マウス卵子の体外受精に関する研究

III. 裸化卵子の受精成績について

福田 芳詔・岡田 修・豊田 裕

(北里大学畜産学部)

排卵直後のマウス卵子は厚い卵丘細胞層に包まれ、精子はこの細胞の間を通過して卵子に侵入する。卵丘細胞は受精に際して一般に卵子を多精子受精から保護し、また精子に対しては卵子と会合するのに大きな標的を与え、その放射状の配列は精子を卵子の方向へ導くことによって受精の機会を増すといわれている。また卵丘細胞間を埋めているゼリー状の基質(卵胞液)は精子の先体反応の誘起に必要な因子を含んでいると考えられている¹⁾。しかしこれらの卵丘を構成する要素を除いた卵子(裸化卵子)の受精能に関する実験成績は Table 1 に示されるごとくさまざまで、マウスでは *in vitro* での受精にとって卵丘細胞を除くと受精率が低下するとの報告²⁾ もあり、低下しないとの報告³⁾ もある。ウサギでは *in vivo* での受精にとって卵丘細胞(放射冠細胞をも含めて)の有効な効果が観察されたとの報告⁴⁾ があるが、その効果が認められなかったとの報告も *in vitro*⁵⁾ および *in vitro*⁶⁻⁸⁾ でなされている。

本実験では我々が開発した安定して高い受精率が得られる体外受精法^{9,10)} を用いて、マウスの裸化卵子の *in vitro* での受精(精子侵入と前核形成)について調べたので報告する。

実験材料および方法

体外受精の方法は基本的には前報⁹⁾ と同じである。卵子は ICR-JCL 系成熟マウスに 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 注射後 16~17 時間に殺し卵管膨大部から採取した。屠殺後直ちに切り出した卵管をプラスチックシャーレ内の 4~

5 ml の流動パラフィンで覆った 0.4 ml の培養液中に投じ、実体顕微鏡下で卵管膨大部を解剖針で裂き、卵丘細胞の集団に包まれた卵子をとり出した (Fig. 1, A)。

卵丘細胞の除去は上記のごとくしてとり出した卵丘細胞に包まれた卵子の入っているシャーレ内に、ヒアルロニダーゼ (Worthington Biochemical Corporation, 和光) を採卵 15 分前に同じ培養液で 900 単位/ml になるように溶かしておいた液を、最終濃度が 150 単位/ml になるように滅菌した 1 ml のツベルクリン注射筒を用いて加え、手で軽くゆすってヒアルロニダーゼを一様にした後、卵丘細胞がバラバラになって卵子が裸になるまで(約 7 分)炭酸ガス培養装置内(温度 37°C, 95% 空気, 5% 炭酸ガス)に放置した。その後培養装置からとり出して、実体顕微鏡下でできるだけ卵丘細胞が入らないように注意して、1 ml のツベルクリン注射筒に接続したガラス毛細管ピペットで卵子を吸いとり、採卵の時に用いたと同じく流動パラフィンで覆った 0.4 ml の培養液の入ったシャーレ内に移した。この操作を 3 回くりかえした。この操作の終了時には卵丘細胞がほとんどなく裸になった卵子をシャーレ内に得ることができた (Fig. 1, B)。

精子は採卵の 1 時間前に成熟雄を殺し、精巢上体尾部から精子の集塊をとって直ちに培養液の中に入れ、数分以内にほぼ均一な精子液となったものを授精するまでの約 1 時間培養装置内に静置(前処理)したものを用いた。濃度は 3,000~16,000/mm³ の範囲であった。

授精は卵丘細胞をつけたままの卵子においては採卵後直ちに、裸化卵子においては卵子を 3 回移し終った後直ちに上記の約 1 時間前処理した精子液を、シャーレ内の卵子の入っている培養液内に加えて行なった。加えた精子液の量は 6.3~10.3 mm³ の範囲であったので授精後の最終精子濃度は 50~400/mm³ と推定される。

授精後は直ちにシャーレを培養装置内にもどし、4~5 時間後にとり出して卵子をスライドグラス上に移し、位相差顕微鏡で精子侵入、前核形成の有無を検査した。

Studies on the fertilization of mouse eggs *in vitro*.
III. Fertilization of denuded eggs by capacitated spermatozoa.

FUKUDA, Yoshinori, Osamu OKADA & Yutaka TOYODA (Dept. of Animal Sci., Kitasato Univ., Towada-shi, Aomori 034)

Jap. J. Animal Reprod. 18 (2), 1972.

Table 1. Summary of recent investigations of the effect of cumulus oophorus on fertilization *in vivo* or *in vitro*

Authors	Species	System	Fertilization-rate	%	Note
BEDFORD & CHANG, 1962	Rabbit	<i>in vitro</i>	{ Ova removed the cumulus mass	51 (/74)	
			{ Untreated ova surrounded by the cumulus	30 (/46)	
			{ Ova removed corona radiata	58 (/24)	
			{ Ova still attached by the corona cells	94 (/17)	
CHANG & BEDFORD, 1962	Rabbit	<i>in vivo</i>	Ova without corona radiata	46 (31/68)	2 Age of ova
				55 (24/44)	4 (hr after
				12 (6/50)	6 ovulation)
			Ova with corona radiata	90 (37/41)	2
				85 (33/39)	4
				60 (53/88)	6
HARPER, 1970	Rabbit	<i>in vivo</i>	{ Without cumulus	42 (29/69)	Transfer at
			{ Untreated	67 (48/72)	9.5~9.75 hr
					after mating
			{ Without cumulus	35 (19/54)	Transfer at
			{ Without cumulus and corona radiata	25 (13/52)	9.5~9.75 hr
					after mating
			{ Without cumulus	92 (33/36)	Transfer at 14hr
			{ Without cumulus and corona radiata	82 (32/39)	after mating
IWAMATSU & CHANG, 1970	Mouse	<i>in vitro</i>	Naked eggs (washed with Tyrode's solution) after treatment with hyaluronidase	61.6 (58/94)	
			With follicular cells and oviductal fluid	75.0 (99/132)	
CROSS & BRINSTER, 1970	Mouse	<i>in vitro</i>	Without cumulus cells	46.3 (37/80)	2-cell stage
			With cumulus cells	90.1(137/152)	
FRASER <i>et al.</i> , 1971	Rabbit	<i>in vitro</i>	Cumulus-deroid eggs	91 (81/88)	
			Corona-deroid eggs	97 (97/104)	
			Intact eggs	92 (73/75)	
CHANG <i>et al.</i> , 1971	Rabbit	<i>in vitro</i>	Denuded eggs	33 (16/48)	Uterine sperm
			(After the dissolution of cumulus oophorus and removal of the corona radiata by manual shaking)	53 (24/45)	Vaginal sperm
			Eggs with follicular cells	29 (27/92)	Uterine sperm
				47 (14/30)	Vaginal sperm

その後 10% ホルマリンで固定しアセトラクモイドで染色して再び観察した。

卵子の分類は前報⁹⁾と同じく精子頭部が卵細胞質内に入り前核への変形過程にあるもの、あるいは前核がすでに形成されているものを受精卵 (fertilized egg) とした。また卵細胞質内に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。

実験結果

裸化卵子と卵丘細胞をつけたままの卵子の受精成績を Table 2 に示した。受精卵の割合は裸化卵子では 71.3% (139/195), 卵丘細胞をつけたままの卵子では 84.7% (166/196) で卵丘細胞を除いた方が低かったが統計的には有意差はみられなかった。また卵丘細胞を除いても 100% の受精率を示すものもあった (実験 2, 4)。多精子受精卵の割合は裸化卵子では 10.1% (14/139), 卵丘細胞をつけたままの卵子では 11.4% (19/166) でほぼ同

Fig. 1. Mous eggs used for *in vitro* fertilization; compressed, phase-contrast, $\times$ ca. 200.

A: An intact egg with cumulus cells, 5 hr after ovulation. B: Denuded eggs washed three times after treatment with hyaluronidase, 4 hr after ovulation.

Table 2. The effect of removal of cumulus cells by treatment with hyaluronidase on the fertilization *in vitro*

	Eggs undergoing fertilization									Poly-spermy (%)
	Experiment								Total (%)	
	1	2	3	4	5	6	7	8		
Denuded eggs	7/15*	9/9	58/73	13/13	30/32	—	11/21	11/32	139/195 (71.3)	14/139** (10.1)
Intact eggs	16/24	12/12	25/26	30/43	—	23/27	36/37	24/27	166/196 (84.7)	19/166 (11.4)

* Number of eggs undergoing fertilization/number of eggs examined

** Number of polyspermic eggs/number of eggs undergoing fertilization

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

	No. of eggs penetrated by i sperm											
	$i=0$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
Denuded eggs	45	103	32	7	4	1	2	0	0	0	1	195
Intact eggs	27	112	33	5	6	5	3	2	0	3	0	196

じ値を示した。

また全検査卵子を補足精子をも含めた侵入精子数によって分類した結果を Table 3 に示した。裸化卵子と卵丘細胞をつけたままの卵子ともほとんど同じ傾向を示した。中でも精子が 1 匹だけ侵入した卵子がそれぞれ 5.28% (103/195), 57.1% (112/196) と全体の半数以上を占めた。

考 察

本実験では卵丘細胞の受精に及ぼす効果はとくに認められなかったが、裸化卵子での受精率は実験 2, 4 のように 100% のものもあれば、実験 1, 8 のようにそれぞれ 46.7%, 34.4% と低い場合もあり、卵丘細胞をつけたままの卵子の受精率に比べると変異が大きいようである。このことは裸化の処理によって一部の卵子では受精

能が失われることを示しているのかも知れない。また多精子受精卵の割合は、卵丘細胞を除いても増加しなかった。このことは侵入精子数の分布が裸化卵子でも卵丘細胞をつけたままの卵子でもほぼ同じ傾向を示したことから裏付けられる。

CROSS & BRINSTER²⁾ は最近、マウスで卵丘細胞の *in vitro* での受精に及ぼす効果について検討し、卵丘細胞を除いた卵子では 2 細胞期に発生する卵子の率は 46.3% と無処理区 (90.1%) に比して有意に低い ($P < 0.001$) と報告している。本実験と大きく違う点は、交尾した雌の子宮内から採取した精子を用いていることと、受精率を 2 細胞期でみていることである。IWAMATSU & CHANG³⁾ は同じくマウスで卵胞細胞 (follicular cells) と卵管液 (oviductal fluid) をつけたままの卵子とヒアルロニダーゼで裸にした卵子とを用いて、牛の卵胞液の存在下に *in vitro* での精子侵入率、受精率、多精子受精率を比較し、それぞれ精子侵入率では 90.1% と 74.5%、受精率では 75.0% と 61.6%、多精子受精率では 15.1% と 34.5% であったと報じている。また精子侵入卵子の平均精子数は裸にした卵子では 6.7 (1~50) と、無処理区の値 4.9 (1~39) に比し多くなることから、卵胞細胞を除くことは精子侵入に対してより効果的であったと報告している。また多精子受精卵の割合は卵胞細胞をつけた卵子 (15.1%) でも裸にした卵子 (34.5%) でもともに高かったのは、報告者も述べているように高い濃度の精子液 (授精後の最終濃度は 2,700~10,000/mm³ と推定される) を用いたためであろう。我々の実験では授精後の最終濃度は 50~400/mm³ と著しく低く、また牛の卵胞液を加えていない点でも条件が異なっている。

ウサギでは、卵丘細胞 (放射冠細胞をも含めて) を除いた卵子とそうでない卵子との間に *in vitro* での受精に有意差はないとする報告が多く^{6~8)}、FRASER⁷⁾ によれば卵丘を除いた (cumulus-devoid) 卵子での受精率は 91%、放射冠を除いた (corona-devoid) 卵子では 97%、対照卵 (intact) では 92% と高い受精率を示している。彼らは *in vitro* system では裸にした卵子も無処理の卵子と同じく容易に受精することから、精子が卵子に侵入する前に卵丘細胞や放射冠細胞と作用しあう必要はないとしながらも、これらの細胞は *in vivo* の状態では卵子と精子の会合が遅れることも考えられるし、また精子濃度が *in vitro* よりもずっと低いと思われるので恐らく有意義なのであろうと述べている。

一方ウサギを用いた *in vivo* での成績として CHANG

& BEDFORD⁴⁾ は交尾後 12~16 時間の雌の卵管に卵子を移植した時の受精率を比較し、放射冠 (corona radiata) をとった卵子の方が低かったことから、放射冠は受精あるいは卵子の受精能力の維持に大きな役割をする と推察している。また HARPER⁵⁾ は裸にした卵子を交尾後 9~9.5 時間に宿主に移植すると受精率が低下したが、交尾後 14 時間に移植した時には低下しないという成績を得て、受精の条件が最適の状態にない時は卵丘細胞と放射冠細胞は精子と卵子の会合を増すのに重要であるが、受精の条件が最適の状態にある時はこれらの細胞層は重要でないと結論している。

また YANAGIMACHI はゴールデンハムスターの精巣上体内精子に対しハムスター、マウス、ラットの卵胞液は受精能獲得 (capacitation) を引き起こす力価を持っていると報じ¹¹⁾、さらに牛の卵胞液には sperm-capacitating factors (=sperm-stimulating factor と acrosome reaction-inducing factor) が存在し、先体反応と受精能獲得はこれらの 2 つの要因が存在した時に完成されると報告している¹²⁾。マウスでの我々の今回の実験では、裸化卵子が卵胞液は大幅に希釈され、牛の卵胞液も使用していないにもかかわらず高率に受精したのは精子-卵子間の相互作用を解明する上にきわめて興味ある事柄と考えられる。

マウスでは *in vivo* での実験がいまだなされていないので、*in vitro* での実験がどのくらい *in vivo* のできごとを再現しているかは不明であるが、本実験からは卵丘細胞の受精に及ぼす効果は特に認められなかったし、卵子を多精子受精から守るということも特に認められなかった。ただヒアルロニダーゼによって卵丘細胞を除いた後 3 回移し替えて洗滌しても、この処理だけで完全に卵子を裸にしたとはいえず、この処理後でも卵子に付着あるいは内在する物質が有効に作用したと思われるのでさらに研究を進める必要があると思われる。

要 約

ICR-JCL 系成熟雌マウスを用いて、裸化卵子と無処理卵子の *in vitro* での受精 (精子侵入と前核形成) について比較した。卵丘細胞の除去は、HCG 注射後 16~17 時間にとり出した過排卵卵子をヒアルロニダーゼで卵丘細胞をバラバラにし、3 回移し替え洗滌して行なった。授精には成熟雄の精巣上体尾部から採取し、前処理 (授精前 1 時間培養) した精子を用いた。その結果、受精率は裸化卵子で 71.3%、無処理卵子で 84.7%、多精子受精卵の割合は裸化卵子で 10.1%、無処理卵子で

11.4% で両区の間有意差は認められなかった。

(1972. 3. 14 受付)

文 献

- 1) AUSTIN, C. R.: The Mammalian Egg, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1961.
- 2) CROSS, P. C. & R. L. BRINSTER: *Biol. Reprod.*, **3**, 298, 1970.
- 3) IWAMATSU, T. & M. C. CHANG: *J. Exp. Zool.*, **175**, 271, 1970.
- 4) CHANG, M. C. & J. M. BEDFORD: *Fert. & Steril.*, **13**, 421, 1962.
- 5) HARPER, M. J. K.: *J. Exp. Zool.*, **173**, 47, 1970.
- 6) BEDFORD, J. M. & M. C. CHANG: *Nature*, **193**, 898, 1962.
- 7) FRASER, L. R., P. V. DANDEKAR & R. A. VAIDYA: *Biol. Reprod.*, **4**, 229, 1971.
- 8) CHANG, M. C., A. HANADA & D. M. HUNT: *Nature*, **232**, 343, 1971.
- 9) 豊田(裕)・横山(峯)・星(冬): 本誌, **16**, 147, 1971.
- 10) 豊田(裕)・横山(峯)・星(冬): 本誌, **16**, 152, 1971.
- 11) YANAGIMACHI, R.: *J. Reprod. Fert.*, **18**, 275, 1969.
- 12) YANAGIMACHI, R.: *J. Exp. Zool.*, **170**, 269, 1969.

Summary

The proportion of eggs undergoing fertilization *in vitro* was compared between intact (Fig. 1, A) and denuded (Fig. 1, B) eggs using capacitated (pre-incubated) spermatozoa.

Superovulated eggs were obtained 16~17 hr after injection of HCG from adult female mice of ICR-JCL strain. They were liberated from the oviduct under warm mineral oil in a plastic petri dish containing 0.4 ml of incubation medium (modified Krebs-Ringer-bicarbonate solution). Immediately, one group of eggs with cumulus cells was treated with hyaluronidase by adding 0.08 ml of a hyaluronidase solution (900 unit/ml) to the incubation medium containing egg clots. After incubation for about 7 min, the denuded eggs were transferred through three changes of the medium to remove the cumulus cells. Another group of eggs was not treated with hyaluronidase and used for fertilization immediately after recovery.

The sperms used were recovered from cauda epididymis of adult males and suspended in the incubation medium in a concentration of 3,000~16,000/mm³. The sperms were then incubated at 37°C under 5% CO₂ in air for 1 hr before they were used for insemination.

At the time of insemination, a drop of pre-incubated sperm suspension (ca. 6.3~10.3 mm³) was added to the medium containing intact or denuded eggs. Final concentration of sperm was estimated at 50~400/mm³.

After insemination, the eggs and sperms were incubated at 37°C in a humid atmosphere of 5% CO₂ in air for 4 to 5 hr. At the end of incubation, the eggs were placed on a glass slide, compressed gently under a cover slip and examined for sperm penetration through the zona pellucida, sperm entry into the vitellus and the formation of male and female pronuclei.

The results indicate that there is no significant difference in the proportion of penetrated eggs (Table 3), the proportion of eggs undergoing fertilization and the rate of polyspermy (Table 2), whether the eggs are denuded or not. The proportion of eggs undergoing fertilization was 71.3% in denuded eggs as compared with 84.7% in intact ones. The numbers of spermatozoa found in the penetrated eggs also showed similar distribution between two groups.

It is considered from these results that the presence of cumulus cells does not play a role for the sperm penetration of mouse eggs *in vitro*.