イオノホア A23187 で処理したヤギ射出精子の体外における 透明帯除去ハムスター卵子への侵入

包 旭日干・花田 章*

(中国内蒙古大学生物系 *農林水産省畜産試験場)

哺乳動物卵子への精子侵入に精子の先体反応が必要とされ、同反応には Ca^{2+} の存在が重要な鍵となること¹⁾、および Ca 塩を含む培地に各種動物の精子を浮遊させカルシウムイオノホア A23187 (以下、I-A) を加えて処理すると化学的に精子の先体反応が誘起されること²⁻⁸⁾は、周知の事実である。しかし、この好都合と思われる I-A の作用を実際に卵子の体外受精研究に使用した報告は少なく、家畜ではブタ卵子⁹⁾ およびヒツジの透明帯除去卵子⁷⁾ に精子侵入を認めた報告があるに過ぎない。

著者は、ブタ精子⁹⁾ に準じて反すう家畜精子を I-A 処理し、その先体反応誘起効果を利用して家畜卵子の体外受精法を開発する目的で一連の実験を進めている。これまで、ウシ射出精子について I-A 処理効果を透明帯除去ハムスター卵子 (以下、H 卵子) への精子侵入能で調査した結果から、I-A 処理時の培地内におけるウシ血清アルブミン (以下、BSA) やカフェインの存否、I-A 濃度とその処理時間が処理効果の発現に影響することが判明している¹⁰⁾。同様に、ヤギ¹¹⁾ やブタ¹²⁾ の射出精子に対する I-A 処理はその後の体外における透明帯除去ハムスター卵子への精子侵入に有効であることが報告されている。しかし、I-A 処理精子を同種卵子の体外受精に使用するためには、I-A 処理前後の諸条件について詳細な吟味が必要であり、とくにブタで認められている多精受精⁹⁾ の防止とともに、ヒツジで認められている精子活力の短時間内喪失⁷⁾ を防ぐための適切な処理条件について各家畜精子ごとに追究する必要がある。

本研究においては、ヤギ卵子の体外受精に適する射出

精子の I-A 処理法を検索するため、体外での H 卵子への精子侵入を指標として以下の実験を行なった。実験 1 では精子の浮遊培地内カフェイン濃度が I-A 処理に及ぼす効果、実験 2 では I-A 濃度とその処理時間の影響、実験 3 では I-A 処理時の精子濃度の影響、実験 4 では異なる雄からの精子に対する I-A 処理効果の相違、実験 5 では I-A 処理後の効果発現時間と卵子に侵入した精子頭部の形態的变化をそれぞれ検討した。

材料と方法

培地および I-A: 基礎培地として BRACKETT と OLIPHANT の合成培地¹³⁾ (2.25 mm 塩化カルシウム含有等張液; 以下、BO 液) に 0~10 mm 濃度のカフェイン (Sigma 製安息香酸ナトリウムカフェイン中のカフェイン含量を 50% として計算) を加えて使用した。射出精子の洗浄から I-A 処理終了までは BSA 無添加液、H 卵子との媒精以降には 3 mg/ml の BSA 添加液をそれぞれ使用した。I-A (Ionophore A23187; Calbiochem 製) は前報¹⁰⁾ のように 10 mm 保存液を作成し、実験直前に蒸留水で希釈して使用した。

供試卵子: 過剰排卵処理した成熟雌ゴールデンハムスターからの採卵と卵子の透明帯除去処理は既報¹⁴⁾ の手順で行なった。H 卵子は事前に準備したプラスチックシャーレ (35×11 mm) 内の BO 液 350 μl (パラフィン油下) 中に 10~20 個ずつ配分して媒精まで 1~2 時間、37.5°C、5% CO_2 、95% 空気の培養器内に保温した。

供試精液と精子の洗浄および I-A 処理: 日本在来種成熟雄ヤギ (1.5~6 歳齢) 7 頭から 1~3 日間隔で人工腔法により精液を採取し、混合精液 (実験 1~3) または個別精液 (実験 4, 5) として供試した。採取後 30 分以内に精液約 1 ml を入れた丸底試験管 (1.5×10 cm) に洗浄液 10 ml を加えてゆるく攪拌し、470×g、5 分間遠心分離した。上清除去後の精子はさらに 2 回洗浄液を加えて遠心分離した後、25×10⁶ 精子/ml、実験 3 では 10.70×10⁶ 精子/ml、の濃度に再浮遊させた。この精子

Penetration of zona-free hamster eggs *in vitro* by ejaculated goat spermatozoa after treatment with ionophore A23187.

Bou, Shorgan & Akira HANADA* (Department of Biology, Inner Mongolia University, People's Republic of China, *National Institute of Animal Industry, Tsukuba Norindanchi P.O. Box 5, Ibaraki 305)

Japan. J. Anim. Reprod., 31 (3), 1985.

Table 1. Effects of ionophore-pretreatments of ejaculated goat spermatozoa in the presence or absence of caffeine on the maintenance of sperm motility and their penetration into zona-free hamster eggs *in vitro*

Concentration		Motility score: time after insemination				No. of eggs		Average No. of sperm in vitellus
Caffeine (mM)	Ionophore (μ M)	0.5 h	1.0 h	2.0 h	3.0 h	Examined	Penetrated (%)	
0	0.1	3.7	3.7	3.3	2.3	60	4 (6.7)	0.08
	0.5	3.7	3.0	2.3	1.3	60	13 (21.7)	0.28
	1.0	2.3	2.0	1.3	0.7	57	2 (3.5)	0.05
2	0.1	3.7	3.0	1.0	0.3	58	3 (5.2)	0.09
	0.5	3.7	3.0	1.0	0	60	56 (93.3)*	3.07
	1.0	2.7	1.3	0	0	63	25 (39.7)	1.51
5	0.1	3.7	2.7	0.7	0.3	61	4 (6.6)	0.07
	0.5	3.3	2.7	0.3	0	61	17 (27.9)	0.95
	1.0	2.7	1.3	0	0	60	21 (35.0)	0.47
10	0.1	2.3	1.7	1.3	0	45	10 (22.2)	0.36
	0.5	1.3	0.3	0	0	58	1 (1.7)	0.02
	1.0	0.3	0	0	0	55	1 (1.8)	0.02

Mixed sperm suspension from male-goats A, C, D, F, 25×10^6 cells/ml in BSA-free BO medium, was pretreated with ionophore A 23187 for 2 min. Eggs were inseminated with the treated spermatozoa (final sperm concentration at $32\text{--}280 \times 10^4$ cells/ml) in the medium containing the same concentration of caffeine and with 3 mg BSA/ml, and examined 6-7 h from the insemination. Three tests in each group. Motility score: 0, 1, 2, 3, and 4; none, less than 25%, 25-50%, 50-75% and more than 75% of motile spermatozoa, respectively.

* Significantly higher than the other values within the same column ($P < 0.01$; χ^2 test).

浮遊液を 1 ml ずつ丸底小試験管 (1×7.5 cm) に配分し、これらに各種濃度に希釈した I-A 液を 5 μ l ずつ添加した。添加後の I-A 濃度と媒精までの処理時間は、実験 1 では 0.1~1.0 μ M に 2.0 分間、実験 2 では 0.1~0.5 μ M に 0.5~3.0 分間、実験 3, 4, 5, では 0.5 μ M に 2.0 分間として、その間手掌中でゆるく攪拌しながら保温した。

媒精: 各 I-A 処理後の精子浮遊液は 50 μ l ずつ分取し、直ちに H 卵子を配分してある受精用培地に移して媒精した。媒精後の最終精子濃度は $32\text{--}1,440 \times 10^4$ 精子/ml の範囲であった。

媒精後の卵子和精子運動性の検査: 媒精後 6~7 時間 (実験 5 では 0.5~5 時間) 炭酸ガス培養器内でインキュベートした H 卵子は、BO 液で洗浄後にホルマウント標本とし、中性ホルマリン液で 1 夜固定後ラクモイド染色を行なった。卵子への精子侵入は位相差顕微鏡下での膨化精子頭部あるいは雌性前核とそれらに符合する精子尾部の検出により判定した。なお、実験 5 では精子頭部の膨化ステージをその膨化程度により 3 期に区分した。すなわち、頭部後方からの膨化が 1/3 未満のものを初期、1/3~2/3 のものを中期、2/3~3/3 のものを後期とし

た。インキュベーション中の精子の運動性は、一定時間ごとに培養皿のまま実体顕微鏡下で観察した。その評価点数としては、運動精子が全体の 3/4 以上のものを 4、3/4~2/4 のものを 3、2/4~1/4 のものを 2、1/4 未満のものを 1、全く運動性を失ったものを 0 で表した。

結 果

1. カフェイン濃度と I-A 濃度の影響 (実験 1)

カフェインを無添加または 2~10 mM 添加した培地内の各精子浮遊液に、I-A を 0.1, 0.5 または 1.0 μ M となるように加えてそれぞれ 2 分間ずつ前処理した精子による H 卵子への侵入成績を表 1 に示した。計 12 組の I-A 処理区の中で、2 mM カフェイン、0.5 μ M I-A の処理区における精子侵入卵率 (93.3%) が他の処理区におけるよりも高く ($P < 0.01$)、検査卵子あたりの侵入精子数の平均も他区よりも多いことを認めた。また、カフェイン無添加培地に比べて、2 mM カフェイン添加培地では精子に対する 0.5 μ M I-A の処理効果が顕著に増進されるが、5 mM 以上のカフェイン添加培地ではこのような I-A 処理効果の著しい増進は認められなかった。

I-A 処理後の精子の運動性の観察結果 (表 1) から、

Table 2. Effects of pretreating time of goat spermatozoa at various concentrations of ionophore A23187 in the presence of caffeine (2 mM) on their penetration into zona-free hamster eggs *in vitro*

Ionophore		No. of eggs		Average No. of sperm in vitellus
Conc. (μ M)	Time (min)	Examined	Penetrated (%)	
0.1	0.5	42	0 (0)	0
	1.0	40	0 (0)	0
	1.5	47	0 (0)	0
	2.0	82	6 (7.3)	0.10
	2.5	41	6 (14.6)	0.17
	3.0	41	8 (19.5)	0.22
0.2	0.5	41	0 (0)	0
	1.0	37	0 (0)	0
	1.5	49	7 (14.3)	0.16
	2.0	94	15 (16.0)	0.22
	2.5	35	17 (48.6)	0.63
	3.0	37	11 (29.7)	0.35
0.3	0.5	45	4 (8.9)	0.13
	1.0	42	15 (35.7)	0.62
	1.5	47	5 (10.6)	0.15
	2.0	75	22 (29.3)	0.45
	2.5	40	11 (27.5)	0.45
	3.0	42	10 (23.8)	0.50
0.4	0.5	48	8 (16.7)	0.19
	1.0	39	13 (33.9)	0.56
	1.5	46	11 (23.9)	0.33
	2.0	87	23 (26.4)	0.30
	2.5	44	23 (52.3)	0.73
	3.0	37	14 (37.8)	0.65
0.5	0.5	40	10 (25.0)	0.30
	1.0	48	14 (29.2)	0.48
	1.5	44	23 (52.3)	0.75
	2.0	84	62 (73.8)*	1.18
	2.5	39	16 (41.0)	0.51
	3.0	38	12 (31.6)	0.42

Eggs were inseminated with the mixed spermatozoa from male goats A, C, D, F (pretreated at 25×10^6 cells/ml; final sperm concentration at $182-580 \times 10^4$ cells/ml) in the same manner as indicated in Table 1, and examined after 6-7 h from the insemination. Total of three tests except for the experiments with spermatozoa pretreated for 2 min where the figures are total of 6 tests, respectively.

* Significantly higher than the other values within the same column ($P < 0.05$; χ^2 test).

一般に、培地内カフェイン濃度の上昇と I-A 処理濃度の上昇につれて精子の運動性維持時間の短縮化傾向が認められた。H 卵子への精子侵入成績が良好であった 2 mM カフェイン、0.5 μ M I-A 処理区では、処理後 1 時間まで精子の運動性は良好であったが、2 時間では急速に不良となり、3 時間では全く運動精子を認めなかった。なお、I-A 処理精子は処理時約 30 分の観察で鞭打つような活性化運動を示すようになり、そのような運動

精子は 2 mM 以上のカフェイン添加培地で 0.5 μ M 以上の I-A により処理した場合に多数出現することを認めた。

2. I-A 濃度とその処理時間の影響 (実験 2)

2 mM カフェイン添加培地内の精子浮遊液に、0.1~0.5 μ M となるように I-A を加えて、それぞれ 0.5~3.0 分間前処理した精子の H 卵子への侵入成績を表 2 に示した。計 30 組の処理区のうち、精子侵入卵率の最高値は

Table 3. Effects of sperm concentration at the time of ionophore treatment on the penetration of zona-free hamster eggs by goat spermatozoa *in vitro*

Sperm Conc. ($\times 10^4$ cells/ml)		No. of eggs		Average No. of sperm in vitellus
At the time of ionophore treatment	In the medium with the eggs	Examined	Penetrated (%)	
1,000	112- 168	29	10 (34.5)	0.62
2,500	456- 506	29	24 (82.8)**	1.17
5,000	824- 936	30	14 (46.7)	0.70
7,000	1,380-1,440	28	5 (17.9)	0.29

Eggs were inseminated with the mixed spermatozoa from male goat A and C (pretreated with $0.5 \mu\text{M}$ ionophore A23187 for 2 min in the presence of 2 mM caffeine) by the same manners indicated in Table 1, and examined after 6-7 h from the insemination. Three tests in each group.

* Significantly higher than the other values within the same column ($P < 0.01$; χ^2 test).

Table 4. Individual variation among male goats in the maintenance of sperm motility and their penetrating ability into zona-free hamster eggs *in vitro* after treatment of spermatozoa with ionophore A23187

Sperm from he-goat	Age (months)	Motility score: time after insemin.				No. of eggs		Average No. of sperm in the vitellus
		0.5 h	1.0 h	2.0 h	3.0 h	Examined	Penetrated (%)	
A	17	4.0	4.0	3.0	3.0	36	34 (94.4)a	2.53
B	58	3.3	3.3	3.0	2.0	52	36 (69.2)b	1.86
C	33	3.0	2.8	2.5	1.8	54	37 (68.5)b	1.33
D	31	2.0	1.8	0.8	0	53	21 (39.6)c	0.60
E	58	1.5	1.5	0.8	0.8	52	19 (36.5)c	0.56
F	67	1.8	1.5	0.8	0	58	21 (36.2)c	0.43
G	58	1.8	0.8	0.3	0	47	13 (27.7)c	0.30

Sperm suspension, 25×10^6 cells/ml in the medium containing 2 mM caffeine, were treated with $0.5 \mu\text{M}$ ionophore for 2 min. Eggs were inseminated with the treated spermatozoa by the same manner as indicated in Table 1, and examined 6-7 h after the insemination. Motility score, as indicated in Table 2, was the average of three tests in each group. The difference between the percentages with different superscripts is significant ($P < 0.01$; χ^2 test).

実験 1 と同じ $0.5 \mu\text{M}$ I-A, 2.0 分間処理区で得られた (73.8%)。 $0.5 \mu\text{M}$ の I-A 濃度で 1.5 分間以下または 2.5 分間以上の処理時間では有意に精子侵入卵率が低下した。 I-A 濃度 $0.4 \mu\text{M}$ 以下の場合も処理時間により侵入卵率の変動が認められたが、いずれも 52.3% 以下の低率の精子侵入卵しか得られなかった。媒精後の精子運動性の維持時間は全処理区とも同様に、3 時間後も運動精子が観察された点で実験 1 の場合よりも良好であった。

3. I-A 処理時の精子濃度の影響 (実験 3)

2 mM カフェイン添加培地に浮遊させる精子の濃度を $10 \sim 70 \times 10^6$ 精子/ml の範囲で 4 段階に調整し、それぞれ $0.5 \mu\text{M}$ I-A を加えて 2 分間前処理した精子による H 卵子への侵入成績を表 3 に示した。精子侵入卵率は I-A

処理時の精子濃度により異なり、 25×10^6 精子/ml 区の 82.8% が他の 3 区よりも有意に高く ($P < 0.01$)、また 50×10^6 精子/ml 区と比べて 70×10^6 精子/ml 区の精子侵入卵率は有意に低下した ($P < 0.05$)。しかし、媒精後の精子運動性の経時的変化は 4 区とも実験 2 と同様で、精子濃度の影響は認められなかった。

4. 精子侵入成績に及ぼす雄個体差の影響 (実験 4)

7 頭の雄から個体別に採取した精子を 2 mM カフェイン添加培地内にそれぞれ 25×10^6 精子/ml の濃度に浮遊させ、 $0.5 \mu\text{M}$ I-A で 2 分間ずつ前処理した場合のその後の H 卵子への精子侵入成績と媒精後の精子運動性の観察結果は表 4 に示した。精子侵入卵率はヤギ A の精子の場合が 94.4% で最高の値を示し、次にヤギ B, C の

Table 5. Time-related changes of the penetration of ionophore-pretreated goat spermatozoa into zona-free hamster eggs *in vitro*

Time after insemination (h)	No. of eggs examined	No. of eggs penetrated (%)	No. of sperm in vitelli total (/egg)	No. of enlarged sperm heads (%)			
				Initial	Progressing	Fully enlarged	Male PN
0.5	30	1 (3.3)	1 (0.03)	1 (100)			
1.0	30	4 (13.3)	5 (0.16)	2 (40.0)	3 (60.0)		
1.5	30	9 (30.0)	9 (0.30)	2 (22.2)	3 (33.3)	4 (44.4)	
2.0	29	17 (58.6)	30 (1.03)	5 (16.7)	4 (13.7)	21 (70.0)	
3.0	27	20 (74.1)	33 (1.22)	2 (6.1)	4 (12.1)	27 (81.8)	
4.0	30	25 (83.8)	44 (1.47)	0	0	39 (88.6)	5 (11.4)
5.0	29	24 (82.8)	34 (1.18)	0	0	22 (64.7)	12 (35.3)

Sperm suspension from he-goat A, 25×10^6 cells/ml in the medium containing 2 mM caffeine, was pretreated with $0.5 \mu\text{M}$ ionophore A23187 for 2 min. Eggs were inseminated with the treated spermatozoa (final sperm concentration at $260\text{--}580 \times 10^4$ cells/ml) by the same manner as indicated in Table 1. Enlargement of sperm heads were classified as follows: initial stage of enlargement were restricted to the posterior region, progressing stage were of 1/2 to 2/3 of sperm heads enlarged, and fully enlarged refers to whole portion of heads enlarged.

精子による成績が 69.2%, 68.5% で比較的高く, ヤギ D~G の精子による成績は 40% 未満の低率であった。これらの異なる雄精子による精子侵入卵率の優劣は媒精後の精子運動性の優劣と密接に関係していることが認められた。すなわち, ヤギ A, B, C の精子では媒精後 2~3 時間においても約 25% 以上の運動精子が認められたのに対し, ヤギ D~G の精子では媒精した 30 分後にすでに 50% 未満の運動精子しか認められず, 1~2 時間以後の精子運動性は急速に低下した。

5. 媒精後の精子侵入卵出現の経時的变化と精子侵入卵の形態的变化 (実験 5)

雄ヤギ A の精子を 2 mM カフェイン添加培地に 25×10^6 精子/ml の濃度に浮遊させ, $0.5 \mu\text{M}$ I-A で 2 分間前処理し, その媒精後 0.5~5.0 時間で H 卵子への精子侵入状況を検討した結果を表 5 に示した。媒精後 30 分の検査では 30 個中 1 個のみが精子侵入卵であった。精子侵入卵率は 1 時間後の 13.3% から 3 時間後の 74.1%, 4 時間後の 83.8% まで経時的に増加し, その後の増加傾向は認められなかった。H 卵子に侵入した計 156 個の精子について頭部の膨化ステージ区分ごとの経時的推移を検討したところ, 膨化初期の精子は媒精後 3 時間までの時間経過とともに漸減し 4 時間後では全く認められなかった。一方, 膨化後期の精子は 1.5 時間以降に増加し, 4 時間後に 11.4%, 5 時間後に 35.3% の侵入精子が雌性前核に変態していた。

考 察

精子に対する I-A 処理効果の発現には培地内の Ca^{2+} の存在が必須条件である^{2,4,8)}。I-A 処理による Ca^{2+} の精子への浸透は精子の先体反応の誘発効果をもつが, 同時に精子活力の急速な喪失を招く^{5,7)}。精子の先体反応の誘起と精子活力の維持を両立させる方法として, I-A 処理後に培地に BSA を加えると有効である⁷⁾。これらの知見を考慮して本研究では, 精子の洗浄から I-A 処理終了までは BSA 無添加, H 卵子との受精用には BSA 添加, の BO 液を培地として使用した。

上記のほかに, 各種の要因が I-A 処理精子による卵子の体外受精成績を左右する可能性があり, 本研究の結果から, 精子を浮遊させる培地内のカフェインの存否とその濃度, 精子浮遊液に添加する I-A の濃度と処理時間, I-A 処理時の精子濃度, 雄ヤギ, I-A 処理精子の媒精後のインキュベーション時間, などが重要な要因であることがわかった。

実験 1 の成績から, $0.5 \mu\text{M}$ I-A 処理区の精子侵入卵率が, カフェイン無添加培地内に比べて 2 mM カフェイン添加培地内において著しく向上することが示された (表 1)。類似の知見はウシ射出精子に対する I-A 処理実験においても認められている¹⁰⁾。ただし, 5 mM 以上のカフェイン添加培地内では, I-A 濃度の上昇につれて I-A 処理後精子活力が急速に失われる傾向が認められ, そのために卵子への精子侵入成績は 2 mM カフェイン添加, $0.5 \mu\text{M}$ 処理区よりも不良であったと考えられる。

2 mm カフェイン添加培地を使用して、最低の I-A 濃度と最短の処理時間で最高の精子侵入卵率を得るための I-A 処理法を追究した実験 2 の成績から、実験 1 と同様に 0.5 μM I-A による 2 分間処理がヤギ精子に適することが示された (表 2)。0.4 μM 以下の I-A 濃度はヤギ精子の先体反応誘起に不十分であると推察される。また、0.5 μM I-A の場合も処理時間の 30 秒の差がその後の卵子への精子侵入成績を大きく左右し、厳密な時間測定が重要なことを示している。

実験 3 の成績から、I-A 処理前の精子濃度調整も重要であることが示された (表 3)。この知見は、精子濃度の高い場合には I-A 処理後のモルモット精子の先体反応誘起率が低下するとの報告²⁾と一致する。ただし、 10×10^6 精子/ml で I-A 処理した場合の精子侵入卵率は低率であった。その原因は不明であるが、ヤギ精子の集団の中で I-A 処理に適切に反応する精子の比率は限定されていると考えるべきかも知れない。

実験 4 の成績から、I-A 処理精子の H 卵子への侵入能には雄ヤギの個体差も影響することが示された (表 4)。類似の知見は I-A 処理ウシ精子の H 卵子への侵入実験でも認められている¹⁰⁾。ただし、この雄による差はヤギ精子の場合には I-A 処理後の精子活力の維持における差と密接に関係しているようであったが、ウシ精子の場合には精子活力には差がなくても認められる点で対照的である。

実験 5 の成績から、I-A 処理後直ちに媒精すると、ヤギ精子はウシ精子¹⁰⁾と同様に 3 時間以内に H 卵子への侵入を実質的に完了することが示された (表 5)。したがって、高率の精子侵入卵を得るためには、I-A 処理後 3 時間まで受精用培地内に生存精子が残っている必要があると考えられる。H 卵子に侵入したヤギ精子頭部の位相差顕微鏡下での形態的变化はウシ精子の H 卵子への侵入時にみられる変化と基本的に一致するものであった。

以上の成績から、ヤギ射出精子を I-A 処理して卵子の体外受精を試みる場合に、各種の関係する要因を吟味しそれぞれ適切な条件を組み合わせる I-A 処理する必要のあることが示された。しかし、H 卵子に侵入容易な精子が透明帯保有の同種卵子にも侵入できるとは限らない。これまで、育成豚から摘出した卵管や子宮¹⁵⁾、あるいはウサギ¹⁶⁾やハムスター¹⁸⁾からの摘出子宮などの腔内で一定時間加温したヤギ射出精子は体外で H 卵子に侵入することが知られている。しかし、これらの前処理法で処理した射出精子によるヤギ卵子の体外受精の成功例はまだ報告されていない。したがって、本研究で適切と考

えられた I-A 処理条件で前処理された精子がヤギ卵子の体外受精に使用できるか否か検討する必要がある。

要 約

カルシウムイオノホア A23187 (I-A) で前処理したヤギ精子を体外受精実験に使用する目的で、前処理のさいの適切な条件を把握するために一連の実験を行なった。前処理の効果は体外における透明帯除去ハムスター卵子への精子侵入成績を指標として検討した。

日本在来種ヤギ射出精子を BSA 無添加で 0~10 mm カフェイン添加の合成培地 (Brackett & Oliphant, 1975; 等張 BO 液) により洗浄後、同液中に再浮遊させ、1-A を 0.1~1.0 μM 濃度となるように添加して 0.5~3.0 分間混和した。同濃度のカフェインと 3 mg BSA/ml を添加した BO 液 350 μl の中の透明帯除去ハムスター卵子に、I-A 処理後の精子浮遊液 50 μl を移して媒精し、37.5°C の 5% 炭酸ガス培養器内でインキュベートした。I-A による精子の前処理効果は精子侵入卵率に反映され、カフェイン濃度、I-A による前処理時間、I-A 処理時の精子濃度、媒精後のインキュベーション時間によって異なることが示された。2 mm カフェイン添加液中に精子を 25×10^6 精子/ml の濃度に浮遊させ、0.5 μM の I-A により 2 分間前処理後に媒精し 6~7 h インキュベートすると大部分の卵子 (73.8~94.4%) は恒常的に精子侵入卵となった。卵子への精子侵入は実質的に媒精後 3 時間以内に終了するものと推定された。良好な精子活力をもつ雄の選抜もまた重要な要因であることが示された。

(1985, 4, 15 受付)

文 献

- 1) YANAGIMACHI R & N USUI: *Exptl. Cell Res.*, **89**, 161, 1974.
- 2) TALBOT P, RG SUMMERS, BL HYLANDER, EM, KEOUGH & LE FRANKLIN: *J. Exp. Zool.*, **198**, 383, 1976.
- 3) GREEN DP: *J. Physiol. (Lond.)*, **260**, 18P, 1976.
- 4) SINGH JP, DF BABCOCK & HA LARDY: *Biochem. J.*, **172**, 549, 1978.
- 5) PETERSON R, L RUSSELL, D BUNDMAN & M FREUND: *Biol. Reprod.*, **19**, 459, 1978.
- 6) RUSSELL L, RN PETERSON & M FREUND: *Fertil. Steril.*, **32**, 87, 1979.
- 7) SHAMS-BORHAN G & RAP HARRISON: *Gamete Res.*, **4**, 407, 1981.
- 8) BYRD W: *J. Exp. Zool.*, **215**, 35, 1981.
- 9) TOYODA Y & Y ITAGAKI: *Proc. 5th World Conf. Anim. Prod.*, Tokyo, II-17, 1983.

- 10) 高橋(芳)・高田(章): 本誌, **31**, 30, 1984.
- 11) HAMANO K, H SASADA, S SUGAWARA & J MASAKI: *J. Mamm. Ova Res.*, **1**, 177, 1984.
- 12) SMITH M, RN PETERSON & LD RUSSELL: *J. Exp. Zool.*, **225**, 157, 1983.
- 13) BRACKETT BG & G OLIPHANT: *Biol. Reprod.*, **12**, 260, 1972.
- 14) HANADA A & MC CHANG: *Biol. Reprod.*, **6**, 300, 1972.
- 15) KIM CI, K NIWA, H IMAI & A IRITANI: *J. Exp. Zool.*, **213**, 181, 1980.
- 16) 花田(章)・塩谷(康): 第 72 回日畜学会講演要旨, 148, 1981.
- 17) KATO, S, H KUSUNOKI, N MIYAKE, T YASUI & S KANDA: *Jpn. J. Zootech. Sci.*, **56**, 62, 1985.

Summary

With the aim of using calcium ionophore A23187 (I-A) for pretreating goat spermatozoa in the study of *in vitro* fertilization, experiments were conducted to assess optimum pretreating conditions of spermatozoa with I-A. Penetration of spermatozoa into zona-free hamster eggs *in vitro* was used as a parameter to evaluate the pretreatment effects. Ejaculated goat spermatozoa from Japanese native breed were washed, resuspended in a modified Tyrode's solution (BRACKETT & OLIPHANT, 1975; isotonic BO medium) containing 0 to 10 mM caffeine but without bovine serum albumin (BSA) and then admixed with 0.1 to 1.0 μ M I-A for 0.5 to 3.0 min. Zona-free hamster eggs in 350 μ l BO medium, which contained the same concentrations of caffeine and 3 mg BSA/ml, were inseminated by introducing 50 μ l sperm suspension pretreated with I-A. Eggs and sperm were incubated at 37.5°C under 5% CO₂ in air.

The proportions of penetrated eggs differed according to caffeine concentration, to I-A concentration, to pretreating time with I-A, to sperm concentration at the time of I-A treatment and to incubation times after insemination. Majority of the eggs, 73.8 to 94.4%, were penetrated when spermatozoa were pretreated with 0.5 μ M I-A for 2 min at sperm concentration of 25×10^6 cells/ml in the medium containing 2 mM caffeine. Sperm penetration into the eggs was inferred to be accomplished within 3 h after insemination. The selection of males with good sperm motility was also indicated to be an important factor for obtaining high proportions of penetrated eggs.