

氏 名 (本籍) ほり うち とし たか
堀 内 俊 孝

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 博 第 2 8 0 号

学位授与年月日 昭 和 5 7 年 3 月 2 5 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

研究科専攻 東北大学大学院農学研究科
(博士課程) 畜産学専攻

学位論文題目 哺乳動物の受精機構に関する研究
—とくにラットを中心として—

論文審査委員 (主 査)

教授 正 木 淳 一 教授 玉 手 英 夫

助教授 菅 原 七 郎

論文内容要旨

近年における哺乳動物の受精に関する研究、とくに精子の卵子内侵入については、Austin & Braden (1956)の位相差顕微鏡によるラット精子の侵入様式の観察に始まる。しかし、その当時はラットでも排卵ホルモンの放出と排卵時刻との関係は明確にされておらず、したがって、排卵から精子侵入までの時間的關係や経時的な精子侵入過程は明らかにされていなかった。その後、電子顕微鏡(TEM)技術の開発に伴って、1960年代にはラット、マウスおよびウサギにおいて、生体内から採取した卵子を用い精子侵入の観察が試みられた。しかし、その当時は電顕のための試料作製法が確立されていなかったうえ、電顕観察のための卵子の取り扱いが難しく、供試卵子数にも制約があつて、得られた知見は極めて限られたものであつた。

一方、培養技術の発達に伴い Yanagimachi & Chang (1969)はハムスターの体外受精に成功した。その後ウサギやマウスでも体外受精が可能になり、受精研究の中心は体内から体外へと移つた。とくにハムスターは受精に伴う精子頭部の形態変化(先体反応など)が光顕レベルでも観察できることから体外受精の研究では以来、活発に用いられている。

他方、往年の受精研究の主役であつたラットでは、培養法や体外受精法など体外での卵子の取り扱い技術の確立が遅れたことなどから、その後の研究がほとんど進展していない。

以上の背景のもとで、本研究はまだ多くの問題を残しているラットを中心として、受精機構、とくに精子の卵子内侵入機構を解明するため、体内受精および体外受精両条件下での精子の卵子内侵入を走査および透過電顕によって経時的に観察した。また、ラットと近縁の各種実験小動物を用いた比較研究によって哺乳動物精子の卵子内侵入様式を明らかにしようとした。本論文は6章よりなり、第2章において受精前のラット精子の形態と機能について、第3章においてラット精子の顆粒膜細胞群通過、透明帯通過および卵細胞内侵入について、さらに第4章においてマウス、ハムスター、ウサギ精子の卵子内侵入について論述し、第5章で総合的に考察を加え、第6章で総括した。

1. 受精前のラット精子の形態と機能について

1) 子宮から回収した精子の形態と機能について

精巢上体尾部精子および交尾後6、12時間で子宮から回収した精子を用いて体外受精を行った結果、精子侵入率はそれぞれ72%、90%、12%で、雄性前核が形成された卵子は3%、79%、40%であつた。この結果、交尾後6時間で子宮から回収された精子は精巢上体尾部精子より約5時間早く卵子に侵入することが明らかにされ、この時間は精巢上体尾部精子が受精能を獲得する時間に一致した。

次いで、交尾後、子宮液の諸性状を経時的に調べた結果(図1)、液量、精子濃度(精子数)、精子生存率および精子活力は交尾後6時間をピークに減少した。さらに、交尾後6時間で子宮から回収した精子の走査および透過電顕の観察によって(表1)、精子頭部先体の原形質膜の部分的消失が50

の精子で認められ、このような変化は受精能の獲得に伴って生じるものと考えられた。

2) 体外で受精能を獲得した精巣上体尾部精子の形態と機能について

卵子との関連で精子頭部の形態変化をとらえるため、体外で約5時間、修正クレープス液で精子をインキュベーションして受精能を獲得させ、卵子に媒精した直後に採取した精子頭部形態の変化を透過電顕によって観察した。その結果、頭部先体の原形質膜は、まず部分的に消失し、次いで、先体外膜と融合し、小胞状または小管状の融合膜を形成することで先体内物質を放出し、先体を消失することが観察された。

2. ラット精子の卵子内侵入過程について

1) 精子の顆粒膜細胞群通過について

ラット精子は顆粒膜細胞群通過直前に先体反応を生じ先体を消失していた。先体を消失した精子は顆粒膜細胞間隔を縫うように通過する。

2) 精子の透明帯通過について(写真1)

生体内で精子の透明帯通過をとらえることは非常に難しいが、過排卵誘起法を併用して例数を増加し、これを走査電顕で観察することによって、その過程が明らかにされた(図1~4)。すなわち、まず精子は頭部先端を斜めから付着させ、活発な鞭毛運動によって頭部前半を透明帯に侵入させる(図1)、次いで、精子頭部は回転しながらきりもみ状に透明帯に侵入し(図2)、精子頭部後域末端まで通過する(図3)、精子頭部が完全に通過すると透明帯表面に侵入孔が認められる(図4)、その孔はすりばち状を呈しており、その側面は溶解状になっていることがわかった。

一方、体外受精では一度に多数の精子が透明帯を通過するので観察が生体内より容易である。精子頭部は生体内と同様、斜めから透明帯を通過しており(図5)、透明帯通過中、精子頭部赤道域の膜に部分的に穴があき(図6、矢印)、一部で小胞状の膜が認められ、内容物が放出されていた。

3) 精子の卵細胞内侵入について

生体内での精子の卵細胞内侵入様式を経時的に走査電顕で観察した(写真2)。すなわち、透明帯を通過した精子は卵細胞表面に頭部側面の後帽域で付着した(図1)。次いで、卵子微絨毛は糸状に伸びて精子頭部を捕獲した(図2)。その後、卵細胞質の突起は精子頭部を後帽域から覆った(図3)。さらに、穿孔器を除いて精子頭部は卵細胞質の突起に覆われた(図4)。その時点では卵細胞質の突起の表面の微絨毛はまばらであった。最後には精子頭部は卵細胞質によって完全に覆われ(図5)、精子頭部の侵入域では微絨毛が消失していた。精子頭部が卵細胞内に取り込まれたのち精子鞭毛は卵細胞表面で波形を示し(図6)、卵細胞内に取り込まれた。この過程の時間的關係は図2に示した。すなわち、精子頭部に付着された卵子は午前5時15分から30分まで精子侵入をうけたすべての卵子で観察されたが、その数は時間の経過につれて急激に減少した。卵細胞質の突起によって精子頭部が部分的および完全に覆われた卵子の出現頻度はそれぞれ午前6時15分およ

び7時～7時30分にピークを示した。波形を示した精子鞭毛の取り込まれている卵子は午前7時15分に最も高い頻度で観察された。

一方、体外受精では生体内と異なる侵入様式が走査電顕で観察された(写真3)。まず精子は頭部先端を卵細胞表面に垂直に付着させた(図1)。さらに頭部の $\frac{2}{3}$ は卵細胞の突起に覆われ(図2)、卵細胞質に垂直に侵入し、頭部後帽域の末端のみが卵細胞表面で認められた(図3)。最後に、精子頭部は卵細胞質内に完全に侵入した(図4)。その時点で卵細胞表面の微絨毛はまばらになっていた。このような精子頭部の侵入様式と時間的關係は表2に示した。垂直な侵入様式は媒精後の時間経過に伴って、付着から侵入中そして侵入完了へと移った。平行な侵入様式は検査卵子136個のうち7%のみしか観察されなかった。しかし、精子頭部が垂直に侵入するにもかかわらず先体の消失した頭部先端で卵細胞と膜融合することはなく、平行な侵入様式を示す生体内と同様、後帽域でのみ膜融合が起った(図5, 6)。

3. 他の動物種における精子の卵子内侵入過程について

1) ラット, マウス, ハムスターおよびウサギ精子の卵子内侵入時間について(図3)

各種哺乳動物精子は排卵後1～3時間で卵子への侵入を開始した。排卵後、最も早く侵入を開始したのはラットで、次いでウサギ, ハムスター, マウスの順であった。また、ウサギでは精子侵入が観察されてから、すべての卵子で精子侵入が確認されるまで、約2時間を要したが、マウスでは約1時間で完了した。

2) 生体内におけるマウス, ハムスター, ウサギ精子の透明帯通過について

精子頭部が透明帯通過中の卵子はラット, マウス, ハムスターおよびウサギでそれぞれ1.8, 3.4, 2.2および4.1%で、観察は非常に困難であった。

マウスおよびハムスター精子はラット精子と同様、頭部先端を斜めから付着させ、きりもみ状に回転しながら通過し、ウサギ精子は頭部先端を斜めから付着させ前後右左に振動させながら通過することを示した。このことから透明帯通過はラットのような鉤形とウサギのような卵形の精子頭部により大きく区分されるかもしれないことが推察された。

3) 生体内におけるマウス, ハムスター, ウサギ精子の卵細胞内侵入について

透明帯を通過した精子は卵子微絨毛と接触するが、ラットほど著しい卵子微絨毛の変化は認められなかった。しかし、卵子微絨毛は精子頭部を押さえ、卵細胞質の突起が精子頭部を覆うのを助けるようにみえた。卵子微絨毛に捕獲されたマウス, ハムスターおよびウサギ精子はラット精子とはほぼ同様な過程で卵細胞内に取り込まれたが、マウスではラットと同様、精子頭部の侵入した部位で卵子微絨毛は消失し、ハムスターおよびウサギでは卵子微絨毛が消失することにはなかった。

以上の実験結果から、図4に示すような哺乳動物における精子の卵子内侵入過程が明らかにされた。本研

究で得られた知見のうち、最も特徴的な成果は①精子の透明帯通過 ②精子の卵細胞侵入における卵子微絨毛の変化とその役割、が明らかにされたことである。

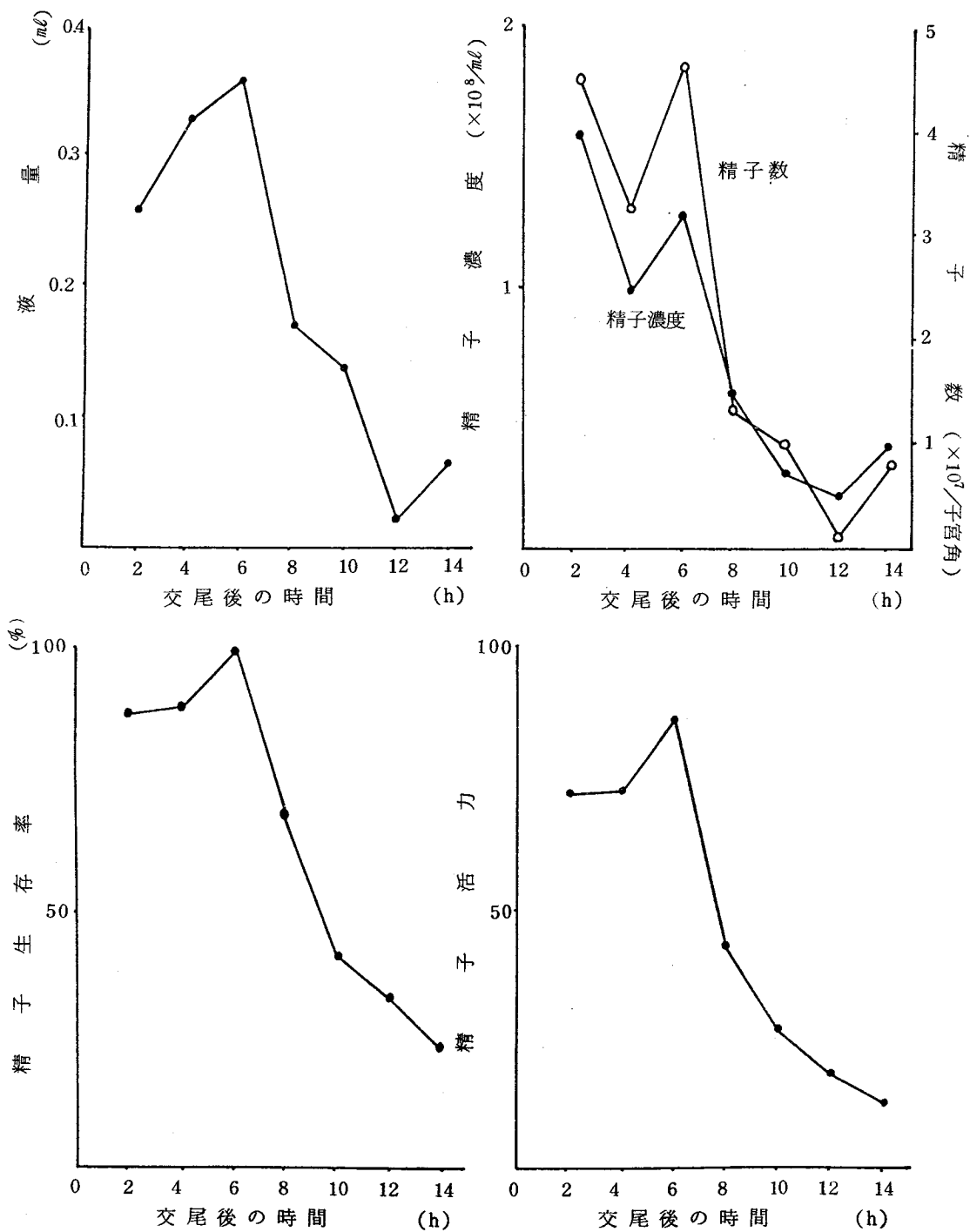


図 1 交尾後採取した子宮液量と子宮液中の精子濃度(精子数), 精子生存率, 精子活力の経時的变化

表1 子宮から回収した精子の頭部先体の形態変化

精子材料	試料数	先 体 (%, M ± SE)			
		正 常	原形質膜の部分的消失	原形質膜の完全な消失	先体内物質の放出
精巢上体尾部	6	80 ±6	18 ±7	2 ±7	0
交尾後6時間の子宮	5	16 ±7	50 ±8	18 ±6	16 ±10
交尾後12時間の子宮	13	6 ±4	29 ±8	13 ±6	52 ±11

(透過電顕による観察)

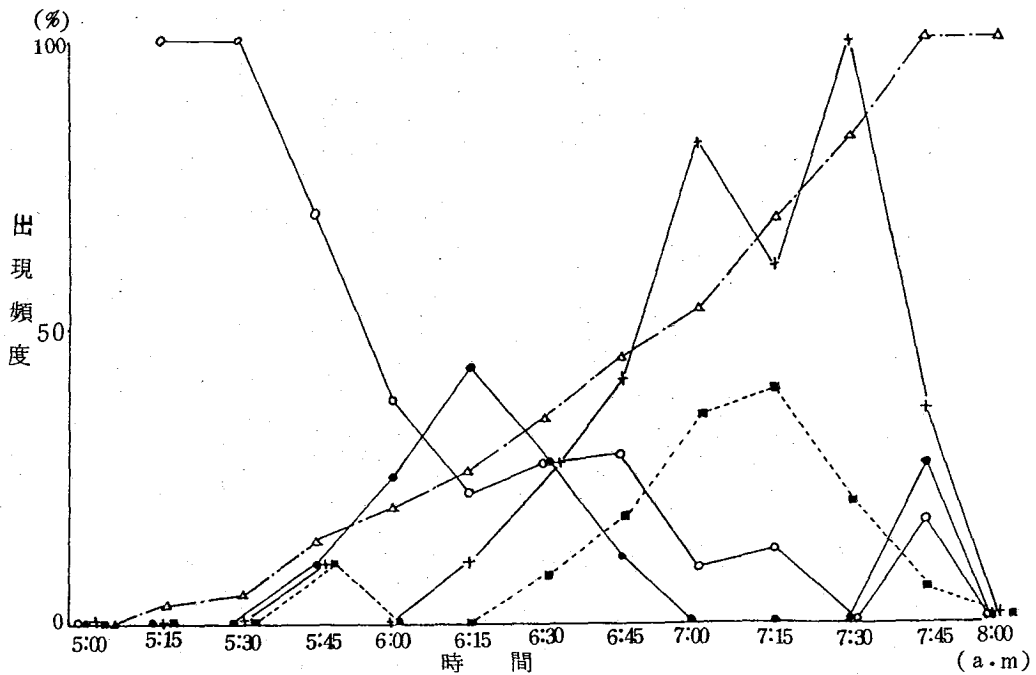


図 2 生体内におけるラット精子の卵細胞内侵入の時間的経過 (走査電顕による観察)

△---△ 精子によって侵入された卵子；○—○ 卵細胞表面で精子頭部に付着された卵子；
●—● 卵細胞質の突起によって精子頭部が部分的に覆われた卵子；+--+ 卵細胞質の突起
によって精子頭部が完全に覆われた卵子；■---■ 波状を示して精子鞭毛が取り込まれている
卵子

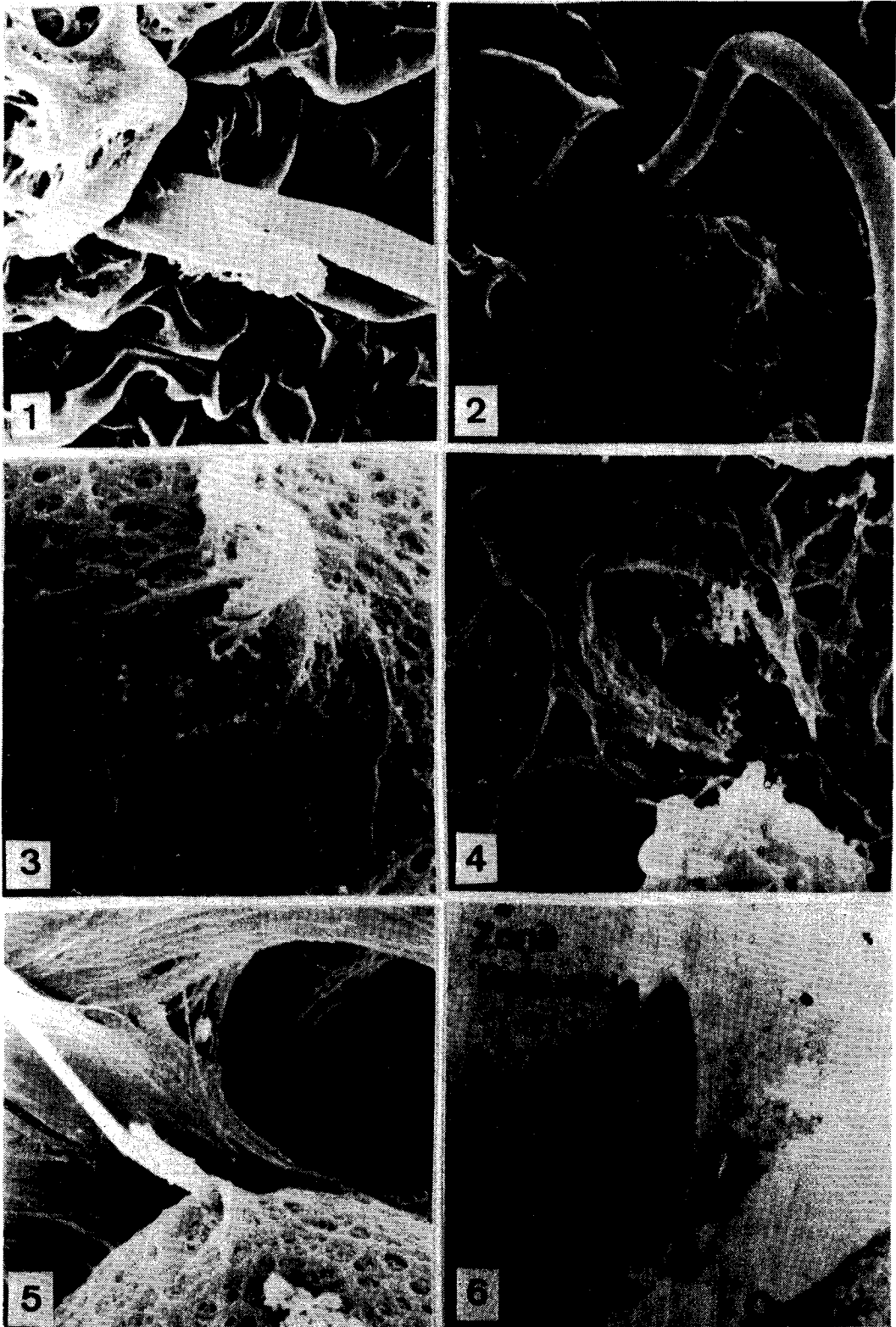


写真1. 生体内および体外受精におけるラット精子の透明帯通過

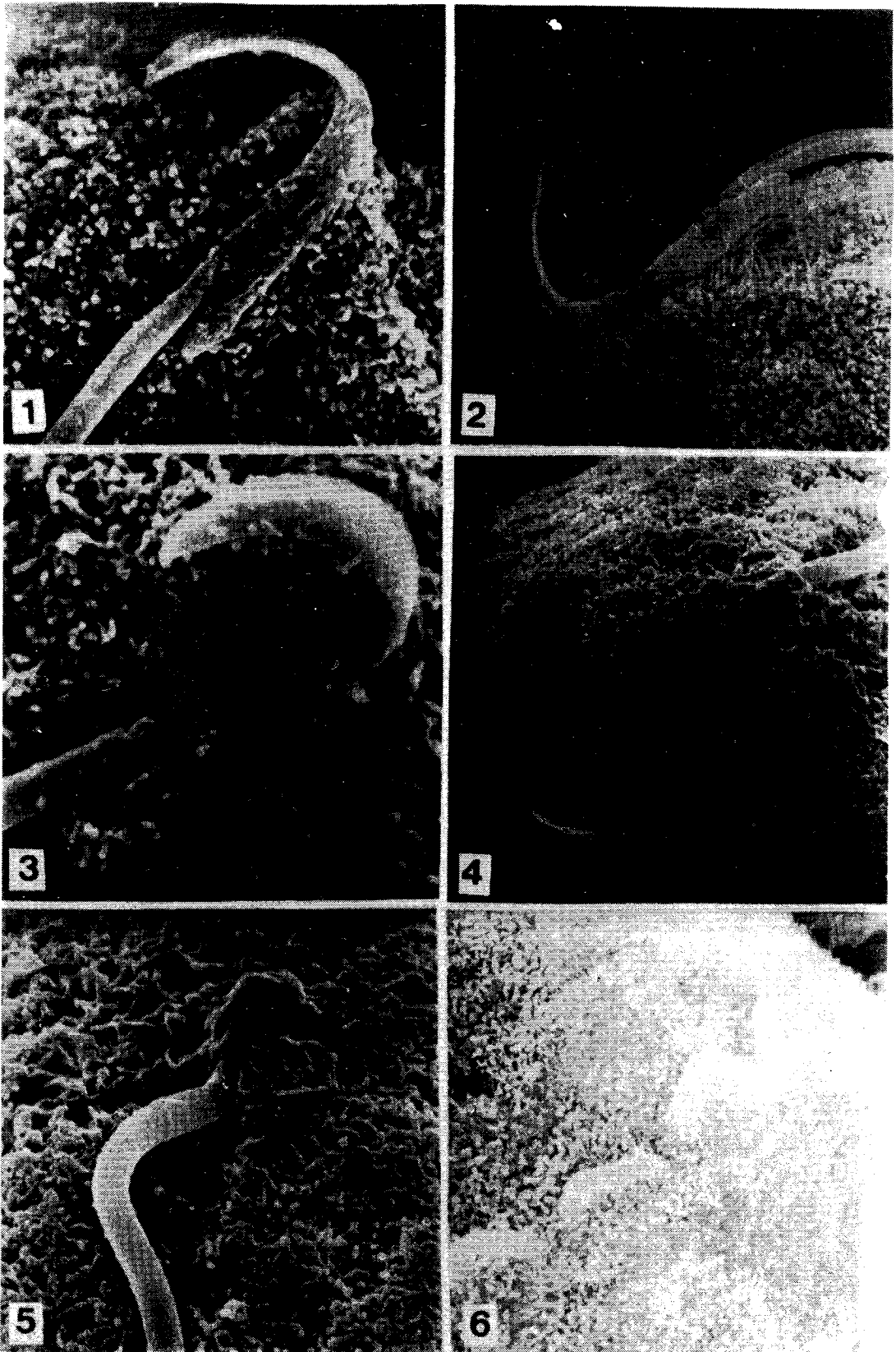


写真 2. 生体内におけるラット精子の卵細胞内侵入

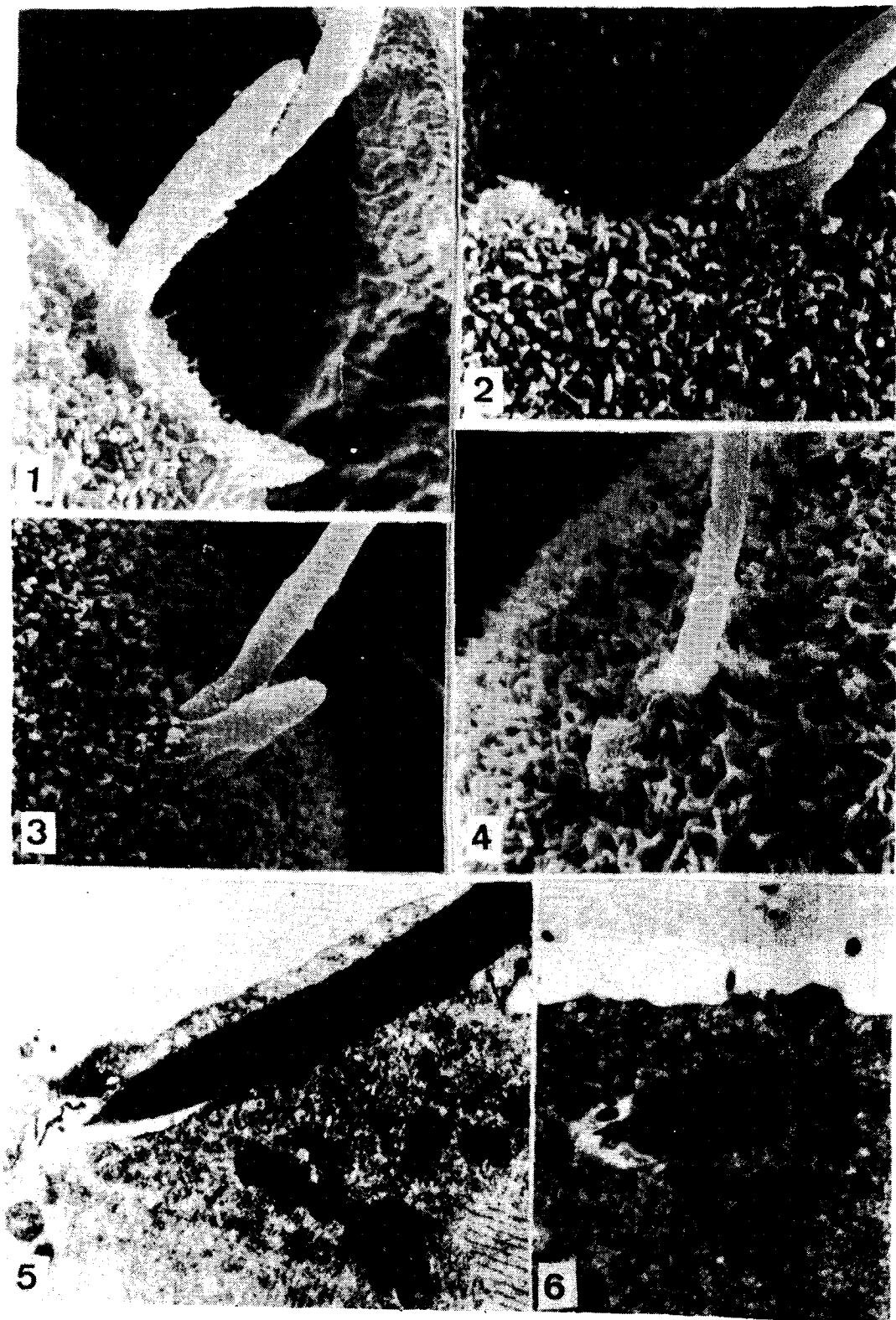


写真3. 体外受精におけるラット精子の卵細胞内侵入

表 2 ラット卵子の体外受精における精子の卵細胞内侵入の走査電顕による観察

検査時間(媒精後の時間, 分)	検査卵子数	精子頭部の侵入様式 (卵子数)			
		垂直に付着	垂直に侵入中	垂直に侵入完了	平行に付着または侵入
30	6	4	1	1	0
45	16	5	3	6	2
60	17	4	4	6	3
75	21	5	6	8	2
90	73	12	15	44	2
120	3	0	0	3	0
総計 (%)	136	30(22)	29(21)	68(50)	9(7)

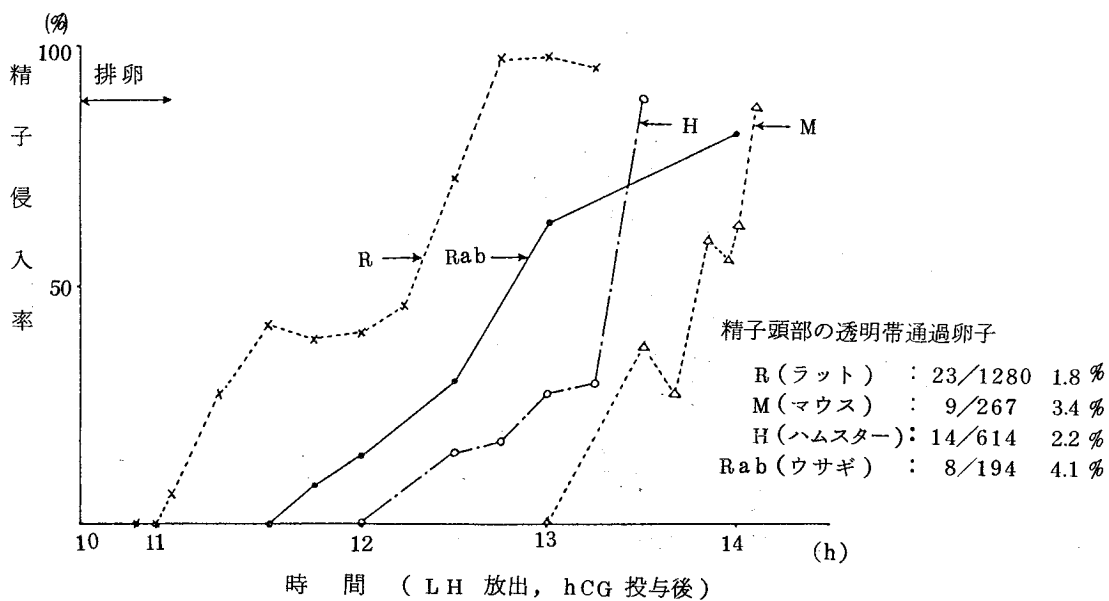


図 3 ラット, マウス, ハムスター, ウサギにおける精子侵入率

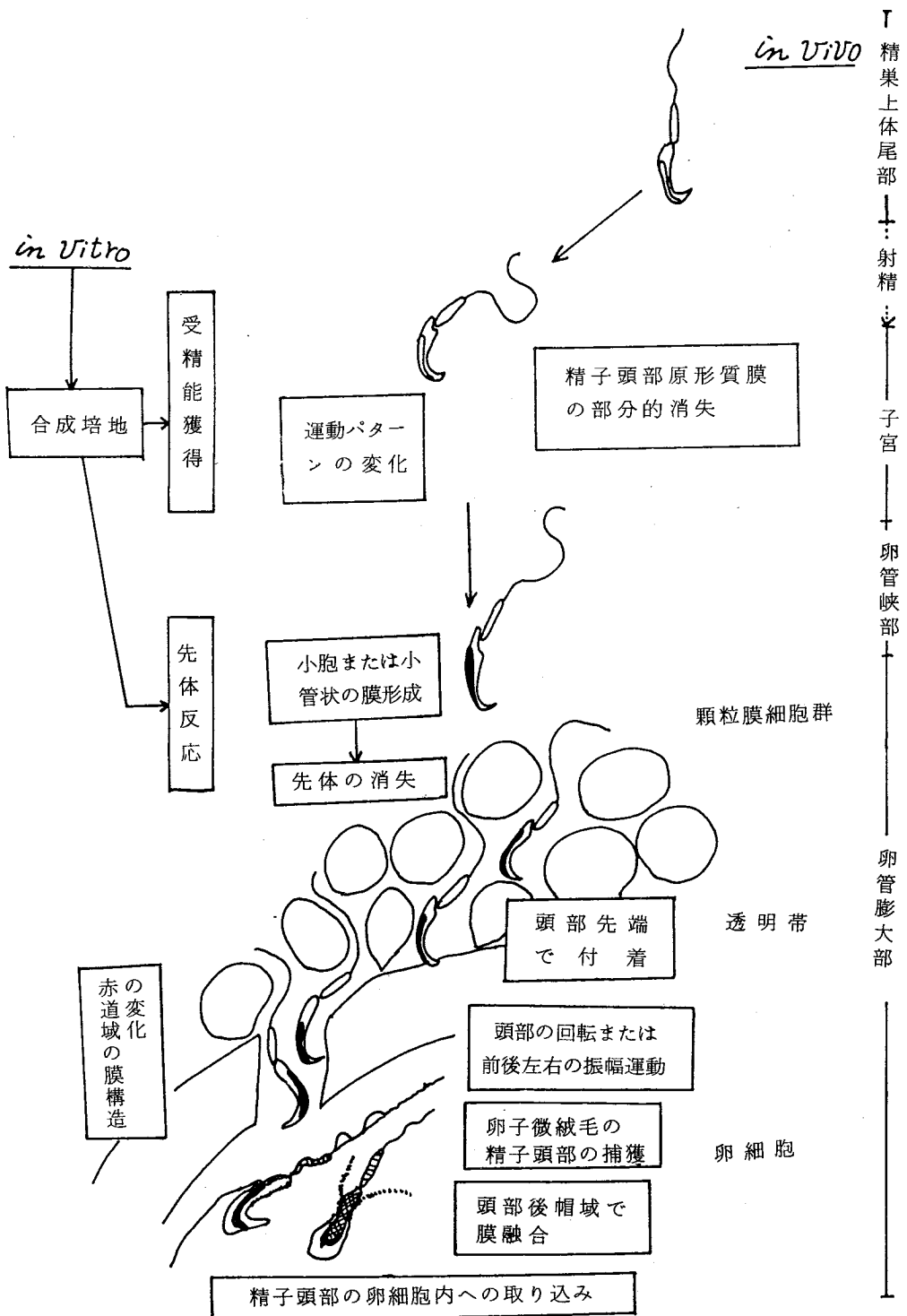


図 4 哺乳動物における精子の卵子内侵入過程の模式図

審査結果の要旨

本研究は、体内および体外受精条件下におけるラット配偶子の動態を走査型および透過型電子顕微鏡により観察し、哺乳動物精子の卵子内侵入様式を解明しようとしたものである。また、ラットと近縁のマウス、ハムスター、ウサギについても同様な観察を行い、動物種による差を明らかにしようとした。

まず、卵子に侵入前のラット精子について観察し、交尾後6時間で子宮から回収された精子は、約50%が先体原形質膜の部分的崩壊を起しているが活発な運動性を維持しており、体外受精の結果では、精巣上体尾部精子や交尾後12時間で子宮から回収された精子に比べて、卵子内への侵入率および雄性前核形成率が高いことを明らかにした。

受精能を獲得した精子は、卵子をとりまく顆粒膜細胞群を通過して透明帯に到達し、透明帯を通過したのち卵細胞内に侵入する。本研究では、顆粒膜細胞通過前のラット精子がすでに先体を失っていることを示すとともに、これまで観察例の少なかった透明帯通過中の精子を、過排卵誘起法と体外受精法を併用してとらえた。これによって、ラット精子は頭部をきりもみ状に回転させながら、べん毛運動によって通過し、あとに小孔を残すことを明らかにした。続いて、透明帯通過後の精子について、卵細胞内への侵入様式を経時的に観察し、卵細胞表面への付着から侵入完了までの過程を走査電顕像で示した。ここでは卵子微絨毛の動態についても観察し、この構造に精子頭部捕獲機構が存在することを明らかにした。さらに、体内受精と体外受精では、精子頭部の卵細胞への侵入角度が明らかに異なることを示した。

マウス、ハムスター、ウサギの精子については、透明帯通過および卵細胞内侵入過程を観察することによって、ラットとの共通点および相異点を明らかにした。

以上のように、本研究は哺乳動物の受精機構のうち、精子の卵子内侵入様式について多くの基礎的知見を加えたものであり、家畜繁殖学の領域に寄与するところが大きく、農学博士の学位を授与するに値すると判定した。