【考 察】

本研究において、チャイニーズハムスター精子においても $M\beta CD$ によって容易に先体反応が誘起され、効率良く受精卵を作製できることが明らかになった。 $M\beta CD$ を利用した体外受精法では、精子の操作も簡単で、常に安定した受精成績が得られることから、この方法は受精現象の研究手段としても有用である。今回の結果で興味深いのは、 $M\beta CD$ によって先体反応を誘起したとしても、最終的に精子が受精能力を発

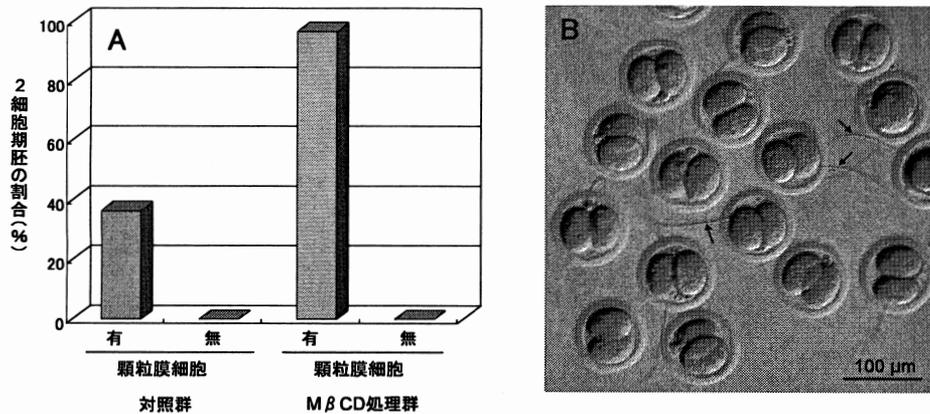


図2 MβCD 処理精子を用いた体外受精の結果

A : 受精率、B : 2細胞期胚。矢印は受精した精子の尾部

揮するには顆粒膜細胞が不可欠であったことである。精子受精能に対する顆粒膜細胞の機能解析、およびMβCD 処理精子に由来する受精卵の発生解析が今後の重要課題である。

[参考文献]

1. Tateno H: Chromosome analysis of mouse zygotes produced by intracytoplasmic injection of spermatozoa exposed to acrosome reaction inducing agents methyl-β-cyclodextrin and calcium ionophore A23187. *J Assist Reprod Genet*, 27: 41-47, 2010.
2. Tateno H, Kamiguchi Y: In vitro fertilisation of Chinese hamster oocytes by spermatozoa that have undergone ionophore A23187-induced acrosome reaction, and their subsequent development into blastocysts. *Zygote* 4: 93-99, 1996.