

氏 名(本籍) <sup>かめ</sup> 亀 <sup>やま</sup> 山 <sup>けん</sup> 賢 <sup>じ</sup> 次

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 博 第 3 6 7 号

学位授与年月日 昭 和 63 年 3 月 25 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 Microfertilizationによるウシの受精過程に  
関する研究

論文審査委員 (主 査)

教授 正木 淳二

教授 水間 豊

助教授 菅原 七郎

## 論文内容要旨

哺乳動物の受精機構に関する研究は、体外受精技術の発展もあって、近年盛んになってきたが、一般には卵子の入手し易い実験動物を中心に進められている。一方、家畜では、体外受精が、受精能力の判定に役立つだけでなく、配偶子の利用や交配の組み合わせを自由に行える点で有効な方法として期待されている。しかし、分娩に至る成功例はまだ少なく、技術的に多くの問題を残している。また、受精の各過程、すなわち精子の受精能獲得や先体反応における変化、精子の各部位の役割、精子侵入と卵子の成熟や賦活化との関係、精子の膨化、前核形成に対する卵細胞質の機能などについても、まだ不明の点が多い。このため、家畜を対象に受精の機構や意義を解析するためには、体外受精技術の確立とともに、関連した実験発生学的手法の導入が必要と考えられる。

本研究では、その一つとしてウシ配偶子を用い、精子侵入過程を異にする体外受精および Microfertilization (受精させる目的で、顕微操作により、精子を直接卵子内あるいは卵卵腔へ注入する技術)を行い、精子侵入後の卵子と精子の動態を調べ、受精機構を解析することを試みた。また、体外受精-体外培養系が確立されているマウスを用いて Microfertilization を行い、精子注入卵子の発生能を検索した。

### 1. ウシ卵胞卵子の体外受精

1) 供試卵子は、比較的数多く容易に採取できる屠場材料のウシ卵巣から吸引採取した卵胞卵子を用いたため、まず体外成熟培養条件について検討した。基礎培地として Ham's F-12 を用い、添加する血清・タンパクの種類や濃度、ホルモン ( $17\beta$ -エストラジオール+ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン) の有無による影響を調べた結果、20% FCS (ウシ胎児血清)+ホルモンの区で 83.0% の高い成熟率が得られたので、以後の実験系に用いた。

2) 体外成熟卵子を用いた体外受精では、精子の各前培養 (preincubation) 区の間には顕著な差は認められず、25% BFF (ウシ卵胞液) を添加することにより 60% 前後の安定した良好な受精率が得られ、卵割に至る発生率は 2~10% で最高 8 細胞期まで発生した (Table 1)。媒精後 20 時間における侵入精子の変化についても各前培養区間に差は見られず、雄性前核形成の見られた卵子の割合は、Ham's F-12+25% BFF 区で 32.5%、カフェインを添加した区で 36.8% であったが、正常な精子侵入卵子では約 80% が前核期であった (Table 2)。

3) 卵巣から採取直後の未成熟卵子に媒精した結果、精子侵入率は成熟卵子に比べて有意に低く、侵入精子の 37.7% が膨化したが、雌核が未成熟の段階では前核形成が見られなかった (Table 3)。

4) 受精能獲得のための前培養を行わない精子を体外成熟卵子に媒精した場合、媒精後 5 時間では侵入精子は見られず、20 時間後でわずかに 19.1% の侵入率を示した。

5) 以上、供試したウシ卵胞卵子は本実験の条件下で体外成熟-体外受精系に利用し得ること

が示された。また、未成熟卵子では精子侵入率が低く、前核形成能がないことが示され、前培養を行わない精子の媒精後5時間に侵入精子が見られなかったことから、通常の体外受精系では、受精能を獲得していない精子は卵子に侵入できないことが確認された。

## 2. ウシ卵胞卵子の Microfertilization

まず、配偶子の顕微操作法の検討を行ったのち、以下の実験を行った。

1) 前培養前後の精子や超音波処理により尾部と先体を除去した精子頭部、さらに凍結乾燥し4℃下に保存した精子頭部を体外成熟卵子へ注入した(Fig. 1)。その結果、精子の処理に関係なく、注入精子(精子頭部)は卵子内ではほとんど膨化し、10.5~26.4%の前核形成が見られた(Table 4)。精子にほとんど変化の見られないもの(Intact)は、尾部が付着したまま注入した区で多くなる傾向があった。3% PVPを含む生理食塩水を卵子に注入した対照区では、2前核は観察されず、単為発生的賦活化によると思われる1つの前核が $\frac{2}{60}$ (3.3%)の卵子に見られた。

2) 未成熟卵子内に超音波処理精子頭部を注入した場合、媒精後の侵入精子にみられたものよりも高い膨化率(67.6%)を示した(Table 5)。

3) 過排卵処理を施したウシの成熟卵胞卵子を屠殺後または内視鏡操作により採取し、超音波処理精子頭部の注入を行い48時間培養した結果、雌雄前核の融合および卵割溝の見られた卵子も観察された。

4) 以上の結果から、精子を直接卵子内に注入した場合、精子の状態には関係なく精子核は卵子内で膨化し、前核形成できることを示した。このことから、精子の受精能獲得の過程は卵子内に侵入するために必要な変化であり、その後の膨化・前核形成には関係しないことが確認された。また、精子尾部自体も受精後の発生にはかかわらないことが示唆された。卵子については、体外受精の場合より前核形成率が低く、注入操作では賦活化が起きにくかったことから、精子侵入ができて正常な賦活化が起こらないと前核期への発生が見られないことが明らかになった。未成熟卵子への精子注入は、媒精時よりも高い膨化率を示したことから、精子注入時の傷害による卵子の活力低下の影響は少ないように思われた。

## 3. ウシにおける精子の膨化・前核形成の過程

### —TEMによる観察—

1) 体外受精卵子とMicrofertilization卵子における精子の膨化・前核形成の過程を比較検討する前に、体外成熟培養前後の卵子の微細構造をTEM(透過型電子顕微鏡)により観察した。その結果、卵胞から採取直後の未成熟卵子(Fig. 2a)では、脂肪滴が卵子全体に分布し、表層付近にミトコンドリア群やゴルジ装置と表層顆粒群が観察された。しかし、通常この時期に見られない囲卵腔やくぼみのあるもの、顆粒膜細胞の突起の見られないものがあった。他方、体外成熟

卵子 (Fig. 2 b) は、ミトコンドリアの分散や表層顆粒の配列、小胞体の増加など、未成熟卵子とは異なる様相を示したが、個々の卵子には差異が見られ、ミトコンドリア群 (Fig. 2 c) や顆粒膜細胞の突起の残っているもの、微絨毛の退行した卵子などが観察された。

2) 体外受精卵子と Microfertilization 卵子における精子の膨化から前核期と未成熟卵子へ侵入した精子の変化を観察した (Table 6, 7)。体外受精では媒精後10時間で精子は膨化の段階 (Fig. 3 a) を示し、媒精後20時間では6個の卵子中、膨化精子の見られたもの2個、雄性前核に発達 (Fig. 3 b) したものの3個で、雌核はすべて前核化していた。媒精後30時間では7個中2個の卵子で雌雄前核が観察されたが、退行過程と思われるミトコンドリアの電子密度の低下、核膜の異常と前核内の腔などが見られた (Fig. 3 c)。

未成熟卵子へ媒精した場合、5個中2個の卵子で膨化精子が観察された。そのうち、1つはわずかな膨化しか示さなかったが、他の1つはかなり膨化が進行しており、膨化核内に尾部が入り込んでいた。

Microfertilization では、精子頭部注入後10時間に2前核の観察された卵子が見られ、膨化段階の精子は捕えられなかった。体外受精卵子と Microfertilization 卵子の前核期像は、精子尾部の有無以外とくに差は見られなかった。すなわち、核膜の近辺には小胞体、ゴルジ装置およびミトコンドリアが多く見られ、有窓層板も観察された。核膜には核膜孔や核膜の水泡化が見られ、核小体や核内ラメラも観察された (Fig. 4)。

3) 以上の結果から、Microfertilization 卵子は、正常に前核期まで発達し得るものと考えられた。ウシ卵胞卵子は、採取段階でも異常の見られるものや、体外成熟培養後に細胞質の成熟を伴っていないと思われるものがあり、媒精後30時間で多くが退行過程をたどることが明らかになった。

#### 4. マウスにおける Microfertilization 卵子の発生試験

マウスでは体外における1細胞期胚からの発生能に系統差があることが知られているため、2-cell block test を行い、発生率の最も良い系統の組み合わせ (♀: C57BL × C3H, ♂: C57BL または BALB) を用いて Microfertilization 卵子の発生試験を行った。その結果、前核形成率、卵割以後の発生率ともに低かったが、4細胞期までの発生が観察された (Table 8, 9)。

以上、本研究では、ウシ卵胞卵子を用い、体外受精の成績を対照として Microfertilization を行うことにより、受精機構、とくに精子侵入前後における精子の受精能獲得や尾部の必要性を明らかにすることができた。また、体外受精と Microfertilization による卵子賦活化の違いを明らかにするとともに、体外成熟および受精に伴う卵子の微細構造を観察し、細胞質の成熟や正常性に関する知見を得た。また、マウスの Microfertilization 卵子が4細胞期まで発生したことにより、Microfertilization の今後の体外受精系への利用の可能性が示された。

Table 1.

In vitro fertilization and subsequent development of bovine oocytes matured in vitro and inseminated with spermatozoa capacitated in vitro.

Treatment of sperm	No. of eggs penetrated/ total no. (%)	No. of eggs (48-72h post insemination)					
		2- cell	3- cell	4- cell	8- cell	Fragmented (%)	cleaved/total (%)
BO+25%BFF	159/295(53.9) <sup>a</sup>	10	2	0	0	19(6.4)	12/295(4.1) <sup>a</sup>
F-12+25%BFF	174/294(59.2) <sup>ab</sup>	13	3	2	1	16(5.4)	19/294(6.5) <sup>ab</sup>
F-12+25%BFF +2mM Caffeine	70/116(60.3) <sup>ab</sup>	8	0	3	0	9(7.8)	11/116(9.5) <sup>b</sup>
BO+25%BFF +His+IA	86/132(65.2) <sup>b</sup>	4	2	1	1	6(4.5)	8/132(6.1) <sup>ab</sup>
F-12+25%BFF +His+IA	56/104(53.8) <sup>ab</sup>	1	1	0	0	3(2.9)	2/104(1.9) <sup>a</sup>

a,b Different superscripts indicate statistically different subsets (Chi-square,  $p < 0.05$ )

Table 2.

Morphological changes of bovine sperm 20h after insemination to bovine oocytes matured in vitro.

Treatment of sperm	No. of eggs penetrated/ total no. (%)	Changes of sperm		Polyspermy*	Degeneration
		Decondensation	Pronucleus		
F-12+25%BFF	47/80(58.8)	7( 8.8)	26(32.5)	7(14.9)	14(17.5) <sup>c</sup>
F-12+25%BFF +2mMCaffeine	58/87(66.7)	6( 6.9)	32(36.8)	14(24.1)	6( 6.9) <sup>t</sup>

\* %of eggs penetrated by sperm

a-b Different superscripts indicate statistically different subsets (Chi-square,  $p < 0.05$ )

Table 3.

Morphological changes of bovine sperm 20h after insemination to immature bovine oocytes.

n	No. of intact sperm						Total	No. of decondensed sperm						2PN
	Stage of female nuclei							Stage of female nuclei						
	MI	AI	TI	MII	PN		MI	AI	TI	MII	PN	Total		
53	15	6	3	6	1	31	6	2	3	6	3	20(37.7%)	2	

Penetration rate of spermatozoa = 38.1%(53/139)

MI;metaphase of the first meiotic division

AI;anaphase of the first meiotic division

TI;telophase of the first meiotic division

MII;metaphase of the second meiotic division

PN;pronucleus

Table 4.

Morphological changes of bovine sperm 20h after injection into bovine oocytes matured in vitro.

Substance injected	No. of eggs	Changes of sperm head		
		Intact	Decondensation	Pronucleus
Washed sperm	38	6 <sup>a</sup>	28	4(10.5%)
Preincubated sperm	33	4 <sup>ab</sup>	24	5(15.8%)
Sonicated sperm head	53	2 <sup>ac</sup>	37	14(26.4%)
Freeze-dried sperm head	49	1 <sup>bc</sup>	38	10(20.4%)
Preincubated sperm head	47	0 <sup>c</sup>	40	7(14.9%)
3%PVP-saline (Control)	60	---	---	---

<sup>a-c</sup>Different superscripts indicate statistically different subsets (Chi-square, p<0.05)

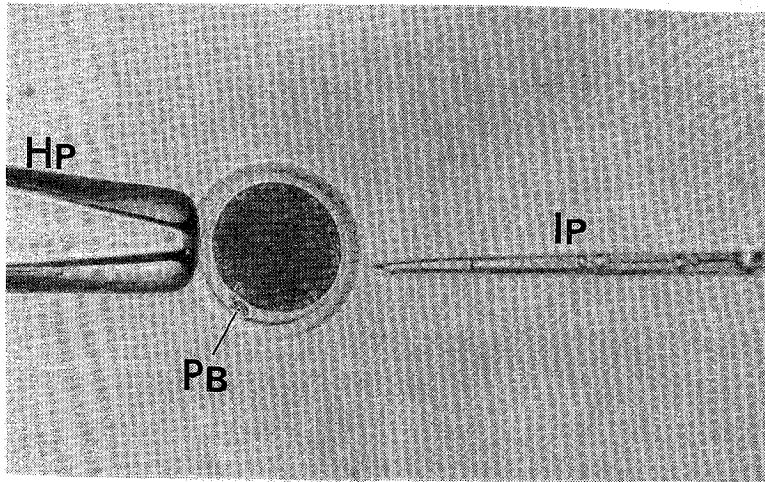


Fig. 1. Procedures for microfertilization; sperm head is in the tip of the injection pipet(IP). Bovine oocyte matured in vitro is held by suction on holding pipet(HP). PB;first polar body X 100

Table 5.

Morphological changes of bovine sperm heads 20h after injection into immature bovine oocytes .

n	<u>No.of intact sperm head</u>						<u>No.of decondensed sperm head</u>					
	<u>Stage of female nuclei</u>					<u>Total</u>	<u>Stage of female nuclei</u>					<u>Total</u>
	<u>MI</u>	<u>AI</u>	<u>TI</u>	<u>MII</u>	<u>PN</u>		<u>MI</u>	<u>AI</u>	<u>TI</u>	<u>MII</u>	<u>PN</u>	
34	6	3	1	1	0	11	4	5	2	12	0	23(67.6%)

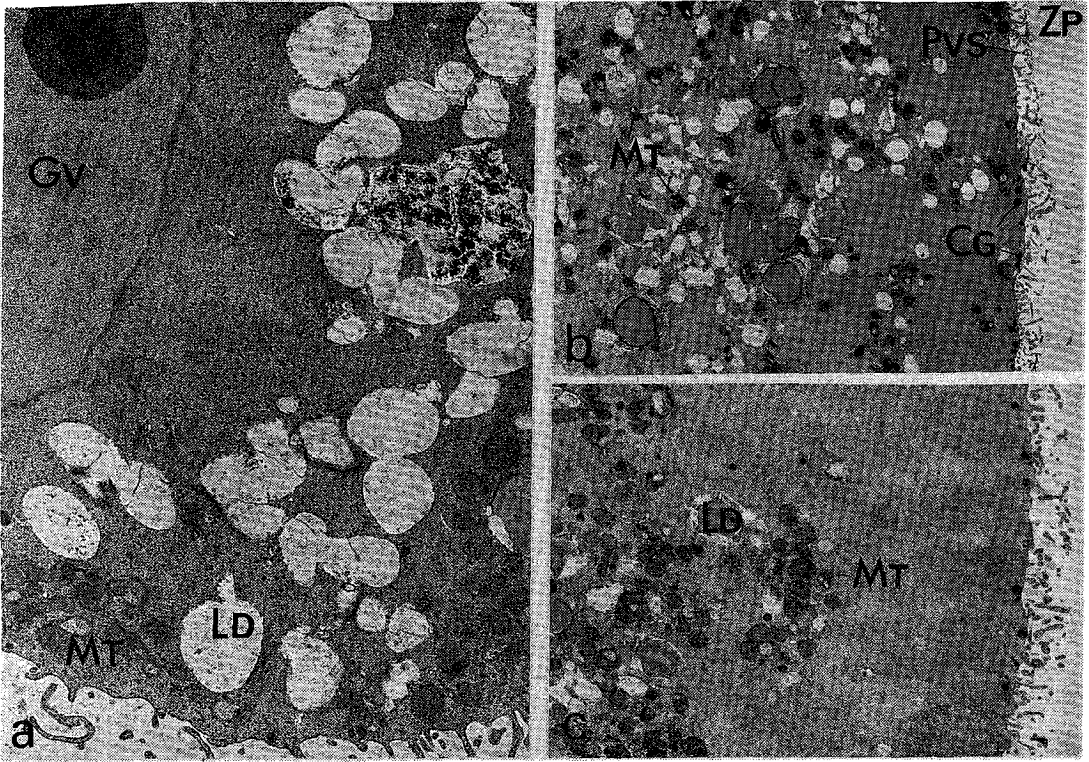


Fig. 2. Fine structure of bovine oocytes. a) Immature oocyte demonstrating a peripheral distribution of mitochondria grouping (MT) and eccentrically located nucleus (germinal vesicle; GV). LD; lipid droplet X 5,000  
 b) Oocyte matured in vitro, showing a random distribution of mitochondria, a perivitellin space (PVS) and cortical granules below the plasma membrane. ZP; zona pellucida X 2,700  
 c) Another type of oocyte matured in vitro characterized by mitochondria grouping. X 3,300



Table 6.

TEM observation on morphological changes of bovine sperm inseminated to bovine oocytes .

Culture for maturation	Time after insemination	No. of eggs	Changes of sperm			Non-detectable
			Intact	Decondense	PN	
+	10h	5	3*	4	0	1
+	20h	6	0	2	3	1
+	30h	7	0	0	2	5
-	20h	5	0	2	0	3

\*Excess sperm by polyspermy

Table 7.

TEM obserbation on morphological changes of bovine sperm heads injected into bovine oocytes matured in vitro .

Time after injection	No. of eggs	Changes of sperm head			Non-detectable
		Intact	Decondense	PN	
10h	5	0	0	2	3
20h	10	1*	0	5	4

\*This sperm head was not attached to ooplasm.

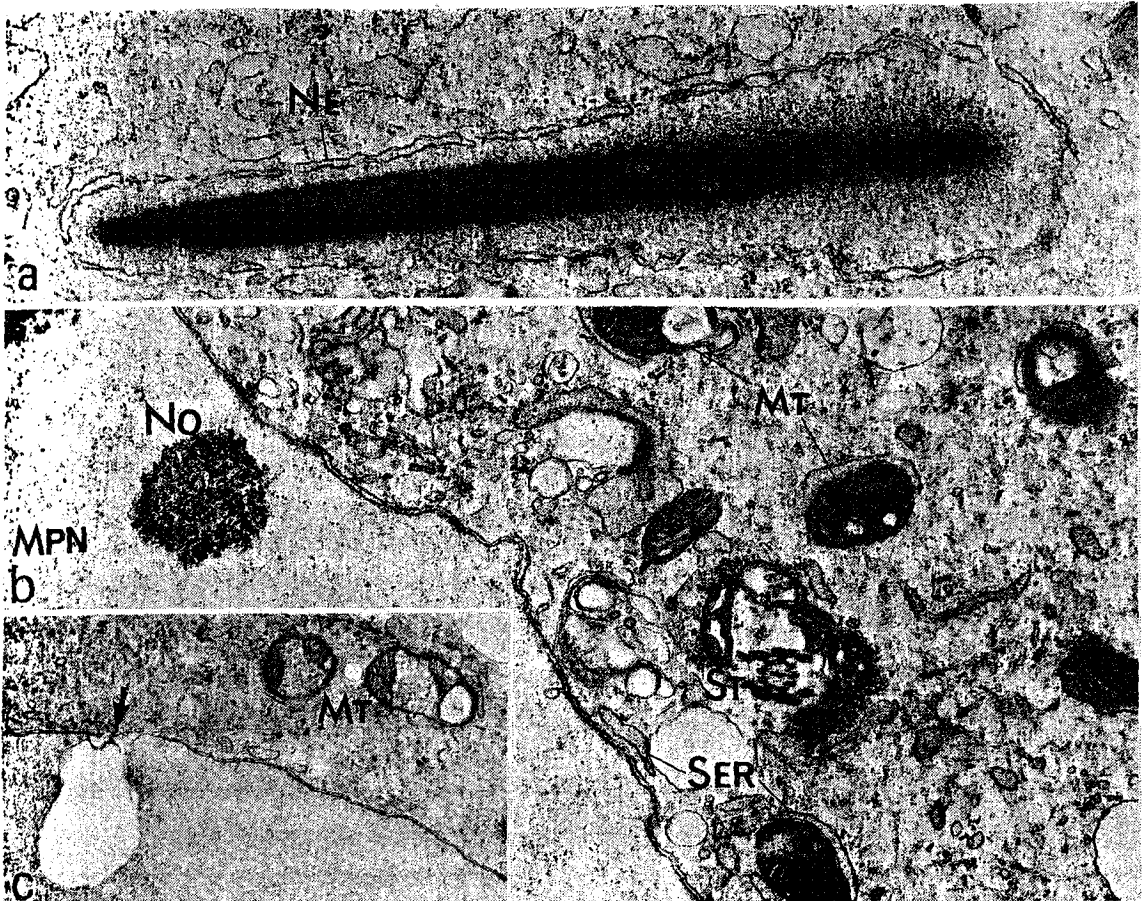


Fig. 3. Ultrastructure of bovine eggs fertilized in vitro.  
 a) Early nuclear decondensation of sperm in the cortex of an egg fixed 10h after insemination. NE; nuclear envelope X 10,000  
 b) Male pronuclei (MPN) in a fertilized egg fixed 20h after insemination. A cross section of mainpiece of the fertilizing sperm (ST) is visible near the nuclear envelope. NO; nucleoli, MT; mitochondria, SER; smooth endoplasmic reticulum X 10,000  
 c) Pronuclear stage, 30h after insemination. Mitochondria of low density and abnormality of pronuclei (arrow) is visible. X 8,300

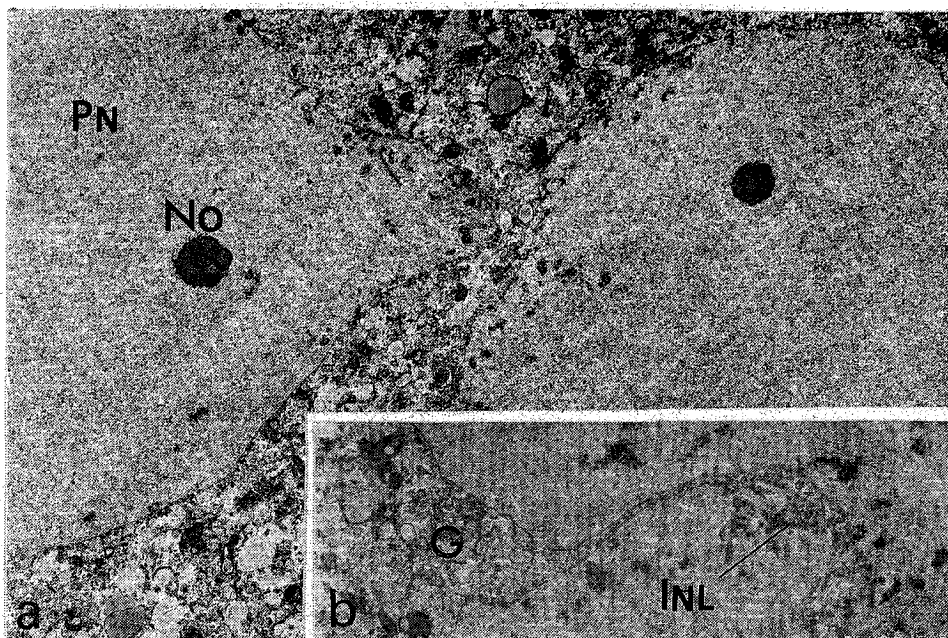


Fig. 4. Eggs in pronuclear stage 20h after injection of sperm head. a) Two pronuclei (PN) and nucleoli (NO) are visible. X 1,300 b) Two pronuclei are close. G; Golgi apparatus, INL; intranuclear lamellae X 3,300

Table 8.

Morphological changes of mouse sperm heads 3-5h after injection into mouse oocytes.

n	Intact	Decondensation	Pronucleus
31	20(64.5%)	8(25.8%)	3( 9.7%)

Table 9.

Development of mouse eggs by microfertilization .

n	24h			48h				
	1-	2-cell	Degeneration	1-	2-	3-	4-cell	Degeneration
50	41	1	5	17	4	5	3	21

## 審査結果の要旨

哺乳動物の受精に関する研究は、一般に卵子の入手しやすい実験動物を用いて進められている。本研究はウシの卵胞、卵子および人工授精用精子を用い、卵子内への精子進入過程を異にする体外受精技術およびmicrofertilization技術（顕微操作により、精子を直接卵子内または囲卵腔へ注入する技術）を導入して受精機構の一端を明らかにしようとした。

ウシの卵胞卵子の体外受精では基礎培地、添加物、精子の前培養条件および卵子成熟度の影響についてしらべ、体外成熟、体外受精系における精子受精能獲得の必要性など、精子・卵子の必要条件を確認した。

ウシの卵胞卵子のmicrofertilizationでは配偶子の顕微操作法を検討したのち、各種の処理を行った牛精子の頭部を未成熟卵子および成熟卵子内に直接注入した。その結果、精子の処理条件に関係なく、注入された精子頭部の核は卵子内で膨化し、前核形成まで進みうることを示した。また、そのためには卵子の賦活化が重要であるとする成績を得た。

ウシ精子の卵子内における膨化・前核形成過程を透過型電顕で観察した結果、体外受精卵子とmicrofertilization卵子の間には精子尾部の有無を除いて本質的な差異は見られず、従ってmicrofertilization時の前核形成までの変化は正常に進行していると考えられた。

比較のために行ったマウスにおけるmicrofertilization卵子の発生試験では、最高4細胞期にまで発生しうることを確認した。

以上、本研究はmicrofertilizationの導入によってウシの受精過程を詳細に観察し、受精および発生の機構解明に貴重な知見を加えた。よって農学博士の学位を授与するに値すると判定した。