

氏 名 (本籍) ふく だ よし のり
福 田 芳 詔 (福島県)

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 第 1 2 0 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 5 0 年 3 月 1 0 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 4 4 年 3 月
東 北 大 学 農 学 部 卒 業

学 位 論 文 題 目 マウス卵子における体外受精に関する
研究

(主 査)
論 文 審 査 委 員 教 授 竹 内 三 郎 教 授 玉 手 英 夫
教 授 津 田 恒 之

論文内容要旨

哺乳類では雌の体内で受精が起るため、受精の過程を観察しさらに受精の成立を支配する要因を明らかにする方法として、体外 (*in vitro*) において受精を起させるための技術の確立が極めて有意義であると考えられる。しかし家畜はもとより実験動物であるマウスにおいてさえ、再現性の高い体外受精法が得られないために、この種の研究は阻まれてきた。今日、家畜における受精現象の実態に関しては不明の部分が多く、とくに排卵後の卵子の受精能保有時間については、間接的な推定値が得られているにとどまり、人工授精における授精適期の理論的裏付けとなるべき正確な実験的根拠に欠けているのが現状である。さらに人工授精が雄畜側からの家畜改良の手段であるのに対し、近年、雌畜の側からの積極的な家畜改良増殖の促進を計る目的で、性腺刺激ホルモン投与による過排卵の誘起が試みられているが、これらの過排卵卵子と自然排卵卵子との間に受精能に関して違いがあるかどうかについての厳密な実験はほとんどなされていない。

本論文は、安定して高い受精率の得られる体外受精法の確立をめざして、従来の方法に工夫を加え、その方法を用いて自然排卵卵子および過排卵卵子の受精能を比較検討し、排卵後の卵子の受精能消失過程とその支配要因を解明しようとしたものである。

まず第一に、全体に共通する実験方法について、とくに体外受精に用いる精子に関する条件について検討した。すなわち培養液としては、クレブス・リングル重炭酸緩衝液を基本とし、これにグルコース (5.56 mM)、ピルビン酸ナトリウム (1.0 mM)、ウシ血清アルブミン (4 mg/ml) および抗生物質 (ペニシリンおよびストレプトマイシン) を添加した合成培地を作成し、まず交尾後 1~4 時間を経過した成熟雌マウスの子宮から回収した精子と、成熟雄マウスの精巢上体尾部から採取した精子との受精能を比較した。その結果、いずれの精子を用いても体内受精に匹敵する高い受精率が得られることが明らかにされた。次に精子側の条件を一定にするために、精巢上体精子を用いて精子採取から授精までの時間および受精の場の精子濃度の影響について検討を加えた。その結果、採取後 6 時間以内の精子を用いて高い受精率が得られることと、受精の場の精子濃度の上昇に伴って多精子受精の頻度が高くなることを明らかにした (表 1)。これらの知見を基に、卵子の受精能の検討に用いる精子としては、成熟雄の精巢上体尾部から採取後 1 時間体外で培養した精子を、前進運動精子で $50/\mu\text{l}$ (総精子数で $70/\mu\text{l}$) になるように授精するのが適切であると判断された。なお、本実験の受精における最終精子濃度は、従来の体外受精法に比較して著しく低いのが特徴で、この点では *in vivo* の状態により近づいていると考えられる。

卵子の受精能に関する研究では、自然排卵卵子と過排卵卵子の受精能保有時間の検討および種々の条件下で排卵された卵子の受精能について検討した。

I 自然排卵卵子の受精能保有時間の検討

まず、性周期が著しく不安定であるマウスの欠点を克服するために、一匹飼いの方式を導入して比較的安定した性周期を把握することに成功し、これに基づいて排卵は膣垢像が発情前期像を示す日に続く午前2～6時に起ることを確認した。次に午前4時を排卵の零点として以後4時間毎に卵子を卵管より採取して体外受精を行ない、精子の卵子透明帯の通過、卵子細胞質への精子のとり込み、受精途上における形態的特徴および2細胞期への発生を検討した。その結果、精子の透明帯通過は排卵後4～36時間にわたり43.4%以上の卵子に認められ、とくに排卵後4～8時間および24～28時間の卵子に対しては、そのほとんどすべてに精子侵入が起ることが明らかにされた。従来、マウス卵子の受精能保有時間は排卵後8～15時間と推定されているが、本実験によって *in vitro* の条件下では、排卵後36時間を経過しても、なお卵子は精子の侵入を受入れることが明らかにされた(表2)。しかし、このうち受精途上(精子添加後4～6時間)において形態的に正常と判定された卵子の割合は、排卵後4, 8, 12, 16および20時間でそれぞれ88.6, 88.4, 70.4, 11.1および0%で排卵後12時間を過ぎると急激に減少することが知られた(表3)。さらに受精の完了、すなわち2細胞期への発生率で比較すると、排卵後4, 8および12時間でそれぞれ89.8, 57.3および18.2%であった。

以上の成績から、排卵後の卵子の受精能保有時間はその受精能をどの段階でとらえるかによって著しく異なることが知られ、受精の完了でとらえるならば、排卵後8時間の卵子はすでに排卵後4時間の卵子よりも有意に低く、排卵後の卵子の受精能の低下は極めて速やかに開始されることが明らかにされた。一方、その受精能を卵子への精子侵入(精子の透明帯通過)で判定すると、排卵後36時間を経過してもなお精子侵入は可能であり、卵子の受精能消失過程が、従来考えられていた精子が卵子へ侵入できなくなるという形をとらないことが示された。

一方、体外受精のかわりに子宮頸管を通して人工授精し、その時期を同じく4時間毎に遅らせて受精率の変化を観察した結果は、従来の知見とほぼ一致し排卵後12時間までは、体外受精とほぼ同様の傾向を示したが、それ以降は卵子への精子侵入は著しく減少し、体外受精とは明らかに異なる傾向を示した。すなわち *in vivo* においては、加齢の進んだ卵子への精子侵入を防ぐ機構の存在が示唆された。この機構の実体については本研究の範囲では十分には明らかにされなかったが、人工授精の時期の遅れに伴い卵管内に見出される精子数の減少が観察され、受精部位への精子の移行がその一因と推察された。

II 過排卵卵子の受精能保有時間の検討

成熟雌に妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG, 4 i u) と絨毛性腺刺激ホルモン (HCG, 4 i u) を用いて排卵された卵子を自然排卵卵子の場合と同様に、排卵後 4 時間毎に卵子を採取し体外受精を試みた結果、精子の透明帯通過は排卵後 4 時間から 36 時間の卵子で認められ、特に排卵後 4~8 時間ではほとんどの卵子で精子侵入が認められ、12~28 時間でも 50% 以上の卵子で認められた。自然排卵卵子と同様 *in vitro* の条件下では排卵後 36 時間を経過しても卵子は精子を受け入れることが明らかにされた (表 4)。しかし、これら精子侵入卵子のうち受精途上において形態的に正常と判定された卵子の割合は、排卵後 4, 8, 12, 16, 20 および 24 時間でそれぞれ 96.4, 88.6, 75.9, 10.7, 1.3 および 1.8% で、排卵後 12 時間を過ぎると急激に低下し、自然排卵卵子の場合と同じ傾向であることが知られた (表 5)。さらに受精の完了、すなわち 2-細胞期への発生率と比較すると、排卵後 4, 8 および 12 時間でそれぞれ 83.7, 12.3 および 4.3% であった。自然排卵卵子と比較し、排卵後 8 時間の卵子の発生率は有意に低く、排卵後の受精能の低下は自然排卵卵子よりも速く開始されることが示された。

Ⅱ 種々の条件下で排卵された卵子の受精能について

動物の条件を変えこの時排卵された卵子の受精能を前述の知見から排卵後 4 時間および 12 時間に採取し、体外受精法を用いて検討した。検査は受精途上と受精完了 (2-細胞期) について行なった。

1. 動物の日令

性腺刺激ホルモンに対する卵巢の感受性が著しく高い幼若期 (生後 3 週令) および感受性の低下が始まる生後 6 ヶ月令の雌マウスに PMSG を注射して排卵させ、春機発動期 (生後 4 週令) および成熟 (生後 2~5 ヶ月令) 動物の卵子との受精能を比較した。排卵数 (平均値 ± 標準誤差) は、3 週令、4 週令、2~5 ヶ月令および 6 ヶ月令でそれぞれ 37.8 ± 3.4 、 21.8 ± 2.1 、 24.3 ± 2.5 および 12.1 ± 1.1 で、3 週令はいずれの区よりも有意に多く、6 ヶ月令はいずれの区よりも有意に少なかった。

排卵後 4 時間の卵子への精子侵入率はいずれの区においても 90% を越え、また 12 時間では 3 週令および 6 ヶ月令では 90% を越えたが、4 週令 (78.5%) および 2~5 ヶ月令 (75.3%) に比べて有意差はみられず精子侵入では同じ傾向にあると考えられるが、精子侵入卵子のうちの正常な受精途上卵子の割合は、3 週令は排卵後 4 時間で 81.1% で、4 週令 (91.8%) および 2~5 ヶ月令 (96.4%) に比べて有意に低く、また形態異常を伴う卵子の割合も 3 週令の排卵後 4 時間の卵子では 18.3% ですでに 4 週令 (8.2%) および 2~5 ヶ月令 (2.4%) に比べて有意に高か

った(表6)。2-細胞期への発生率では排卵後4時間で3週令(73.7%)および6ヶ月令(72.2%)は4週令(79.9%)および2~5ヶ月令(83.7%)に比べて有意差はみられなかったが、低い値を示した。以上から動物の日令は排卵数と排卵された卵子の受精能に影響を与えることが知られた。

2. 動物の栄養水準

成熟動物に対して給与量を飽食量の60%に制限して約4週間飼育し、体重減少の停止を確認した後、過排卵処理をして卵子の受精能を検討した。一部の動物は制限給餌から飽食に戻し体重および発情の戻りを観察した後、過排卵処理をして卵子の受精能を検討した。排卵数(平均値±標準誤差)は制限給餌区および飽食へ戻した区でそれぞれ 8.1 ± 1.6 および 12.1 ± 1.1 で、いずれも対照区(飽食)の 24.3 ± 2.5 に比べて有意に減少した。

制限給餌区における排卵後4時間の卵子の受精能は、精子侵入率が100%、精子侵入卵子のうち正常な受精途上卵子の割合が71%、2-細胞期への発生率が76.5%で、対照区に比べて正常な受精途上卵子の割合は有意に低下したが、2-細胞期への発生率では有意差はなく、受精途上の過程で退行する卵子が少ないことが知られた。飽食へ戻した区におけるそれぞれの値は84.7, 84.0および61.7%と対照区に比べて2-細胞期への発生率が有意に低下した。この結果から飽食へ戻した場合、受精途上の過程で退行する卵子が多いことが知られた。排卵後12時間の卵子の受精成績はいずれの区においても対照区との間に有意差はみられなかった。

以上の結果から制限給餌は排卵数および排卵された卵子の受精能に影響を及ぼすことが知られた。

3. エストロジエンの投与

成熟マウスに発情前期の午後6時(排卵前10時間)および発情期の午前8時(排卵後4時間)にエストロジエン(1,3,5(10)-Estratrien-3,17 β -Diol-3-Benzoa-te)を $1 \mu g$ および $0.1 \mu g$ 皮下注射した後、採卵しその時の卵子の受精能を検討した。

排卵後4時間における精子侵入卵子の割合はいずれの区でも100%かこれに近い値を示したが、12時間では発情前期 $1 \mu g$ 投与区で73.7%、発情前期 $0.1 \mu g$ 投与区で100%、発情期 $1 \mu g$ 投与区で72.2%および発情期 $0.1 \mu g$ 投与区では87.5%で、対照区(69.2%)に比べて $0.1 \mu g$ 投与の2区はいずれも有意に高く排卵前および排卵後のエストロジエン $0.1 \mu g$ の投与は精子侵入を効果的にすることが知られた。精子侵入卵子のうち正常な受精途上卵子の割合は排卵後4時間で発情前期 $1 \mu g$ および $0.1 \mu g$ 投与区でそれぞれ69.1%と86.5%で $1 \mu g$ 投与区は対照区(88.6%)に比べて有意に低下した。排卵後12時間では発情前期 $1 \mu g$ 投与区および $0.1 \mu g$ 投与区でそれぞれ64.3%と81.1%、発情期 $1 \mu g$ 投与区

および0.1 μ g投与区でそれぞれ61.5%と76.2%で発情前期0.1 μ g投与区は対照区(70.4%)に比べて有意に高かった。この結果から排卵前のエストロジェンの投与は、高い量の場合は多精子受精途上卵子を増大させること、低い量は受精能を保つことで卵子の受精能に影響を及ぼすことが知られた。しかし2細胞期への発生率は対照区に比べて各処理区で有意差はみられず、受精途上で受けた影響は顕著でなくなったが、1 μ g投与区では対照区に比べていずれも低い値を示した。

以上、本研究によって1)体外受精法において特に精子の条件を一定することで、卵子の受精能の量的検討が可能であること。2)卵子自体の受精能は精子が侵入できるかどうかでみると、従来考えられていた期間を越えて持続するが、受精途上でみると排卵後12時間、受精の完了で判定するとすでに排卵後8時間以内に低下しはじめること。3)過排卵卵子の受精能は受精の完了で判定すると自然排卵卵子の受精能に比べて速やかに失われること。4)排卵される卵子の受精能は動物の条件(日令、栄養水準、性ステロイド)によって違うことが明らかにされたものと考えられる。

表1. 受精の場の精子濃度と受精成績

精子濃度 (μ l)	動物数	検査卵子数	受精途上卵子数 (%)	多精子受精途上 卵子数 / 受精途上 卵子数 (%)
50	11	303	251 (82.8)	13/251 (5.2)
100	6	114	101 (88.6)	13/101 (12.9)
200	5	79	73 (92.4)	10/73 (13.7)
400	5	96	96 (100)	13/96 (13.5)
対照	5	186	178 (95.7)	4/178 (2.2)

表2. 精子侵入卵子の割合(自然排卵卵子 In Vitro)

授精時期 (排卵後の時間)	動物数	検査卵子数	精子侵入卵子数(%)
4	11	142	140(98.6)
8	8	106	95(89.6)
12	6	78	54(69.2)
16	7	82	54(65.9)
20	6	77	36(46.8)
24	7	79	77(97.5)
28	5	58	57(98.3)
32	4	53	23(43.4)
36	5	65	33(50.8)

表3. 精子侵入卵子の分類(自然排卵卵子 In Vitro)

授精時期 (排卵後の時間)	精子侵入 卵子数	卵細胞質内に精子が侵入した卵子		卵卵腔内でのみ 精子が侵入した 卵子数 (%)
		正常な受精途上 卵子数(%)	形態異常を 伴う卵子数 (%)	
4	140	124(88.6)	14(10.0)	2(1.4)
8	95	84(88.4)	6(6.3)	5(5.3)
12	54	38(70.4)	15(27.8)	1(1.8)
16	54	6(11.1)	40(74.1)	8(14.8)
20	36	0	29(80.6)	7(19.4)
24	77	0	72(93.5)	5(6.5)
28	57	0	53(93.0)	4(7.0)
32	23	0	10(43.5)	13(56.5)
36	33	0	10(30.3)	23(69.7)

表4. 精子侵入卵子の割合（過排卵卵子）

授精時期 (排卵後の時間)	動物数	検査卵子数	精子侵入卵子数(%)
4	9	180	165(91.7)
8	9	238	210(88.2)
12	10	210	166(79.3)
16	8	175	121(69.1)
20	8	278	150(54.0)
24	6	105	55(52.4)
28	6	129	92(71.3)
32	3*	6	4(66.7)
36	9**	43	7(16.3)

* 2匹は卵管内に卵子なし。

** 4匹は卵管内に卵子なし。

表5. 精子侵入卵子の分類（過排卵卵子）

授精時期 (排卵後の時間)	精子侵入 卵子数	卵細胞質内に精子が侵入した卵子		卵卵腔内でのみ 精子が侵入した 卵子数(%)
		正常な受精途上卵子数 (%)	形態異常を 伴う卵子数 (%)	
4	165	159(96.4)	4(2.4)	2(1.2)
8	210	186(88.6)	22(10.5)	2(0.9)
12	166	126(75.9)	15(9.0)	25(15.1)
16	121	13(10.7)	96(79.3)	12(10.0)
20	150	2(1.3)	132(88.0)	16(10.7)
24	55	1(1.8)	43(78.2)	11(20.0)
28	92	0	52(56.5)	40(43.5)
32	4	0	1(25.0)	3(75.0)
36	7	0	1(14.3)	6(85.7)

表6. 精子侵入卵子の種類

区	授精時期 (排卵後の時間)	精子侵入		卵細胞質内に精子が侵入した卵子		卵細胞内にのみ精子が侵入した卵子数(%)	
		精子数	卵子数	正常な受精上卵子数(%)	形態異常を伴う卵子数(%)	精子が侵入した卵子数(%)	卵子数(%)
3週令	4	159		129(81.1)	29(18.3)	1(0.6)	
	12	158		106(67.1)	40(25.3)	12(7.6)	
4週令	4	98		90(91.8)	8(8.2)	0	
	12	73		37(50.7)	30(41.1)	6(8.2)	
6ヶ月令	4	57		55(96.5)	2(3.5)	0	
	12	42		29(69.0)	11(26.2)	2(4.8)	
対照区	4	165		159(96.4)	4(2.4)	2(1.2)	
(生後2~5ヶ月令)	12	166		126(75.9)	15(9.0)	25(15.1)	

審査結果の要旨

哺乳動物では雌の体内で受精が起るため、受精の過程を観察しさらに受精成立の要因を明らかにすることは困難とされてきた。受精の過程を観察し受精成立の要因を明らかにする方法として、体外受精の技術の確立がきわめて有意義と考えられる。しかし家畜はもとよりマウスにおいてさえ再現性の高い体外受精法が得られないために、この種の研究は阻まれてきた。本論文は安定して高い受精率の得られる体外受精法を確立し、排卵後の卵子の受精能消失過程とその支配要因の解明をねらい、さらに体外受精法を用いて、卵子の受精能に及ぼす動物の日令、動物の栄養水準および性ステロイド（エストロジェン）の投与の影響について検討を行ったものである。

著者はまずマウスにおいて精巣上体精子と子宮内精子の受精成績を比較し、ともに体内受精に匹敵する高い受精率を得たので、精巣上体精子でも体外で受精能獲得を誘起できることを明らかにした。次いで精巣上体精子を用いて採取から受精に用いるまでの培養時間の影響を検討したところ、3分～6時間培養しても受精率は変わらずマウス精子は受精能獲得に要する時間がきわめて短かいと推察した。また、受精の場の精子濃度を検討したところ、1 μ l 当り 50～400 の各区で受精率には差はなかったが、多精子受精卵の割合は100以上の区で有意に増加し1 μ l 当り 50が適切であると判断した。自然排卵卵子の受精能保有時間はその基準を何にとるかによって著しく異なり、精子の卵子透明帯の通過でみれば排卵後3～6時間を経過してもなお精子侵入がみられたが、精子侵入率も高くそのうち形態的に正常な受精途上卵子と判定された卵子の割合は排卵後1～2時間までであった。しかし受精卵の完了を2細胞期への発生率でみると排卵後8時間の卵子はすでに受精能の低下が起っていることを認めた。過排卵卵子では自然排卵卵子に比べて受精能の低下が速いことが受精途上でもそのきざしがみられ、2細胞期での観察ではさらに明確にされた。

受精能に及ぼす日令の影響では幼若動物から得た卵子は受精能が低いこと、動物の栄養水準の影響では強い制限給餌下で排卵された卵子は受精能が低いこと、エストロジェン投与の影響では高い投与量の場合排卵された卵子の受精能が低下することをそれぞれ明らかにした。

以上のように本論文は体外受精およびその応用について詳細に検討し、その間いくつかの新知見を含み、家畜繁殖学の進歩に寄与するところが大きい。よって、審査員一同は著者に農学博士の学位を授与される資格を有するものと認定した。