

カフェイン添加培地におけるマウス体外受精卵の補足精子の出現率

誌名	宇都宮大学農学部學術報告 = Bulletin of the College of Agriculture, Utsunomiya University
ISSN	05664691
著者	吉澤, 緑 野澤, えみ子 仲本, 智之
巻/号	14巻1号
掲載ページ	p. 5-9
発行年月	1989年3月

カフェイン添加培地におけるマウス体外受精卵の補足精子の出現率

吉澤 緑・野澤えみ子*・仲本 智之・村松 隆

Incidence of supplementary sperm in mouse eggs fertilized in
caffeine-containing medium

Midori YOSHIZAWA, Emiko NOZAWA*, Satoshi NAKAMOTO
and Takashi MURAMATSU

Résumé

Superovulated mouse eggs were fertilized *in vitro* with epididymal sperm preincubated and suspended (200 sperms/ μ l) in caffeine-containing (2 mM) and caffeine-free media. Fertilization rate was 90.6% in caffeine-containing medium and 88.0% in caffeine-free medium, with no significant difference between them. Incidence of those eggs having supplementary sperm (sperm within the perivitelline space) was 92.4% in caffeine-containing medium and 73.9% in caffeine-free medium. The difference was highly significant ($P < 0.001$). Average number of supplementary sperm per egg significantly increased from 3.5 ± 0.23 (SE) in caffeine-free medium to 6.1 ± 0.38 in caffeine-containing medium ($P < 0.001$). No correlation was observed between the incidence of supplementary sperm and that of mitosis. The proportion of eggs in mitosis was higher in caffeine-free medium than in caffeine-containing medium (96.3% vs. 91.7%, $P < 0.02$).

緒 言

近年、哺乳動物における体外受精の研究が著しく進展し、ヒトでは不妊克服の手段として実用化の段階に至っている。

また、受精率を高めるためにヒト人工授精用培地へ種々の薬物を添加することが試みられ (Makler et al. 1980), なかでも、カフェインは精子の運動性及び受精能力を改善する効果が認められ (Moussa 1983), 家畜の体外受精用添加剤として比較よく用いられている (高橋と花田 1984, 包と花田 1985, 浜野と豊田 1986, 梶原ら 1987)。

しかし、体外受精では体内受精に比べて多精子侵入およびこれに起因する多倍体の出現率が高く (豊田ら 1971, Maudlin & Fraser 1978, Niwa et al. 1980), これにカフェインを添加した場合には、カフェインの精子過活性化、卵への侵入促進作用 (Fraser 1979) により、多精子侵入の頻度がいっそう高くなることが懸念さ

れる。著者らは先に、カフェインを用いたマウス体外受精において多精受精による多倍体の出現率が高くなることを報告した (1987)。本研究では多精受精の要因となる補足精子 (透明帯を通過し、囲卵腔内に留まる精子) の出現率について調べ、卵の分割能との関連についても検討したので報告する。

材料および方法

<実験動物>

実験に用いたマウスは、人工照明下で明14時間 (5:00~19:00), 暗10時間とし、室温20~22°Cで飼育した。卵子提供用雌には、BALB×C57BLのF₁マウスを、精子提供用雄にはJcl:ICRマウスを用いた。

<体外受精>

体外受精は、豊田ら (1971) の方法に準じて以下のように行った。培地としてTYH (豊田ら 1971) を用い、カフェイン処理の場合には、これに2mMの濃度でカフェインを添加して精子前培養および媒精用培地とし

* 自治医大法医学教室, Department of Legal Medicine, Jichi Medical School

た。成熟した F₁ 雌マウスに PMSG および hCG を 5 IU ずつ 48 時間間隔で腹腔内注射し、過排卵を誘起した。hCG 注射 16 時間後に卵管膨大部より卵丘塊に包まれた卵子を取り出し、カフェイン添加および無添加培地で予め 2 時間前培養しておいた精巢上体尾部精子液 (精子濃度: 200 精子/ μ l) に導入して、体外受精を行なった。媒精 13 時間後に卵をカフェインを含まないコルセミド (0.1 μ g/ml) 添加培地へ移し、更に 4 時間培養した。

受精の判定は、染色体標本について行なった。すなわち、前核または第 1 分割期の染色体のゲノムを 2 個以上有する卵を受精卵とした。

<染色体標本作製法>

染色体標本の作製は、既報(1987)に準じて行なった。すなわち、受精卵を 0.4 ml の 1% クエン酸ナトリウム液中で 15 分間低張処理し、メタノール 3 : 酢酸 1 の固定液を少量 (0.01~0.02 ml) 低張液中へ注入した。この際、実体顕微鏡下で観察しながら固定液が卵に直接触れぬよう、徐々に注入した。予備固定した卵を 1 個ずつスライドグラスにのせ、先を細く引いたパスツールピペットでメタノール・酢酸固定液を卵の上に数滴落として固定した。固定液の滴下数は、多くの場合 3, 4 滴であったが、染色体の適度な分散が得られるよう実験の都度若干増減した。また、固定液の蒸散が早いと染色体の展開が不十分なまま固定され、染色体の重なりが多くなる。これを防ぐため、加湿器を用いて室内を十分に加湿しながら固定操作を行なった。固定液が乾燥した後、更に 1, 2 滴の固定液を卵の上に落とし、乾燥後、標本を無染色のま

ま検鏡し、染色体の分散の程度を調べた。

標本を十分乾燥したのち、既報 (Yoshizawa et al. 1985) に従って C バンド染色を施し、検鏡した。

上記の染色体標本作製法により、分裂像を示すすべての卵において染色体数を分析することができた。

差の有意性検定は、 χ^2 -検定および t-検定によった。

結 果

本実験における受精率は、カフェイン添加区では 90.6% (384/424)、無添加区では 88.0% (322/366) で、添加区の方が高い傾向にあったが、有意な差ではなかった (Table 1)。

カフェイン添加培地および無添加培地において得られた体外受精卵の染色体標本の観察において、多数の精子を保有する卵が認められた (Fig. 1)。これらの精子は、頭部と尾部をもつ完全な形態のもの、頭部と尾部が分離したもの、頭部のみのものもあったが、頭部の形状はいずれも精子固有のもので前核形成の兆候は認められなかった。従って、これらの精子は困卵腔内に留まる補足精子であると判断された。補足精子を有する受精卵の率 (以下、補足精子出現率という) は、カフェイン添加区 92.4% (355/384)、無添加区 73.9% (238/322) で、カフェイン添加区の方が有意 ($P < 0.001$) に高かった (Table 1)。また、卵 1 個あたりの補足精子数は、無添加区では 1~35 (平均 3.2)、カフェイン添加区では 1~58 (平均 6.1) であり、カフェイン添加区の方が有意 ($P < 0.001$) に多いことが認められた (Table 2)。

Table 1. Fertilization rate and incidence of supplementary sperm (s.s.) in mouse eggs inseminated in caffeine-containing and -free media

	Caffeine-containing	Caffeine-free
No. of eggs inseminated	424	366
fertilized	384 (90.6%)	322 (88.0%)
with s. s.	355 (92.4%)*	238 (73.9%)
without s. s.	29 (7.6%)	84 (26.1%)

* Value significantly higher than that in caffeine-free medium ($P < 0.001$)

Table 2. Average numbers of supplementary sperm (s.s.) in 1-cell mouse eggs fertilized in caffeine-containing and -free media

	Caffeine-containing	Caffeine-free
No. of eggs with s. s.	355	238
Range of number of s. s.	1-58	1-35
Average number of s. s. \pm SE	6.1* \pm 0.38	3.5 \pm 0.23

* Value significantly larger than that in caffeine-free medium ($P < 0.001$), SE: standard error

Table 3. Incidence of supplementary sperm (s. s.) in mitotic and unmitotic 1-cell mouse eggs following fertilization in caffeine-containing and -free media

	Caffeine-containing	Caffeine-free
No. of eggs fertilized	384	322
in mitosis	352 (91.7%)	310 (96.3%)*
with s. s.	323 (91.8%)	231 (74.5%)
out of mitosis	32	12
with s. s.	32(100.0%)	7 (58.3%)

* Value significantly higher than that in caffeine-containing medium ($P < 0.02$)

卵の分割能と補足精子の関係をみるために、分裂像の有無によって補足精子出現率を比較した。第1分割中期像は、Kaufman (1973) の分類により late prometaphase および early metaphase とした。Table 3 に示すように、中期像を示す卵はカフェイン添加区では91.7% (352/384)、無添加区では96.3% (310/322) で、無添加区において有意に多かった ($P < 0.02$)。これは、カフェイン添加区では前核期を示す卵が、無添加区よりも多かったためである。補足精子出現率は、カフェイン添加区では、中期像が観察された卵では91.8% (323/352)、中期像が観察されなかった卵では100% (32/32)、カフェイン無添加区ではそれぞれ74.5% (231/310)、58.3% (7/12) であり、両区とも中期像の有無による補足精子出現率の差は有意ではなかった。また、補足精子を有する卵と有しない卵について分裂像の出現率を比較したが、添加区、無添加区ともに有意な差を示さなかった。

考 察

島根と村松 (1979) は、第1分割期のマウス体内受精卵における補足精子の出現率を観察し、自然排卵では6.8%、PMSG, hCG 投与による過排卵では6.5%であった。清水 (1976) は、ラットの胞胚において (自然排卵、体内受精) 9.6% の胚で2個以上の精子が透明帯を通過しているのを観察した。一方、体外受精では、豊田ら (1971) は、マウスで2時間前培養した精子を用いた場合には、単精子侵入卵は約30%にとどまったと報告し、Niwa et al. (1980) も数系統のマウスで、11~73% の卵において2個以上の精子が囲卵腔または卵細胞質内へ侵入していたと報告している。本研究においても補足精子の出現率は、カフェインを添加しない場合でも73.9%に達した。また、透明帯を通過する精子が多くなれば、多精受精 (過剰精子、過剰前核および多倍体) の機会も多くなると考えられ、マウス体外受精におけるその出現率は、1~29% (Niwa et al. 1980)、あるいは、6~9% (豊田ら1971) と報告されている。また Maudlin & Fraser

(1978) は、数系統の卵子提供用雌の平均で19.4%という高い多倍体の出現率を得た。補足精子、多精受精をもたらす要因としては、卵の加齢あるいは薬物による透明帯反応、卵黄遮断などの多精子侵入阻止機能の低下が一般に考えられている。体外受精の場合は、その他の要因として、誘起排卵に用いる PMSG 投与量 (Maudlin & Fraser 1977)、媒精時の精子濃度 (Fraser & Maudlin 1978, 1979) の関与が指摘されている。また、Niwa et al. (1980) は、マウスの系統によって精子侵入、多精受精の出現率に差のあることを指摘している。

以上のように、体外受精は補足精子・多精受精の出現率を高める要因を含んでいるが、本研究の結果は、カフェインの添加により、補足精子の出現率がいっそう高くなることを示した。また、先に報告したように (吉澤ら1987)、多倍体の出現率はカフェイン添加区11.3%、無添加区5.1%で顕著な差が認められ、補足精子の出現率の上昇は、多倍体の出現率の増加につながることも示された。これら補足精子・多精受精をもたらすカフェインの機序については、本研究では前培養および媒精用培地の両方にカフェインを添加しているため、精子、卵子あるいはその両者への作用が考えられる。マウス精巢上体尾部精子は前培養2時間で受精能を獲得するが、著者らの経験では、カフェイン添加培地で前培養すると精子の運動はよりいっそう増強され、過活性化を起こした精子が多くなる。Fraser (1979) もカフェインによる精子の受精能獲得促進効果を認めている。また、Maudlin & Fraser (1977) は、PMSG 投与量の増加に伴って、多精に由来する多倍体卵の出現率が高くなることを観察し、これはホルモン処理による透明帯または卵黄膜の質的変化によるものであろうと推論している。

卵の分割能と補足精子出現率の関係について、島根と村松 (1979) はマウス体内受精卵の観察で、分裂像を示す卵において、補足精子出現率が極めて低いことを報告している。この所見は、分割能の低い“弱い”卵で補足精子を生じ易いこと、および補足精子の存在によって分

割が妨げられるという2つの可能性を示唆している。しかし、本研究の観察によれば極めて多数の補足精子を有する卵においても正常な分裂像が得られているので、第2の可能性は一応除外して考えることができよう。本研究ではカフェイン添加区、無添加区ともに第1分割期の染色体像の有無による補足精子出現率の差は認めなかった。しかし、これによって第1の可能性を否定することはできない。前述したように、体外受精においては卵への多数精子の侵入を起し易く、“弱い”卵だけでなく大部分の卵が補足精子を保有するという結果を招来しているからである。

本研究では、補足精子に焦点を当てて観察を進めた。補足精子は囲卵腔内に留まるもので、それ自体は卵の発生にとって無害な存在と考えることができるかもしれない。しかし、補足精子の出現率と多倍体の出現率は平行関係にあり、発生障害の誘因となることは注目しなければならぬ。

要 約

カフェイン添加培地と無添加培地においてマウス体外受精を行なった。受精率は添加区90.6%、無添加区88.0%で有意な差はなかった。補足精子をもつ卵の率は、添加区92.4%、無添加区73.9%で添加区の方が有意に高い値を示した。第1分割中期像はカフェイン無添加区において高率に得られた。補足精子出現率を分裂像の有無で比較したが、添加区および無添加区ともに有意な差はみられなかった。

参 考 文 献

- 1) 包 旭日干, 花田 章 (1985), 家畜繁殖誌 31(3): 115-121
- 2) Fraser, L. R., Maudlin, I. (1978), J. Reprod. Fert., 52: 103-106
- 3) Fraser, L. R., Maudlin, I. (1979), Environmental Health Perspective 31: 141-149
- 4) Fraser, L. R. (1979), J. Reprod. Fert., 57: 377-384
- 5) 浜野 晴三, 豊田 裕 (1986), 家畜繁殖誌 32(4): 177-183
- 6) 梶原 豊, 後藤和文, 小坂昭三, 中西喜彦, 小川清彦 (1987), 家畜繁殖誌 33(4): 172-179
- 7) Kaufman, M. H. (1973), J. Cell Sci., 12: 799-808
- 8) Makler, A., Makler, E., Itzkovitz, J., Brandes, J. M. (1980), Fert. Steril., 33(6): 624-630
- 9) Maudlin, I., Fraser, L. R. (1977), J. Reprod. Fert., 50: 275-280
- 10) Maudlin, I., Fraser, L. R. (1978), J. Reprod. Fert., 52: 107-112
- 11) Moussa, M. M. (1983), Fert. Steril., 39(6): 845-848
- 12) Niwa, K., Arakaki, M., Iritani, A. (1980), Biol. Reprod., 22: 1155-1159
- 13) 島根 緑, 村松 隆 (1979), 宇都宮大農学術報告 10(3): 55-62
- 14) 清水工経 (1976), 日不妊会誌 21(3): 51-58
- 15) 高橋 芳幸, 花田 章 (1984), 家畜繁殖誌 30(1): 30-39
- 16) Tarkowski, A. K. (1966), Cytogenetics 5: 394-400
- 17) 豊田 裕, 横山峯介, 星 冬四郎 (1971), 家畜繁殖誌 16: 152-157
- 18) Yoshizawa, M., Muramatsu, T., Okamoto, A. (1985), Jpn. J. Anim. Reprod., 31: 78-83
- 19) 吉澤 緑, 仲本智之, 野澤えみ子, 村松 隆, 岡本 昭 (1987), 第79回日畜学会大会講演要旨: 19
- 20) 吉澤 緑, 野澤えみ子, 仲本智之, 村松 隆 (1987), 哺乳卵研誌 4(1): 47-48

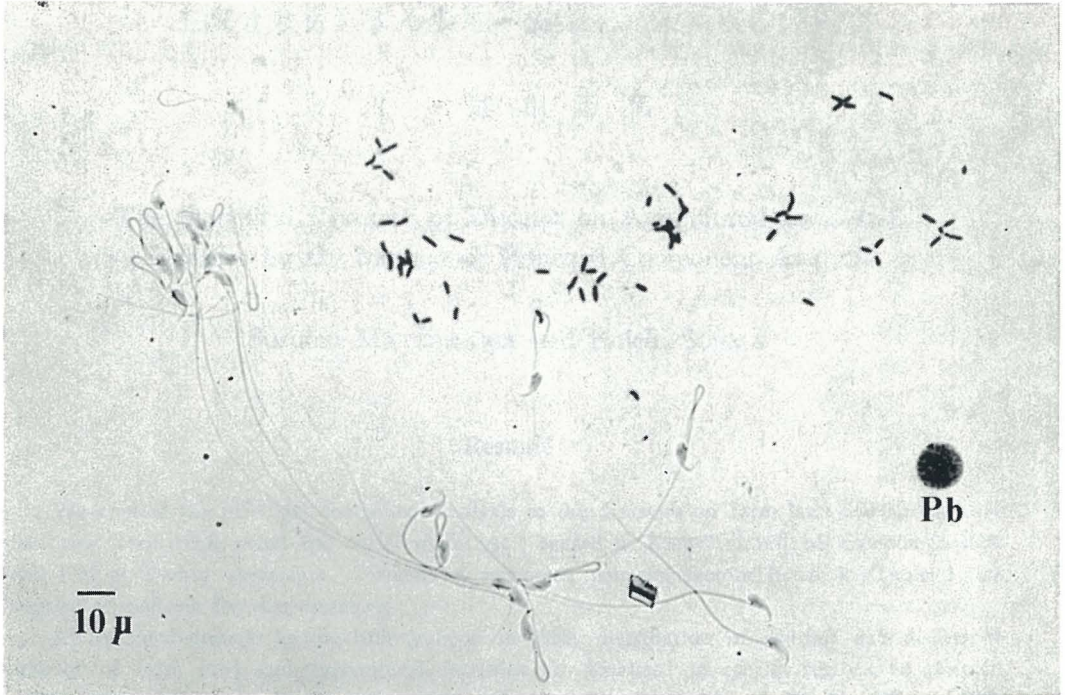


Fig. 1. A first-cleavage mouse egg derived from fertilization in caffeine-containing medium, showing a triploid complement of chromosomes and 20 supplementary sperm. Pb, polar body. C-band stain after air-drying.