マウス卵子の体外受精に関する研究

I. 精巢上体精子による受精成績

豊田 裕・横山 峯介・星 冬四郎

(北里大学畜産学部)

哺乳動物卵子の体外受精, すなわち未受精卵を雌の体内からとり出し *in vitro* で受精させる方法は, 受精成立に必要な条件の解明に有効な方法であるのみならず, 実験発生学あるいは育種学的見地からも広い応用の可能性をもつ分野と考えられる。この試みの歴史は古く 19 世紀にさかのぼるが¹⁻³⁾, 確実な成功例は精子の受精能獲得 (capacitation) の発見^{4,5)}以降まずウサギを用いて得られ^{6,7)}その後ゴールデンハムスターでの成功⁸⁾を契機として最近になってマウス⁹⁻¹¹⁾, チャイニーズハムスター¹²⁾あるいはヒト¹³⁾の卵子について相次いで成功例が報じられ, またラットにおいても透明帯を除いた条件下で卵子への精子侵入が得られている¹⁴⁾。しかし現在までのところ, これらの方法による受精率は体内での正常な受精に比して一般に低くまたその変異が大きく, この方法による受精成立条件の解明はほとんど未開の分野と考える。

われわれはマウスを用いできるだけ体内受精に近い状態で安定した受精を得ることを目的とし, とくに卵子への精子侵入に必要な条件の検討を進めているが若干の知見を得たので順次報告したい。本報においては基本的な操作および成熟雄の精巢上体から採取した精子による受精成績について報告する。

実験材料および方法

使用動物はすべて ICR-JCL 系成熟マウス (2~5 月令) で, これらは生後 4 週令で日本クレアから購入し以後固型飼料 (CA-1, 日本クレア) および水を不断給与して飼育したものである。培養液の組成は Table 1 に示すごとく Krebs-Ringer-Bicarbonate 液を基本としブドウ糖, ビルビン酸ナトリウム, 牛血清アルブミン (Ar-

Studies on the fertilization of mouse eggs *in vitro*. I. *In vitro* fertilization of eggs by fresh epididymal sperm.

TOYODA, Yutaka, Minesuke YOKOYAMA & Tosihiro HOSI (Dept. of Animal Sci., Kitasato Univ. Towada-shi Aomori, 034)

Jap. J. Animal Reprod. 16 (4), 1971.

Table 1. Composition of the medium for the *in vitro* fertilization of mouse egg

Component	g/l	mM
NaCl	6.976	119.37
KCl	0.356	4.78
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.251	1.71
KH ₂ PO ₄	0.162	1.19
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.293	1.19
NaHCO ₃	2.106	25.07
Na pyruvate	0.110	1.00
Glucose	1.000	5.56
Bovine albumin	4.000	
Streptomycin sulphate	0.050	
Penicillin potassium	0.075	

mour, 和光) および抗生物質を添加した。培養液は 2 週間毎に新しいものを調製して冷蔵庫内に保管し使用直前に牛血清アルブミンを加え注射器型の汙過減菌器 (pore size 0.45 μ) を通した後使用した。実験開始の約 1 時間前に上記の汙過減菌した培養液の 0.4 ml を滅菌済のプラスチックシャーレ (直径 35 mm, 豊島製作所) の中央にとり, 直ちにあらかじめ 5% に炭酸ガスを含む空気中で飽和され 37°C に加温された流動パラフィン 4~5 ml で上面を覆い炭酸ガス培養装置 (HC-12G 型, 平沢製作所) 内に静置し温度 (37°C) および気相 (95% 空気, 5% 炭酸ガス) と平衡させた後実験に用いた。

卵子の採取に際しては成熟雌マウスに 4 i.u. の PMS (ピーメックス, 友田) および 4 i.u. の HCG (プベローゲン, 友田) を 48 時間間隔で腹腔内注射し, HCG の注射後 16~17 時間に殺し卵管膨大部から卵子を採取した。屠殺後直ちに取出した卵管は滅菌した汙紙上で附着している血液および脂肪組織を注意深く除き培養液と流動パラフィンの入ったシャーレ内に投じ実体顕微鏡下で観察しながら卵管膨大部の卵管壁を解剖針で裂き卵丘細胞の集団に包まれた卵子をとり出して培養液内に入れた。精子の採取は成熟雄を殺した後直ちに精巢上体をと

り出し尾部の精巣上体管が精子で充満している部分を切開して行なった。培養液内に誘導された精子の集塊からは活発な前進運動を示す多数の精子が泳出し数分以内にほぼ均一な精子液が形成された。精子液の濃度は特に調節しなかったが、血球計算盤による算定の結果 10,000~20,000/mm³ の範囲であった。

授精は精子液の作製後できるだけ速やかに(3~7分後)行なった。1 ml ツベルクリン注射筒に接続したガラス毛細管ピペットを用い 5~10 μ l の上記精子液を各シャーレ内の卵子を含む培養液に添加した。卵子採取から授精までの時間は 3~18 分の範囲であった。授精後の最終精子濃度は測定しなかったが原精子液の濃度および添加精子量から 100~500/mm³ と推定される。

授精後はシャーレを培養装置内にもどして静置培養し 1/2, 1, 2, 3, 4 および 5 時間後の各時期にとり出し精子侵入の状況を観察した。検査に際しては実体顕微鏡($\times 16$)下で卵子を毛細管ピペット内に吸引し、アルブミンを含まない培養液で 2 度洗滌した後スライドグラス上に移しカバーグラスで軽く圧迫して観察に供した。ただし授精後 30 分および 1 時間のものは培養終了時においても卵子周囲に卵丘細胞が附着していたので、操作・観察を容易にするためにヒアルロニダーゼ溶液で卵丘細胞を除去した後上記処置を行なった。卵子検査用のスライドにはあらかじめカバーグラスの 4 隅に当る部分にワセリン滴(ワセリン 9: パラフィン 1 の混合物を 1 滴ずつ附着させたもの)をつけておき指圧によって卵の位置および扁平の程度を調節できるようにした。観察はまず新鮮な試料について精子の透明帯通過の有無、侵入精子数および前核形成の有無を位相差顕微鏡で検査し、その後 10% ホルマリンで 2~6 時間固定し染色標本について再び検査を行なった。染色標本による観察はとくになまの標本では観察困難な部分、すなわち卵子染色体の

第 2 成熟分裂像の観察および変形過程にある精子頭の観察のために行なった。染色液としては 45% 酢酸に 0.25% の濃度にラクモイドを溶解して用いた¹⁵⁾。

卵子は侵入した精子の状態に従い次のように分類した。1) 精子侵入卵 (penetrated egg): 精子が透明帯の内側に入っているすべての卵子をいう。すなわち精子が卵卵腔に留まっているものと明らかに卵細胞内に入っているものと両者を含む。2) 受精卵 (fertilized egg): 上記の后者に属する卵子で精子頭部が卵細胞質内に入り前核への変形過程¹⁶⁾にあるもの、あるいは前核がすでに形成されているもの。3) 受精卵の区分: 受精卵のうち精子頭部が前核への変形過程にあり卵子染色体が第 2 成熟分裂の後~終期像を示す卵子を stage I の卵子とし、雌雄前核の形成されている卵子を stage II の卵子として発育段階を区分した。また卵細胞内に 2 個以上の精子頭あるいは雄性前核を有する卵子を多精子受精卵 (polyspermic egg) とした。

実験成績

授精後の各時期における精子侵入卵、受精卵、前核形成卵の割合を Table 2 に、精子侵入卵における侵入精子数の分布を Table 3 に示す。

授精後 30 分に検査した 50 個の卵子は厚い卵丘細胞層に包まれ授精前とほぼ同様の状態にあった。卵子の観察を容易にするためにヒアルロニダーゼでこれらの卵丘細胞を除いて検査したので卵丘細胞層内における精子の状態は十分に検査しなかったが、実体顕微鏡による低倍率での観察によって多数の精子が卵丘細胞層内に突入し活発に運動していることが認められた。しかし卵子の透明帯を通過した精子は全く認められず卵子の染色体はすべて第 2 成熟分裂の中期に止まっていた。授精後 1 時間で検査した 101 個の卵子のうち約 77% (78/101) のも

Table 2. *In vitro* fertilization of mouse eggs by fresh epididymal sperm

Incubation time (h)	No. eggs examined	No. (%) eggs penetrated	Fertilized eggs			
			Total (%)	Stage I*	Stage II*	Polyspermic
1/2	50	0 (0)	0 (0)	0	0	0
1	101	23 (22.8)	11 (10.9)	11	0	1
2	84	81 (96.4)	74 (88.1)	74	0	6
3	115	108 (93.9)	102 (88.7)	96	6	3
4	77	70 (90.9)	68 (88.3)	42	26	1
5	55	51 (92.7)	50 (90.9)	7	43	1

* stage I=eggs at Ana-Telo II with enlarged sperm head (s) in vitellus.
stage II=eggs with male and female pronuclei.

Table 3. Distribution of the number of spermatozoa found in the perivitelline space or in vitellus of penetrated eggs

Incubation period	No. eggs penetrated	No. eggs penetrated by i sperm						Av. no. sperm/penetrated egg
		$i=1$	2	3	4	5	6	
1	23	14	3	3	3	0	0	1.8
2	81	45	19	6	6	2	3	1.9
3	108	71	26	9	2	0	0	1.5
4	70	46	16	3	3	2	0	1.6
5	51	35	10	5	1	0	0	1.5
Total (%)	333	211 (63.4)	74 (22.2)	26 (7.8)	15 (4.5)	4 (1.2)	3 (0.9)	1.6

のにおいても精子侵入は認められなかったが、ほとんどの卵子において透明帯に附着した運動精子が認められ一部のものは頭部を透明帯に突入させ活発な尾部の運動を示していた (Plate 1)。残り 23 個の卵には透明帯を通過した精子が認められ、そのうちの 12 個では精子は卵卵腔内を自由に動きまわり卵細胞質内へは侵入していないことが明らかであった。これらの卵の染色体はすべて中期像を示した (Plate 2)。しかし、11 個の卵では、精子頭部は卵細胞質内に埋没し雄性前核への変形過程の最初の徴候 (Plate 3) を示していた。これらの精子頭はなまの標本の位相差顕微鏡による観察では判別困難であるが、染色によって明瞭に膨大した頭部 (enlarged head) として認められた。これらの卵子の染色体は第 2 成熟分裂の後期 (7 例) あるいは終期 (4 例) を示し卵細胞への精子侵入による卵子の活性化が起こったことが示された。

2 時間以降に検査された卵子ではそのほとんどすべてに精子侵入が認められ、2, 3, 4 および 5 時間の各区における精子侵入卵の割合はそれぞれ 96.4, 93.9, 90.9 および 92.7% で、合計すると 331 個の卵子のうち 310 個すなわち 93.7% の卵子に精子侵入が認められた。これらの精子侵入卵のうち精子が卵細胞内に入れず卵卵腔に留まっていたものはそれぞれ 7, 6, 2 および 1 例に過ぎず大部分の 294 個 (88.8%) は受精卵と判定された。受精卵における精子頭部の状態は Table 2 に明らかなごとく培養期間の延長に伴いより進んだ状態へと (stage I から stage II へ) 移行し 2 時間培養区ではすべての卵子が、また 3 時間区では 102 例中 96 例 (94.1%) が “enlarged head” の状態であった (Plate 4) のに対し 4 時間区では約 38% (26/68) の卵子において雌性前核の形成が認められ 5 時間区ではほとんどの受精卵が雌性前核を有していた。 (Plate 5 および 6)。

精子頭部のこのような変化に対応して卵子の染色体にも変化がみられほとんどの例において “enlarged head” には第 2 成熟分裂の後期～終期が、雄性前核には雌性前核が対応して認められた。

それぞれの卵子の透明帯を通過した精子の数の分布は Table 3 に示されるごとく、ただ 1 個の精子のみ透明帯の内側に認められた卵子が全体の 63.4% (211/333) を占め、次が 2 個の侵入精子を有するもので (22.2%) 精子数の増加に伴いその出現頻度は急激に減少した。精子侵入卵当りの侵入精子数の平均値は培養時間の長短と関係なくほぼ一定の値 (1.5~1.9) を示した。一方、多精子受精卵は Table 2 の左端に示されるごとく総計 12 個で全受精卵の 4.1% であった。これらの卵子はすべて 2 個の雄性前核あるいは前核への変形過程にある精子頭を有していた。

考 察

現在までのところ、マウス卵子の体外受精の成功例としては子宮内精子を用いた WHITTINGHAM (1968)⁹⁾, MUKHERJEE & COHEN (1970)¹¹⁾ の報告、および精巣上体精子を用いた IWAMATSU & CHANG (1969) の報告¹⁰⁾ がある。このほかに *in vitro* で培養されている卵管膨大部の中で受精を起こさせた報告^{17,18)} もあるがこれはむしろ “semi-*in vitro*” と称すべき実験と考えられる³⁾。WHITTINGHAM⁹⁾ は Swiss および C 57 BL×Balb/c の F₁ を用い交尾後 1~2 時間の雌マウスの子宮内から採取した精子を用いてはじめて体外受精に成功しその受精卵を雌マウスに移植して 17 日令の胎子を得た。最近 MUKHERJEE & COHEN¹¹⁾ はこれと同じ方法を用い 253 個の卵子に体外受精を試み約 1/4 の卵子が 2 細胞期に、その約 1/3 が胚盤胞にまで発生することを示しさらにそのようにして得た 23 個の胚盤胞を偽妊娠あるいは妊

妊娠に移植して 11 匹の正常な子を得ている。一方、IWAMATSU & CHANG¹⁰⁾ は雄マウス (Swiss-Webster) の精巣上体から直接採取した精子を用いての体外受精にはじめて成功したが授精後 2~5 時間の検査による受精率は 1.2 (2 時間後)~21.9% (5 時間後) と低い。培養液に牛の卵胞液を加えることによってより高い受精率が得られたがそれでも約 37% にとどまったと報じている。なおこの報告では授精後 2 時間までは全く精子侵入がみられず、この期間は精子の受精能獲得 (capacitation) に費やされたものと推定している。

本実験は上述の実験とは独立してはじめられたので、使用したマウスの系統、培養液の組成、卵子の採取時期、精子の採取方法あるいは授精精子数など種々の点で条件が異なり現段階では成績の比較は困難である。しかし上述の実験成績と比較して本実験の成績は次の点に特徴を有すると考えられる。(1) 受精率が高いこと：子宮内精子を用いた上述 2 者の報告では卵子への精子侵入を観察していないので直接比較できないが 2 細胞期まで進んだ卵の割合から推定すると 15~40% の範囲と推定され、また精巣上体精子を用いた IWAMATSU & CHANG の成績も 40% 以下である。一方、本実験においては Table 2 に明らかなごとく授精後 2~5 時間の精子侵入卵は全検査卵の 93.7% でほとんど 100% に近い。卵細胞質内に雄性前核あるいは膨大した精子頭が認められ卵子の染色体も第 2 成熟分裂の後~終期像あるいは雌性前核を示し明らかに受精の初期の過程にあると判定された卵子だけに限っても全体の約 89% を占めた。この成績は、卵子および精子が正常で適期に授精されれば受精率は

100% に近いという正常な雌の体内での受精を *in vitro* で再現し得たものと考えられる。もちろん、これらの受精卵が雌雄前核融合を経て正常な発生を示すか否かは今後検討されねばならない。(2) 卵子への精子侵入時期について：Table 2 に示されるごとく精子の透明帯通過は授精後 30 分ではいまだ開始せず、1 時間後に約 23% の卵子に認められ 2 時間後にはほぼ完了すると考えられる。Table 3 に示された侵入精子数も 2 時間以降は増加せず、精子侵入が 2 時間以内に終ることを裏付けている。この結果は、マウス精子の受精能獲得に要する時間がおよそ 1 時間以内であろうとする *in vivo* での実験成績¹⁰⁾ と一致する。一方、IWAMATSU & CHANG の成績では精子侵入までに 2 時間以上を要しわれわれの成績と一致しない。受精能獲得の機序についてはいまだ不明の部分が多く、とくにマウス精子が雌性生殖道内で受精能獲得に要すると思われる期間は短かく、人工授精などの手段による *in vivo* での受精を指標とした実験では、精子の受精部位への移動に要する時間の変異の陰にかくれて実証困難とされているので、この体外受精による検討がとくに有効と考えられる。

要 約

ICR-JCL 系成熟雄マウスの精巣上体尾部から採取した精子と、HCG 注射後 16~17 時間の成熟雌マウスの卵管膨大部から採取した過排卵卵子を用いて体外受精を試み受精の初期の過程を観察した。培養液としては Krebs-Ringer-Bicarbonate 液を基本としたものを用い、5% の割合で炭酸ガスを混じた空気の下に 37°C

Explanation of Plate

Whole-mount preparation of mouse eggs fertilized *in vitro*, photographed under a phase-contrast microscope. Fig. 1, 5 and 6: fresh preparations: Figs. 2~4: fixed with 10% formalin, stained with 0.25% lacmoid in 45% acetic acid. Magnification: $\times$ approx. 400.

1. An egg examined 1 hr after insemination showing a spermatozoon in the act of penetration of zona pellucida (arrowed). Tail of the spermatozoon was vigorously moving when photographed. Denuded by hyaluronidase before examination.

2. Penetrated egg examined 1 hr after insemination, showing a sperm head in perivitelline space (upper arrow) and egg chromosomes still remaining at metaphase II (lower arrow).

3. A very recently activated egg showing the chromosomes at early anaphase II (3b). The head of the fertilizing spermatozoon has swollen slightly in the posterior region (3a). Examined 1 hr after insemination.

4. A fertilized egg examined 3 hr after insemination showing enlarged sperm head in vitellus (4a) and the chromosomes at telophase II (4b).

5. A fertilized egg examined at 4 hr after insemination showing early growth of pronuclei.

6. A fertilized egg examined at 5 hr after insemination showing male (left) and female (right) pronuclei.

PLATE

で 1/2~5 時間培養した。その結果、培養開始後 30 分では卵子への精子侵入（透明帯通過）は認められなかったが、1 時間後には約 23% の卵子に侵入がみられ 2~5 時間後に検査された 331 個の卵子の約 94% に精子侵入がみられた。このうち卵細胞内に明らかに精子が認められ受精の初期の過程にあると認められたものは 294 個 (88.8%) であった。

本研究は昭和 44 年度科学研究費による研究 (No. 86586) の一部である。なお本研究の概要は日本畜産学会第 58 回大会において報告した。

(1971, 1, 18 受付)

文 献

- 1) AUSTIN, C. R.: *Intern. Rev. Cytol.* **12**, 337, 1961.
- 2) CHANG, M. C.: *J. Animal Sci.*, **27**, Suppl. 1, 15, 1968.
- 3) THIBAUT, C.: Metz & Monroy (Eds) *Fertilization Vol. 2* p. 405~435, Acad. Press, N.Y., 1969.
- 4) CHANG, M. C.: *Nature*, **168**, 697, 1951.
- 5) AUSTIN, C. R.: *Aust. J. Sci. Res.*, **B 4**, 581, 1951.
- 6) DAUSIER, L., THIBAUT, C. & WINTENBERGER, S.: *Compt. rend. Acad. Sci.*, **238**, 844, 1954.
- 7) CHANG, M. C.: *Nature*, **184**, 466, 1959.
- 8) YANAGIMACHI, R. & M. C. CHANG: *J. exp. Zool.*, **156**, 361, 1964.
- 9) WHITTINGHAM, D. G.: *Nature*, **220**, 592, 1968.
- 10) IWAMATSU, T. & M. C. CHANG: *Nature*, **224**, 919, 1969.
- 11) MUKHERJEE, A. B. & M. M. COHEN: *Nature*, **228**, 472, 1970.
- 12) PICKWORTH, S. & M. C. CHANG: *J. Reprod. Fert.*, **19**, 371, 1969.
- 13) EDWARDS, R. G., B. D. BAVISTER & P. C. STEPTOE: *Nature*, **221**, 632, 1969.
- 14) TOYODA, Y. & M. C. CHANG: *Nature*, **220**, 589, 1968.
- 15) MARSTON, J. H. & M. C. CHANG: *J. exp. Zool.*, **155**, 237, 1964.
- 16) MCGAUGHEY, R. W. & M. C. CHANG: *J. exp. Zool.*, **170**, 397, 1969.
- 17) BRINSTER, R. C. & J. D. BIGGERS: *J. Reprod. Fert.*, **10**, 277, 1965.
- 18) PAVLOK, A.: *J. Reprod. Fert.*, **16**, 401, 1968.
- 19) BRADEN, A. W. H. & C. R. AUSTIN: *Anst. J. Biol. Sci.*, **7**, 552, 1954.

Summary

Adult female mice of ICR-JCL strain were superovulated by intraperitoneal injections of PMS and HCG 48 hr apart. They were killed 16~17 hr after injection of HCG and their eggs were recovered under warm mineral oil in a plastic petri dish containing 0.4 ml of incubation medium. Sperm suspension was prepared by suspending a dense mass of sperms recovered from cauda epididymis of adult male into 0.4 ml of incubation medium under mineral oil. The incubation medium was a modified Krebs-Ringer Bicarbonate solution containing glucose, sodium pyruvate, bovine albumin and antibiotics. (Table 1)

At the time of insemination, a drop of sperm suspension (ca. 5~10 μ l) was added to the medium containing egg clot. Final concentration of sperm was 100~500/mm³.

The percentages of penetrated eggs were 0, 22.8, 96.4, 93.9, 90.9 or 92.7%, when examined at 1/2, 1, 2, 3, 4 or 5 hr after insemination, respectively (Table 2). Thus, in this experimental condition, sperm penetration of zona pellucida starts around 1 hr and completes within 2 hr after insemination. At 2 hr after insemination all the fertilized eggs showed enlarged sperm head and anaphase or telophase of second meiosis, while at 5 hr after insemination, most of them were found to have male and female pronuclei. Average number of sperm per penetrated egg was 1.6 (Table 3) and the rate of polyspermy was 4.1%.