

# マウスの体外受精における精子の卵子への侵入におよぼす 前培養と受精時の精子濃度の影響

町田 隆彦・上田 修二・浜田 善幸・青木 晋平

(農学部畜産学研究室)

## Influence of Sperm Concentration of Preincubation and Insemination on the Fertilization of mouse eggs *in vitro*

Takahiko MACHIDA, Shuji UEDA, Yoshiyuki HAMADA, Shimpei AOKI

(Laboratory of Zootechnical Science, Faculty of Agriculture.)

**Abstract:** An experiments were designed to determine in relation the sperm concentration of preincubation and insemination on the fertilization rates for the superovulated mouse eggs *in vitro* of ICR strain.

Immature female mouse were induced to superovulate by PMSG (5 iu) and HCG (5 iu). Then eggs were recovered 15—16 hr after and injection of HCG. Epididymal spermatozoa from mature mouse were created two kinds of sperm concentrations—concentration ( $10-30 \times 10^6/\text{ml}$ ) and medium concentration ( $0.1-0.9 \times 10^6/\text{ml}$ ). Those sperm suspension were preincubated for an hour in an atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$  in air at  $37^\circ\text{C}$ . After preincubation for 1 hr, the high concentration of spermatozoa were divided same and medium concentrations, and the medium concentrations of spermatozoa were divided same and low concentrations ( $0.01-0.09 \times 10^6/\text{ml}$ ). Those various concentration of epididymal spermatozoa were fertilized *in vitro* with eggs. Each treatment of spermatozoa were compared regarding the rate of eggs penetrated and the penetrating stage.

- 1) When the treatment of high (preincubation) -medium (insemination) sperm concentration group was greater fertilization rate than that in another treatments.
- 2) By the treated high-high sperm concentration groups were inhibited conspicuously penetration of mouse eggs *in vitro*.
- 3) When the medium-medium and medium-low sperm concentration, it makes little difference whether the penetration speed or morphological changes of fertilized eggs.

体外受精の研究は、1878年 SHENK<sup>1)</sup> により最初に試みられてから1世紀を経た現在、哺乳動物での成功例は十数種に及び、2・3の実験動物では安定した受精成績が得られるようになった。とくに1954年<sup>2)</sup> 以来、この研究が急速に進展し、1978年にヒトで最初の試験管ベイビーが誕生するに至った。しかし、体外受精の手段で考えられる要因は極めて多岐に亘り、動物種によっては、受精成績に変異が大きく、未説明の問題が多く残されている。

体外受精における精子側の要因として、受精能獲得のための前培養の必要性<sup>3,4,5)</sup>、受精時の最適精子濃度と最小精子数<sup>6,7,8)</sup> などについて、いくつかの報告があるが、前培養精子濃度と、受精時精子濃度の関係について調べた報告は少ない。

本実験では、マウス精巣上体精子を体外受精した場合の前培養精子濃度と、受精時の精子濃度が、卵子への精子侵入率、侵入過程に及ぼす影響について検討した。

### 材料および方法

実験材料としては、ICR系マウスを人工明暗(12:12時間)、室温 $20^\circ\text{C}$ の条件下で飼育したものを供試した。

卵子の採取は、21~24日令の幼若雌マウスに8 IUのPMSG(セトロロピン:帝国臓器)を18:00~20:00に皮下注射し、さらに48時間後に8 IUのHCG(プベローゲン:三共)を腹腔内に注射して過排卵を誘起した。HCG投与後15~16時間目に摘出した卵管膨大部より排卵卵子を採取した。

精子の採取は、成熟雄の精巣上体管を摘出、切断して浸出する精子塊を、プラスチック・シャーレ内のパラフィンオイルで覆った培養液中に取り込み、原精子懸濁液を作成した。(Fig. 1) つづ

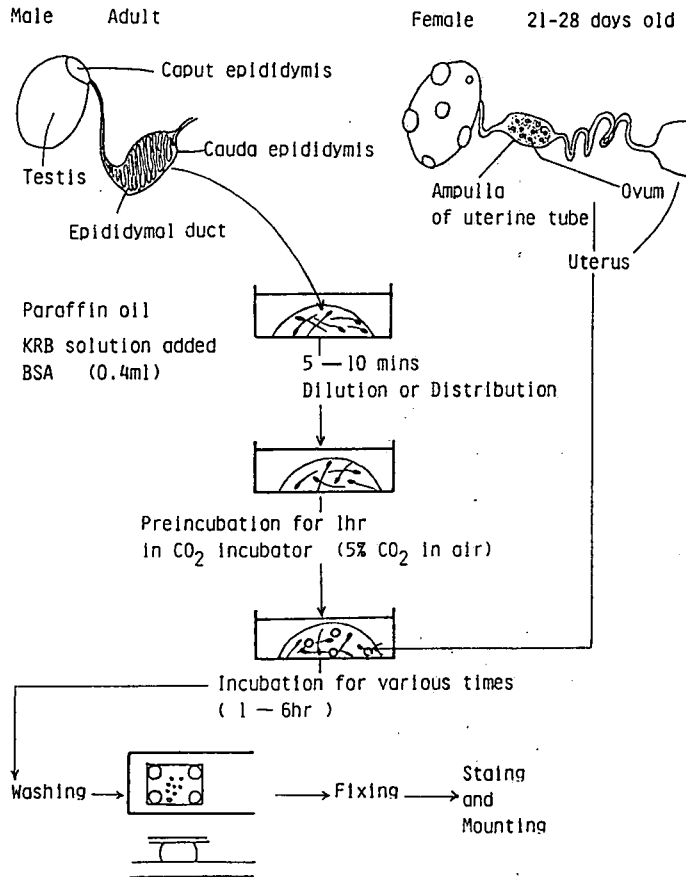


Fig. 1 Experimental procedures

いて原精子懸濁液中の精子数を血球計算法で計数し、 $10\sim 30\times 10^6/\text{ml}$ と $0.1\sim 0.9\times 10^6/\text{ml}$ の2区になるよう希釈調整し、 $37^\circ\text{C}$ の炭酸ガス培養器中で受精能獲得のための前培養を行った。前培養1時間後、受精時の精子濃度区として、 $10\sim 30\times 10^6/\text{ml}$ 、 $0.1\sim 0.9\times 10^6/\text{ml}$ 、 $0.01\sim 0.09\times 10^6/\text{ml}$ の3区に分配・希釈した。(Fig. 2) この精子濃度を調整したシャーレ内の精子懸濁液中に過排卵卵子を投入して、炭酸ガス培養液中に6時間静置して受精させた。受精後、1, 2, 3, 4, 5, 6時間目に取り出した卵子を培養液で2回洗浄し、グルタルアルデヒドと中性ホルマリンで2重固定<sup>9)</sup>、0.25%酢酸ラクモイドで染色<sup>10)</sup>後、位相差顕微鏡で精子の侵入状態を観察した。

培養液は、修正 Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer (KRB) 100 ml 中にグルコース 100 mg, ビルビン酸ナトリウム 11 mg, ペニシリン 7.5 mg, ストレプトマイシン 5 mg が含まれた液に、Bovine Serum Albumine (BSA) を 4 mg/ml 添加して PH を 7.3~7.8 に調整した。この

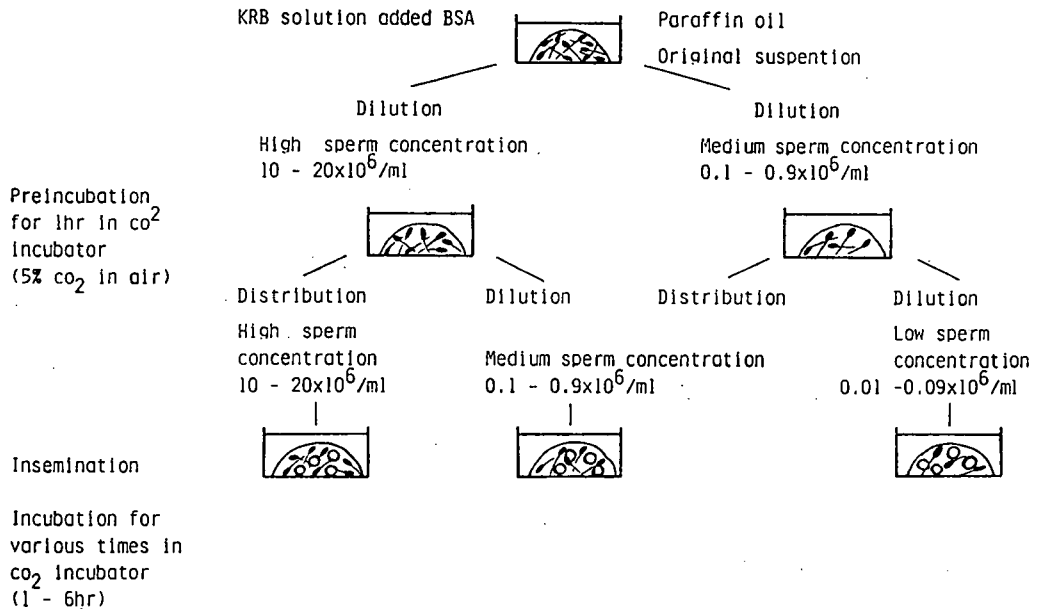


Fig. 2 Fertilization in vitro methods.

培養液 0.4 ml を、パラフィンオイルを満した 21 mm 径のプラスチックシャーレ内に過減菌器を通して注入し、95%空気、5%炭酸ガス、37°Cの培養器中で気相平衡させたものを供試した。

精子侵入卵を次の4期に分類した。Stage I：精子が透明帯を通過して、頭部が卵胞腔に留まっているもの。Stage II：精子が卵細胞質内に侵入し、後頭部の核質の拡散が始まったもの。Stage III：精子頭部全体が膨化し、核質の拡散は進んでいるが、まだ核小体は出現していないもの。Stage IV：雄性前核が認められるもの。

### 結果および考察

#### 1. 体外受精卵の精子侵入率および侵入過程におよぼす前培養時の精子濃度の影響

前培養の精子濃度試験区として、中濃度の  $0.1 \sim 0.9 \times 10^6/\text{ml}$ 、平均  $0.47 \times 10^6/\text{ml}$  (中一中区)と、高濃度の  $10 \sim 20 \times 10^6/\text{ml}$ 、平均  $15.5 \times 10^6/\text{ml}$  (高一中区)の2区を設けた。なお受精時の精子濃度は、両区とも平均  $0.47 \sim 0.73 \times 10^6/\text{ml}$  とした。両区における体外受精後6時間目までの卵子内への精子侵入率および侵入過程の経時的变化を Table 1 の実験 I に示した。受精後1時間目の精子侵入率は、中濃度前培養区 ( $0.47 \times 10^6/\text{ml}$ ) (中一中区)は14%、高濃度前培養区 ( $15.5 \times 10^6/\text{ml}$ ) (高一中区)は34%であった。雄性前核が出現する Stage IV の卵子は、中一中区が受精後5時間目、高一中区が3時間目で観察された。6時間目の精子侵入率および雄性前核が形成された Stage IV の卵子の割合は、中一中区が79, 69%、高一中区が97, 90%であり、本実験のように前培養1時間の精子の場合、高濃度 ( $10 \sim 20 \times 10^6/\text{ml}$ ) で前培養し、受精時に中濃度 ( $0.1 \sim 0.9 \times 10^6/\text{ml}$ ) に希釈して受精した精子が、受精率、卵侵入速度ともに良好な成績を示した。IWAMATSU & CHANG も、本実験の結果と同様の成績を報告している。また、マウス精子の前培養時間については IWAMATSU & CHANG<sup>11)</sup> は Swiss-Webster 系マウスの精巣上体精子は、*in vitro* で受精能を獲得するには2時間を要すると報告しているが、本実験で供試した ICR 系マ

Table 1. Temporal relationship between sperm penetration and transformation of sperm head in mouse eggs in vitro

Treatment	Sperm conc. ( $\times 10^5$ /ml) PI—F	Incubation period(hr)	No. of eggs examined	Total (%)	No. of eggs penetrated			
					Stage (%)			
					I	II	III	IV
I	0.47—0.47	1	87	12(14)	9(75)	3(25)		
		2	87	48(55)	36(75)	12(25)		
		3	75	50(67)	12(24)	20(40)	18(36)	
		4	93	63(68)	18(28)	20(32)	25(40)	
		5	90	63(70)	9(14)	11(17)	15(24)	28(45)
		6	108	85(79)	19(22)	4(5)	3(4)	59(69)
		Total	540	321(59)	103(32)	70(22)	61(19)	87(27)
	15.5—0.73	1	89	30(34)	22(73)	8(27)		
		2	79	44(56)	30(68)	14(32)		
		3	96	70(73)	39(56)	10(14)	12(17)	9(13)
		4	76	57(75)	21(37)	19(33)	9(16)	8(14)
		5	87	70(80)	15(21)	7(10)	18(26)	30(43)
		6	72	70(97)	2(3)	0	5(7)	63(90)
		Total	499	341(68)	129(38)	58(17)	44(13)	110(32)
II	15.5—0.73	1	89	30(34)	22(73)	8(27)		
		2	79	44(56)	30(68)	14(32)		
		3	96	70(73)	39(56)	10(14)	12(17)	9(13)
		4	76	57(75)	21(37)	19(33)	9(16)	8(14)
		5	82	70(80)	15(21)	7(10)	18(25)	30(43)
		6	72	70(97)	2(3)	0	5(7)	63(90)
		Total	499	341(68)	129(38)	58(17)	44(13)	110(32)
	28.3—28.3	1	91	2(2)	2(100)			
		2	88	0				
		3	91	0				
		4	89	0				
		5	82					
		6	83					
		Total	541	2(0.004)	2(0.004)			
III	0.47—0.042	1	80	27(34)	24(89)	3(11)		
		2	86	26(30)	21(82)	5(18)		
		3	98	56(57)	27(48)	14(25)	15(27)	
		4	92	72(78)	43(60)	12(17)	17(23)	
		5	93	55(59)	8(15)	5(9)	10(18)	32(58)
		6	87	67(77)	5(7)	10(15)	17(25)	36(53)
		Total	536	303(56)	128(43)	49(16)	59(19)	68(22)
	0.47—0.47	1	87	12(14)	9(75)	3(25)		
		2	87	48(55)	36(75)	12(25)		
		3	75	50(67)	12(24)	20(40)	18(36)	
		4	93	63(68)	18(28)	20(32)	25(40)	
		5	90	63(70)	9(14)	10(17)	15(24)	29(45)
		6	108	85(79)	19(22)	3(4)	3(4)	59(69)
		Total	540	321(59)	103(32)	70(22)	61(19)	87(27)

Stage I: Eggs with intact sperm head in perivitelline space

Stage II: Eggs with partially enlarged sperm head in vitellus

Stage III: Eggs with fully enlarged sperm head in vitellus

Stage IV: Eggs with male pronucleus

Percentage of eggs to total number of eggs

PI: Pre-incubation F: Fertilization

ウスは、豊田ら<sup>12)</sup>の報告と同様、1時間の前培養で受精能を獲得し、十分な精子侵入卵が得られた。

## II, 体外受精卵の精子侵入率および侵入過程におよぼす体外受精時の精子濃度の影響

受精時における精子濃度の影響を検討するため、高濃度 ( $15.5\sim 28.3\times 10^6/\text{ml}$ ) で1時間前培養した精子を、受精時に中濃度 ( $0.73\times 10^6/\text{ml}$ ) (高一中区) と、高濃度 ( $28.3\times 10^6/\text{ml}$ ) (高一高区) で分配・受精した試験Ⅱおよび中濃度 ( $0.47\times 10^6/\text{ml}$ ) で1時間前培養した精子を、中濃度 ( $0.47\times 10^6/\text{ml}$ ) (中一中区) と、低濃度 ( $0.042\times 10^6/\text{ml}$ ) (中一低区) で受精した試験Ⅲを設けて比較した。(Table 1. 試験Ⅱ, Ⅲ)

高一中区 ( $15.5\sim 0.73\times 10^6/\text{ml}$ ) は上記のように良好な受精成績を示したが、高一高区 ( $28.3\sim 28.3\times 10^6/\text{ml}$ ) の精子侵入卵は、451卵中、囲卵腔に精子頭部が存在す Stage I の卵が2個観察されたに過ぎなかった。この高濃度前培養—高濃度受精区の受精成績が極端に悪かったのは、精漿中に含まれる Decapacitation factor が受精後の培養液中に多く存在するため、精子の受精能獲得に多くの時間を要し、本実験のように数時間の培養では卵子に侵入できなかったことが考えられる。

中一中区 ( $0.47\sim 0.47\times 10^6/\text{ml}$ ) と、中一低区 ( $0.47\sim 0.042\times 10^6/\text{ml}$ ) 両区の受精成績を比較すると、経時的な精子侵入速度に多少の変異がみられたが、受精後6時間目の精子侵入率は、中一中区79%、中一低区77%で両区に差はみられず、経時的な侵入 Stage も類似した推移を示した。TSUNODA & CHANG<sup>9)</sup>の成績によれば、受精時の精子濃度が  $0.005\sim 0.045\times 10^6/\text{ml}$  の低濃度よりも、 $0.1\sim 0.63\times 10^6/\text{ml}$  の中濃度の方が精子侵入率が高く、この濃度範囲が最適濃度であると報告している。

以上本実験の結果では、前培養1時間における精子濃度は  $10\sim 20\times 10^6/\text{ml}$  の比較的高い濃度で前培養し、受精時は  $0.1\sim 0.9\times 10^6/\text{ml}$  の濃度で体外受精した試験区が最も高い受精成績が得られた。

## 要 約

ICR 系の幼若雌マウスから得られた過排卵子の体外受精において、前培養および受精時の精巢上体精子の濃度が、受精にどのような影響をもたらすかについて検討した。

前培養時の精子濃度を高濃度区 ( $10\sim 30\times 10^6/\text{ml}$ ) と、中濃度区 ( $0.1\sim 0.9\times 10^6/\text{ml}$ ) の2区に調整し、 $37^\circ\text{C}$  の炭酸ガス培養中で1時間前培養した。受精時に、高濃度前培養精子区を、高濃度および中濃度に分配した精子で受精した2区と、中濃度前培養精子区を、中濃度および低濃度 ( $0.01\sim 0.09\times 10^6/\text{ml}$ ) に分配・受精した2区の精子侵入率、侵入過程について比較した。

1) 精巢上体精子を高濃度で前培養し、中濃度で体外受精した試験区が、最も高い受精率(97%)であった。

2) 高濃度で前培養および受精した精巢上体精子は、卵子内に殆んど侵入することができなかった。

3) 中濃度で前培養した精子を、中濃度と低濃度で体外受精した両区の受精成績は、精子の侵入速度ならびに受精精子の形態的变化に差がみられなかった。

## 引用文献

- 1) SCHENK, S. L. (1878) Mitt. Embryol. Inst. Univ. Wien II, 107.
- 2) THIBAUT, C., et al (1954) C. R. Soc. Biol., 148: 789.
- 3) IWAMATSU, T. & M. C. CHANG (1971) J. Reprod. Fert., 26: 197.
- 4) TOYODA, Y. & M. C. CHANG (1974) J. Reprod. Fert., 36: 9.
- 5) NIWA, K. & M. C. CHANG (1974) Biol. Reprod., 11: 463.
- 6) TSUNODA, Y. & M. C. CHANG (1974) J. Reprod. Fert., 44: 139.
- 7) NIWA, K. & M. C. CHANG (1973) J. Reprod. Fert., 35: 577.
- 8) NIWA, K. & M. C. CHANG (1974) J. Reprod. Fert., 40: 471.
- 9) 豊田 裕 (1973) 家畜繁殖誌, 19: XI.
- 10) MARSTON, J. H. & M. C. CHANG (1964) J. exp. Zool., 155: 237.
- 11) IWAMATSU, T. & M. C. CHANG (1971) J. Reprod. Fert., 26: 197.
- 12) 豊田 裕, 横山 峰 (1971) 家畜繁殖誌 16: 147.

(昭和57年 9月22日受理)

(昭和58年 1月28日発行)