

3 - b in vitro fertilizationにおけるmedium 中のenergy sourceの影響について

東北大学医学部産科婦人科学教室

星 和彦・斎藤 晃
桃野 耕太郎・長池 文康
鈴木 雅洲

研究目的

精子は運動その他の機能の維持に必要なエネルギーを得るために種々の代謝を行なう。エネルギー供給の主役は精子の行なう呼吸と解糖によって生じるATPであり、その供給源としては主に細胞外に存在する種々の基質が利用されるが、内在基質も利用されることが知られている。

細胞内外の種々の基質と精子の呼吸や運動性との関連については、多くの報告があるが、基質とsperm-egg fusionの関係のみた報告はほとんどみられない。

そこでわれわれは、ヒト卵の透明帯と透明帯除去ハムスター卵を用いて、ヒト精子のin vitro受精実験を行ない、培養液中に含まれる種々の基質の受精に対する効果について検討した。

研究方法

① 実験の概要

透明帯除去新鮮ハムスター卵と高濃度塩溶液に入れて保存しておいたヒト卵を用い、基質の有無による数種類の培養液中でヒト精子を媒精させ受精の有無を観察した。

② 培養液

基本的な培養液としてはTable 1に示したmodified-Krebs Ringer液(mBWW液)を使用した。この中で基質となり得るのはglucose, Na-pyruvateそしてNa-lactateであるが、これらの有無で8種類のテスト培養液を作製し実験に用いた。なお基質の除去にともなう浸透圧の変化はNaClを増やすことにより一定に調節した。(約308 mOsmol)

③ 透明帯除去ハムスター卵の調製

PMS (30IU)とHCG (30IU)で過排卵処理したゴールデンハムスターの卵管より採卵し、0.1% hyaluronidaseと0.1% trypsin処理にて透明帯除去卵を調製した。最終的に透明帯除去卵はmBWWで3回洗浄され培養液中に入れられた。

④ ヒト卵透明帯の調製

手術標本より得られたヒト未熟卵を48時間成熟培養し、その卵を0.5 M硫酸アンモニウム+1 M塩化マグネシウム+0.1%デキストランの塩溶液に入れて保存した。実験に先立ちこれらの卵は十分洗浄され、ハムスター卵と同様に、用意された培養液内に置かれた。塩溶液に入れることにより、卵細胞は死滅するが、透明帯は性質を変えずに保存され、ヒト精子の付着、侵入については新鮮卵と変わらないことが報告されている。

⑤ 受精の方法と観察

0.3 mlのテスト培養液をペトリディッシュに入れ、その上をミネラルオイルでおおう。培養液の中に前述の透明帯除去ハムスター卵あるいはヒト卵を入れ、次いで洗浄精子浮遊液を0.03 ml加えた。最終精子濃度は、 $1 \sim 2 \times 10^7/ml$ になるよう調節された。37°Cの大气中で4~5時間培養したのち、卵をとり出し受精の有無を位相差顕微鏡下に観察した。

研究成績

Table 2は各テスト培養液中におけるヒト精子の透明帯除去ハムスター卵への侵入(受精)率と平均侵入数を示したものである。

受精率に関しては、通常mBWWと基質除去mBWWの間に有意な差を認めることができなかった。しかし精子の平均侵入数はglucose-freeの培養液では減少の傾向がみられた。

Table 3は同様にヒト卵(透明帯)への侵入をみた成績である。通常mBWW内での受精率は高いが、基質除去の各培養液内でのそれは低く、中でもglucose-freeの培養液中では精子侵入は認められなかった。

考察ならびに要約

1976年Yanagimachiらはacrosome reactionを完了したヒト精子が、透明帯除去ハムスター卵に受精可能なことを見つけ、ヒト精子の受精能を調べるときに使用可能であることを報告した。われわれはこのin

vitro 受精系とヒト卵透明帯を用い、細胞外基質の受精に与える影響を検討して以下のような結果を得た。

ヒト精子は基質のない培養液中でも透明帯除去ハムスター卵への侵入は可能であった。これは細胞外にエネルギー源がなくても acrosome reaction が起こることを示していると考えられる。一方、ヒト卵透明帯への侵入は基質が欠除することにより低下し、とくに、glucose-free のときには認められなかった。また、glucose-free の場合は、透明帯除去ハムスター卵への平均侵入数も少なく、細胞外に存在する基質の中では glucose がヒト精子の受精能に最も大きな影響を与えていると思われた。

Table 1. Composition of standard medium used.

	mBWW	
	g/L	mM
NaCl	4.910	84.00
KCl	0.356	4.78
CaCl ₂	0.189	1.71
KH ₂ PO ₄	0.162	1.19
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.294	1.19
NaHCO ₃	3.000	35.71
Na-pyruvate	0.028	0.25
Na-lactate	2.416	21.58 ^a
Glucose	1.000	5.56
Human serum albumin ^b	35.000
Antibiotic stock soln. ^c	1.0 ml
mOsmol	308	

a DL-lactic acid, Na-salt (Sigma Chem., St. Louis, MO); 60% syrup, 3.68 ml.

b Purified human serum albumin, Norite-treated, (Sigma Chem., St. Louis, MO)

c 100,000 IU/ml K-Penicillin G and 50 mg/ml Streptomycin sulfste in distilled water, stored frozen until use.

Table 2. Human sperm penetration into zona-free hamster eggs in test media.

Test medium	No. of experiments	Total no. of eggs inseminated	No. (%) of eggs penetrated ^a	No. of sperm	
				No. of eggs	No. of sperm
Glucose free mBWW	4	42	31 (74)	1.69	
Na-Pyruvate free mBWW	4	32	24 (75)	2.44	
Na-Lactate free mBWW	4	46	33 (72)	2.78	
Glucose & Na-Pyruvate free mBWW	4	49	36 (73)	1.94	
Glucose & Na-Lactate free mBWW	4	50	38 (76)	2.36	
Na-Pyruvate & Na-Lactate free mBWW	4	48	37 (77)	3.56	
Energy source free mBWW	8	87	62 (71)	1.75	
(Glucose, Na-Pyruvate & Na-Lactate free)					
Regular mBWW	8	92	69 (75)	2.26	

a Examined 4 hrs after insemination.

Table 3. Human sperm penetration into the zona pellucidae of human eggs in test media.

Test medium	No. of experiments	Total no. of eggs inseminated	Sperm attachment to zona ^a	No. (%) of eggs	
				Penetrated ^b	Not Penetrated
Glucose free mBWW	1	4	Few	0 (0)	
Na-Pyruvate free mBWW	1	4	Few	2 (50)	
Na-Lactate free mBWW	1	4	Few	1 (25)	
Glucose & Na-Pyruvate free mBWW	1	3	Few	0 (0)	
Glucose & Na-Lactate free mBWW	1	3	Few	0 (0)	
Na-Pyruvate & Na-Lactate free mBWW	1	3	Few	0 (0)	
Energy source free mBWW	3	9	Very few	0 (0)	
(Glucose, Na-Pyruvate & Na-Lactate free)					
Regular mBWW	3	9	Very many	8 (89)	

a After pipetting.

b Examined 5 hrs after insemination.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



考察ならひに要約

1976年 Yanagimachi らは acrosome reaction を完了したヒト精子が、透明帯除去ハムスター卵に受精可能なことを見つけ、ヒト精子の受精能を調べるときに使用可能であることを報告した。われわれはこの invitro 受精系とヒト卵透明帯を用い、細胞外基質の受精に与える影響を検討して以下のような結果を得た。

ヒト精子は基質のない培養液中でも透明帯除去ハムスター卵への侵入は可能であった。これは細胞外にエネルギー源がなくても acrosome reaction が起こることを示していると考えられる。一方、ヒト卵透明帯への侵入は基質が欠除することにより低下し、とくに、glucose-free のときには認められなかった。また、glucose-free の場合は、透明帯除去ハムスター卵への平均侵入数も少なく、細胞外に存在する基質の中では glucose がヒト精子の受精能に最も大きな影響を与えていると思われた。