HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ブタ体外受精における精子の受精能に関する研究
Author(s)	鈴木, 啓太
Citation	北海道大学. 博士(農学) 乙第5829号
Issue Date	2001-06-29
DOI	10.14943/doctoral.r5829
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/32799
Type	theses (doctoral)
File Information	5829.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

ブタ体外受精における精子の受精能に関する研究

鈴　木　　啓　太

ブタ体外受精における精子の受精能に関する研究

目　次

第１章　緒　論　1

第２章　精子処理法が精子の受精能におよぼす影響
第１節　緒　言　8
第２節　前培養が精子の受精能におよぼす影響　１０
第３節　パーコール法で分離した射出精液由来精子の受精能　１８
第４節　パーコール法で分離した精巣上体精子の受精能　２３
第５節　考　察　３８
第６節　要　約　４５

第３章　受精培地のカリウムイオンとナトリウムイオンが
精子の受精能におよぼす効果およびその機構
第１節　緒　言　４７
第２節　受精培地の高濃度カリウムイオンが精子の卵子への
侵入におよぼす影響　４９
第３節　体外受精時のカリウムイオンの必要性　５７
第４節　ナトリウムイオンとカリウムイオン濃度が
精子の卵子への侵入におよぼす影響　６３
第５節　考　察　７１
第６節　要　約　７８

第４章　受精培地の構成成分が精子の受精能におよぼす影響
第１節　緒　言　８０
第２節　重炭酸が精子の受精能におよぼす影響　８４
第３節　体外受精時のタンパク質の必要性　９２
第４節　新たな体外受精培地の開発とその有効性　１００
第５節　考　察　１０７
第６節　要　約　１１４

第５章　単精子侵入率向上の方策
第１節　緒　言　１１５
第２節　卵管上皮細胞が単精子侵入におよぼす影響　１１８
第３節　ヒアルロン酸が単精子侵入におよぼす影響　１２３
第４節　ヒアルロン酸が精子の受精能獲得におよぼす影響　１３１
第５節　考　察　１４８

第6節　要　約　156

第6章　総　括　157

謝　辞　160

引用文献　161

略記および用語の定義

略　記

ATP (adenosine 5'-triphosphate): アデノシン 5'-三リン酸
BSA (bovine serum albmin): ウシ血清アルブミン
Ca^{2+}: カルシウムイオン
cAMP (cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate)
　: サイクリックアデノシン 3', 5'- 一リン酸
CASA (Computer Assisted Sperm Analysis)
　: コンピュータを利用した精子解析
cGMP (cyclic guanosine3', 5'-monophosphate)
　: サイクリックグアノシン 3', 5'- 一リン酸
COCs (Cumulus Oocytes Complexes): 卵丘-卵子複合体
CTC (chlortetracycline): クロルテトラサイクリン
FCS (Fetal Calf Serum): ウシ胎子血清
hCG (human Chorionic Gonadotropin): ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン
Hepes (N-2-hydroxyethylpiperadine-N'-2-ethanesulfonic acid)
　: N-2- ヒドロキシエチルピペラジン-N'- エタンスルホン酸（ヘペス）
K^+: カリウムイオン
Na^+: ナトリウムイオン
pFF (porcine follicular fluid): ブタ卵胞液
PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin): 妊馬血清性性腺刺激ホルモン
PVA (polyvinyl alcohol): ポリビニルアルコール（合成高分子）
PVP (polyvinylpyrrolidone): ポリビニルピロリドン（合成高分子）

[A]：A の濃度を表す。また、[　] 後の添字 i, e はそれぞれ細胞内および細胞外を示す。
例えば、$[K^+]_i$ は、細胞内カリウムイオン濃度
　　$[Na^+]_e$ は、細胞外（培地中の）ナトリウムイオン濃度

用語の定義

精子侵入（卵子）：卵子に精子の侵入が見られる現象（およびその卵子）
精子侵入卵子率 (%) = (精子侵入卵子数/供試卵子数)×100
単精子侵入（卵子）：１卵子あたり１精子の侵入が見られる現象（およびその卵子）
単精子侵入率 (%) = (単精子侵入卵子数/精子侵入卵子数)×100
単精子効率 (%) = (単精子侵入卵子数/供試卵子数)×100
平均侵入精子数：精子の侵入の見られた卵子一個あたりの平均侵入精子数
前核形成率 (%) = (前核形成卵子数/精子侵入卵子数)×100

第1章　緒　　論

人類は、野生動物を家畜化し、その繁殖特性を利用して人為的な支配下におくことで、家畜の生産性を高め、その生産物を利用してきた。現在では、育種改良技術の進歩とともに、自然交配から、人工授精、さらには体外受精、胚移植といった繁殖技術を組み合わせ、効率的な遺伝的改良を進めることが可能になり、家畜の生産性は飛躍的に向上している。しかし、体外受精、胚移植が既に実用技術として位置づけられるウシ(Thompson, 1997)に比較すると、ブタでは未だに体外受精の成功例が少なく、体外受精は実用技術として確立していない(Funahashi & Day, 1997)。胚移植と組み合わせた体外受精は、生体の移動、および、生体同士の接触を伴わないため、疾病の伝播を防ぐことを可能とし、また、特定病原菌を保有しないSPF (Specific Pathogen Free) 豚作成への応用に期待がかかっている。さらに、近年になってクローン技術、遺伝子導入技術などの新技術を用いた家畜生産が検討され始めている。これらの新技術を行うためには大量の受精卵（あるいは卵子）を必要とし、体外受精は受精卵を大量に作出する基礎技術として今後重要な位置を占めることが予想される。一方、体外受精は、精子および卵子の発生・生理学的動態を追跡し、詳細に受精機構を解明するための有効な手段であり、家畜繁殖のみならず、ヒトの生殖治療の学問的基礎を提供してきている。哺乳動物精子および卵子の受精前後に起こるさまざまな現象が究明されつつあるが、詳細について解明されていない部分も多い。すなわち、安定した体外受精系を確立することで、受精機構の解明を通して、受精、発生機構に関する基礎知見を得ることができ、また、さまざまな研究と技術に応用することが期待される。

多くの生物で、両性の配偶子が接合することは、新たな個体が誕生する最も初期段階に起こる現象である。受精に関する初期の研究には、無脊椎動物、あるいは、両生類や魚類といった、哺乳動物以外の生物が材料として用いられてきた。これらは、研究材料の入手が容易であり、また、自然界での受精が体外で起こることから、実験室で比較的容易に受精、発生に関する研究を行うことができたことにも起因している

(Yanagimachi, 1994)。一方、家畜を含む哺乳動物の受精は、通常数個から十数個の卵子が排卵後卵管内に入り、卵管膨大部に到達し、精子は膣側から雌生殖道に入り、子宮、卵管峡部、膨大部へと移動した後、精子と卵子は卵管膨大部で出会い、受精が成立する（図１－１）。すなわち受精は本来雌の体内で起こる現象であり、また、研究に用いる目的で回収できる卵子の数も少なく、さらに技術的な問題とも相まって、哺乳動物の受精を体外で再現させることが可能になるまでには多くの困難が伴っていた。哺乳動物の体外受精の可能性が示されたのは、1950 年代に入ってからである。すなわち、哺乳動物の精子は、雌性生殖道内に一定期間存在することで細胞生理学的修飾を受けた後、初めて卵子に侵入する能力を獲得する現象が見出されたこと (Chang, 1951; Austin, 1951) に端を発する。この精子の変化を、 Austin (1952) は、「受精能獲得 (キャパシテーション; Capacitation)」と名付けた。その後、Chang (1959) は、ウサギを用いて、排卵卵子と雌性生殖道内で培養した精子を簡単な組成の培地中で体外受精後、体外受精卵を卵管内に移植し、正常な産子を得たことを報告した。この結果は、体外受精卵にも正常な発生能があることを示している。さらに、Yanagimachi と Chang (1963) によって、ハムスター精子は体外での受精能獲得が可能であることが示され、生体器官（雌性生殖道）の関与なしに体外受精を行う糸口となった。それ以降、体外培養法の改良、発展に伴い、特定の哺乳動物では、受精現象を体外で再現できるようになり、現在までに体外受精に関連する一連の研究、すなわち卵子および精子の成熟、受精機構、胚発生に関する研究は、相補しながら進展してきている。

現在の体外受精方法は、精巣上体精子あるいは射出精液由来精子に受精能を獲得させ、卵胞から回収後に体外成熟培養を行った卵子、あるいは排卵卵子と共培養し、受精卵を作出、受精卵ないし胚の体外培養を行うことが一般的である（図１－２）。ブタ体外受精では、効率的な体外受精卵の作成のためには、まず、１）卵巣内の卵胞から卵子を回収後、受精するために必要な第二減数分裂中期 (M II 期) まで（体外成熟）培養し、また、同時にこの過程で細胞質成熟をさせ、２）精子を適切に処理して受精に必要な状態にし、さらに、３）高率に単精子侵入卵子、すなわち正常受精卵を作成すること、が必

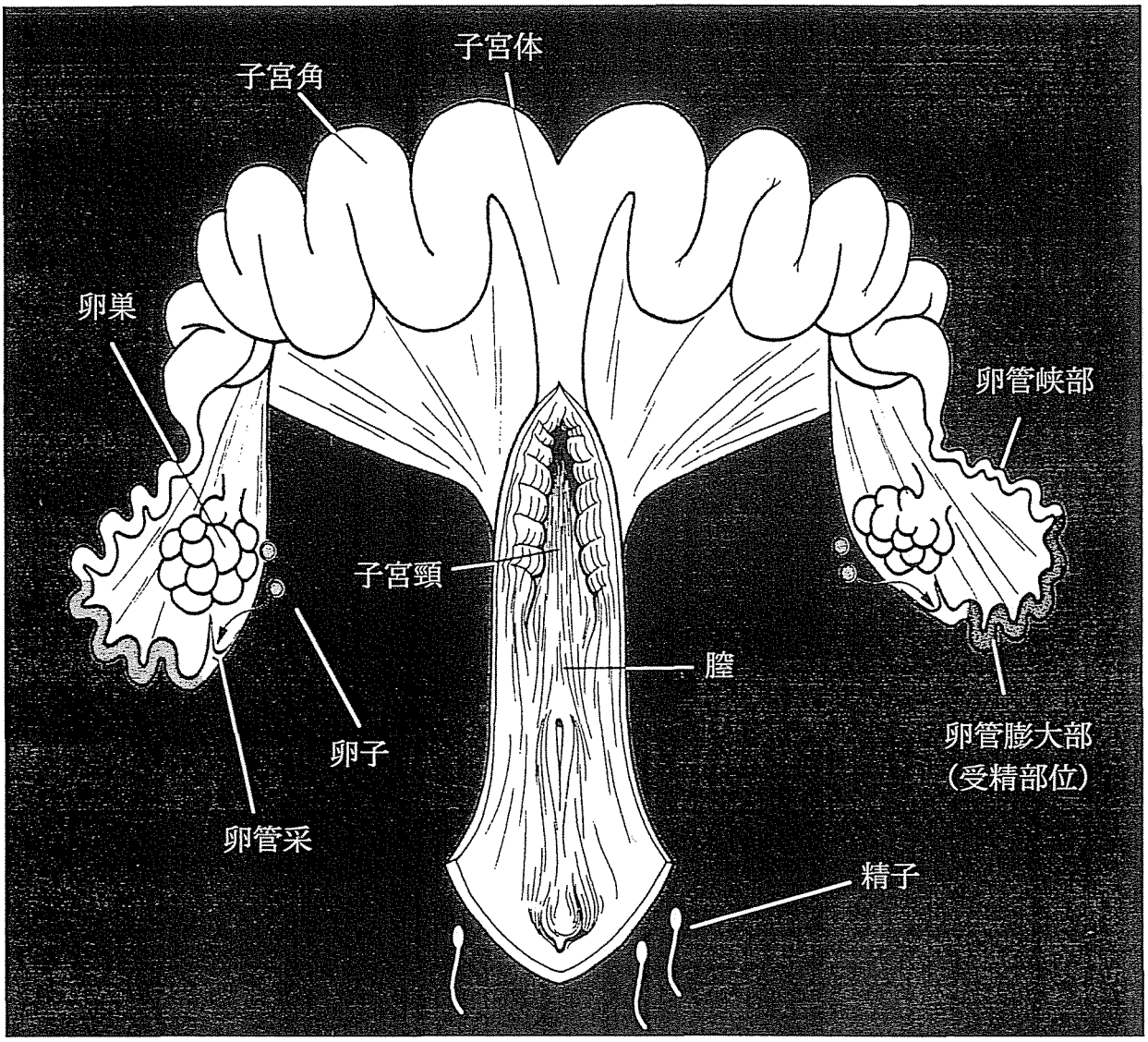

図１－１．雌ブタ生殖器と生体内で精子が通過する経路

生体内では、排卵された卵子が卵管采から卵管内に入り、卵管膨大部に到達する。一方、精子は膣側から（ブタでは子宮内に射出される）雌生殖道内に入り、子宮、卵管峡部、卵管膨大部へと移動する。精子と卵子は卵管膨大部で出会い、受精が成立する。
（Marrable A. W. (1971), The Embryonic Pigより引用）

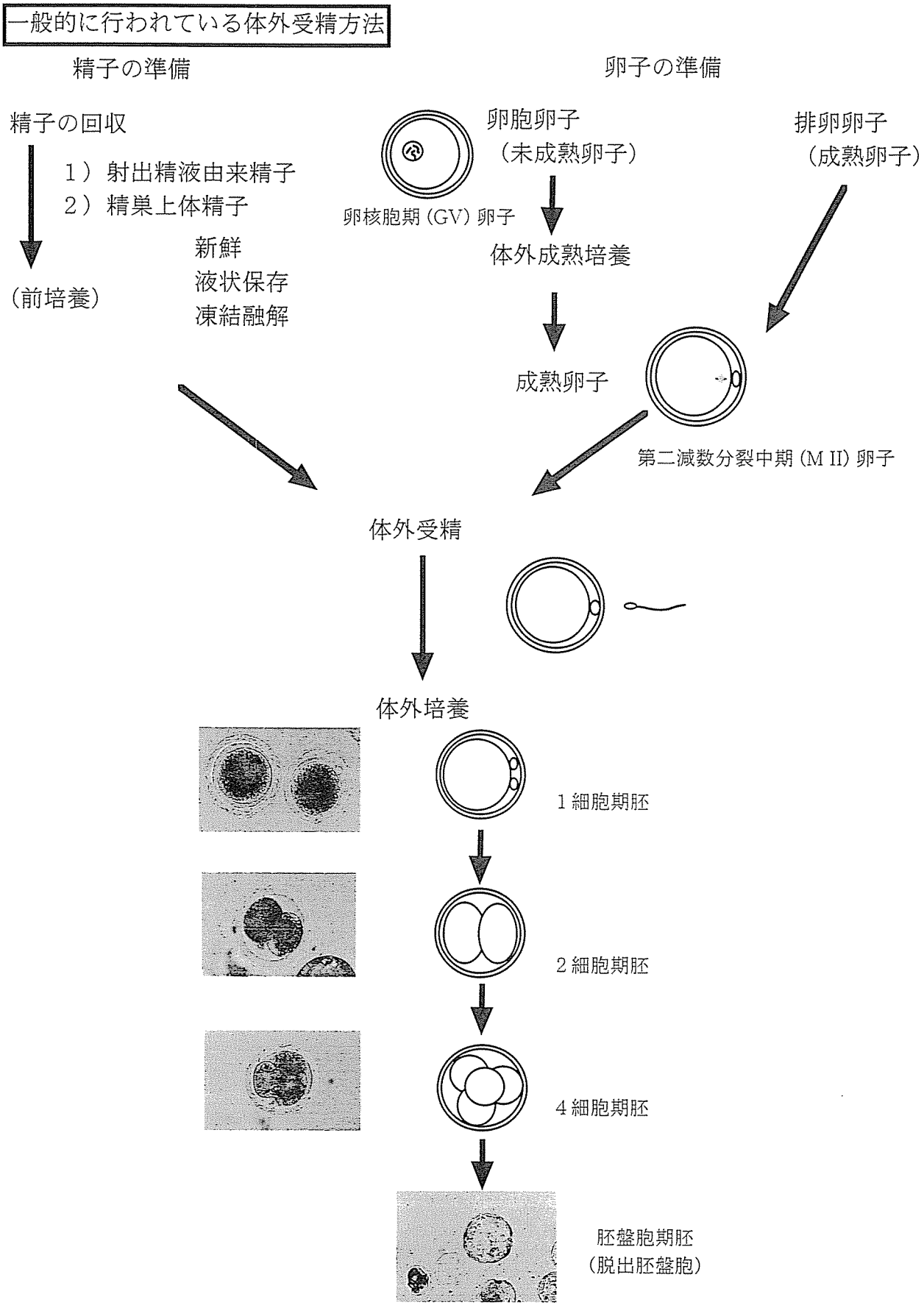

図１－２．ブタ体外受精の方法

要である。ブタの体外受精の研究初期には、他種哺乳動物精子の侵入を阻止しないハムスター卵子を用いて受精能を検査（ハムスターテスト）したImaiら(1977)の報告があり、わずかに2%の卵子に精子の侵入が見られたのみであった。雌性生殖道内で前培養を行った精子を用いた場合には、10-36%の侵入が見られている。Iritaniら(1978)は、体外成熟培養を行った卵胞卵子を精巣上体、あるいは射出精液由来精子と共培養を行い、卵子への精子の侵入を見ている。その結果、mKRBで前培養した射出精液由来精子を用いた場合には、卵子への精子の侵入は観察されなかったが、精巣上体精液由来精子を用いた場合、低率ながら卵子への侵入が見られ(3.3%)、雌性生殖道を用いない体外受精の可能性が示唆されることになる。一方、雌性生殖道内で前培養した精子を用いた場合には、10-26%の卵子への精子の侵入が示されている。その後、雌性生殖道を用いず、体外で受精能を獲得させた射出精液由来精子（Pavlok, 1981; Nagai *et al.*, 1984; Cheng *et al.*, 1986; Yoshida, 1987; Nagai *et al.*, 1988)、あるいは精巣上体精子による卵子への侵入が報告され(Nagai *et al.*, 1983; Nagai *et al.*, 1984; Nagai *et al.*, 1988)、さらに、体外受精で得た受精卵の移植による産子もわずかながら報告されてきている(Cheng *et al.*, 1986; Nagai *et al.*, 1988; Mattioli *et al.*, 1989; Yoshida *et al.*, 1993; Funahashi *et al.*, 1996; Funahashi *et al.*, 1997)。したがって、ブタ体外受精卵には、受精卵移植後に正常な産子にまで発育する能力があることは明らかである。しかし、ブタでは、正常な体外受精卵を常時高率に作出するためには、多くの困難がある。その中には、前核形成不全(Nagai, 1996)、高率に起こる多精子侵入および受精卵の低発生率(Funahashi & Day, 1997)、さらには、精液サンプル間（雄間）に大きな受精能の差がある(Wang *et al.*, 1991)ことなどが含まれる。したがって、これらの問題を克服し、正常受精卵を高率に作出可能な体外受精方法を確立することが求められる。これらの問題の中で、精子の処理、精子と卵子の共培養（受精）時には、以下の問題がある。

（1）個体毎あるいは採取反復間毎の精液サンプル間に認められる精子侵入率の差異

まず、第一に、異なる雄から採取した精液間で、あるいは同一の雄から採取した精液であっても、採取ロットが異なる精液に由来する精子を用いた場合に、体外受精率（侵

入率）に大きな違いが見られる（Nagai *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1996）。このため、適切な条件設定が困難となる。体外受精に用いる精子の処理法については、卵子との共培養前に前培養を行うこと（Nagai *et al.*, 1984; Zheng & Sirard, 1992）、高精子濃度状態で精子を前培養後、受精を行うこと（Nagai *et al.*, 1984）などが試みられている。また、ヒトやウシでは、一定の体外受精結果を得るために、パーコール（Percoll）法（Parrish *et al.*, 1995）、あるいは、swim-up 法（Shamsuddin & Rodriguez-Martinez, 1994）で分離後の、活力のある精子を用いる方法が比較的一般的に行われている。しかしながら、ブタ精子に関する精子の処理法についての詳細な検討は、ほとんど行われていない。したがって、精液間の受精能の差異を減らし、安定した体外受精結果を得るためには、体外受精に用いる精子の処理法の検討が必要である。

（2）受精に必要な培地成分

第二に、ブタ体外受精結果は、研究者間で大きな差があり、一定した結果を得ることが難しい（Nagai, 1996）。この原因としては、用いる精液の違いと共に、体外受精方法の違い、特に、用いる培地の違いが大きく影響している可能性がある。現在、塩類、生体由来のタンパク質や細胞、あるいは種々の化学物質が体外受精培地に添加されている。培地を構成するナトリウム（Hyne *et al.*, 1984; Bhattacharyya *et al.*, 1986; Murphy *et al.*, 1986; Fraser *et al.*, 1993）、カリウム（Fraser, 1983; Bhattacharyya *et al.*, 1986; Murphy *et al.*, 1986; Yanagimachi & Bhattacharyya, 1988）、カルシウム（Murphy & Yanagimachi, 1984）などの主要な塩類やイオン、培地の pH（Hyne, 1984; Murphy & Yanagimachi, 1984）、生体由来の成分である血清やアルブミン（Fraser, 1985; Tajik *et al.*, 1993）、あるいは、細胞および体内での受精部位である卵管から採取した卵管上皮細胞や卵管液（Parrish *et al.*, 1989; Kano *et al.*, 1994; Dubuc & Sirard, 1995）などが精子の受精能獲得、先体反応、あるいは受精能に与える影響について調べられている。また、いくつかの化学物質が精子侵入卵子率の向上を目的として培地に添加されており、それらが精子に与える影響について調べられている（Meizel *et al.*, 1980; Parrish *et al.*, 1985; Tesarik, 1985; Fraser, 1986; Chung *et al.*, 1993）。し

精において、受精に適切な培地の種類および受精に必須あるいは重要な培地成分などの基礎的な知見はほとんどない。したがって、これらを明らかにすることで、安定した体外受精結果を得るために用いる培地を絞り込むことができる。

（3）多精子侵入（受精）

第三に、多くの報告で繰り返し言及されている問題として、ブタの体外受精では2つ以上の精子が卵子内に侵入してしまう多精子侵入と呼ばれる異常受精が頻発する現象がある (Nagai, 1994; Funahashi & Day, 1997)。他種哺乳動物では、体外受精時に多精子侵入は高率に起こらないため、大きな問題とはなっていない (Nagai & Moor, 1990)。体外成熟培養を行った卵子では、卵子の表層顆粒放出様式が、体内で成熟した卵子とは異なっていること (Wang *et al.*, 1997) が報告されており、表層顆粒の放出が多精子侵入の防御に影響を与えていると考えられる (Wang *et al.*, 1998)。しかし、ブタでは、体内であっても通常より多量の精子が受精部位に存在する場合、多精子侵入が発生する (Hunter, 1973)。したがって、ブタにおける多精子侵入拒否機構は、必ずしも卵子のみに依存しているのではなく精子の要因も係わり、子宮-卵管接合部での精子の選別、卵管峡部における一時的な精子の待機、排卵に伴う受精に適した精子の効果的な卵管膨大部への移動、といった卵管の効果的な精子選別機構が考えられる (Yanagimachi, 1994; Hunter, 1996)。同時に、多精子侵入拒否機構の一つとして、卵管内の分泌液（卵管液）の役割も重要であろう。すなわち、体内では卵子の多精子侵入拒否機構と協調して、受精の場である卵管内の環境に反応した精子側の効果とが協調的に働くことで、効果的に単精子侵入卵子を作り出している事が予想される。したがって、体外受精で単精子侵入卵子を効率的に作出するためには、雌性生殖道内の環境が参考になると考えられるが、これらに関する知見は少なく、詳細に検討していく必要がある。

本研究では、以上述べたブタ体外受精の問題を解決し、さらに、受精機構の解明に必要な基礎知見を得るため、1）体外受精に用いる精子の処理法の検討、2）精子侵入に必須な培地成分およびその濃度の確立を目的とした。さらに、3）体外受精による単精子侵入卵子の効率的作出を試みた。

第２章　精子処理法が精子の受精能におよぼす影響

第１節　緒　言

ブタの体外受精には、新鮮な射出精液由来精子あるいは精巣上体精子、およびそれぞれの液状保存あるいは凍結融解した精子が用いられている。これらの精子を遠心洗浄、再懸濁し、一定時間の培養（前培養）を行った後、精子と卵子との共培養を行う方法が広く用いられている。(Nagai *et al.*, 1984; Cheng, 1985; 浜野と豊田, 1986; Nagai *et al.*, 1988)。これら一連の方法で処理した精子を使用して得られる体外受精の結果は、精液を採取する雄の違い、あるいは、同じ雄から採取した精液であっても、サンプル間で（体外）受精率に大きな差が見られることが報告されている(高橋と永井, 1990; Wang *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1996)。再現性のある結果を得るためには、一定の受精能を有する精子を選別した後、それらを受精に適した状態に導くことが必要であるのかもしれない。

哺乳動物精子の前培養は、精子に受精能を獲得させる目的で行われてきた(Yanagimachi, 1994)。ブタ体外受精研究の初期には、精子を雌性生殖道内で一定時間培養することで、精子に受精能を獲得させていた(Iritani *et al.*, 1978)。その後、生体の関与なしに、簡単な組成の合成培地中で精子の受精能を獲得させ、体外受精を行うことが可能となった(Nagai *et al.*, 1984)。現在行われているブタの体外受精では、それぞれの報告ごとに、精子の前培養時間が異なっている。精子の前培養時間の違いによる精子侵入卵子率には違いが見られ(浜野と豊田, 1986; Nagai, 1996)、また、前培養時の精子濃度がその後の精子侵入卵子率に影響をおよぼしていることが示されている(Nagai *et al.*, 1984; 浜野と豊田, 1986)。これまで、精子の前培養は体外で受精能獲得を起こさせるために必要な過程であると言われてきた(Hamano *et al.*, 1989; Rath, 1992)。しかしながら、Yoshida ら (1993) は、前培養を行わない新鮮射出精液由来の精子を用いた体外受精で得られた卵子から産子が得られたことを報告している。また、

Mattioli ら (1989) は、前培養をせずにパーコールで処理した精子を用いて作成した体外受精卵を移植後、産子を得ることに成功している。Yoshida ら (1993)、Mattioli ら (1989) のいずれの研究グループも比較試験を行っていないので前培養の効果は不明である。しかしながら Berger ら (1989) は、パーコールで洗浄することで部分的な精子の受精能獲得を導いている可能性のあることを示唆している。

精子の選別は、正常な形態を有し、運動性のある精子を回収するために行われる (swim-up: Shamsuddin & Rodriguez-Martinez, 1994; glass wool: Katayama *et al.*, 1989; Sanchez Sarmiento *et al.*, 1996; SpermPrep filtration column: Smith *et al.*, 1995; Correa & Zavos, 1996; Percoll: Sirard *et al.*, 1993; Parrish *et al.*, 1995; low speed centrifugation: Martinez *et al.*, 1996; Gadea *et al.*, 1998)。パーコールは、PVP でコーティングされたシリカビーズを主成分とし、細胞を分画するために広く使用されており (Avery & Greve, 1995)、パーコール分離法は、哺乳動物精子の選別に用いられている。しかし、ブタでは、この方法を体外受精に用いている研究はわずかである (Mattioli *et al.*, 1989)。

近年になって、精子の運動特性について、その移動軌跡をコンピュータ解析 (computer assisted sperm motion analysis: CASA) 技術で評価できるようになっている (Mortimer *et al.*, 1995)。いくつかの研究では、精子の運動特性のパラメータと受精能との関連性、あるいは精子の運動特性のあるパラメータによる受精能の予測可能性を検討している (Mortimer *et al.*, 1995)。現在のところ、精子の運動特性と受精能とのはっきりとした関連性を示すのは困難であるとする見方がある (Oehninger *et al.*, 2000)。一方、Liu と Baker (1992) は、ヒト精子の運動特性のパラメータは、その受精能を予測するものとなり得ることを示している。しかし、パーコールで分離したブタ精子の運動特性と受精能について検討している研究は、現在のところほとんど見当たらない。

以上のことから、本章では、体外受精に用いる精子の処理方法を検討することを目的に、まず、雄の違いによる精子の受精能を比較し、次いで、前培養の効果を検討した。さらに、パーコール法で分離した精子の受精能および運動特性について比較検討した。

第２節　前培養が精子の受精能におよぼす影響

本節では、異なる雄から採取した射出精液由来の精子を用いた場合の体外受精結果を比較し、続いて、前培養条件が受精結果におよぼす影響について調べた。

１．材料および方法

供試精子および卵子

精子は、性成熟に達し、繁殖豚として飼育されている、大ヨークシャー (Large White)、ランドレース (Landrace)、デュロック (Duroc) 種の雄豚から採取した精液に由来する。卵子は、と畜場で回収したと畜直後の未経産雌豚の卵巣から採取した。

精液の採取

本節では、射出精液由来の精子を使用した。射出精液は、精子濃度の高い濃厚部精液 (sperm rich fraction) を手圧法 (gloved-hand-method) で採取した。採取時には、膠様物の混入を避けるために二重にしたガーゼを使用し、採集後は急激な温度変化を避け、最終的に 15 ℃になるように徐々に温度を下げ、暗所に保存した（液状保存射出精液）。

培養条件

本研究では、特に言及しないかぎり、卵子の体外成熟培養、および精子と卵子の共培養は 39 ℃, 5% CO_2, 95% 空気、また、精子の前培養は 37 ℃, 5% CO_2, 95% 空気の培養器内で行った。いずれの場合も培地は使用する環境に３時間以上前に置き、気相条件等を平衡にした。

精子の前培養

精液を、室温 (約 20 ℃) にした 5 ml の精子洗浄液に移し、600 g, 8 分間の遠心分離

を行い、上清を除去後、沈殿した精子を精子洗浄液で再懸濁した（精子の洗浄）。同様に前培養培地で洗浄した後、前培養培地に精子を再浮遊させ、前培養を行った。また、前培養は、実験計画にしたがって条件を変えた。精子濃度は、血球計算盤を用いて測定し、所定の濃度に調節した。

卵子の採取および体外成熟培養

と畜直後に採取した卵巣を、急激な温度変化を避けるため保温容器に入れ、一時間以内に実験室に持ち帰った。生理食塩水で数回洗浄後、18 あるいは 19 ゲージの針 (Termo) を装着した 5 ml のプラスチック製注射筒 (Termo) を用いて直径が約 2-5 mm の卵胞から卵丘-卵子複合体 (cumulus-oocytes-complexes: COCs) を含む卵胞液を吸引、採取した。採取時には回収液の急激な pH 変化を避けるため、灌流液として 加温した卵子洗浄用培地を少量使用した。吸引した COCs を含む卵胞液を 35-37 ℃ の加温槽内に立てた試験管内に集め、COCs を含む沈殿物をプラスチックディッシュ上に移し取った。実体顕微鏡下で卵丘細胞がしっかり付着し、卵細胞質が均一な卵子を選び、約 37 ℃ 程度に加温した卵子洗浄培地中に回収した。COCs を洗浄培地内でピペッテイングを繰り返すことで洗浄し（卵子の洗浄）、同様に成熟培養培地で選別を行いながら洗浄を繰り返し、最終的に成熟培地の小滴中に COCs を移した。体外成熟培養は 44-46 時間行った。

pFF の調製

ブタ卵胞液 (porcine follicular fluid: pFF) は Naito ら (1988) の方法を参考に調製した。と畜場で採取した卵巣を冷却して実験室に持ち帰り、生理食塩水 (5 ℃) で数回洗浄後、灌流液を使わずに、COCs の回収と同様な方法で卵胞液を吸引採取した。卵胞液以外の細胞組織や血液などの混入物を取り除くため、5 ℃ で 7,500-10,000 g の遠心分離を 30 分間行ない、上澄を凍結用プラスチック試験管 (Falcon, 4805) に移し、使用まで -80 ℃ で保存した。

体外受精

体外成熟培養の終了したCOCsを受精培地で洗浄し、細胞質が均一で膨潤化した卵丘細胞層が均一に付着している卵子を選別後、シャーレ中の受精培地に卵子を移した。前培養の終了した精子を受精培地で洗浄(900g, 8分)し、所定の濃度になるように希釈を行い、卵子のある受精培地に導入し、卵子と精子の共培養（体外受精）を行った。

卵子の固定、染色および観察

培養の終了した精子の付着した卵子は洗浄し、余分な精子を透明帯から剥がした。ワセリンのラインスポットを4点付着したスライドガラス上に卵子を並べ、カバーグラスを被せた。その後、24時間以上カルノア固定液（酢酸：エタノール=1:3）に浸して脱脂、脱水による固定を行った。核相の観察には、1%アセトオルセイン溶液で染色後、余分な染色液を置換液（氷酢酸：グリセロール：蒸留水=1:1:3）で洗い流し、カバーガラスの周囲を密封して、標本の作成を完了した。Nagaiら(1984)の方法にしたがい、卵子を位相差顕微鏡下で観察し、卵子の核相、精子侵入の有無および侵入精子数、雌雄性前核形成について記録した。卵子内への精子の侵入は、精子頭部の膨化、あるいは精子尾部を伴った前核を基準に判断し、精子侵入卵子、および侵入精子数について調べた。

統計処理

精子侵入卵子率はカイ2乗検定で、また、平均侵入精子数はスチューデントのt検定で統計分析を行った。

実験1．異なる雄から採取した精液由来の精子を用いた体外受精結果の比較

用いる精子の雄個体の違いによる体外受精結果を比較するため、5頭の雄豚(A, B, C, DおよびE)から採取した精液由来の精子を用いて、体外受精を行った。卵子の洗浄には、20 mM Hepes, 1 mg/ml PVAを加え、pH 7.4にしたTCM199培地(Medium 199, ICN Biochemicals)(TCM199-Hepes)を、卵子の体外成熟培養には、10% FCS,

10% pFF, 10 IU/ml PMSG（帝国臓器），10 IU hCG（帝国臓器）を加えたウェイマウス培地 (Waymouth's Medium MB752/1: ICN Biomedicals) (Way-FCS) を用いた。精子洗浄液は、Saline-BSA (0.9% NaCl, 0.1% BSA) を、精子の前培養培地は、PM-Hepes-BSA（付表１）および PM-BSA（付表１）を、受精培地は、FM-BSA（付表1）を使用した。精子の前培養は 1.5 時間、精子濃度は 4×10^8 cells/ml、精子と卵子の共培養（受精）は 6 時間、精子濃度は 1×10^5 cells/ml (雄 A, B および C)、または $1\text{-}3 \times 10^4$ cells/ml (雄 D および E) で行った。また、本実験では、共培養後、卵子に付着している余分な精子を取り除いた後、BMOC-2 溶液 (Cheng, 1985)（付表２）で４時間の培養を行ない精子侵入を観察した。

実験２．精子の前培養時間が精子侵入卵子率におよぼす影響

本実験では、3 頭の異なるランドレース種の雄豚 (F, G および H) から採取した精液由来の精子を用いて、精子の前培養時間、および前培養培地への BSA の添加が、卵子への精子侵入におよぼす影響を観察した。

精液を洗浄後、BSA を添加 (PM-BSA) あるいは無添加の前培養培地 (PM-PVA（付表１）) 中で、前培養を行った。前培養時の精子濃度は、1×10^8 cells/ml とした。精子の前培養時間および前培養培地中の BSA が、精子の体外受精能におよぼす影響を明らかにするため、雄 F 精子は、0, 1.5, 4, 8 および 12 時間の前培養を BSA 無添加培地 (PM-PVA) で行い、同時に 1.5 時間区については、BSA 添加前培養培地 (PM-BSA) で前培養を行った。雄 G 精子は、0, 1.5, 4 および 8 時間の前培養を、BSA 添加 (PM-BSA)、あるいは無添加前培地 (PM-PVA) 中で行った。雄 H 精子については、BSA 無添加前培地 (PM-PVA) 中で 1.5 時間の前培養を行った。いずれの精子も、前培養後、体外成熟培養を行った卵子と８時間の共培養を FM-PVA（付表１）中で行った (精子濃度: 1×10^6 cells/ml)。同時に、卵子との共培養直後および 共培養８時間後に運動性のある精子割合（精子活力）を位相差顕微鏡で観察した。

2．結　果

（1）異なる雄から採取した精液由来の精子を用いた体外受精結果の比較（実験1）

由来する雄による精子の受精能を比較するため、異なる雄から採取した精子を用いて体外受精を行った結果を、表2－1、および表2－2に示した。まず、精子濃度1 x 10^6 cells/ml で雄A, BおよびC由来の精子を用いた体外受精の結果、精子侵入卵子率に23から97%までの大きな差が認められた（表2－1）。同様に、1-3 x 10^4 cells/ml で雄DとE由来の精子を用いた精子侵入卵子率を比較した場合にも、59から84%と、雄個体間に有意な差が認められた（表2－2）。

（2）精子の前培養時間が精子侵入卵子率におよぼす影響（実験2）

精子の前培養時間が体外受精結果におよぼす影響を見るため、異なる時間、前培養を行った精子を用いて体外受精を行った。精子の前培養時間が長くなるにともない、精子侵入卵子率が高まり、単精子侵入率が低下する傾向が認められた（表2－3）。雄F精子を用いた場合、1.5時間の前培養(13%)に比較して8時間の前培養を行ったものでは有意に高い精子侵入卵子率(58%)を示した。同様に、雄G精子を用いた場合、8時間の前培養を行った精子を用いた時に最も高い精子侵入卵子率を示した(70%)(0, 1.5, 4時間の前培養区で、それぞれ2, 2, 10 %の精子侵入卵子率）。また、1.5時間の前培養を行った雄H精子は、3頭の雄のうち最も高率な精子侵入卵子率を示し(74%)、精子の前培養時間および精液を採取する雄個体間で、精子の卵子へ侵入する能力に差が見られた。それぞれBSAを含む、および含まない前培養培地で1.5時間の前培養を行った精子を用いた場合、雄F精子では、3および2%、雄G精子では4および2%であり、また、雄G精子を用いた場合、どの前培養時間の区においても、前培養培地中のBSAの有無によって、前培養培地中へのBSAの添加は精子侵入卵子率を上昇させる効果は認められなかった。さらに、運動性のある精子割合は、雄Gについて8時間培養後の精子活力が著しく低下していたが、精子侵入卵子率との関連は見られなかった。

表２－１．採取した雄の違いによる精子の受精能の比較（１）[¶]

雄	供試卵子数	精子侵入卵子数 (%)
A	74	63 (79.1)[a]
B	87	20 (23.0)[b]
C	77	75 (97.4)[c]

[¶]受精時の精子濃度：1 x 10^5 cells/ml
[a,b,c] 異なる肩文字を持つ値の間に有意差あり（$P < 0.01$）

表２－２．採取した雄の違いによる精子の受精能の比較（２）[¶]

雄	供試卵子数	精子侵入卵子数 (%)
D	178	149 (83.7)[a]
E	133	78 (58.6)[b]

[¶]受精時の精子濃度：1-3 x 10^4 cells/ml
[a,b] 異なる肩文字を持つ値の間に有意差あり（$P < 0.01$）

表２－３．精子の前培養時間および前培養培地中の BSA の有無が精子の卵子への侵入におよぼす影響[¶]

雄	反復	前培養時間 (h)	前培養培地中の BSA の有無 (+/-)	卵子数 侵入/供試[#] (%)	卵子数 単精子侵入 (%)	平均侵入精子数	精子活力 (%) 受精培地に移した直後	精子活力 (%) 受精終了後
F	4	0		1/ 48 (2.2)^{abh}	1 (100.0)	1.0	60－70	90
	4	1.5	－	9/ 71 (12.7)^{be}	8 (88.9)	1.1	80－90	90
	3	1.5	＋	2/ 81 (2.5)^{a}	2 (100.0)	1.0	70－80	90
	4	4	－	16/ 48 (33.3)^{c}	13 (81.3)	1.3	80－90	80－90
	4	8	－	30/ 52 (57.7)^{d}	20 (66.7)	1.5	70－80	80
	4	12	－	12/ 49 (24.5)^{ce}	8 (66.7)	1.3	50－60	70－80
G	4	0		2/114 (1.8)^{a}	2 (100.0)	1.0	70－80	40－60
	4	1.5	－	3/147 (2.0)^{a}	3 (100.0)	1.0	80－90	90－95
	4	1.5	＋	4/109 (3.7)^{ag}	4 (100.0)	1.0	80－90	90－95
	4	4	－	7/ 74 (9.5)^{bg}	5 (71.4)	1.3	90－95	90－95
	4	4	＋	10/ 68 (14.7)^{bh}	10 (100.0)	1.0	90－95	90－95
	4	8	－	80/115 (69.6)^{df}	37 (46.3)	2.0	30－40	10－30
	4	8	＋	73/113 (64.6)^{df}	30 (41.1)	2.2	30－50	10－20
H	3	1.5	－	55/ 74 (74.3)^{f}	22 (40.0)	2.0	60－70	60－70

[¶] 受精培地は、すべての実験区で同種（FM-PVA）

[#] 卵核胞崩壊卵子

$^{a-h}$ 異なる肩文字を持つ値間で有意差あり（$P < 0.05$）

（3）結果の要約

本節では、精液を採取する雄の違い、および精子の前培養時間により、受精結果に大きな影響を与えていた。精液を採取した雄個体間で、精子侵入卵子率に有意な差が認められた。精子の前培養時間を0から8時間へと長くするに伴い、精子侵入卵子率は高まるが、単精子侵入率は逆に低下する傾向が認められた。また、1.5時間の前培養であっても高い精子侵入卵子率を示す個体もあった。さらに、前培養培地へのBSAの添加は精子侵入卵子率、単精子侵入率、平均侵入精子数に影響をおよぼさなかった。精子活力は、個体、前培養時間、BSAの有無間に差はなく、精子侵入卵子率、単精子侵入率、平均侵入精子数との関連性も認められなかった。

第3節　パーコール法で分離した射出精液由来精子の受精能

ブタ体外受精では前培養した精子を用いるのが一般的である。一方精子の分離法として知られているパーコール法では、分離後に前培養を行わずに体外受精に用いている。本節では、より一般的な洗浄・前培養法およびパーコール溶液を用いない洗浄法を対照に、射出液状保存精液由来精子のパーコール処理が卵子への侵入能におよぼす効果を検討した。

1．材料および方法

卵子の準備

卵子の洗浄には、TCM199-Hepesを、卵子の体外成熟培養には、Way-FCSを用い、本章第2節の方法にしたがって卵子を準備した。

精子の準備

本節では、大ヨークシャー種の雄豚から採取した射出液状保存精液由来の精子を用いた。

精子の分離、洗浄法

精子の分離・洗浄法としてパーコール法を用いた。対照区として、一般的な遠心洗浄・前培養法、およびパーコール溶液を用いない洗浄法を用いた。

1）パーコール法による精子の分離

70および35%のパーコール溶液を、塩類濃度がHTM（Hepes緩衝タイロード溶液: 138 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 5 mM glucose, 0.4 mM $MgSO_4$,0.3 mM NaH_2PO_4, 20 mM Hepes）と等しくなるように調製し、試験管内に下層を2 ml 70%、および上層を

4 ml 35% パーコール溶液で二重層を作成した。このパーコール溶液の二重層上に HTM で希釈した 1 ml の精液を重層した後、200 g, 5 分間、続いて、1,000 g, 15 分間の遠心を行ない、最下層部に沈殿した精子をパーコール分離精子として用いた（図２－１）。

体外受精は本章第２節の方法にしたがって行った。パーコール法で処理した精子は前培養を行わず、受精培地 (FM-BSA) で再懸濁後、受精培地中で体外成熟培養を行った卵子と精子濃度 2×10^5 cells/ml で共培養を行った。6 時間の共培養後、一部の卵子を固定した。また、残りの卵子は、余分に付着した精子を除去した後、BMOC-2 溶液中でさらに 4 時間培養した後固定した。いずれの卵子についても核相を調べ、雌性前核の状態については、核膜が形成されつつあるものを「初期」、完全に形成されているものを「完全」な前核として判断した。

２）通常の洗浄法（通常法）

濃厚部精液を Saline-BSA で 5 ml になるように懸濁し、1,200 g, 3 分間の遠心を行い、上清を除去した。沈殿した精子を再懸濁し、遠心をさらに 2 回行った（通常法）。

通常法では、精子を洗浄後、沈殿した精子を 4 ml の前培養培地 (PM-BSA) で懸濁し、1.5 時間の前培養を行った（精子濃度: 4×10^8 cells/ml)。前培養の終了した精子を、受精培地中の体外成熟培養を行った卵子と共培養した。すべての卵子は、6 時間の精子との共培養後、洗浄し、BMOC-2 溶液で 4 時間の培養を行った。

３）対照となる洗浄法（対照法）

パーコール法で用いたパーコール溶液は生理的条件にするために HTM で希釈している。パーコール法との比較のため、対照法では精液を 5 ml の HTM に 0.5 mg/ml PVP、および、0.5 mg/ml PVA を添加した溶液で希釈し、1,200 g, 3 分間の遠心を行った。上清を除去し、同様に沈殿した精子を同じ HTM 溶液で希釈、遠心を 2 回行った。体外受精およびその後の卵子は、１）と同様に処理を行った。

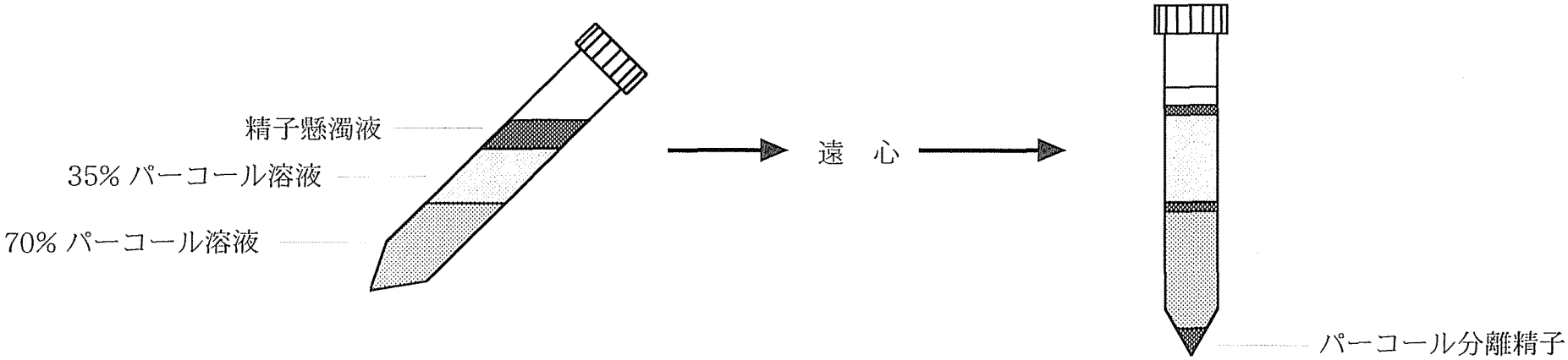

図２－１．パーコール法による精子の分離方法

生理的塩類組成になるように調製したパーコール溶液を作成し、試験管内にパーコール濃度の高い溶液を下層にして重層した。精子懸濁液を最上層に静かに重層したのち、遠心を行った。遠心後、最下層に沈殿した精子をパーコール分離精子として用いた。（方法の詳細は、材料および方法の項目を参照）

2．結　果

体外受精に用いる射出精液由来精子の処理法を検討するため、パーコール法、通常行われている洗浄・前培養法および対照となる洗浄法を行った精子を用いて体外受精を行い、受精結果を比較した。BSA を含まないパーコール溶液（パーコール法）あるいは洗浄液（対照法）で分離、洗浄した区と、BSA を含む通常法の精子侵入卵子率に差はなく、ともに高かった（表２－４）。このことは、精子の洗浄過程で BSA を添加しない場合でも、あるいは前培養を行わない場合でも精子の受精する能力を低下させないことを示している。精子と卵子の共培養を６時間行った卵子と、共培養後に洗浄し、精子の存在なしにさらに４時間（合計１０時間）の培養を行った卵子との間の精子侵入卵子率に差は見られなかったことから、精子の卵子への侵入は、ほとんどの卵子で最初の６時間に起こっていることを示唆している。また、10 時間と６時間の培養時間で、卵子の核相の状態に差が見られた。しかしながら、パーコール法で分離した精子および対照法で洗浄した精子を用いた場合に差は見られず、わずかにこの２区の間では６時間の培養で、対照法で早期の精子の侵入が認められる。すなわち、本実験では、パーコール法による精子の受精能促進効果を示すことはできなかった。

表２－４．パーコール処理が射出精液由来精子の卵子への侵入能におよぼす影響[¶]

精子の処理法	精子と卵子の共培養開始後の時間 (h)	供試卵子数[#]	精子侵入卵子数 (%)	精子の侵入を受けた卵子の核相[§]						
				MI	TI	MII	AII	TII	雌性前核[‡] 初期	雌性前核[‡] 完全
パーコール法	6	34	32 (94.1)	0	0	2	4	5	10	11[a]
対照法	6	37	35 (94.6)	0	1	1	2	5	5	21[b]
パーコール法	10[$]	36	36 (100)	0	0	1	0	0	0	35[c]
対照法	10[$]	38	37 (97.4)	0	0	1	0	0	0	36[c]
通常法（前培養）	10[$]	35	35 (100)	同定せず						

[¶] 2反復の結果

[#] 卵核胞崩壊卵子

[$] 精子と卵子の共培養後に、精子の存在しない状態で4時間の培養を行ったもの

[§] MI, TI, MII, AII およびTII は、それぞれ、 metaphase I, telophase I, metaphase II, anaphase II およびtelophase II

[‡] 前核膜を形成しつつある前核を初期、形成している前核を完全とした

[a,b,c] 異なる肩文字を持つ値間に有意差あり ($P < 0.05$)

第４節　パーコール法で分離した精巣上体精子の受精能

射出精液由来精子を用いた前節の体外受精結果では、通常法や対照法で高い精子侵入卵子率を示していたため、パーコール法にこれらの方法に比較して精子侵入卵子率を高める効果は認められなかった。本節では、さらに、凍結融解精巣上体精子に対するパーコール法の有効性を検討するため、精子の運動特性に関する各パラメータについて運動性解析装置を用いて調べるとともに、体外受精に用いて受精結果を比較した。

１．材料および方法

精子の凍結保存と融解

本実験では、と畜場で採取した４頭の雄ブタ（PRP, PNK, YEL および BLE）の精巣上体から回収し、凍結保存後融解した精子を用いた。精液の凍結は、Nagai ら（1988）による報告を改良した方法で行った。まず、適当な太さ（1~2 mm）の精巣上体尾部管部位を直線状にほぐし、輸精管側から、先端の鋭利部分を加工した 18 ゲージの注射針を 挿入し、50 ml のプラスチック注射筒を装着した後、空気圧で精巣上体尾部精子を試験管内に回収した。回収した精子を WS-PVA（付表１）で２回洗浄（600 g, 10 分）後、沈殿した精子を BF-5 溶液（Pursel & Johnson, 1975）で、２倍量に希釈、懸濁した。精子懸濁液の温度を３時間かけて徐々に５℃ に下げた。冷却した精子懸濁液を、6%（v/v）グリセロールを含む BF-5 溶液で、さらに２倍量になるように希釈、懸濁した（最終グリセロール濃度：3%）。精子懸濁液を0.5 ml のプラスチックストローに入れ、まず、液体窒素上４cm の位置に設けた台上に精子懸濁液の入ったストローを並べ、ふたをして３０分間放置した。続いて、ストローを液体窒素中に保持し、使用まで液体窒素中で保存した。凍結精液の融解は、ストローを 35 ℃の温湯中に 15 秒程度保持し、空気の泡が出なくなった直後に 20 ℃の水中に１分間保持して行った。

パーコール法による精子の分離

実験1では一層の、実験2および3では二層のパーコール溶液による分離法を用いた。まず、特定の濃度のパーコール溶液を、10倍の塩類濃度にしたWS-PVAと混合することで作成した。精子は5 ml WS-PVAで懸濁し、洗浄した(600 g, 8分)。沈殿した精子をWS-PVAで精子濃度が1×10^8 cells/mlとなるように懸濁し、1 mlの精子懸濁液を試験管内にあらかじめ準備しておいた溶液の上に重層した。実験1では一層のパーコール溶液を、実験2および3では二層のパーコール溶液を用いて精子を処理した区をパーコール分離区、いずれも対照としてパーコール溶液をWS-PVAに置き換えた区を対照区(whole fraction: FRW)とした。その後、200 g, 5分、続いて900 g, 15分間の遠心を行った。パーコール法で分離した精子は、上層を除去後、精子を含む最下層をWS-PVAで3 mlにした。対照区は、上清を除去し、沈殿した精子をWS-PVAで3 mlに希釈した。パーコール溶液を除去するため、また、条件を同じにするため対照区も同様に600 g, 8分で2回の遠心、再懸濁を行った。大気中で行う運動特性の解析には、行うため、pHの急激な変化を避ける目的でHepes濃度を高めた受精培地(Pig-FM-Hepes: 111 mM NaCl, 4 mM $NaHCO_3$, 20 mM Hepes, 他はPig-FMと同様)で、体外受精用には受精培地(Pig-FM: 付表2)でパーコール分離区、あるいは対照区の精子を再懸濁した。精子の洗浄、分離は20 ℃、大気中で行った。

精子の運動特性の解析

精子の移動軌跡に係わる各種パラメーターを、精子運動性解析装置(Motility Analyzer, Hamilton Throne, IVOS, Version 10.6)で解析した。解析パラメータの設定は以下のようにした; frames acquired: 30, frame rate: 60 Hz, minimum contrast: 80, minimum cell size: 5 pixels, minimum static contrast: 1, straightness threshold: 50%, low VAP cut off: 5.0 μm/s, medium VAP cutoff: 25.0 μm/s, head size non-motile: 5, head intensity non-motile: 80, static head size: 0.33 to 2.50, static head intensity: 0.38 to 2.00, temperature set: 38.5。出力画面上で、プ

レイバック機能、スローモション機能を利用して設定を行い、誤って判断される精子を可能なかぎり減らした。測定した項目は、認識された精子に占める運動精子割合(Motile)、激烈に運動している精子割合 (VAP > 25.0 μm/s, STR > 50) (Progressive), および運動精子の平均軌跡速度 (average cell path velocity: VAP), 直線軌跡速度 (straight line velocity: VSL), 曲線速度 (curvilinear velocity: VCL), 頭部転移振幅 (amplitude of lateral head displacement: ALH), 横切頻度 (beat cross frequency: BCF), 直進性 (平均値) (straightness: STR = VSL/VAP)、そして直線性 (平均値) (linearity: LIN = VSL/VCL) である。観察の直前に 10 μl の精子懸濁液 (5×10^7 cells/ml) を、観察用チャンバー (Makler chamber) 上に置いた直後に、解析を開始した。その際、出力画面上で、プレイバック機能、およびスローモーション機能を使い、凝集した精子数を数えた。カウントされた総精子数に占める凝集した精子数 (凝集精子割合) および凝集した精子群数の割合を求めた。1サンプルあたり、少なくとも5視野を解析した。精子の軌跡を追跡にあたっては、1実験区あたり 276 から 2075 個の精子を検査し、3回以上の反復を行った。

体外受精

卵子の洗浄には WS-PVA を、体外成熟培養には Way-FCS の基礎培地を TCM199 に変更した TCM199-FCS を用い、45 時間の体外成熟培養を行った。受精培地には、Pig-FM を用い、受精時の精子濃度は、1×10^6 cells/ml で行った。体外受精には、二層のパーコール溶液で分離した精子 (FR75)、および対照区の精子 (FRW) を用い、精子と卵子の共培養を8時間行った。

実験1．パーコール濃度の違いによる精子の分離能

パーコールの精子を分離する効率を調べるため、15 (FR15), 30 (FR30), 45 (FR45), 60 (FR60), 75 (FR75) および 90% (FR90) 濃度の一層のパーコール溶液で精子を分離した。精子濃度は、分離前後に血球計算盤を用いて算出した。分離後の精子は、最下層の

分画から回収したものであり、分離前の精子数に対する分離後の精子数の割合を求めた。

実験２．パーコール法で分離した精子の運動特性

本実験では、実験１である程度の精子の選別能に差が見られた濃度のパーコール溶液を用い、二層（上層：２ml 60%、下層：２ml 75%）にした溶液を使用した。対照区は、4 ml の WS-PVA をパーコール法と比較するための洗浄時に用いた。洗浄、希釈した精子は、Pig-FM-Hepes 中で、15 または 90 分間培養（39 ℃、大気中）し、パーコール分離精子（FR75）、および対照区の精子（FRW）の軌跡を解析した。

実験３．パーコール法で分離した精子の受精能

二層のパーコール溶液（実験２と同様）で分離した精子の受精能を見るため、それらを体外成熟培養した卵子と共培養した。

統計処理

得られた結果は、StatView プログラム（Abacus Concepts, Inc.）を用いて分散分析（ANOVA）を行った。さらに、それぞれの実験区間の比較には、フィッシャーの PLSD test を行った。百分率表記のデータは、分析の前にアークサイン変換を行った。体外受精結果は、カイ２乗検定あるいはフィッシャーの直接確率検定、およびスチューデントの t 検定を行った。有意水準が 0.05 以下の場合に統計的に有意であると判断した。

２．結　果

（１）パーコール濃度の違いによる精子の分離能（実験１）

パーコール濃度の違いが精子の分離能におよぼす影響を見るため、一層の異なる濃度のパーコール溶液で精子を分離し、その分離能を調べた。最下層の精子の回収率は、パーコール濃度が上昇するにつれ減少する傾向があったが、対照区（FRW）とパーコール濃

度15から45%(FR15からFR45)までの間(100-86%)、および、パーコール濃度75%(FR75, 14%)と90%(FR90, 2%)との間に差は認められなかった（図２－２）。一方、パーコール濃度45%(FR45, 86%)と60%(FR60, 39%)の間($P<0.01$)、および60%(FR60)と75%(FR75, 14%)の間($P<0.05$)には差が見られた。

（２）パーコール法で分離した精子の運動特性（実験２）

パーコール法で分離した精子の運動特性を明らかにするため、パーコール法および比較のために対照法で処理した精子の運動特性をCASA装置を用いて調べた。75%のパーコール溶液で分離した精子(FR75)は、運動精子割合(Motile)($P<0.01$)、激烈に運動している精子割合(Progressive)($P<0.01$)、いずれの雄においても対照区(FRW)に比較して有意に高いことを示している（表２－５）。すなわち、パーコール法で、運動および激烈に運動している精子を選別することができる。しかし、Motile、Progressiveともその精子割合は培養時間、雄間にも有意な差が認められ（表２－６）、培養時間が長くなるにしたがって有意に低下した。いずれの精子割合も培養15分より90分で、分離方法間の差がより明確で、パーコール法が対照区より高いことが認められた。Motileについて、培養１５分では、雄PRPとPNKが高いが、90分の培養後では、雄BLEが最も高く、培養時間により雄の順位に変動が認められた。運動パラメータについて、FR75のSTRとLINは、FRWの値よりも高く($P<0.05$)、分離法間に差が認められ、15分間培養した精子のALHは、90分間培養した精子よりも高かった（表２－７，８）。一方、それ以外のパラメータには、パーコール分離したものと対照区との間、および培養時間の違いによる明確な傾向は見られなかったが、雄の要因は、すべてのパラメータに影響をおよぼしていた($P<0.05$)。また、雄-YELのVAP, VCL, ALHは、他の雄の精子の値に比較して高く($P<0.01$)、雄-BLEのVSLは、雄-PNKおよび-YELの値に比較して低い傾向が認められ($P<0.05$)、雄-PRPのALHは、雄-PNKに比較して高く($P<0.01$)、雄-PRPおよび-BLEのBCFは、雄-PNKおよび-YELの値に比較して高かった($P<0.05$)。さらに雄-PNKのSTRとLINは、他に比較して高く

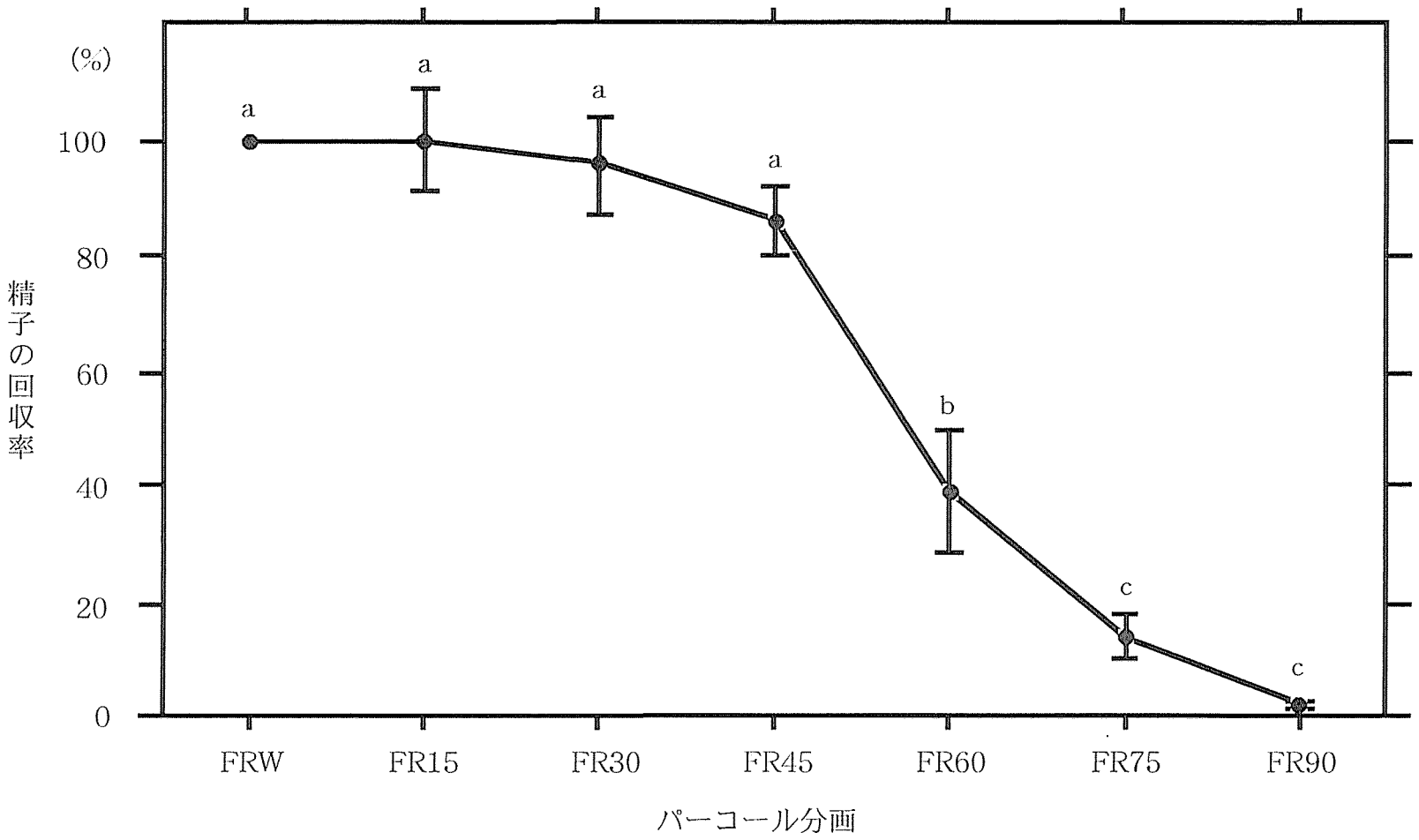

図２－２．パーコール濃度と精子の分離能

単相のパーコール溶液で精子を分離し、分離前の精子数に対する分離後の精子数の割合を算出した。パーコール分画、FRW, FR15, FR30, FR45, FR60, FR75, および FR90 は、それぞれ未分離、15, 30, 45, 60, 75, および 90% 濃度のパーコール溶液で分離した分画を示す。値は平均値 ±SD。

a-c 異なる文字を持つ値間で回収効率に有意差があることを示す($P < 0.05$)

表２－５．パーコール分離法が運動精子率（Motile）および激烈に運動する精子率（Progressive）におよぼす影響

雄	培養時間	パーコール分画	精子割合 ± SD ¶ Motile	精子割合 ± SD ¶ Progressive
PRP	15 分	FRW	35.4 ± 6.5	7.3 ± 3.1
		FR75	68.5 ± 3.2 a	12.2 ± 2.5
PNK		FRW	18.0 ± 12.7	4.9 ± 4.8
		FR75	63.9 ± 10.6 a	14.2 ± 4.4 a
YEL		FRW	28.8 ± 7.9	4.2 ± 2.7
		FR75	39.3 ± 3.0	6.0 ± 0.9
BLE		FRW	24.5 ± 6.7	3.1 ± 2.3
		FR75	53.4 ± 2.6 a	18.9 ± 1.1 a
PRP	90 分	FRW	7.9 ± 1.0 b	1.0 ± 0.8 b
		FR75	38.0 ± 10.5 ab	8.3 ± 5.5 a
PNK		FRW	5.0 ± 5.0 b	0.8 ± 1.1 b
		FR75	19.9 ± 5.2 ab	7.0 ± 3.4 ab
YEL		FRW	8.8 ± 4.0 b	0.4 ± 0.6 b
		FR75	30.7 ± 6.9 a	6.4 ± 1.5 a
BLE		FRW	13.1 ± 3.1	0.5 ± 0.4
		FR75	59.6 ± 4.3 a	29.1 ± 6.0 a

¶ Motile: 検査精子のうち運動している精子の割合、Progressive: 検査精子のうち激烈に運動している精子の割合

a FRW 区と FR75 区間に有意差あり（$P < 0.05$）（同一雄、同一培養時間内）

b 培養時間１５分区と９０分区間に有意差あり（$P < 0.05$）（同一雄、同一分離フラクション内）

表２－6. 運動精子率 (Motile) および激烈に運動する精子率 (Progressive) の分散分析結果¶

要因	Motile	Progressive
雄	**	**
分離	**	**
時間	**	**
雄×分離	−	**
雄×時間	**	−
分離×時間	−	*
雄×分離×時間	*	−

¶アークサイン変換後の分析結果

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

表２－7. バーコール分離後の精子の運動パラメータ

雄	培養時間	バーコール分画	運動パラメータ ± SD [¶]						
			VAP (μm/s)	VSL (μm/s)	VCL (μm/s)	ALH (μm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)
PRP	15 分	FRW	63.4 ± 47.5	38.3 ± 43.6	157.3 ± 81.8	7.7 ± 4.0	34.0 ± 24.8	56.3 ± 30.1	23.9 ± 20.2
		FR75	69.2 ± 47.6	39.4 ± 41.4	155.9 ± 82.2	7.6 ± 4.1	33.5 ± 23.1	53.8 ± 28.3	25.7 ± 19.7
PNK		FRW	66.2 ± 46.8	41.0 ± 42.1	153.4 ± 84.8	7.1 ± 4.1	31.8 ± 23.5	60.4 ± 27.9	29.2 ± 21.1
		FR75	66.8 ± 48.9	42.1 ± 41.7	148.1 ± 80.7	7.1 ± 3.9	30.5 ± 22.2	60.8 ± 24.6	29.3 ± 19.6
YEL		FRW	83.2 ± 61.2	40.3 ± 49.6	175.0 ± 104.8	8.4 ± 5.1	27.0 ± 26.2	46.8 ± 31.1	24.6 ± 22.9
		FR75	76.7 ± 55.8	40.8 ± 47.4	169.4 ± 95.0	8.3 ± 4.6	28.6 ± 25.5	49.1 ± 29.1	25.1 ± 22.4
BLE		FRW	45.5 ± 32.1	22.4 ± 25.7	110.9 ± 63.4	5.6 ± 3.5	29.4 ± 24.9	48.7 ± 29.2	21.5 ± 17.7
		FR75	60.3 ± 34.2[a]	33.3 ± 28.2	143.7 ± 70.7[a]	7.0 ± 3.7[a]	33.1 ± 20.3	53.0 ± 29.1	25.2 ± 19.3
PRP	90 分	FRW	53.2 ± 50.1	33.8 ± 53.0	111.1 ± 72.6[b]	5.7 ± 3.5[b]	26.0 ± 27.8	51.1 ± 38.2	27.9 ± 30.6
		FR75	59.6 ± 41.8	34.5 ± 35.8	135.6 ± 84.1[b]	6.8 ± 4.1[b]	33.4 ± 23.9	55.1 ± 31.5	28.8 ± 24.6
PNK		FRW	75.4 ± 73.3	46.9 ± 74.1	136.6 ± 88.1	6.1 ± 3.4	29.8 ± 22.6	51.3 ± 31.9	27.3 ± 22.3
		FR75	53.5 ± 37.1[ab]	35.1 ± 32.4[b]	127.1 ± 77.3[b]	5.7 ± 3.8[b]	28.7 ± 22.1	61.7 ± 25.6	28.5 ± 20.4
YEL		FRW	91.9 ± 83.6	46.4 ± 68.9	191.3 ± 115.8	8.2 ± 4.8	27.6 ± 26.8	40.2 ± 29.3	19.2 ± 20.5
		FR75	80.7 ± 55.6	43.6 ± 50.0	177.9 ± 95.1	8.6 ± 4.4	30.6 ± 25.7	48.7 ± 32.1	25.4 ± 25.5
BLE		FRW	44.6 ± 17.0	18.1 ± 15.9	112.6 ± 49.5	6.3 ± 3.3	46.4 ± 15.5[b]	41.6 ± 27.1	17.2 ± 12.4
		FR75	67.1 ± 32.9	40.6 ± 28.3	150.4 ± 65.8	7.2 ± 3.5	33.5 ± 18.1	59.3 ± 24.6[b]	28.1 ± 17.4

[¶]VAP (average cell path velocity): 平均軌跡速度, VSL (straight line velocity): 直線軌跡速度, VCL (curvilinear velocity): 曲線速度, ALH (amplitude of lateral head displacement): 頭部転移振幅, BCF (beat cross frequency): 横切頻度, STR (straightness:, VSL/VAP): 直進性 (平均値), LIN (linearity: VSL/VCL): 直線性 (平均値)

[a] FRW 区と FR75 区間に有意差あり ($P < 0.05$) (同一雄、同一培養時間内)

[b]培養時間１５分区と９０分区間に有意差あり ($P < 0.05$) (同一雄、同一分離フラクション内)

表２－8. 精子運動パラメータの分散分析結果

要因	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR[¶]	LIN[¶]
雄	**	**	**	**	*	**	**
分離	–	–	–	–	–	**	*
時間	–	–	–	*	–	–	–
雄×分離	*	–	–	–	–	–	–
雄×時間	–	–	*	*	–	–	–
分離×時間	–	–	–	–	–	*	–
雄×分離×時間	–	–	–	–	–	–	–

[¶]アークサイン変換後の分析結果

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

($P<0.01$)、雄-PRP と -BLE の STR は、雄-YEL の値に比較して高い傾向にあった ($P<0.01$)。これらから、運動パラメータについては、パーコール法で分離した精子では、対照法で処理した精子に比較してわずかに STR と LIN が高い傾向が見られるが、他の運動パラメータでは、雄による違いが顕著であることが示された。

凝集精子率は、精子分離法および雄要因に影響を受けており ($P<0.01$)（表２－９，１０）、対照区 (FRW) の精子は、パーコール分離した精子に比較して高い凝集精子率を示した ($P<0.01$) ことから、パーコール分離は凝集する精子を除去することが示唆された。さらに、雄-PRP と -BLE は、雄-PNK に比較してこの値は高く ($P<0.01$)、雄-YEL は、雄-PNK および -PRP よりも高い値を示し ($P<0.05$)、雄間で有意な差が見られた。一方、培養時間は凝集状況に影響しなかった。

（３）パーコールで分離した精子の体外受精能（実験３）

体外受精結果からは、パーコール分離 (FR75) は、雄-PRP および -BLE 精子の卵子への精子の侵入を有意に高め、雄-PNK および -YEL の精子では有意ではなかったが受精能が高い傾向にあり（表２－１１）、パーコール分離により卵子への侵入能の高い精子を選別できる可能性が示唆された。また、対照区 (FRW)、FR75 区ともに雄-PRP および -BLE の精子は、雄-PNK および -YEL の精子よりも高い精子侵入卵子率であり、雄による卵子への精子の侵入能の違い、およびパーコール分離の有用性に差異があることが示唆される。雄-PRP および -BLE 精子では、明らかに、パーコール分離した精子を用いた場合、対照区の精子を用いた場合よりも、単精子侵入率が低かった。一方、パーコール分離精子と対照区の単精子効率には、統計的な有意差は認められなかった。

（４）結果の要約

凍結融解精巣上体精液由来精子を異なる濃度のパーコール溶液で分離したところ、60 から 75% パーコール溶液で有意に選別される精子数が減少した。このため、続く実験では 60 および 75% 濃度にした二層のパーコール溶液を用いて分離した精子を用い、運

表２－９．パーコール分離が精子の凝集におよぼす影響

雄	培養時間	パーコール分画	凝集精子割合[¶] ± SD
PRP	15 分	FRW	4.1 ± 4.5
		FR75	2.0 ± 3.8
PNK		FRW	1.1 ± 0.9
		FR75	0.0 ± 0.0
YEL		FRW	8.7 ± 3.9
		FR75	5.5 ± 4.9
BLE		FRW	8.7 ± 3.6
		FR75	2.8 ± 0.9
PRP	90 分	FRW	3.6 ± 0.9
		FR75	2.7 ± 2.8
PNK		FRW	2.0 ± 1.3
		FR75	0.5 ± 0.6
YEL		FRW	5.1 ± 3.9
		FR75	4.2 ± 2.3
BLE		FRW	6.1 ± 2.9
		FR75	3.2 ± 2.6

[¶] CASA システムに認識された精子数に対する凝集した精子数 (%)

表２－１０．精子凝集に関する分散分析結果¶

要因	凝集精子割合
雄	**
分離	**
時間	－
雄×分離	－
雄×時間	－
分離×時間	－
雄×分離×時間	－

¶アークサイン変換後の分析結果
*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

表２－１１．パーコール分離した精子の受精能

雄	パーコール分画	卵子数 (% ± SE) 供試[#]	精子侵入	単精子侵入	単精子効率±SE	平均侵入精子数 ±SE
PRP	FRW	97	53 (54.6 ± 14.2)[a]	21 (39.6 ± 14.5)[a]	21.7 ± 5.3[ad]	2.8 ± 0.3[a]
	FR75	97	96 (99.0 ± 0.9)[b]	12 (12.5 ± 6.3)[b]	12.4 ± 6.2[ac]	9.2 ± 0.8[b]
PNK	FRW	98	3 (3.1 ± 1.7)[c]	3 (100.0 ± 0.0)[aef]	3.1 ± 1.7[b]	1.0 ± 0.0[ab]
	FR75	90	6 (6.7 ± 3.8)[c]	5 (83.3 ± 8.3)[ag]	5.6 ± 3.5[bc]	1.2 ± 0.2[a]
YEL	FRW	70	0 (0.0 ± 0.0)[c]	–	0.0 ± 0.0[b]	–
	FR75	71	3 (4.2 ± 3.3)[c]	3 (100.0 ± 0.0)[aef]	4.2 ± 2.8[bc]	1.0 ± 0.0[ab]
BLE	FRW	95	37 (38.9 ± 1.6)[d]	28 (75.7 ± 4.5)[ceg]	29.5 ± 0.9[d]	1.2 ± 0.1[c]
	FR75	98	74 (75.5 ± 8.1)[e]	25 (33.8 ± 12.6)[df]	25.5 ± 7.1[d]	3.0 ± 0.3[a]

[#]ＭＩＩ卵子

[a-g]同一項目内で異なる肩文字を持つ値間に有意差あり ($P < 0.05$)

動精子率、激烈に運動する精子率、および運動パラメータをCASAで分析した。いずれの場合も、雄の違いによる差が見られ、パーコール法は、運動精子率、激烈に運動する精子率、およびALHを高めることが示された。これらの精子を体外受精に用いた結果、４頭の雄からの精子の内、２頭の精子についてはパーコール分離をした場合に卵子への侵入能が高まった。

第5節　考　察

本章では、精子の処理方法が体外受精結果におよぼす影響について検討した。まず、異なる雄から採取した液状保存射出精液由来の精子を体外受精に用い、精子の侵入を受けた卵子の割合を比較した。その結果、精子侵入卵子率は雄間で大きく異なっていた(23-97%)（第2節 実験1）。この結果は、雄間、あるいは同一雄であっても採取反復間で体外受精能に差が見られている過去の報告 (Nagai *et al.*, 1990; 高橋と永井, 1990; Wang *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1996) と一致しており、このことが安定した体外受精結果を得ることを難しくする一つの原因となっている。このため、安定した体外受精結果を得るための精子の適切な処理方法が望まれる。

体外受精に用いる精子に対して比較的一般的に行われる処理法として前培養がある (Nagai *et al.*, 1984; Cheng, 1985; 浜野と豊田, 1986; Nagai *et al.*, 1988)。本章で、精子の前培養時間が精子侵入卵子率におよぼす影響を検討したところ、前培養時間が精子の受精能に大きな影響をおよぼしていることが明らかになった。すなわち、雄FおよびGの精子は、前培養時間が長くなるにつれて精子侵入卵子率が高まり、前培養時間が8時間のときに最も高かったが、雄Hは1.5時間で高い精子侵入卵子率を示し、最適な前培養時間は雄によって異なっていることが明らかになった。精子の前培養時間がブタ精子の卵子への侵入能力に影響を与えていることを示している同様な過去の報告もある (浜野と豊田, 1986; Behalova *et al.*, 1993)。一方、前培養を行わない精子を用いた体外受精も報告されているが (Mattioli *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1991; Yoshida *et al.*, 1993)、これらの報告では、卵子は12時間以上の培養後、受精の状況を検査しており、卵子と精子の共培養中に精子の前培養と同様の効果を精子に与えた可能性もある。本章第3節では、洗浄処理のみを行った精子を用いた場合、卵子との共培養後6時間ですでに雌性前核が形成していることが確認できた。凍結融解精子は、受精能獲得している場合、体外で卵子に侵入するためには2から3時間を必要とし (Nagai *et al.*, 1993)、Hunter (1972) は、体内での前核形成は、受精（精子の侵入）後2時間で起こるとして

いる。したがって、本章第3節で用いた射出精液由来の精子には前培養は必要ではなく、また、この実験方法では、比較的速やかに精子の受精能獲得が起こる可能性がある。さらに、前培養培地中のBSAは、精子の卵子への侵入能を高めなかった（第2節実験2）。今後、BSAの必要性に関する詳細な検討が必要である。

続いて液状保存射出精液由来（第3節）および凍結融解精巣上体精子（第4節）をパーコール法で分離し、受精能を検討した結果、液状保存射出精液由来の精子は、パーコール法を行わない場合であっても高率な精子侵入卵子率を示したため、パーコール分離の効果を明確にすることができなかった。一方、凍結融解精巣上体精子をパーコール分離し、体外受精に用いた結果、パーコール法で分離した精子は、通常に洗浄した対照区に比較して、高い運動性と激烈に運動する精子の割合を示し（第4節実験2）、また、精子の卵子への侵入能を高める効果が認められた。しかし、特定の雄から採取した精液由来の精子を用いた場合に、精子侵入卵子率を高める効果の認められない場合があった。

精子の受精能に影響を与える要因

なぜ、精子を体外受精に用いた場合、採取した雄の違い、あるいは同一個体由来の精子であっても採取反復間（高橋と永井, 1990）で精子侵入卵子率に差が見られるのだろうか。一般的な体外受精を行う場合、精子が卵子へ侵入するためには、まず、精子が運動する能力を持ち、卵子に到達することが必要である。一方、第4節の結果からは、運動精子率および激烈に運動している精子割合の高い精子サンプルであっても、必ずしも高い精子侵入卵子率を示していないことが明らかとなった。したがって、精子が卵子に侵入するためには、運動性を持っていることは必要であるが、それだけでは不十分なように思われる。哺乳動物精子の受精には、複雑な精子表面の変化、運動特性の変化等を伴う受精能獲得が必須のプロセスである(Yanagimachi, 1994)。すなわち、高い運動性を有している場合でも、受精能獲得をしていないために受精することができなかった可能性がある。さらに、卵子側の要因も考慮に入れる必要がある。しかしながら、本研究では、実験の反復毎に卵子は同時に回収したものであり、また、各々の実験区に無作為

に配置しており、体外受精試験はいずれも並行して行っているため、卵子の違いが特定の実験区の精子侵入卵子率を低下させた原因になったとは考えにくい。一つの仮説として、細胞膜の脂質二重層の組成および構造は細胞膜の流動性を決定しており(Bretscher *et al.*, 1994)、精子の細胞膜の流動性は受精能と深い係わりがあることが示唆されていること(Davis, 1981; Aitken, 1999)から、低い精子侵入卵子率を示す精子は、主に脂質構造が不適切な細胞膜を持っていることが考えられる。前培養時間による射出精液由来精子の精子侵入卵子率の違いは、培養中に精子の細胞膜脂質の組成および構造が変化したことに起因している可能性がある。すなわち、ある一定時間培養することで、精子の細胞膜が流動化し、精子の卵子への侵入能力を上昇させたことが推測できる。加えて、BSAは精子の細胞膜組成を変化させることが報告されており(Davis *et al.*, 1980)、BSAが培地中に存在することで、精子は容易に受精能を獲得することが示唆されている。しかし、本章の結果からはBSAが精子侵入卵子率に与える効果は認められなかった。

精子の選別と受精能

精子の選別法として、いくつかの方法が知られている。その中で本章では、ウシ精子で広く用いられているパーコール法(Parrish *et al.*, 1995)で選別した精子の受精能について検討した。パーコール法による精子の洗浄は、一般的に用いられてきた、精子を懸濁後、遠心により沈殿させる方法(遠心洗浄法)に比較していくつかの利点がある。可溶化した精漿成分を除去するために、パーコール法は、1回の洗浄でたやすく再懸濁可能な精子の沈殿を得ることができる一方で、後者は、パーコール法と同程度の除去を行うためには、数回の遠心と再懸濁の過程が必要がある。遠心洗浄法では、精漿の可溶化成分を除去することができるにすぎない。パーコール洗浄法は、精子懸濁液中の精漿の可溶化成分を除去するのみならず、ゲル状の物質の除去もできる(Harrison *et al.*, 1992)。パーコール法は、広く細胞の分画に用いられており、また、精子以外の夾雑物も除去することができる(Bolton *et al.*, 1986; Aitken *et al.*, 1992; Avery & Greve,

1995)。このため、パーコール法は、脱受精能獲得因子 (de-capacitating factor) などの受精能獲得を抑制する働きのある精漿成分を効果的に除去している可能性がある。Berger ら (1989) は、パーコール法によって分離されたブタ精子はある程度の受精能獲得を起こしていることを示唆している。さらに、形態の異常なヒト精子は、低い受精率、および、体外受精後の卵子を移植 (embryo transfer: ET) した場合に低受胎率を示し (Kruger *et al.*, 1986)、核クロマチン異常と形態異常精子率の間には相関があることが示唆されている (Liu & Baker, 1992)。パーコール法は、形態異常精子を除去することができ (Hall *et al.*, 1995; Claassens *at al.*, 1996; Gravance *et al.*, 1998)、加えて、Parrish ら (1995) は、パーコール法は扱うことが比較的容易な方法だとしており、上記の問題を解決し、安定した体外受精結果を得るためには有効な方法の一つである。

Arora ら (1994) は、体内でパーコールを用いた場合に有毒な影響は認められず、パーコールは、臨床的に精子の分離に使用されており、パーコールの有害な影響は報告されていないとしている。また、パーコール法で分離した精子を用いて作成した体外受精卵が正常な子ブタに発生しており (Mattioli *et al.*, 1989)、仮にパーコールに有害な作用があるとしても、パーコールは数回の洗浄を行うことで精子懸濁液から除去することができる (Avery & Greve, 1995) ことから、通常の体外受精で行う精子の洗浄により、精子の受精能に対する有害な作用は現れないと考えられる 。Mattioli ら (1989) は、パーコール法で、高い精子侵入卵子率を得ており、Grant ら (1994) は、パーコール法で洗浄した精子を用いた場合、分割する受精卵の割合が上昇することを報告している。これら 2 つの報告では、高精子濃度で長時間の精子の前培養を行っているため、はっきりとしたパーコールの効果を示すことはできていない。また、本研究第 3 節の液状保存射出精液を用いた場合にパーコールの有効性を明確に示すことができなかった。その理由としては、受精培地中の高い Ca^{2+} 濃度、あるいは、前培養なしでも元来高い受精能を持っている精子のサンプルであったことが挙げられる。パーコール法がブタ体外受精において、受精能の低い射出精液由来精子の受精能の改善に有効であることが期待される。

第 4 節では、凍結融解精巣上体精子をパーコール法で分離し、精子の運動特性と受精

能を調べた。パーコール濃度の違いによる精子の回収効率の差を見るため、一層のパーコール溶液で精子を分離したところ、パーコール濃度が高まるにつれ、精子の回収効率は低下し、特に、45 から 60%、および 60 から 75% の間に大きな低下が見られた（第４節実験１）。桝田ら (1988) は、同様な傾向のブタ精子のパーコールの分離効率を示している。しかし、ヒト精子をパーコール法で分離した過去の結果は、本研究の結果とは異なった傾向を示し、40-100% のパーコール溶液上に精子を静置した後、拡散によって分離した場合に、ほとんどの精子は最上層から回収され、続いて最下層に分離された精子が存在しており (21%)、中間層にはごくわずかな精子のみが存在していた (Pousette *et al.*, 1986)。また、ウシ精子の分離には 90% のパーコール溶液が広く使われている (Parrish *et al.*, 1995)。したがって、精子の分離に適切なパーコール濃度は種間で異なっている可能性がある。パーコール法で分離した精子は、精子洗浄のみの対照区 (FRW) に比較して、高い運動精子率、激烈に運動する精子割合を示した（第４節実験２）。一方、体外受精結果におよぼす効果は雄によって異なり、パーコール分離した精子が、対照区に比較して高い精子侵入卵子率を示した場合（雄-PRP および -BLE) およびパーコールの効果が見られなかった場合（雄-YEL および -PNK) があった（第４節実験３）。したがって、パーコール分離法は運動性の高い精子を分離することはできるが、必ずしも受精能のある精子を分離できるわけではないことを示している。パーコール法で分離した精子が、高い運動性を示しているにも係わらず、低い受精能しか持っていない場合があることの詳細な理由は、本研究からは明らかではない。

パーコール法で分離した精子が高い運動性を持っていたにも係わらず、低い精子侵入卵子率を示した理由として、受精能獲得ができなかったこと、凍結融解によって精子の先体あるいは細胞膜が損傷し、パーコール法では損傷を受けた精子を除去できなかったことなどが考えられる。低い精子侵入卵子率を示した雄の精子サンプル中には、自然発生的な先体反応を起こして先体が剥離し、受精に係わることができない精子 (Krogenaes *et al.*, 1994) が多く存在していた可能性もある。また、精子に傷害を与える反応性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) (Aitken, 1999) は、精液中の白血球

によって産出され(Aitken *et al.*, 1992)、精子細胞膜の流動性を低下させるといわれている(Zalata *et al.*, 1998)。パーコール法は白血球を除去できる(Bolton *et al.*, 1986; Aitken *et al.*, 1992; Avery & Greve, 1995)ことから、特定の雄の精子に対して白血球由来のROSの有害な作用があったとは考えにくい。現在では、受精能獲得を示唆する変化はCTC法で(Wang *et al.*, 1995)、低い精子侵入卵子率の精子に係わる原因の一つであると考えられる細胞膜の損傷はPI-CFDA法で(Harrison & Vickers, 1990)、さらに、先体の正常性はいくつかの先体染色法(Cross & Meizel, 1989)で追跡することが可能である。今後、凍結融解処理、およびパーコール分離法が、精子の機能的な変化、形態異常、あるいは精子細胞膜脂質組成にどのような影響を与えているのかについて、上記の方法を用いて詳細に追跡し、さらにそれらを体外受精結果と比較することで、精子サンプル間の差、および精子の分離に最適なパーコール処理方法を検討する必要がある。

CASAの有効性

CASAシステムを用いることで、精子の「動き」を追跡することができる。精子の受精能と運動特性パラメターの関係について調べているいくつかの研究がある(Grunert *et al.*, 1989; Mortimer *et al.*, 1995)。しかし、標準となる方法や解析条件の設定は研究ごとに異なっているので、得られた結果から精子の受精能を判断する場合には、注意が必要である(Mortimer *et al.*, 1995)。本節ではCASAで得られたパラメータと精子侵入卵子率の間に明確な関係を見出すことはできなかった。たとえばハイパーアクティベーション(超活性化現象)を起こしており、前進性はないが激烈に回転運動をしている精子(Mortimer *et al.*, 1995)などについては、解析条件を厳密にすることなどにより詳細に検討する必要があるのかもしれない。ヒト精子では、低いALH値と、体外受精の失敗との関連性が示唆されている(Jeulin *et al.*, 1986)。加えて、CASAで得られる精子のパラメータと精子侵入卵子率との関連性について、重回帰による解析が試みられている(Mortimer *et al.*, 1995)。しかしながら、Oehningerら(2000)は、一つのCASAパラメータのみが受精能との間に相関を示すとは考えにくく、受精能を推測することは

困難であろうとしている。さらに、古くから行われている方法、たとえば顕微鏡観察による形態異常率の算定などは、CASA で得られた結果よりも、精子の受精能を適確に推測できるように見える (Grunert *et al.*, 1989)。いずれの場合でも、Tomlinson ら (1999) が精液のパラメータ値に関する論文で言及しているように、哺乳動物の正常な受精では、一つの卵子に侵入するのは、ただ一つの精子であることを忘れてはならない。すなわち、CASA では、精子群を調べており、必ずしも受精する（予定の）精子を追跡しているわけではない。したがって、CASA で得られたパラメターを、精子の受精能を予測する手段にすることは矛盾があるのかもしれない。以上より CASA パラメターと受精能との関連について明らかにするためには、より適切な解析条件、得られた数値の統計処理方法などのさらなる検討が必要である。さらに、本研究では、精子の凝集状況について、詳細に追跡することができた。精子の凝集状況と受精能との関連は明らかにはできなかったが、パーコール分離によって、凝集した精子の割合は減少する傾向にあり、また、凝集状況には、雄間で違いが見られた。凝集状況と、受精能との関係についても、今後さらに検討していく必要がある。CASA を用いることで、精子の凝集状況を追跡することが比較的容易となるため、凝集状況の観察に、CASA を適用することが期待できる。

本章では、雄毎、あるいは精液毎に、前培養やパーコールによる精子の選別などの適切な処理が必要であることが明らかになった。比較的高く安定した体外受精結果を得るためには、CASA の利用により簡便に適切な処理条件が決定できるようにする必要がある。受精能力が異なる精子すべてについて体外受精が可能である方法は現在のところ確立されていないが、体内の状態を参考にして、受精環境、たとえば、精子の受精能獲得を効果的に促進するような受精培地などを改善していくことが必要であろう。

第6節　要　約

本節では、まず、異なる雄から採取した射出精液由来の精子を用いた体外受精を行い、精子侵入卵子率を比較したところ、雄の違いによる差がはっきりと現れた（第2節）。次に、異なる雄から採取した射出精液由来の精子を用いて、体外受精を行い、精子の前培養時間が精子侵入卵子率におよぼす影響を比較した。その結果、精子の前培養時間は、精子の卵子への侵入能に大きな影響をおよぼしており、また、雄によって最適な前培養時間は異なっていた（第2節）。したがって、あらかじめ、条件設定を行い、体外受精を行う必要があることが示された。続いて、パーコール法で分離した精子を用いて体外受精を行ったところ、射出精液由来精子を用いた場合では、元来精子の受精能が高く、パーコール法の明確な効果は現れなかった。また、この精子サンプルは、前培養が必要ではないことが示唆された（第3節）。凍結融解精巣上体精液由来の精子を、パーコール法で分離し、パーコール濃度の違いによる精子の分離効率を検討したところ、パーコール濃度が45-60%、および60-75% の間に、回収される精子割合の急激な減少が見られた。また、二層のパーコール(60, 75%)を用いて分離した精子を体外受精に用いたところ、パーコール法を用いない場合に比較して精子侵入卵子率を上昇させる効果が見られた一方で、雄によってはその効果が認められないものもあった。同時にパーコール分離した精子の運動特性をCASAで調べた結果、パーコール法で分離した精子の運動率、および激烈に運動する精子割合の上昇が見られた。しかし、体外受精結果の精子侵入卵子率と、運動性との明確な関係はなかった（第4節）。以上から、低い精子侵入卵子率を示す精子を用いて安定した体外受精結果を得るためには、低い精子活力が疑われる場合には、パーコール法を用いて選別した精子を用い、それ以外の場合には、精子の前培養時間を長くすることが有効であることが示唆された。しかし、パーコール法で分離した精子を用いた場合、必ずしも高い精子侵入卵子率を得られたわけではなく、今後の手法の一層の改良が求められる。また、精子の受精能獲得状況、先体の正常性、細胞膜の正常性といった精子の生理的状態が精子の受精能に深く係わりのあることが考えられ、

本章ではそれらについては明らかにしておらず、今後検討する必要がある。同時に、現在、ほとんど知見のない、培地成分などが、精子の受精能におよぼす影響を、多精子侵入を抑制する効果とともに検討していく必要がある。

第3章　受精培地のカリウムイオンとナトリウムイオンが精子の受精能におよぼす効果およびその機構

第1節　緒　言

現在、培地に添加した種々の化学物質、培地のイオン組成、あるいは生体由来のタンパク質や細胞の存在が体外受精結果におよぼす影響について調べられている。培地の構成成分である塩類は、培地中でイオン化し、培地の主要な成分となる。培地中の塩類（イオン）が精子および卵子、あるいは受精におよぼす影響に関して、実験動物ではいくつかの知見がある。カルシウムイオン（Ca^{2+}）は、直接あるいはタンパク質のリン酸化を介して間接に精子の先体反応を引き起こすことを示唆する結果や、超活性化運動時に細胞内濃度が上昇することが示されており、細胞内情報伝達機構における役割とともに受精における係わりが注目されている（Fraser, 1994; Yanagimachi, 1994）。ナトリウムイオン（Na^+）およびカリウムイオン（K^+）濃度（それぞれ$[Na^+]$、および$[K^+]$）が生体の細胞内外で異なることはよく知られており、細胞内では低$[Na^+]$、高$[K^+]$、反対に細胞外では高$[Na^+]$、低$[K^+]$である。また、哺乳動物の受精の場である卵管の内腔液では、血清成分と比較して$[K^+]$は高く、$[Na^+]$は低く（Iritani *et al.*, 1974）、さらに精液成分である精漿中の$[K^+]$と$[Na^+]$もこれと似た傾向を示している（Borland *et al.*, 1977）。マウス精子では、培地のナトリウムイオン濃度（細胞外ナトリウムイオン濃度：$[Na^+]_e$）が、受精能獲得および精子の先体反応や体外受精結果に影響を与えることから、受精に必要とされる$[Na^+]_e$が調べられている（Fraser *et al.*, 1993）。さらに、ラットにおいては受精培地の$[K^+]_e/[Na^+]_e$の濃度比が高い場合に精子侵入卵子率が高まる傾向が見られている（Toyoda & Chang, 1974）。また、受精培地にK^+が存在しないときに、精子と卵子の細胞膜融合が起こらないことがモルモット（Yanagimachi & Bhattacharyya, 1988）およびマウス（Boldt *et al.*, 1991）で示されており、これらの種では受精時にK^+が精子および卵子の細胞膜に効果的に作用することが示唆されている。

一方で、高 $[K^+]_e$ は哺乳動物精子の代謝、運動を抑制するとの報告 (Wales & White, 1958) もあり、さらに、動物種によって精子および卵子の K^+ への反応が異なっている可能性も考えられる。哺乳動物の受精前後に起こるさまざまな現象が究明されつつあるが、いまだに解明されていないことが多い。特に、培地および生体内における受精環境において、最も主要なイオンである Na^+ および K^+ がブタ精子の受精能に与える影響についてはほとんど調べられていない。

以上のことから、本章では Na^+ および K^+ が精子の卵子への侵入におよぼす影響を明らかにすることを目的として行った。

第２節　受精培地の高濃度カリウムイオンが精子の卵子への侵入におよぼす影響

受精の場である発情期にある哺乳動物の卵管内腔液には、現在用いられている体外受精培地に比較してカリウムイオン（K^+）が多く含まれていることが Iritani ら（1974）、および Borland ら（1977）によって示されている。それらの結果は、現在、哺乳動物の体外受精で一般的に用いられている培地に含まれている濃度の数倍の K^+ が卵管内腔液に存在していることを明らかにしている。高濃度の $[K^+]_e$ が、ヒト精子の先体反応を促進すること（Roblero *et al.*, 1988）や、高い $[K^+]_e/[Na^+]_e$ 値の培地で前培養されたラット精子は受精能が高く、また、卵子に早く侵入すること（Toyoda & Chang, 1974）が示されている。一方、ブタでは、体外受精時に K^+ の濃度を高めた時の影響は明らかにされていない。そこで本節では高濃度の K^+ がブタ精子の受精能におよぼす影響に関して検討した。同時に、精子の受精能と密接な関係を持つことが示唆されている細胞内カルシウムイオン濃度（$[Ca^{2+}]_i$）を測定し、K^+ との関係について調べた。

１．材料および方法

体外受精

卵子の体外成熟培養から体外受精までの処理、および精子の洗浄から前培養までの処理は第２章第２節の方法にしたがって行った。精子は液状保存射出精液由来のものを用いた。精子の洗浄には WS-BSA（付表１）を、精子の前培養には PM-BSA を、また、受精には mBO（Brackett & Oliphant, 1975, 付表２）を、受精後の卵子の培養には BMOC-2（培養培地）をそれぞれ使用した。精子の前培養は、精子濃度 1×10^8 cells/ml で1.5時間、精子と卵子の共培養は精子濃度 1×10^5 cells/ml で６時間行ない、共培養の終了後、培養培地中で４時間の培養を行った。

精子の細胞内遊離遊離カルシウムイオン濃度の測定

精子の細胞内遊離カルシウムイオン濃度（$[Ca^{2+}]_i$）の測定は、Zhou ら（1990）の方法にしたがって行った。遊離カルシウムイオンに特異的に結合する蛍光物質である Fura-2/AM（和光純薬）を、DMSO に 1 mM となるように溶解したストック溶液を作成し、使用直前まで -20℃で保存した。精子内 $[Ca^{2+}]_i$ の測定に用いた溶液には、400 mM EGTA, 2.4 M Tris (pH 8.2), 0.92 mg/ml Digitonin, 6 M HCl, 990 mM Ca^{2+} のストック溶液、および Fura-2 を精子内に取り込ませるための溶液として Physiological Medium (145 mM NaCl, 4 mM KCl, 0.5 mM $MgSO_4$, 1 mM Na_2HPO_4, 1 mM $CaCl_2$, 5 mM Glucose, 10 mM Hepes, pH 7.4) (Zhou *et al.*, 1990) を基礎とし、K^+ として培地組成の KCl 濃度を変え、浸透圧を NaCl で修正した溶液を用いた。

精子を受精培地で 0 から 6 時間まで培養し、1 時間間隔で、Fura-2 を用いて精子の細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ を測定した。あらかじめ培養器（5% CO_2, 95% 空気, 39℃）内で平衡にしておいた Physiological Medium にストックの Fura-2 を最終濃度 500 nM になるように入れ、そこに、受精培地で所定時間培養後、遠心（1,500 g、5 分）・沈殿した精子を再懸濁した。再度遠心後、Physiological Medium に再懸濁した。Fura-2 の取り込みのために 1 時間、培養器内（5% CO_2, 95% 空気, 39℃）で培養後、石英セルに精子懸濁液 3 ml を移し、蛍光分光光度計（日立 650-40）で蛍光強度の測定を行った。セルの温度はあらかじめ 39℃に設定しておき、波長は励起が 339 nm (5 nm スリット）、放射が 500 nm (10 nm スリット）に設定した。各ストック溶液を、最終濃度が、3.3 mM EGTA、20 mM Tris、0.06 mg/ml Digitonin、20 mM HCl、3.3 mM Ca^{2+} になるように以下の通りに加え、よく攪拌した後に測定した。まず、細胞外に存在する Fura-2 を確認するために 25 μl EGTA, 25 μl Tris を加え、反応 150 秒後の値を F とした。細胞膜を壊すために 25 μl Digitonin を加え、反応 120 秒後の蛍光強度を F_{min} とする。その後、HCl を 10 μl 加えて酸性にし、さらに十分量の Ca^{2+} (10 μl) を加えることによって、すべての Ca^{2+} を Fura-2 に結合させた時（150 秒後）の値を F_{max} とした。Grynkiewicz ら（1985）の次の計算式にしたがって、$[Ca^{2+}]_i$ を算出した。

$$[Ca^{2+}]_i = K_d (F - F_{min})/(F_{max} - F)$$

K_d = 224 nM （Fura-2 と Ca^{2+} の解離定数）

実験１．受精培地の高濃度カリウムイオンが精子の卵子への侵入におよぼす影響

受精培地中の高濃度のカリウムイオンが受精におよぼす影響を見るため、対照区の KCl 濃度を 4 mM（受精培地 mBO の標準濃度）に、その他の実験区は 20, 40, 60, および 80 mM の 4 区を設定した。培地の浸透圧を一定にするため、カリウムイオン濃度 ($[K^+]_e$) を高めたことに伴い培地に添加する NaCl 濃度をそれぞれ、112 (対照区), 96, 76, 56, 36 mM にした。前培養の終了した精子を洗浄せずに $[K^+]_e$ の異なる 5 種の受精培地で希釈後、それぞれの受精培地中で卵子と共培養した。

実験２．高濃度のカリウムイオンが精子の受精能に与える影響

実験 1 で、KCl 濃度が 60 mM の受精培地を用いた場合に最も高い精子侵入卵子率が得られたことから、高 $[K^+]_e$ が精子の受精能に与える影響を見るために、$[K^+]_e$ が 4 (90.6 mM NaCl) または 60 mM (34.6 mM NaCl) の 2 種の PM-BSA を用いて前培養を 1.5 時間行った。精子の前培養時の精子濃度は 1×10^8 cells/ml に調節した。精子と卵子の共培養には 4 mM $[K^+]_e$ の受精培地 (mBO) を用いた。

実験３．高濃度のカリウムイオンが卵子の受精能に与える影響

高濃度の K^+ が卵子におよぼす影響を見るために、成熟培養後に洗浄した卵子を、2 種の受精培地、すなわち $[K^+]_e$ を 4 (112 mM NaCl) および 60 mM (56 mM NaCl) にした受精培地 (mBO) で、共培養前の 1.5 時間、精子と卵子の共培養と同一条件で培養することで前処理を行った。その後、mBO ($[K^+]_e$ = 4 mM) で 4 回洗浄後、受精培地に移した。精子の前培養は精子濃度 1×10^8 cells/ml に調節した PM-BSA ($[K^+]_e$ = 3.1 mM) を用い、1.5 時間行った。精子と卵子の共培養には 4 mM $[K^+]_e$ の受精培地 (mBO) を用いた。

実験４．高濃度のカリウムイオンが精子内の遊離カルシウムイオン濃度におよぼす影響

高濃度カリウムイオンが精子の受精能を高めていたことから、受精時に精子内濃度が上昇することが知られている精子内遊離カルシウムイオン濃度を測定し、培地のカリウムイオン濃度との関連について調べた。対照区としてKClを４mM、高カリウム濃度の区として60 mM添加し、浸透圧を一定に保つためにNaClをそれぞれ145および89 mMにした２種のmBOを受精培地として用いた。また、前培養培地にはPM-BSA（$[K^+]_e$ = 4 mM）を用いた。精子を前培養後に受精培地に導入し、精子と卵子の共培養と同じ条件で精子のみを培養（精子濃度：1×10^7 cells/ml）した後、細胞内遊離カルシウムイオン濃度の測定を行った。

２．結　果

（１）受精培地の高濃度カリウムイオンが精子の卵子への侵入におよぼす影響（実験１）

体内における受精の場である卵管の内腔液には、一般的に用いられている受精培地に比較して高濃度のK^+が含まれていることから、受精培地の高$[K^+]_e$が精子の卵子への侵入状況におよぼす影響を調べた。精子と卵子の共培養（受精）に用いる培地の$[K^+]_e$の違いにより、精子侵入卵子率には差が見られ、対照区（$[K^+]_e$ = 4 mM）の62%から、$[K^+]_e$の上昇に伴って上昇する傾向が見られ（20 mM: 72%, 40 mM: 90%）、60 mMで97%と最大値を示したが、さらに高い濃度の80 mMでは78%へと低下していた（表３-１）。一方、精子侵入卵子率の上昇は単精子侵入率の低下および平均侵入精子数の上昇を伴っていた。また、ほぼ同じ精子侵入卵子率であった20と80 mMの区を比較すると、80 mMでの単精子侵入率が低く（80 mM: 17%, 20 mM: 37%）、平均侵入精子数は多かった（80 mM: 4.2, 20 mM: 2.7）。80 mMで共培養を行った後、多くの卵子は細胞質が変質していた。これらの結果から、受精培地の高$[K^+]_e$は、精子の受精能を高めていることが示されたが、その最適濃度については受精後に受精卵（胚）を培養後に胚移植して産子への発生試験を行い、卵子に対する傷害作用の有無を確認する必要がある。

表３－１．受精培地の高 $[K^+]_e$ が精子の卵子への侵入におよぼす影響

$[K^+]_e$ (mM)‡	卵子数（%）			平均侵入精子数 ± SE
	供試#	精子侵入	単精子侵入	
4	112	69 (61.6)[a]	33 (47.8)[a]	1.8 ± 0.1[a]
20	93	67 (72.0)[ac]	25 (37.3)[a]	2.7 ± 0.3[b]
40	114	103 (90.4)[b]	22 (21.4)[b]	4.0 ± 0.3[c]
60	118	114 (96.6)[b]	8 (7.0)[c]	6.2 ± 0.4[d]
80	105	82 (78.1)[c]	14 (17.1)[b]	4.2 ± 0.4[c]

‡ 精子と卵子の共培養（受精）時の $[K^+]_e$

卵核胞崩壊卵子

a, b, c, d 同一項目内の異なる肩文字を持つ値間に有意差あり（$P < 0.05$）

表３－２．精子の前培養培地の高 $[K^+]_e$ が精子の卵子への侵入におよぼす影響

$[K^+]_e$ (mM)‡	卵子数（%）			平均侵入精子数 ± SE
	供試#	精子侵入	単精子侵入	
4	236	178 (75.4)	65 (36.5)	2.5 ± 0.2
60	243	212 (87.2)*	32 (15.1)*	3.8 ± 0.2*

‡ 精子の前培養用培地中の $[K^+]_e$

卵核胞崩壊卵子

* 同一項目内で有意差あり（$P < 0.05$）

表３－３．卵子の前処理時の高 $[K^+]_e$ が精子の卵子への侵入におよぼす影響

$[K^+]_e$ (mM)‡	卵子数（%）			平均侵入精子数 ± SE
	供試#	精子侵入	単精子侵入	
4	236	236	1 (0.4)	13.3 ± 0.4
60	219	219	1 (0.5)	13.0 ± 0.4

‡ 卵子の前処理用培地中の $[K^+]_e$

卵核胞崩壊卵子

（2）高濃度のカリウムイオンが精子および卵子の受精能に与える影響（実験2、3）

実験1で、受精培地の高 $[K^+]_e$ は精子侵入卵子率を高めており、その効果が精子あるいは卵子のどちらに対する効果なのかを検討するため、精子および卵子をそれぞれ高 $[K^+]_e$ の培地で処理後に体外受精を行い、受精結果を比較した。精子の前培養を高 $[K^+]_e$ の培地（$[K^+]_e$ = 60 mM）で行った場合、対照区（$[K^+]_e$ = 4 mM）に比較して精子侵入卵子率は有意に（$p < 0.05$）高く（高 $[K^+]_e$：87%、対照区：75%）、また、単精子侵入率および平均侵入精子数は、それぞれ対照区で、37%, 2.5、高 $[K^+]_e$ では15%, 3.8と、いずれも有意な差が見られた（$P < 0.05$）（表3－2）。一方、卵子を高 $[K^+]_e$ の培地（$[K^+]_e$ = 60 mM）あるいは通常濃度の K^+ を含む培地（$[K^+]_e$ = 4 mM）前処理を行った場合には、すべての卵子に精子の侵入が見られ、また、ほぼすべての卵子が多精子侵入卵子であり、平均侵入精子数を含め、卵子の前処理用の培地中の $[K^+]_e$ の異なる両者間に差は認められなかった（表3－3）。精子および卵子をそれぞれ高 $[K^+]_e$ の培地で処理をして得られたこれらの結果から、受精培地の高 $[K^+]_e$ が精子侵入卵子率を高めた（実験1）のは、主に精子の受精能を高めた効果によるものであると推察される。

（3）高濃度のカリウムイオンが精子内の遊離カルシウムイオン濃度におよぼす影響（実験4）

培地の高 $[K^+]_e$ が、受精時に細胞内濃度が高まることが示されている Ca^{2+} を介して精子の受精能を高めたのかを調べるため、高 $[K^+]_e$ 培地で培養した精子の細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ を測定した。図3－1に示されている通り、高 $[K^+]_e$（60 mM）のmBOで培養した精子の $[Ca^{2+}]_i$ は、対照区（$[K^+]_e$ = 4 mM）に比較して上昇が早く、また、培養1時間後に最大値を示し（86 nmol/10^7 cells）、通常濃度の $[K^+]_e$（4 mM）であるmBOで培養した場合の最大値（68 nmol/10^7 cells, 培養時間4時間）よりも高かった。したがって、受精培地の高い $[K^+]_e$ は、精子の $[Ca^{2+}]_i$ を効果的に高めていることが示唆された。

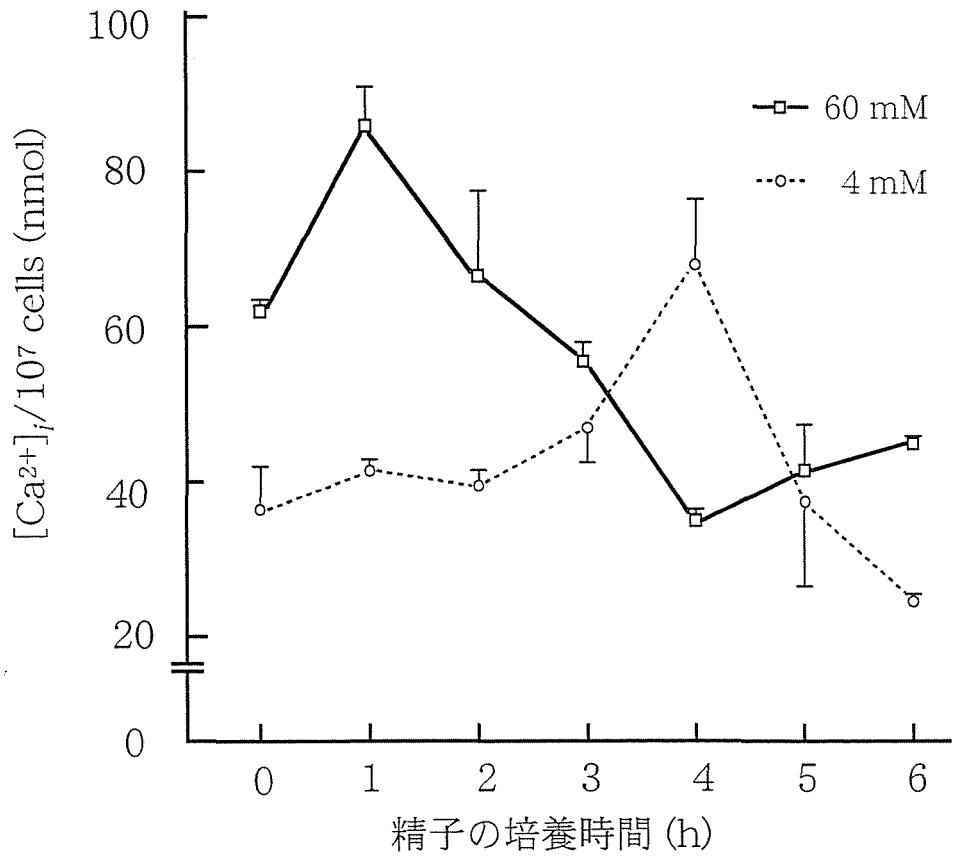

図３－１．$[K^+]_e$ が４および 60 mM の受精培地で培養した精子の細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ の推移

前培養を行った精子を受精培地で培養後、Ca^{2+} に結合性の蛍光色素である Fura-2/AM で染色して精子内 $[Ca^{2+}]_i$ を測定した。Fura-2/AM 取り込みのために１時間を要するため、実際の測定は培養終了時とはずれがある。

（4）結果の要約

哺乳動物の卵管内 $[K^+]$ は、現在体外受精に用いられている受精培地における濃度に比較して高い。受精培地の $[K^+]$ がブタ精子の受精能におよぼす影響に関する知見はほとんど見当たらないため、本節では、培地の $[K^+]_e$ を高めることが受精に与える効果を検討した。その結果、受精培地の高 $[K^+]_e$ (60 mM) は、精子侵入卵子率を高め、多精子侵入率および平均侵入精子数ともに上昇させた（実験１）。この効果は、精子あるいは卵子のどちらに対するものかを明らかにするため、精子および卵子を高 $[K^+]_e$ 培地でそれぞれ独立に処理後、通常用いられている $[K^+]_e$ (4 mM) の培地で体外受精を行った。精子を高 $[K^+]_e$ 培地で前処理（前培養）した場合に、精子侵入卵子率は高く（実験２）、一方卵子を前処理した場合には、高 $[K^+]_e$ の効果は認められなかった（実験３）ことから、受精時の高 $[K^+]_e$ が精子侵入卵子率を高める効果は、精子の受精能を高めたためであることが示唆された。さらに、精子の受精能に重要な役割を持つことが示されている精子の $[Ca^{2+}]_i$ を、高 $[K^+]_e$ の培地で培養後に調べたところ、培養した場合に比較して高い値を示したことから、高 $[K^+]_e$ は精子の $[Ca^{2+}]_i$ を高め、受精能を上昇させていることが推測された（実験４）。

第３節　体外受精時のカリウムイオンの必要性

体外受精の培地にカリウムイオン（K^+）が存在しない時、精子と卵子の融合が起こらないことが、モルモット（Yanagimachi & Bhattacharyya, 1988）、およびマウス（Boldt *et al.*, 1991）で示されている。前節では、高濃度の K^+ がブタ精子の受精能を高めているという結果が得らた。一方、ブタ精子が受精するための K^+ の必要性は明らかではなく、基礎的な知見もない。そこで本節では、ブタの体外受精系を用いて、精子が卵子に侵入するために必要な培地の K^+ 濃度（$[K^+]_e$）について検討した。さらに、第２節で高 $[K^+]_e$ は精子の卵子への侵入を促進していたことから、細胞内外の K^+ の濃度差が減少することで精子の受精能が高められている可能性がある。一方、細胞内外の K^+ の濃度差の減少は、K^+ が細胞外に流出することでも実現される。通常の体外受精では、培地の K^+ 濃度は、数 mM レベルであり、細胞内外の K^+ の濃度差の減少がブタ精子の受精に必要であると仮定すると、K^+ が細胞外に流出することが必要になる。このため、受精と関連した K^+ の挙動を明らかにする目的で、精子の細胞膜上に存在し、細胞内外の濃度勾配にしたがって K^+ の（細胞内から細胞外への）流出を仲介する K^+ チャネルに対する阻害剤を受精培地に添加して体外受精を行い、精子の受精に果たす K^+ チャネルの機能を検討した。

１．材料および方法

第２章第２節の方法に従い、卵子および精子を準備した。精子の洗浄には WS-PVA を用いた。精子の前培養は PM-PVA を基礎にして調製した培地を用い、精子濃度を 1×10^8 cells/ml で 1.5 時間、精子と卵子の共培養は FM-PVA を基礎にした培地を用い、精子濃度を 1×10^5 cells/ml で８時間行った。

実験１．精子の受精能におけるカリウムイオンの必要性

精子との共培養に用いた卵子は、成熟培養終了後、0.1% のヒアルロニダーゼを含む WS-PVA で処理し、洗浄した卵丘細胞除去卵子を用いた。培地中の $[K^+]_e$ が精子の受精能におよぼす影響を見るために、K^+ として KCl を 0 あるいは 3.1 mM 含む 2 種の前培養培地で精子の前培養を行った。また、浸透圧を一定にするため、それぞれ NaCl の濃度を 94.6, 91.5 mM にした。前培養後、5 種の受精培地、すなわち KCl 濃度を 0, 0.3, 0.7, 1.5 または 3.1 mM（浸透圧を一定にするために NaCl 濃度はそれぞれ 114.1, 113.8, 113.4, 112.6 および 111.0 mM）にした FM-PVA に精子を導入し、卵子との共培養を行い、前培養および受精時の $[K^+]_e$ の影響を見た。また、共培養開始後の精子活力を 0, 4 および 8 時間後に位相差顕微鏡を用いて測定した。活力 0 から 25 % を－、25 から 50 % を　+/－、50 から 75 % を＋、75 から 100 % を＋＋として評価した。

実験２．K^+ チャネル阻害剤が精子の受精能におよぼす影響

K^+ チャネル阻害剤が受精結果におよぼす効果を検討した。精子の前培養、受精培地の $[K^+]_e$ は、3.1 mM とした。また、精子との共培養には卵丘細胞除去卵子を用いた。K^+ チャネル阻害剤として 塩化テトラエチルアンモニウム (Tetraethylammonium Chloride: TEAC, 和光純薬）を 1.0 あるいは 10.0 mM、4-アミノピリジン（4-Aminopyridine: 4-AP, 和光純薬）を 0.5 あるいは 5 mM の濃度となるように受精培地に添加した。いずれも対照区として阻害剤無添加区を設定した。

統計処理

得られたデータはカイ２乗検定で解析した。

2．結　果

（1）精子の受精能におけるカリウムイオンの必要性（実験1）

精子の前培養および受精時の K^+ の必要性を明らかにするため、培地中の $[K^+]_e$ を低くした場合、あるいは K^+ 欠如培地を用いた場合の精子の受精能を調べた結果を表3－4に示した。前培養時の $[K^+]_e$ にかかわらず受精時の $[K^+]_e$ が同一である場合に、精子侵入卵子率に差は認められなかった（$P<0.01$）。対照区（精子の前培養、受精時のいずれも $[K^+]_e$ = 3.1 mM）の精子侵入卵子率は67%であり、受精時の $[K^+]_e$ の低下にしたがって精子侵入卵子率が低くなる傾向が認められた。また、前培養、受精時共に K^+ が存在しない区では精子の侵入が起こらなかった。単精子侵入率は低 $[K^+]_e$ のとき（前培養時に $[K^+]_e$ = 0 mM の場合は、受精時に $[K^+]_e$ = 0.3 mM の時、前培養時に $[K^+]_e$ = 3.1 mM の場合は、受精時に $[K^+]_e$ = 0 mM の時）にそれぞれ対照区に比較して高い値を示したが、同時に単精子効率は低下した。これらのことから、K^+ は受精時に必要であることが示され、本実験で用いた K^+ 濃度では、3.1 mM で最も高い受精能を示すことが明らかになった。また、培地の低 $[K^+]_e$ あるいは K^+ を含まない培地での精子の活力を観察し、$[K^+]_e$ による影響を調べた結果を表3－5に示した。精子を $[K^+]_e$ が 0 mM の培地で前培養したとき、受精培地での培養直後（0 h）の活力は $[K^+]_e$ が 3.1 mM の場合に比較して低い傾向にあるが、その後に K^+ が含まれる培地での培養4時間後までに上昇し、対照区と差がなくなった。また、$[K^+]_e$ ＝ 3.1 mM の培地で前培養した精子は受精培地での培養直後から活発な動きを示し、4から8時間後まで続いた。受精培地での培養時に $[K^+]_e$ ＝ 0 mM であるとき、前培養培地の $[K^+]_e$ にかかわらず経時的に活力が早く低下する傾向があった。したがって、K^+ は精子の活力維持の役割を果たしていることが示された。

（2）カリウムチャネル阻害剤が精子の体外受精能におよぼす影響（実験2）

精子の受精能におよぼす K^+ の作用が K^+ チャネルを介しているかを調べるため、K^+

表３－４．低 $[K^+]_e$ 培地における精子の受精能

$[K^+]_e$ (mM) ‡		卵子数（%）			
前培養	受精	供試#	精子侵入	単精子侵入	単精子効率
0	0	91	0 (0.0)[a]	-	-
	0.3	82	9 (11.0)[b]	8 (88.9)*	9.8*
	0.7	90	38 (42.2)[ce]	13 (34.2)	14.4*
	1.5	90	46 (51.1)[c]	24 (52.2)	26.7
	3.1	87	60 (69.0)[d]	22 (36.7)	25.3
3.1	0	93	5 (5.4)[a]	5 (100.0)*	5.4*
	0.3	84	13 (15.5)[b]	10 (76.9)	11.9*
	0.7	94	33 (35.1)[e]	23 (69.7)	24.5
	1.5	98	56 (57.1)[dc]	24 (42.9)	24.5
	3.1（対照区）	89	60 (67.4)[d]	31 (51.7)	34.8

‡ 培地中の $[K^+]_e$

卵核胞崩壊卵子

§ 括弧内は精子侵入卵子数に対する割合

[a,b,c,d,e] 対異なる肩文字を持つ値間で有意差あり（$P < 0.05$）

* 対照区と有意差あり（$P < 0.05$）

表３－５．低 $[K^+]_e$ 培地における精子活力 ¶

$[K^+]_e$ (mM) ‡		共培養開始後の経過時間 (h)		
前培養	共培養	0	4	8
0	0	+/-	+/-	-
	0.3	+/-	++	+/-
	0.7	+/-	++	++
	1.5	+/-	++	++
	3.1	+/-	++	+
3.1	0	++	+/-	-
	0.3	++	+	+
	0.7	++	++	++
	1.5	++	++	++
	3.1（対照区）	++	++	+

¶ 精子活力；-：0-25%, +/-: 25-50%, +: 50-75%, ++: 75-100%

‡ 培地中の $[K^+]_e$

チャネル阻害剤を受精培地に添加して体外受精を行った。K^+チャネル阻害剤であるTEACあるいは4-APが培地中にそれぞれ10 mMおよび5 mM含まれる場合に精子侵入卵子率は低下した（表3－6および7）。K^+チャネルは、細胞外に比較して高濃度の細胞内K^+を細胞膜を隔てた濃度勾配にしたがって細胞外に排出する機能を持ち、その阻害は精子の受精能を阻害していたことから、受精時に細胞内K^+はK^+チャネルを介して細胞外に移動することで脱分極が起こり、受精能を得ている可能性が示唆される。

（3）結果の要約

受精時のK^+の必要性を明らかにするため、$[K^+]_e$を低下させた、あるいはK^+欠如の精子前培養培地および受精培地を用いて体外受精を行った。その結果、精子の卵子への侵入能は、精子の前培養培地におけるK^+の存在に係わらず、受精時の$[K^+]_e$が低くなるにしたがい精子侵入卵子率が低くなる傾向が見られ、K^+欠如受精培地では、ほとんどの卵子は精子の侵入を受けなかった。したがって受精時に細胞外のK^+は必要であることが示された（表3－4）。また、培地の低い$[K^+]_e$あるいはK^+を含まない培地における精子の活力を調べ、K^+濃度による影響を調べた結果、K^+は精子の活力維持の役割を担っていることが示唆された（表3－5）。さらに、精子の受精能におよぼすK^+の作用がK^+チャネルを介しているかを調べるため、K^+チャネル阻害剤を受精培地に添加して体外受精を行ったところ、精子侵入卵子率は低下した（表3－6および7）ことから、精子の受精能におよぼすK^+の作用は、K^+チャネルを経由したK^+の細胞外への移動による脱分極が関係していることが示唆された。

表３－６．K^+ チャネル阻害剤（TEAC）が精子の卵子への侵入におよぼす影響

$[TEAC]_e$ (mM)‡	卵子数（%）		
	供試#	精子侵入	単精子侵入
0（対照区）	154	109 (70.8)[a]	50 (45.9)
1	167	117 (70.1)[a]	40 (34.1)[a]
10	165	31 (18.8)[b]	18 (58.1)[b]

‡受精培地中の TEAC 濃度

#卵核胞崩壊卵子

a, b 同一項目内の異なる肩文字を持つ値間に有意差あり（$P < 0.05$）

表３－7．K^+ チャネル阻害剤（4-AP）が精子の卵子への侵入におよぼす影響

$[4\text{-AP}]_e$ (mM)‡	卵子数（%）		
	供試#	精子侵入	単精子侵入
0（対照区）	124	89 (71.8) [a]	34 (38.2)
0.5	124	76 (61.3) [a]	40 (52.6)
5	131	2 (2.3) [b]	2 (100.0)

‡受精培地中の 4-AP 濃度

#卵核胞崩壊卵子

a, b 同一項目内の異なる文字を持つ値間に有意差あり（$P < 0.05$）

第４節　ナトリウムイオンとカリウムイオン濃度が精子の卵子への侵入におよぼす影響

前節までの結果から、高濃度の K^+ が精子の受精能を高めること、および体外受精時のカリウムイオンの必要性が明らかになった。いずれの場合にも、浸透圧調整のために、$[K^+]_e$ を変化させるのに伴い、培地に含まれるナトリウムイオン濃度（$[Na^+]_e$）を変えている（NaCl として 36-114 mM）。したがって、本節では Na^+ が精子の受精能におよぼす影響を明らかにするとともに、培地の $[Na^+]_e$ と $[K^+]_e$ とを同時に変化させた場合に精子の受精能に与える効果について調べた。

１．材料および方法

体外受精は、第２章第２節の方法に従って行った。精子の洗浄には WS-PVA を、受精培地には FM-BSA を基礎にした培地を用い、精子濃度 1×10^5 cells/ml で８時間行った。なお、精子の前培養は行っていない。

実験１．受精培地の NaCl 濃度が精子の受精能におよぼす影響

受精培地の NaCl 濃度が精子の受精能におよぼす影響を見るために、NaCl を 60 から 120 mM 含む受精培地で体外受精を行った（NaCl 以外のナトリウム塩に由来する Na^+ は 39.5 mM）。これらの培地の浸透圧を塩化コリン濃度で調整して一定にした（340-350 mOsm/kg）。また、すべての培地の $[K^+]_e$ を 5.0 mM にした。

実験２．高濃度カリウムおよびナトリウムイオンが精子の受精能におよぼす影響

高濃度カリウムおよびナトリウムイオンが精子の受精能におよぼす影響を見るため、以下の培地を準備した。高 $[K^+]_e$ の影響を見るため、１）25 mM KCl, 110 mM NaCl（高 K, ~320 mOsmol/kg）、２）0 mM KCl, 110 mM NaCl, 5 mM 塩化コリン（K (-), ~280 mOsmol/kg）、３）5 mM KCl, 110 mM NaCl, 20 mM 塩化コリン（K-Osm,

~320 mOsmol/kg)、および、高 $[Na^+]_e$ の影響を見るため、４）5 mM KCl, 160 mM NaCl（高 Na, ~370 mOsmol/kg)、５）5 mM KCl, 0 mM NaCl, 110 mM 塩化コリン (Na (-), ~280 mOsmol/kg)、６）5 mM KCl, 110 mM NaCl, 50 mM 塩化コリン (Na-Osm, ~370 mOsmol/kg) の受精培地で体外受精を行った。なお、対照区は、5 mM KCl, 110 mM NaCl の受精培地を用いた（対照区：~280 mOsmol/kg）。

続いて、受精培地中の KCl 濃度と NaCl 濃度の組み合わせによる精子の受精能への影響を見るため、110 mM NaCl, 5 mM KCl を含む培地を対照区とし、22 mM NaCl、25 mM KCl を含む培地を低 NaCl、高 KCl 培地とし、塩化コリンで対照区と同程度の浸透圧（280 mOsmol/kg）に調整した。

2．結　果

（1）受精培地の NaCl 濃度が精子の受精能におよぼす影響（実験１）

受精培地の NaCl 濃度が精子の受精能におよぼす影響を調べるため、NaCl 濃度を変えた培地を用いて、体外受精を行った結果を表３－８に示した。精子侵入卵子率はいずれの区においても低く (20-46%)、一般的に体外受精に使用される培地（280~290 mOsmol/kg）に比較して高い浸透圧（340~350 mOsmol/kg）が影響した可能性がある。処理区間の比較では、精子侵入卵子率については、60 mM 区と 80, 90, 110 mM 区との間に、単精子侵入率については 60 mM 区と 120 mM 区を除く他の区との間に、また、単精子効率については 60 mM 区と他のすべての区との間に有意な差が認められた。その他の区間では、わずかに単精子効率に 90mM NaCl 区で 120 mM 区に比較して高い値が見られたのみであった。このことから、精子の卵子への侵入能は 60 mM 以下の NaCl では低下することが示唆され、また、70 から 120 mM の間の NaCl 濃度では差がないことが示された。

表３－８．培地中の NaCl 濃度が精子の卵子への侵入におよぼす影響[¶]

NaCl (mM)	卵子数 (%)			
	供試[#]	精子侵入	単精子侵入	単精子効率
60	70	14 (20.0) [a]	5 (35.7)[a]	7.1[a]
70	71	22 (31.0) [ab]	16 (72.7)[b]	22.5[bc]
80	64	25 (39.1) [b]	18 (72.0)[b]	28.1[bc]
90	66	30 (45.5) [b]	23 (76.7)[b]	34.8[b]
100	65	21 (32.3) [ab]	17 (81.0)[b]	26.2[bc]
110	60	25 (41.7) [b]	20 (80.0)[b]	33.3[bc]
120	63	19 (30.2) [ab]	12 (63.2)[ab]	19.0[c]

[#] M II 卵子

[a, b, c] 同一項目内の異なる肩文字を持つ値間で有意差あり（$P < 0.05$）

[¶] 浸透圧は塩化コリンで調整し、340-350 mOsmol/kg にした。なお、NaCl 以外のナトリウム塩に由来する Na^+ 濃度は 39.5 mM である。

（2）高濃度カリウムおよびナトリウムイオンが精子の受精能におよぼす影響（実験２）

受精培地に添加するKClおよびNaCl濃度の影響を見るため、それぞれを高濃度含む場合、通常用いられる濃度を含み浸透圧を高濃度含む場合と同程度に調整した場合、あるいは無添加の場合について、精子の卵子への侵入状況を調べた。結果を表３－９に示した。NaClは対照区と同濃度で、KClを添加せず浸透圧を塩化コリンで調整したK(-)区では、対照区(63%)に比較して精子侵入卵子率に大きな低下が見られた(13%)。一方、NaCl、KCl濃度は対照区と同じで浸透圧を高K区と同程度にしたK-Osm区(67%)に比較して、それよりKCl濃度が高い(25 mM)高K区(83%)で高い精子侵入卵子率が見られた。前節までの結果で得られた高$[K^+]_e$が精子侵入卵子率を高めたのは、浸透圧調整のために低下させたNaCl濃度によるものではなく、高$[K^+]_e$自体に起因することを示している。また、K-Osm区では対照区と同程度の精子侵入卵子率を示していることから、塩化コリンには少なくとも精子の卵子への侵入を阻害する作用はないと考えられる（表３－９）。一方、KCl濃度、浸透圧は対照区と同じにしNaClを添加していないNa(-)区では、K(-)区同様、対照区に比較して有意に低い精子侵入卵子率を示した(14%)。また、NaCl, KClを対照区と同濃度で、浸透圧を高Na区と同程度にするために塩化コリンを添加したNa-Osm区では対照区と比較して精子侵入卵子率は低下した(13%)。また、高Na区では精子侵入卵子率は低下する傾向があった(5%)（表３－１０）。

以上のことから、高濃度のKClは精子の侵入能を高めることが再確認され、また、その効果は低$[Na^+]_e$によるものではないことが同時に明らかになった。さらにNaCl無添加および高濃度含む培地では、いずれも精子の卵子への侵入能は低くなったことから、K^+と同様に適切な$[Na^+]_e$が必要であることが明らかになった。浸透圧の影響のみを比較することにより、320 mOsmolまでは精子侵入卵子率に影響はないが、高濃度含む場合に見られた低い精子侵入卵子率は、浸透圧を同程度にした場合にも近い値を示したことから、高浸透圧が原因となっている可能性もある。

続いて、これまで得られた結果をもとに、高濃度KClおよび低濃度NaClの培地を用いて体外受精を行ない、結果を表３－１１に示した。低Na-高K区では52%の精子侵

表３－９．高濃度 KCl および浸透圧が精子の卵子への侵入におよぼす影響[¶]

試験区	塩類濃度 (mM) KCl	塩類濃度 (mM) 塩化コリン	浸透圧[§] (mOsmol/kg)	卵子数 (%) 供試[#]	卵子数 (%) 精子侵入
対照区	5	0	280	79	50 (63.3)[a]
K (−)	0	5	280	77	10 (13.0)[b]
K−Osm	5	20	320	78	52 (66.7)[a]
高 K	25	0	320	78	65 (83.3)[c]

[¶] 110 mM NaCl

[§] 平均値 ± 5 mOsmol/kg

[#] M II 卵子

a, b, c 異なる肩文字を持つ値間に有意差あり ($P < 0.05$)

表３－10．高濃度 NaCl および浸透圧が精子の卵子への侵入におよぼす影響[¶]

	塩類濃度 (mM)		浸透圧[§]	卵子数 (%)	
試験区	KCl	塩化コリン	(mOsmol/kg)	供試[#]	精子侵入
対照区	110	0	280	79	50 (63.3)[a]
Na (−)	0	110	280	78	11 (14.1)[b]
Na-Osm	110	50	370	75	10 (13.3)[b]
高 Na	160	0	370	77	4 (5.2)[b]

[¶] 5 mM KCl

[§] 平均値 ± 5 mOsmol/kg

[#] M II 卵子

a, b 異なる肩文字を持つ値間に有意差あり ($P < 0.05$)

表３－１１．高濃度 KCl および低濃度 NaCl の組み合わせが精子の卵子への侵入におよぼす影響

	塩類濃度 (mM)			浸透圧[§]	卵子数 (%)	
試験区	NaCl	KCl	塩化コリン	(mOsmol/kg)	供試[#]	精子侵入
対照区	110	5	0	280	97	16 (16.5)[a]
低Na-高K	22	25	68	280	74	38 (51.4)[b]

[§]平均値 ± 5 mOsm/kg

[#] M II 卵子

a, b 同一項目内の異なる肩文字を持つ値間で有意差あり($P < 0.05$)

入率が認められ、対照区と比較して高率であり、低 NaCl 濃度と高 KCl 濃度の組み合わせが精子の卵子への侵入能を効果的に高めることが明らかになった。

（3）結果の要約

培地の NaCl 濃度および KCl 濃度が精子の卵子への侵入能におよぼす影響を明らかにするため、まず、NaCl 濃度を変えた受精培地を用いて体外受精を行ったところ、精子侵入卵子率は、わずかに 60 mM NaCl で低い値が得られたが、その他の NaCl 濃度(70-120 mM)間で差は見られず、受精培地中の NaCl 濃度が 70 から 120 mM の範囲では、濃度の違いによる精子の卵子への侵入能への影響は少ないことが推測される（実験1）。NaCl および KCl を無添加あるいは高濃度添加した培地、さらに、高濃度添加した培地と同程度の浸透圧にした培地を用いて、これらの塩類の添加および浸透圧が精子の卵子への侵入能におよぼす影響を調べたところ、KCl 無添加、NaCl 無添加、高濃度 NaCl、および比較的高い浸透圧の培地を用いた場合、精子の卵子への侵入能は低下することが明らかになった。また、低い NaCl 濃度 (22 mM) と高い KCl 濃度 (25 mM) の組み合わせが精子の卵子への侵入能を効果的に高めていることが示唆された（実験2）。

第5節　考　察

本章では、体外受精に用いる培地のKCl、およびNaCl濃度を変えることで、溶液中でイオンとして存在するK^+、およびNa^+濃度が精子の卵子への侵入におよぼす影響を観察した。培地の$[K^+]_e$の違いにより、精子侵入卵子率に明らかな差が見られたことから、精子の受精能にK^+は重要な役割を担っていることが示唆された。

1．高$[K^+]_e$が精子の卵子への侵入能に与える影響

$[K^+]_e$が一般的に体外受精に用いられている程度の濃度である4 mMから60 mMにまで増加させた時、精子侵入卵子率は濃度依存的に上昇した。この効果は、精子と卵子の共培養前に、高$[K^+]_e$の培地で精子の前培養処理を行った後、通常濃度のK^+(4 mM)を含む受精培地で精子と卵子の共培養を行ったときに精子侵入卵子率を高めていたことから、主に精子に対する効果であることが示唆される。哺乳動物の受精の場である卵管分泌液中には、血清成分に比較してK^+濃度は高く、Na^+濃度は低いことが示されている（ヒツジ：Iritani *et al.*, 1969、ウサギ：Iritani *et al.*, 1971、ブタ：Iritani *et al.*, 1974、マウス：Borland *et al.*, 1977)。しかし、過去の研究では、培養環境を体内に近付けるため、培地の$[K^+]_e$を高めることは、精子の（体外）受精能を必ずしも上昇させてはいない。たとえば、高$[K^+]_e$の培地は、体外でのハムスター精子の先体反応誘起に対する効果が認められず(Rogers *et al.*, 1981)、逆にウサギ精子の活力を減退させ、$[K^+]_e$を減少させることで超活性化現象の増加が見られたこと(Burkman *et al.*, 1984)が観察されている。Fraser(1983)が、マウスの体外受精結果に与えるK^+濃度の影響を調べたところ、精子侵入卵子率は標準的なK^+濃度である2.7 mMの培地を用いた時に比較して高濃度K^+(27.7 mM)の培地で有意に低く、高$[K^+]_e$はマウス精子の受精能を低下させていた。卵管内は、高$[K^+]_e$であるが、必ずしもそれが受精に適しているのではなく、たとえば、血中と同程度のカリウムイオン濃度である卵胞液が放出されることで局部的な$[K^+]_e$の低下が受精に適した状態を作り出している、あるいはホルモンの

作用による卵管液の組成が変化するためであることをFraser (1994) は仮定している。これに反して、ラットでは、前培養時の $[K^+]_e$ が高い (35 mM) 場合に、精子侵入卵子率は対照区に比較して高まる傾向が見られている (Toyoda & Chang, 1974)。現在のところ、哺乳動物精子に対するイオンの効果について検討している研究は少ないため、これらの結果のみから結論付けることは困難であるが、この二つの相反する結果は、異なる動物種や個体によって高 $[K^+]_e$ に対する精子の反応が異なることを示唆する。高 $[K^+]_e$ は哺乳動物精子の代謝、運動を抑制するとの報告 (Wales & White, 1958) がある一方で、Babcock ら (1983) はウシ精子で、また Peterson と Freund (1973) はヒト精子で、細胞内と同程度の K^+ 濃度が代謝活性を促進することに言及している。運動に係わる代謝と受精能に係わる代謝に異なる様式で K^+ が効果をおよぼしている可能性もある。

2．精子の卵子への侵入における K^+ の必要性

本章第3節で精子が卵子に侵入するための K^+ の必要性を見るため、K^+ を含まない培地で精子と卵子の共培養を行ったところ、精子の卵子への侵入は見られなかった。一方、K^+ を含まない培地で前培養を行なった精子を用いた場合、その後の精子と卵子の共培養時に K^+ が存在することで卵子への侵入が見られたことから、K^+ は受精時に必要であることが明らかになった。過去に行われた研究結果から、K^+ は精子が卵子と融合時に必須であることは、哺乳動物に共通する現象のようである。Yanagimachi と Bhattacharyya (1988) による透明帯除去卵子を用いた実験の結果は、モルモット精子では、1）K^+ 欠如培地中で、受精能獲得、および先体反応は起こること、2）K^+ を含む培地中で先体反応を起こした精子は、K^+ 欠如培地中で卵子と融合できること、3）K^+ 欠如培地中で先体反応を起こした精子は、K^+ 欠如培地中で卵子と融合できないこと、4）K^+ を含まない培地中で先体反応を起こした精子は、K^+ を含む培地中で卵子と融合できること、を示している。Boldt ら (1991) は、カルシウムイオノフォアで受精能を獲得させ、先体反応を誘起したマウス精子は、K^+ 欠如培地中で透明帯除去卵子と接着可能であるが、融合できないことを示している。このため、精子が卵子に接着後、融合

する時に K^+ が必要とされることが示唆される。本章では、K^+ を含んだ培地を用いた精子と卵子の共培養中に受精能獲得が起こっていた可能性も否定できず、今後、精子の受精能獲得および先体反応の状況を確認する必要がある。また、K^+ 欠如培地における精子の活力低下が示され、エネルギー代謝にも影響を与えていることが推測される。K^+ 欠如培地での前培養で低い活力を示した精子は、K^+ を含む受精培地に移した後に活力は回復したことからも可逆的な活力の低下であることが示唆される。

極性を持つイオンは脂質二重層である生体膜をそのままでは透過することができず、イオンポンプ、およびイオンチャネルと呼ばれる膜タンパク質の存在によって初めて透過可能になる (Bretscher *et al.*, 1994)。この膜タンパク質のイオン運搬作用により、細胞内のイオン濃度は、細胞外とは異なる濃度になっている (Bretscher *et al.*, 1994)。細胞外に比較して細胞内 K^+ 濃度は高く、反対に細胞内 Na^+ 濃度は低い。これは、細胞膜を介したイオンの濃度勾配に逆らった Na^+, K^+ -ATPase による、細胞内からの Na^+ の汲み出し、および細胞外からの K^+ の取り込み作用（能動輸送）が働いているためであると考えられている。同時に、一定の条件下で開口するイオンチャネルを通じて細胞膜を隔てたイオンの濃度勾配にしたがったイオンの移動が行われる（受動輸送）(Bretscher *et al.*, 1994)。また、K^+ は膜電位を決定する重要なイオンでもある。K^+ 欠如培地中では、精子の先体成分の分泌（先体反応）が抑えられ（ハムスター: Mrsny & Meizel, 1981; マウス: Fraser, 1983)、活力および体外受精率が低下する現象が見られている (Fraser, 1983)。培地に K^+ が存在しない場合に精子の卵子への侵入が起こらないことは、単純に細胞内への K^+ の取り込みができず、機能を果たすために必要とされる生理的な $[K^+]_i$ を維持できないため（Fraser, 1994）、あるいは、膜電位に影響を与え、精子と卵子の融合が阻害された可能性（Boldt *et al.*, 1991）が考えられる。

3．培地の $[K^+]_e$ と $[Na^+]_e$ が受精結果におよぼす影響

広汎に体外受精培地の主要成分として用いられる Na^+、および K^+ が、精子および卵子におよぼす直接の効果を観察することは難しい。たとえば、K^+ 濃度を一定にしたま

まで、$[Na^+]_e$ を上昇させようとすれば、培地の浸透圧が上昇し、$[Na^+]_e$、あるいは、浸透圧の上昇効果のどちらの影響であるのかを判別することができない。第2節で、高 $[K^+]_e$ 培地で見られた精子侵入卵子率の上昇は、浸透圧調整のために低くした $[Na^+]_e$ による影響である可能性も考えられたが、第4節で浸透圧を一定にした培地を用いた場合であっても高 $[K^+]_e$ では精子侵入卵子率は上昇する傾向が見られた。また、$[K^+]_e$ を変化させずに塩化コリンで浸透圧を一定にし NaCl 濃度を変えた培地を用いて体外受精を試み、わずかに 60 mM の NaCl（総 Na^+：99.5 mM）で精子侵入卵子率の低下が見られたが、それ以外の NaCl 濃度（70-120 mM）でははっきりとした傾向は見られていない。したがって、高 $[K^+]_e$ の場合に高い精子侵入卵子率が見られたのは、低い $[Na^+]_e$ の影響ではなく、高 $[K^+]_e$ の直接の影響であることが明らかである。さらに、マウス精子では、低い $[Na^+]_e$ では、精子侵入卵子率および先体反応率が低いことが示されている (Fraser, 1983; Fraser *et al.*, 1993)。これらのことから、ブタ精子に関しては現在のところ明らかではないが、低い $[Na^+]_e$ が精子の侵入能を高めている可能性は低いと考えられる。一方、塩化コリンを用いて $[Na^+]_e$ を高めた場合と同程度に浸透圧を調整した時、対照区に比較して精子侵入卵子率が低下が見られた。したがって、高い $[Na^+]_e$ の場合に見られた低い精子侵入卵子率は、高浸透圧が原因となっていることが推察される。しかし、$[Na^+]_e$ を高めるにしたがい、浸透圧は自動的に上昇するため、高い $[Na^+]_e$ の直接の影響であるかについては本章の結果からは断言することはできない。Gilmore ら (1996) は培地の浸透圧を生理的状態 (290 mOsmol/kg 程度) から低下させて精子の反応を観察し、活力は 210 から 300 mOsmol/kg までほぼ一定であり、それ以下では激減すること、また精子の細胞膜の完全性は 270 から 300 mOsmol/kg で最も高値を示し、それ以下では徐々に低下傾向にあることを示した。浸透圧 300 mOsmol 以上の結果は明らかにされていないが、本研究で 350 mOsmol/kg 以上の浸透圧では、低い精子侵入卵子率を示したことから、高浸透圧の有害性が示唆される。卵子に対する高浸透圧の影響とともに精子に対する影響についても詳細に検討し、イオン濃度との関連を今後明らかにしていく必要がある。

４．受精時に精子内で起こるイオンの挙動

イオンポンプやチャネルといった膜タンパク質機能に対する阻害物質、およびイオンの膜透過性を高めるイオノフォアを用いることで、細胞膜を隔てたイオンの出入を制御することができる。Na^+, K^+-ATPase の阻害剤であるウワバイン（1 μM）は、先体反応を阻害するが、K^+ イオノフォアであり、膜内外の $K^+ - H^+$ 交換反応を行うニゲリシンには、その阻害作用を除く作用があることが Mrsny ら（1984）によって示されている。これらを用いて Working と Meizel（1983）は、ハムスター精子の先体反応に K^+ の精子内への流入と、その結果起こる先体内の pH 上昇が重要な作用を果たすことを指摘している。しかし、ウワバインとニゲリシンを用いた場合には K^+ の膜内外への移動は同じ方向に進み、いずれも細胞内から細胞外へ漏出することになり、K^+ が細胞内に流入する方向への移動は起こりえず、上記の推測は妥当ではない。また、精子に対するイオノフォアの効果を調べた Yanagimachi と Bhattacharyya（1988）の推論では、K^+ が細胞内へ流入し、K^+ の動態に連動して H^+ が細胞外へ流出する、としているが、この場合も細胞内に K^+ が流入することは論理的ではない。Boldt ら（1991）は、マウス精子では K^+ チャネル阻害剤の影響が見られなかったことから、精子と卵子の細胞融合時には K^+ チャネルは係わっていないと推測をしているが、本研究では、K^+ チャネル阻害剤は、精子の卵子への侵入を阻害していた。Shellenbarger と Shapiro（1980）はマウスの体外受精で、K^+ チャネル阻害剤 TEAC（5 mM）はマウスの精子侵入を阻害したことを述べており、今回の結果とも一致している。したがって、ブタ精子では、K^+ チャネルが受精時に果たす役割の大きいことが示唆される。

Boldt ら（1991）は受精時の精子において、脱分極による Ca^{2+} の細胞内への流入を想定している。また、モルモット精子では、精子細胞内 Na^+ の上昇が受精能獲得に必要であること（Hyne *et al.*, 1984）から、細胞内 Na^+ の上昇が、受精前に起こるもっとも初期のイオンの挙動であることを指摘している。本章で、高 $[K^+]_e$ は精子の卵子への侵入を促進し、精子の $[Ca^{2+}]_i$ を高めたこと、および K^+ チャネル阻害剤は精子の卵子への侵入能を阻害していたことから、ブタ精子の場合、１）卵管内における $[K^+]_e$ の上昇、

あるいは２）何らかの刺激によってK^+チャネルを介してK^+が細胞外へ流出し、いづれの場合にも、その結果として細胞内外のK^+濃度差が小さくなることで脱分極が起こり、膜電位依存性のCa^{2+}チャネルが開口し、Ca^{2+}の流入が起こることで精子の受精能を高めた可能性がある（図３－２）。細胞内Ca^{2+}は、受精能獲得、先体反応を調節しており、さまざまな機序で精子の機能を変化させていることが確認あるいは推測されている。その一つとして、アデニル酸シクラーゼの活性化が考えられている。この酵素は、ATPからcAMPを産出する。多くの研究で、サイクリックヌクレオチド、特にcAMPとcGMPが精子の機能を高める役割を果たしていることが報告されている。細胞外のサイクリックヌクレオチドやサイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ阻害剤（サイクリックヌクレオチドの分解を阻止する作用を持つ）は、精子の活力を高め、体外での受精能を高めていることが示されている。cAMPの主要な機能は、cAMP依存性プロテインキナーゼの活性化にあるようであり、細胞中の特定の基質のリン酸化を促進することによって、これらのキナーゼは続いて精子の機能を調節することができる(Fraser, 1994)。

精子と卵子の共培養時に存在する成分が卵子への精子の侵入に与える影響は、精子あるいは卵子のどちらに、あるいは両者に対するものなのかを判断できないため、今後、それぞれに対する影響を見ていく必要がある。また、経時的に変化しているこれら一連の細胞内外のイオンの動態と受精現象との関わりを明らかにするためには、さらなる検討が必要である。特に、今後、蛍光色素などを用いて細胞内イオンの挙動を直接観察することで、受精時に精子内で起こるイオンの動態が明らかになるだろう。

Fraser (1994) による仮説（マウス精子）

$[Na^+]_i \uparrow \rightarrow [H^+]_i \downarrow \rightarrow pH_i \uparrow \rightarrow Ca^{2+}$チャネル？

$\rightarrow [Ca^{2+}]_i \uparrow \rightarrow$ 受精する能力の獲得

本研究結果から推測される仮説（ブタ精子）

$[K^+]_e \uparrow$

$[K^+]_i \downarrow$ ？ → 脱分極？ → 膜電位依存性 Ca^{2+}-チャネル？

$\rightarrow [Ca^{2+}]_i \uparrow \rightarrow$ 受精する能力の獲得

$[\ ]_i$：細胞内濃度　　$[\ ]_e$：細胞外濃度　　↑：上昇を表す　↓：低下を表す

図３－２．受精前に起こる精子に係わるイオンの挙動（仮説）

第6節　要　約

本章では、培地成分でもっとも主要な成分であるKClとNaClに着目し、それらが精子の受精能におよぼす影響および作用機序を明らかにすることを目的に行った。

哺乳動物の卵管内 $[K^+]$ は、現在体外受精に用いられている濃度に比較して高く、また、培地の K^+ がブタ精子の受精能におよぼす影響に関する知見はほとんど見当たらないことから、培地中の高い $[K^+]_e$ が受精に与える効果を検討した結果、精子侵入卵子率を高め、この効果は、精子の受精能を高めているためであることが示された。さらに、高 $[K^+]_e$ は精子の $[Ca^{2+}]_i$ を高めることで、受精能を上昇させていることが推測された（第2節）。さらに、受精時の K^+ の必要性を明らかにするため、$[K^+]_e$ を低下させた、あるいは K^+ 欠如の精子の前培養培地および受精培地を用いて体外受精を行った結果、精子の前培養培地における K^+ の存在に係わらず、受精時の $[K^+]_e$ が低くなるにしたがい、精子侵入卵子率が低下する傾向が見られ、K^+ 欠如受精培地中では、ほとんどの卵子は精子の侵入を受けていなかったことから、受精時に細胞外の K^+ は必要であることが示された。さらに、精子の受精能におよぼす K^+ の作用が K^+ チャネルを介しているものかを調べるため、K^+ チャネル阻害剤を添加した受精培地を用いて体外受精を行ったところ、精子侵入卵子率は低下したことから、精子の受精能におよぼす K^+ の作用は、K^+ チャネルを経由した K^+ の細胞外への移動が関係していることが示唆された（第3節）。また、培地中のNaCl濃度が精子の卵子への侵入能におよぼす影響を明らかにするため、NaCl濃度を変えた受精培地を用いて体外受精を行ない、受精培地中のNaCl濃度が70から120 mMの範囲では、濃度の違いによる精子の卵子への侵入能への影響は少ないことが示された。NaClおよびKClを無添加あるいは高濃度添加した培地、さらに、高濃度添加した培地と同程度の浸透圧にした培地を用いて、これらの塩類が精子の卵子への侵入能におよぼす影響を調べたところ、高濃度KClを含む培地では、精子の卵子への侵入能は高められていることが明らかになり、この場合に用いた培地と同程度の浸透圧を持つ培地では効果が認められなかったことから、第2節で得られた効果、すなわち、

高 $[K^+]_e$ 培地で精子侵入卵子率が高まったのは、浸透圧調整のために低下させた NaCl 濃度の影響ではなく、高 $[K^+]_e$ 自体の効果であることが示唆された。また、低濃度の NaCl と高濃度の KCl を含む培地で精子の侵入能は高められたことから、低濃度 NaCl と高濃度 KCl 濃度の組み合わせが精子の卵子への侵入能を効果的に高めていることが明らかになった（第4節）。以上のことから、ブタ精子の受精においては、K^+ は卵子への侵入に不可欠であり、$[K^+]_e$ を高めることで卵子への侵入能力を高めていることが示された。その効果は、細胞外 $[K^+]_e$ が高い場合、あるいは、K^+ チャネルを介して K^+ が細胞外に流出することによって脱分極が起こり、膜電位依存性の Ca^{2+} チャネルが活性化され、$[Ca^{2+}]_i$ が上昇することで精子は卵子に侵入する能力を得ることが示唆された。

第４章　受精培地の構成成分が精子の受精能におよぼす効果

第１節　緒　言

ブタ体外受精に用いられている培地として、mKRB (Nagai *et al.*, 1984)、BO (Nagai *et al.*, 1988)、mTBM (Abeydeera & Day, 1997)、TCM199 (Wang *et al.*, 1991)、mTyrode (Yoshida *et al.*, 1993) など、いくつかの種類のものが報告されている。体外受精用の培地に必要な条件は、精子および卵子を受精に適した状態にさせることである。顕微受精 (ICSI) などの人為的操作による補助的手段を用いない場合には、精子の運動性を維持させ、受精能を獲得させるとともに、精子を卵子と接触させ、細胞質内に侵入させる必要がある。さらに、培地中に存在する精子や卵子に有害な物質を除去あるいは無害化させ、適切な pH を維持し、細胞の代謝に必要な成分を含んでいる必要がある。体外受精に用いられている培地は、精子および卵子の生理的な機能を維持するための塩類（イオン）、エネルギー源、および血清や血清アルブミンなどのタンパク質を含んでいる。

重炭酸／CO_2 緩衝系は、体外受精に使用する培地に広く用いられている。また、卵管内腔液は高濃度の重炭酸を含み (Hamner, 1973; Brackett & Mastroianni, 1974; Maas *et al.*, 1977)、精子の活力と代謝を高める効果のあることが報告されている (Hamner & Williams, 1964, Murdoch & White, 1971; Garbers *et al.*, 1982; Tajima *et al.*, 1987)。さらに、重炭酸は、マウス精子が受精するために必須であり (Lee & Storey, 1986)、モルモットの受精を促進すること (Bhattacharyya & Yanagimachi, 1988)、ハムスター精子の活力、先体反応、透明帯への侵入を促進し (Boatman & Robbins, 1991)、マウス精子の超活性化を高めていること (Neil & Olds-Clarke, 1987)、などが示されている。しかし、家畜では、受精時における重炭酸の重要性については検討されていない。一方、重炭酸の必要性に関する実験を行うことは、非常に複雑となる (Umbreit, 1957)。まず、重炭酸溶液はアルカリ性を示すため、生理的な pH を得るに

は、溶液をCO_2ガスで平衡にする必要がある。気相中のCO_2濃度が一定の条件では溶液のpHは、重炭酸濃度に依存する。すなわち、重炭酸濃度が高くなると、pHは高まる。したがって、目的とするpHは、気相条件が一定である場合には、ある特定のCO_2濃度で得ることができる。それ以外の重炭酸濃度を用い、最終的なpHをNaOHあるいはHClで調整したとき、Henderson-Hasselbalch等式にしたがって自動的な調節が行われる。この調節は、CO_2ガスが溶液に溶け込んだ場合に重炭酸イオンと水素イオンが生成する、あるいは、CO_2の分解や損失が起こった場合に重炭酸イオンがCO_2になる反応によるものである（図４－１）。温度も、このシステムの平衡に影響を与えるため、最終的なpHや重炭酸濃度に対しても影響を与える。他の培地成分による緩衝作用を考慮に入れると、さらに複雑になる。もし、培地のpHが、重炭酸濃度による平衡状態に達していない場合、重炭酸の分解あるいはCO_2の培地中への吸収が平衡に達成するまで続く。このように、培地の平衡時の重炭酸濃度とpHは、最初の重炭酸濃度のみではなく、気相のCO_2濃度と温度にも依存している。これらをすべて厳密に調節しない場合、重炭酸塩の添加の有無による精子の受精能におよぼす効果の比較は、pHの差異による影響を受け、正確ではなくなる。

哺乳動物細胞の体外培養では、培地への添加物として、血清としてウシ胎仔血清(FCS)あるいは血清アルブミンとしてウシ血清アルブミン(BSA)などが比較的よく用いられる。ブタの体外受精に用いる培地には、BSA (Yoshida *et al.*, 1990; Nagai *et al.*, 1984; Nagai *et al.*, 1988)や、血清 (Wang *et al.*, 1992; Rath, 1992) を添加している。血清と同様に、アルブミンには未知の成分が含まれ、これらの成分のロットによる差が細胞の生存性などに異なる効果をおよぼす原因になる。また、そのために、いくつかの物質が体外受精結果に影響をおよぼす種々の要因解析を困難にする。一方、受精の場に存在する体細胞が体外受精結果に与える影響について調べられており、ブタでは卵子に付着した卵丘、顆粒層細胞は精子の卵子への侵入を促進させてはいない結果をKikuchiら(1993)が報告している。また、MahadevanとTrounson(1985)は、ヒトでは卵子の卵丘細胞の有無による精子侵入卵子率に差がないことを示している。しかし、卵丘

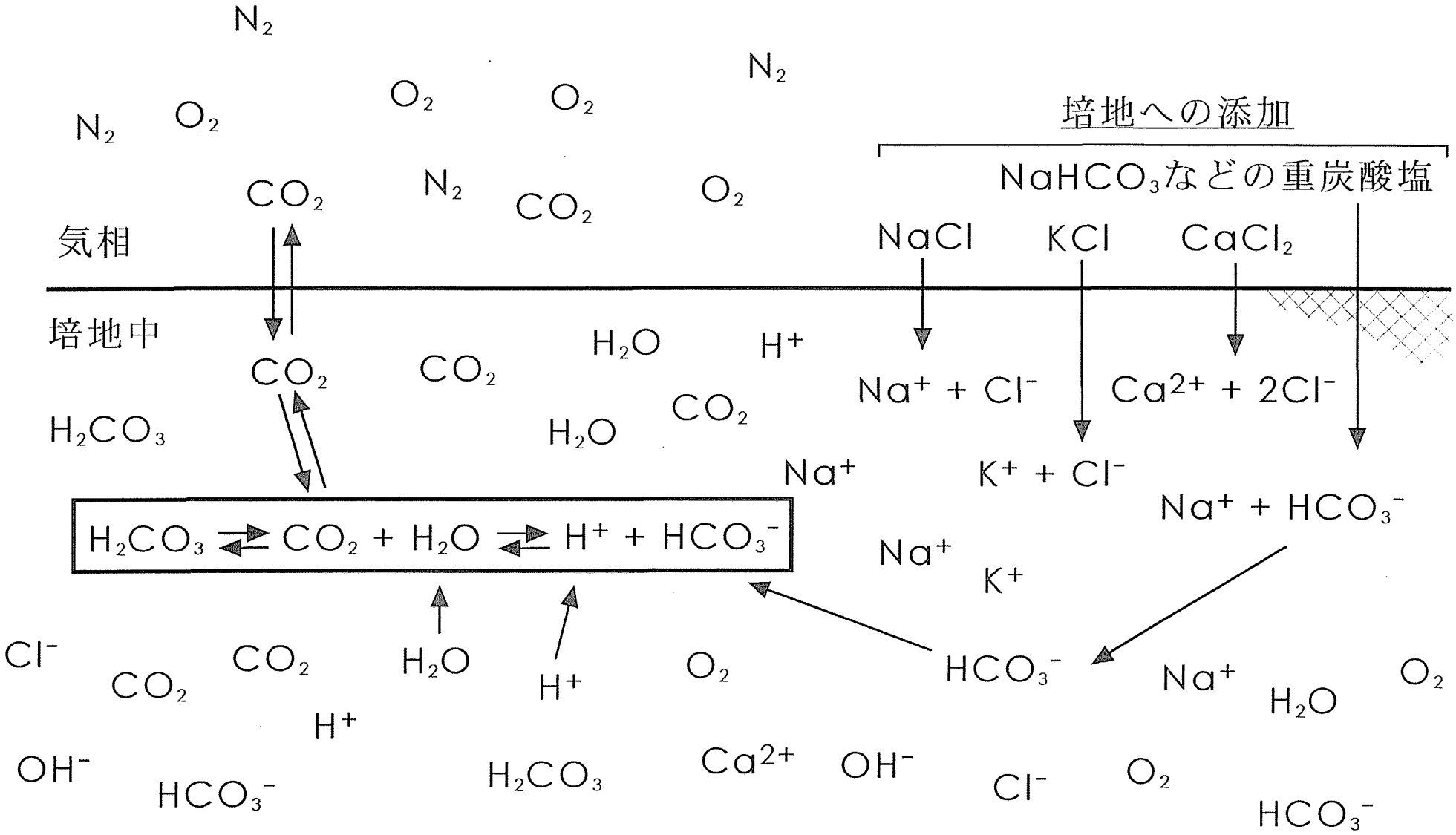

図４－１．培地中での重炭酸の挙動（概要）

培地中に気相中の CO_2 が溶け込むことで、HCO_3^- および H^+ が生じ、反対に、気相中の CO_2 濃度が低い場合などには逆の反応が起こる。なお、化学式で表した各物質の数は実際の濃度に対応していない。

細胞の存在下でハムスター精子の卵子への侵入率が上昇したことをGwatkinら(1972)は報告している。これらの精子の卵子への侵入等に与える効果を検討するためには、アルブミンなどのタンパク質が無く、かつ他の細胞が存在しない条件で体外受精を行うことが望ましい。また、たとえば、精子と卵子との相互作用に果たす透明帯あるいは細胞膜上のタンパク質の役割を解析する場合などに、タンパク質を添加していない培地を有効に用いることができる。第2章の結果からは、前培養時のBSAは精子の卵子への侵入には影響を与えていないことが部分的に明らかになった。しかし、受精時のBSAの必要性については調べておらず、詳細に検討する必要がある。

以上のことから、本章では、体外受精に用いる培地が、精子の卵子への侵入におよぼす影響を明らかにするため、培地成分の中で、重炭酸、およびタンパク質(BSA)に着目し、それらの体外受精時における必要性を観察し、さらに、基礎となる培地の比較を行った。

第２節　重炭酸が精子の受精能におよぼす影響

本節では、体外受精時の培地中の重炭酸の必要性について調べた。重炭酸塩を添加あるいは無添加で浸透圧とpHを可能なかぎり同程度にした培地を用い、体外受精結果に与える影響を見た。重炭酸が受精におよぼす影響を見るとともに、細胞の機能を損なわないと考えられ、広く用いられている緩衝剤であるHepes (Ferguson *et al.*, 1980)、および、ブタ体外受精に効果的とされるカフェイン (Wang *et al.*, 1991) が精子の卵子への侵入におよぼす影響を観察した。

１．材料および方法

精子および卵子の準備

精子は、デュロック、大ヨーク、ランドレースの雄ブタから採取した射出液状保存精液由来のものを用いた。卵子は、第２章第２節の方法にしたがって準備した。

体外受精培地

精子の前培養培地および受精培地は、修正タイロード溶液を基本にした　PM-BSA、およびFM-BSAを用いた。精子の前培養はpHを7.8に調整した前培養培地で、体外受精はpHを7.4に調整した受精培地で行った。重炭酸塩を含む培地は5% CO_2、および含まない培地は、CO_2ガスを導入しない気相（大気中）で平衡にした（表４－１）。

体外受精

精子の前培養は、39 ℃で1.5時間行った。前培養は精子濃度4×10^8 cells/mlで行い、前培養後の精子を卵子と６時間共培養した。共培養時の精子濃度は、1×10^5 cells/mlとした。精子と卵子の共培養終了後、BMOC-2で４時間培養した。

表４－１．体外受精に用いた培地組成[¶]

	前培養培地 (PM)			受精培地 (FM)				
培地成分	B-PM	BH-PM	H-PM	B-FM	BC-FM	BHC-FM	H-FM	HC-FM
$NaHCO_3$	40	40	-	15	15	15	-	-
Hepes	-	20	20	-	-	20	20	20
pH ± SE	7.82±0.06	7.86±0.05	7.80±0.02	7.31±0.03	7.28±0.02	7.33±0.06	7.36±0.02	7.36±0.01
$CaCl_2$	2	2	2	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6
カフェイン	-	-	-	-	2	2	-	2
NaCl	95	70	112	113	112	96	112	111
BSA (mg/ml)	3	3	3	5	5	5	5	5

[¶]組成の濃度は、特に指定のある場合以外は mM で表記。本表に記載してある以外の組成は、付表５および７の組成表にしたがった共通の濃度の塩類等を含む。

実験１．重炭酸が精子の受精能におよぼす影響

本実験では、精子の前培養および受精時における重炭酸、さらに受精時のカフェインが精子の卵子への侵入能におよぼす影響を明らかにすることを目的として行った。重炭酸塩(B-PM)、あるいはHepesを含む（重炭酸塩無添加）前培養培地(H-PM)で精子の前培養を行った。H-PMで前培養した精子は、カフェイン無添加のHepesを含む受精培地(H-FM)、２mMカフェインとHepesを含む受精培地(HC-FM)、および重炭酸塩とカフェインを含む受精培地(BC-FM)で卵子と共培養した。B-PMで前培養した精子は、BC-FMで卵子と共培養した。

実験２．Hepesが精子の受精能におよぼす影響

実験１で、Hepes添加の受精培地であるH-FMおよびHC-FMで見られた低い精子侵入卵子率は、Hepesに精子の卵子への侵入を阻害する作用があることが原因であった可能性がある。したがって、本実験では、精子を重炭酸塩およびHepesの両者を含む(BH-PM)、あるいはHepesを含まない前培養培地(B-PM)で前培養し、BH-PMで前培養した精子は重炭酸塩とHepesおよびカフェインを含む受精培地(BHC-FM)、また、B-PMで前培養した精子はBC-FMで受精させ、Hepesに精子の卵子への侵入を阻害する作用があるかどうかについて検討した。

実験３．カフェインが精子の受精能におよぼす影響

実験１で、重炭酸塩を受精培地に添加していない場合、カフェイン単独では精子侵入卵子率を高めなかったので、重炭酸の存在下でのカフェインの効果を改めて再度確認した。精子は、H-PM中で前培養を行い、受精は、２mMカフェイン添加(BC-FM)、および無添加培地(B-FM)で行った。本実験に用いた精子は、実験１，２とは異なった２頭の雄（I, J）由来の精子を用いた。予備試験の結果、高い精子侵入卵子率を示していたので、受精時の精子濃度は、1-3 x 10^4 cells/mlで行った。

2．結　果

（1）重炭酸が精子の受精能におよぼす影響（実験1）

重炭酸塩無添加培地を使用した受精培地（H-FM, HC-FM）に比較して、重炭酸塩添加培地を使用した場合、精子侵入卵子率は高く、単精子侵入率は低かった。受精時に重炭酸が存在している場合（BC-FM）、前培養時の重炭酸の有無（H-PM, B-PM）による差は、精子侵入卵子率、単精子侵入率、平均侵入精子数ともに見られなかったことから、重炭酸塩の培地への添加は受精時に必要であるといえる。重炭酸塩を含まない受精培地では、カフェインを添加した場合（HC-FM）であっても精子侵入卵子率は改善されなかった（表4－2）。

表4－1に示したように、測定したBC-FMの平均pH値は、H-FM, HC-FMのpH値よりもわずかに低い値を示した。受精培地はオイルで覆って使用したため、受精終了後の培地のpHを測定しなかったが、フェノールレッドの色調から判断する限り、これらの培地のpHに差は認められなかった。表には示していないが、精子の前培養前後のB-PMとH-PMのpHの測定から、これらの培地間に緩衝能の差はないことが明らかになった。したがって、培地中の重炭酸の有無による精子侵入卵子率の差はpHの違いによるものではないといえる。

（2）Hepesが精子の受精能におよぼす影響（実験2）

実験1で、重炭酸塩添加培地に比較して、Hepes添加培地では低い精子侵入卵子率を示したことから、Hepesに精子の受精能を阻害する作用が考えられたた。そのため重炭酸とHepesの両方を含む培地を用いて、Hepesの阻害作用があるかを検討した。その結果、表4－3に示した通り、重炭酸のみ（B-PM→BC-FM）、あるいは重炭酸とHepesを含む培地（BH-PM→BHC-FM）のどちらの培地を用いた場合でも、すべての卵子に精子の侵入が見られた。すなわち、Hepesが精子の卵子への侵入を阻害している作用は見られなかった。したがって、実験1でHepes添加培地（H-FMおよびHC-

表４－２．精子の卵子への侵入におよぼす重炭酸の影響

培　地§	卵子数（%）			平均侵入
前培養 → 受精	供試#	精子侵入	単精子侵入	精子数± SD
H-PM → H-FM	163	5 (3.1)[a]	5 (100.0)[a]	1.0 ± 0.0
H-PM → HC-FM	146	1 (0.7)[a]	1 (100.0)[a]	1.0 ± 0.0
H-PM → BC-FM	84	58 (69.0)[b]	6 (10.3)[b]	5.1 ± 2.5
B-PM → BC-FM	154	100 (64.9)[b]	22 (22.0)[b]	5.0 ± 4.3

§精子の前培養および受精培地

卵核胞崩壊卵子

a, b, c 同一項目内の異なる肩文字を持つ値間に有意差あり（$P < 0.05$）

表４－３．培地への Hepes の添加が精子の卵子への侵入におよぼす影響

培　地§	卵子数（%）	
前培養 → 受精	供試#	精子侵入
B-PM → BC-FM	53	53 (100.0)
BH-PM → BHC-FM	60	60 (100.0)

§精子の前培養および受精培地

卵核胞崩壊卵子

FM) に比較して重炭酸を含む培地 (BC-FM) で示した高い精子侵入卵子率は、Hepes の存在による阻害効果 (H-FM および HC-FM) ではなく、重炭酸の促進効果 (BC-FM) であることが明らかになった。

（3）カフェインが精子の受精能におよぼす影響（実験3）

実験1で、重炭酸が存在しない場合に、カフェインが精子侵入卵子率を高める効果を示さなかったため、本実験では、重炭酸の存在下でカフェインが精子侵入卵子率におよぼす効果を検討した。雄の違いによる結果に差が見られたので、それぞれの雄ごとに表4－4に示した。どちらの雄の精子についても受精培地 BC-FM で高い精子侵入卵子率を示し、同時に多精子侵入率も増加させていたことから、重炭酸の存在下でカフェインには明らかに受精能を促進する効果があることが明らかになった。一方、カフェイン無添加培地を用いた場合、雄J精子は非常に低い精子侵入率を示したが (3%)、雄I精子は、それに比較して高い値を示し (22%)、また、単精子侵入率はどちらも同程度であった。雄Iの精子は雄Jの精子に比較して BC-FM 中で高い受精能を持っており (雄 I: 84%, 雄 J: 58.6%)、また、多精子侵入率も雄Jの精子よりも雄Iの精子のほうが高かった。カフェイン添加の有無にかかわらず、雄I精子は、雄J精子に比較して高い精子侵入卵子率を示していた。

顕微鏡を用いた肉眼検査による、精子と卵子の共培養前および共培養後の精子活力は、どちらの時点でもカフェイン添加培地中での活力のほうが高かった（表4－5）。しかし、いずれの培地での精子活力とも雄間で差がなく、精子活力と精子侵入卵子率との関連性は認められなかった。

（4）結果の要約

本節では、精子の受精能におよぼす培地中の重炭酸の効果について検討した。浸透圧および pH を厳密に調節した培地を用い、重炭酸塩の添加の有無による精子の卵子への侵入能を調べたところ、受精時に重炭酸が存在している場合には、高い精子侵入卵子率

表４－４．重炭酸の存在下でカフェインが精子の卵子への侵入におよぼす影響

培　地[§]			卵子数（%）		
前培養 → 受精		雄	供試[#]	精子侵入	単精子侵入
H-PM → BC-FM		I	178	149 (83.7)[a]	34 (22.8)[a]
H-PM → B-FM		I	184	41 (22.3)[b]	37 (90.2)[b]
H-PM → BC-FM		J	133	78 (58.6)[c]	47 (60.3)[c]
H-PM → B-FM		J	142	4 (2.8)[d]	4 (100.0)[bc]

§ 精子の前培養および受精培地

卵核胞崩壊卵子

a, b, c, d 同一項目内の異なる肩文字を持つ値間に有意差あり（$P < 0.05$）

表４－５．カフェインが精子の活力におよぼす影響

	雄 I		雄 J	
	B-FM	BC-FM	B-FM	BC-FM
受精培地に導入直後	71.3±6.3	83.8±6.3*	75.0±5.8	91.3±4.8**
共培養６時間後	70.0±7.1	86.9±4.6***	69.4±6.8	87.5±6.0***

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$: カフェイン無添加区に比較して有意差あり

を示したが、重炭酸が存在しない場合には、卵子への精子の侵入はほとんど見られなかった。したがって、重炭酸は精子の受精能を促進する効果を持つことが明らかになった（実験１）。しかしながら、実験１では、重炭酸のない培地には、培地に緩衝作用を持たせるためにHepesを培地に添加している。このため、重炭酸無添加培地で見られた低い精子侵入卵子率は、Hepesの作用による阻害の可能性がある。Hepesが精子の卵子への侵入におよぼす効果を検討するため、続いて重炭酸とHepesが含まれている培地を用いて体外受精を行った。その結果、培地にHepesが含まれている場合であっても、精子侵入卵子率は低くはならなかった。このことから、Hepesは精子の受精能を阻害することはなく、実験１の結果は、重炭酸が精子の受精能を高めていることを示している（実験２）。さらに、実験１で、重炭酸が存在している場合のみカフェインが精子の受精能を高めていた。カフェインと重炭酸の相互作用について検討するため、重炭酸の存在下でカフェインが精子侵入卵子率におよぼす影響について観察した。カフェインを添加していない重炭酸を含む培地を用いた場合に比較して、明らかにカフェイン添加培地では重炭酸の存在下で精子侵入卵子率を高めており、カフェインは単独ではその効果はなく重炭酸との協調作用であることが示唆された（実験３）。

第３節　体外受精時のタンパク質の必要性

体外受精に用いる培地には、ウシ血清アルブミン(BSA)やウシ胎仔血清(FCS)などのタンパク質あるいはタンパク質を豊富に含む物質が添加されている。一方、これらのタンパク質がブタ精子の卵子への侵入能におよぼす効果を検討している研究は見当たらない。さらに、各種タンパク質が精子および卵子におよぼす効果を検討するためには、タンパク質を添加しない培地を用いて体外受精を行う必要がある。このため、精子の卵子への侵入にタンパク質が必要であるかどうかを明らかにする必要がある。そこで本節では、精子の前培養および受精培地中のタンパク質が精子の受精能におよぼす効果を調べ、さらに、タンパク質を添加しない培地を用いて、卵丘細胞が精子の卵子への侵入におよぼす影響について検討した。

１．材料および方法

卵子および精子は第２章第２節の方法に準じて準備した。精子は液状保存射出精液由来の精子を用いた。また、精子の前培養および受精には、修正タイロード溶液を基本とした培地を使用した。精子の洗浄はWS-BSAを用いて行い、前培養は1.5時間、精子濃度、1×10^8 cells/mlで行った。受精のための培養は８時間行った。

実験１．受精培地中のタンパク質が精子の受精能におよぼす影響

精子の前培養は、3 mg/ml BSAを含む培地(PM-BSA)で行い、前培養の終了した精子は、受精培地で２回遠心(1,500 x g)、洗浄した。受精培地へのタンパク質の添加効果を見るため、洗浄の終了した精子を５種類の各受精培地(FM)で希釈後、卵子の入っているそれぞれの培地に導入した。各FMには以下のようにタンパク質、タンパク質を豊富に含む物質、あるいは合成高分子を添加した。1) 5 mg/ml BSA (No.A-4503, Fraction V, Lot No. 107F-0052: Sigma) (FM-BSA), 2) 10% (v/v) FCS (Batch No.

19397: Filtron, Brooklyn, Australia) (FM-FCS), 3) 5 mg/ml PVA (FM-PVA), 4) 5 mg/ml PVP (FM-PVP) および 5) 合成高分子およびタンパク質等を含まないもの (FM-Free)。精子と卵子の共培養中の精子濃度は 1-3 x10^4 cells/ml に設定した。

実験２．精子の前培養時のタンパク質 (BSA) の必要性

前培養培地中のタンパク質が精子の受精能におよぼす効果を検討するため、２種類の前培養培地、すなわち 3 mg/ml の PVA を含み、タンパク質を含まない PM-PVA、または、タンパク質として 3 mg/ml の BSA を含む PM-BSA 中で前培養を行った。前培養終了後、２種類の受精培地、FM-PVA または FM-BSA 中で精子と卵子の共培養を行った。受精時の精子濃度は 1-3 x 10^4 cells/ml に設定した。

実験３．タンパク質 (BSA) および精子濃度が精子の卵子への侵入におよぼす影響

実験１で、タンパク質を添加していない培地を用いた場合、添加した培地を用いた場合に比較して低い精子侵入卵子率を示した。受精時の精子濃度は、精子侵入卵子率に影響を与えることが知られている。このため、本実験は、タンパク質（BSA）の有無および卵子と精子の共培養時の精子濃度が、精子の卵子への侵入におよぼす影響を明らかにし、タンパク質無添加培地で高い精子侵入卵子率を得ることができるかを調べる目的で行った。精子の洗浄には WS-BSA を、前培養には PM-BSA を用いた。前培養の終了した精子を洗浄後、３種の受精培地、FM-PVA、FM-Free または FM-BSA に導入し、卵子との共培養を行った。精子と卵子の共培養時の精子濃度を、1 x 10^4 cells/ml および 1 x 10^6 cells/ml とした。

実験４．タンパク質 (BSA) および卵丘細胞が精子の受精能におよぼす影響

本実験は、受精時のタンパク質（BSA）および卵丘細胞が精子の受精能におよぼす影響を明らかにするために行った。卵丘細胞剥離卵子は、成熟培養の終了した卵胞卵子を 0.1% のヒアルロニダーゼを含む WS-PVA で処理後、WS-PVA で洗浄して準備した。

また、卵丘細胞の効果を見るため、卵丘細胞を除去していない卵子を同時に準備した。精子の前培養はPM-PVA中で行った後に受精培地に導入し、卵子との共培養を行った。受精培地としてFM-PVAおよびFM-BSAの2種を用い、精子と卵子の共培養時のBSAおよび卵丘細胞の有無が、精子の卵子への侵入におよぼす影響を調べた。精子と卵子の共培養時の精子濃度は1-3 x 10^4 cells/ml に設定した。

2．結　果

（1）受精培地中のタンパク質が精子の受精能におよぼす影響（実験1）

合成高分子(PVA, PVP)およびタンパク質(BSA, FCS)が精子の受精能におよぼす影響を明らかにするため、これらを添加した受精培地を用いて体外受精を行った。その結果、タンパク質添加培地(FM-BSA: 77%およびFM-FCS: 57%)に比較して、タンパク質無添加培地中での精子侵入卵子率は低かった(それぞれFM-Free, FM-PVAおよびFM-PVPで14, 19および27%)。また、単精子侵入率はFM-Free, FM-PVAおよびFM-PVPの間、あるいはFM-BSAおよびFM-FCSの間には差はなく、FM-BSAおよびFM-FCSに比較してFM-Free, FM-PVAおよびFM-PVPで有意に高かった。単精子効率はFM-PVPでFM-Free, FM-BSAおよびFM-FCSよりも高い値を示した。これらの結果から、タンパク質が培地に添加されている場合、精子の受精能を高め、また、単精子侵入を減少させることが示された。FCSに比較してBSAに特にその効果が強く見られた。同時に、タンパク質添加培地に比較して低率ではあるが、合成高分子を添加した培地を用いた場合でも、精子は卵子に侵入できることが明らかになった（表4－6）。

（2）精子の前培養時のタンパク質(BSA)の必要性（実験2）

実験1で得られた結果から、受精時にBSAが存在することで精子の受精能が高められていること、タンパク質を添加せず、合成高分子を添加した培地を用いた場合であっても精子は卵子に侵入できることが示された。しかし、FM-Freeでは、卵子がシャー

表４－６．受精培地中のタンパク質および合成高分子が精子の卵子への侵入におよぼす影響

受精培地	卵子数（%）			単精子効率
	供試[#]	精子侵入	単精子侵入	
FM-Free	140	19 (13.6)[a]	18 (94.7)[a]	12.9[a]
FM-PVA	140	27 (19.3)[ab]	23 (85.2)[a]	16.4[ab]
FM-PVP	136	36 (26.5)[b]	33 (91.7)[a]	24.3[b]
FM-BSA	274	212 (77.4)[c]	37 (17.5)[b]	13.5[a]
FM-FCS	143	82 (57.3)[d]	17 (20.7)[b]	11.9[a]

[#]供試卵子は、卵核胞崩壊卵子を用いた

a, b, c, d 同一項目内の異なる肩文字を持つ値間に有意差あり（$P < 0.05$）

表４－７．培地中の PVA および BSA が精子の受精能におよぼす影響

培地		侵入／供試卵子数[#]	精子侵入卵子率（範囲）	単精子侵入卵子数（%）
前培養	受精			
PM-PVA	FM-PVA	27/132	20.5 (16-25)[a]	22 (81.5)[a]
	FM-BSA	119/136	87.5 (80-96)[b]	25 (21.0)[b]
PM-BSA	FM-PVA	30/142	21.1 (20-22)[a]	26 (86.7)[a]
	FM-BSA	122/136	89.7 (84-96)[b]	17 (13.9)[b]

[#] 供試卵子は、卵核胞崩壊卵子を用いた

a, b 同一項目内の異なる肩文字を持つ値間に有意差あり（$P < 0.05$）

レおよび操作用ガラスピペットの表面に接着しやすく、取り扱いが困難であった。本実験では、精子の前培養時のタンパク質および合成高分子の効果を見るため、精子の前培養培地としてPM-BSA、あるいはBSAをPVAで置換したPM-PVAを、受精培地としてFM-BSAあるいはFM-PVAを用いて体外受精を行った。表4－7に示されるように、受精培地にFM-PVAを使用した場合、PM-PVAあるいはPM-BSAで前培養した精子の精子侵入卵子率はいずれも21%であり、また、受精培地がFM-BSAの時、PM-PVAあるいはPM-BSAで前培養した精子は、それぞれ88%、および90%の精子侵入卵子率を示した。したがって、精子の卵子への侵入能は、受精培地中のBSAの有無による影響を強く受け、精子の前培養中のBSAの有無による差異はなかった（$P<0.05$）。単精子侵入率は、精子の前培養培地の違いによる差は見られず、受精培地の違いによって精子侵入卵子率と逆の傾向を示し、FM-PVAで受精を行った場合は、FM-BSAで行った場合に比較して高い値を示した。

（3）タンパク質（BSA）および精子濃度が精子の卵子への侵入におよぼす影響（実験3）

本実験は、タンパク質（BSA）および精子濃度が精子の卵子への侵入におよぼす影響を明らかにする目的で、PVAあるいはBSAを添加した受精培地（FM-PVA, FM-BSA）、およびタンパク質、合成高分子等を添加していない受精培地（FM-Free）を用いて異なる精子濃度で体外受精を行い、精子の卵子への侵入状況を見た。その結果、精子と卵子の共培養時の精子濃度を、1×10^4 cells/mlから1×10^6 cells/mlに高めることで、精子侵入卵子率は有意に上昇した（$P<0.05$）。合成高分子およびタンパク質の両者を添加していない培地（FM-Free）では、精子濃度が1×10^4 cells/mlの時には卵子への精子の侵入は認められなかったが、1×10^5 cells/mlでは35%の卵子に精子の侵入が見られた。FM-PVAおよびFM-BSAにおいても同様の傾向が認められ、1×10^4 cells/mlで受精を行った場合の精子侵入卵子率は、FM-PVAおよびFM-BSAでそれぞれ13%、44%であり、1×10^6 cells/mlの場合には、それぞれ69%、75%に上昇した（図4－2）。したがって、タンパク質（BSA）を添加していない受精培地を用いた場合でも、受精時

の精子濃度を高めることで、精子侵入卵子率を高めることができた。

（4）タンパク質(BSA)および卵丘細胞が精子の受精能におよぼす影響（実験4）

精子の卵子への侵入におよぼすタンパク質および卵丘細胞の効果を見るため、BSA添加あるいは無添加（PVA添加）受精培地を用いて、それぞれ卵丘細胞剥離および付着卵子卵子への精子の侵入状況を観察した。その結果、卵丘細胞の有無は、精子侵入卵子率、単精子侵入率、および平均侵入精子数には影響を与えていなかったが、培地に添加したBSAあるいはPVAを添加した培地間で差が見られた($P<0.05$)。精子侵入卵子率、単精子侵入率、および平均侵入精子数は、FM-PVAでは、卵丘細胞剥離のそれぞれ9, 88%および1.1、卵丘細胞付着卵子では、それぞれ17, 76%および1.3で有意差はなかった。FM-BSAでは、卵丘細胞剥離および付着卵子を用いた場合のそれぞれの値は、78, 31%および4.3（卵丘細胞剥離卵子）、81, 21%および4.3（卵丘細胞付着卵子）で有意差はなかった。いずれの値も、卵丘細胞の有無による差は認められず、PVAを添加した培地を用いた場合には、BSAを添加した培地を用いた場合に比較して、精子侵入卵子率は低く、単精子侵入率は高く、平均侵入精子数は少ない傾向が見られた。したがって、卵子を取り囲んでいる卵丘細胞の有無は、精子の卵子への侵入能に影響せず、一方、タンパク質（BSA）を添加した受精培地は、合成高分子(PVA)を添加した培地に比較して、その侵入能を高める効果が認められた（表4－8）。

（5）結果の要約

本節では、体外受精に用いる培地に広汎に添加されているタンパク質が精子の卵子への侵入におよぼす効果を明らかにすることを目的として行った。まず、もっとも一般的に用いられているウシ血清アルブミン(BSA)、あるいは種々のタンパク質を含んでいる溶液であるウシ胎仔血清(FCS)、合成高分子であるPVAおよびPVPを受精培地に添加し、その効果を検討した。BSAおよびFCSを含んでいる培地に比較して合成高分子を含む培地あるいはそれらを含まない培地を用いた場合に精子の卵子への侵入能は低い

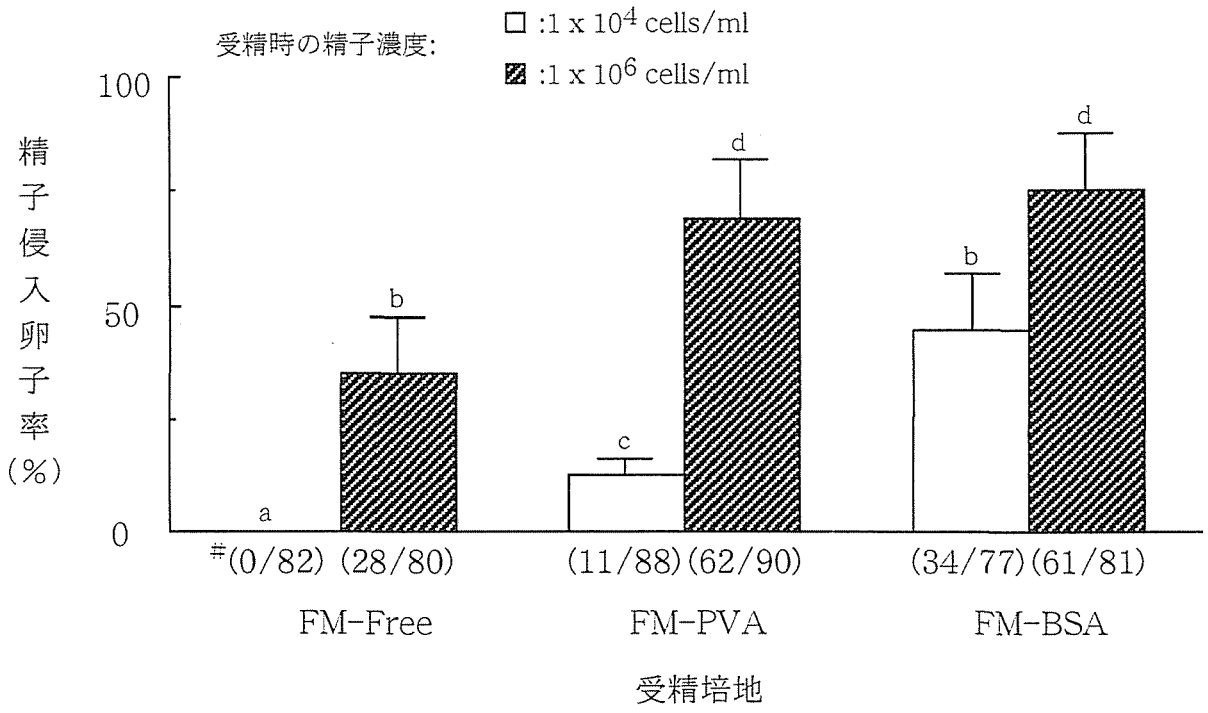

図４－２．タンパク質（BSA）および精子濃度が精子の卵子への侵入におよぼす影響

PM-BSA 中で前培養を行った精子と体外成熟培養を行った卵子とを、5 mg/ml PVA あるいは BSA を添加した受精培地（それぞれ FM-PVA および FM-BSA）、あるいはそれらを添加しない受精培地（FM-Free）中で共培養した。共培養時の精子濃度は、1 x 10^4 あるいは 1 x 10^6 cells/ml とし、培地に添加するタンパク質（BSA）および合成高分子（PVA）が、異なる精子濃度での精子の卵子への侵入におよぼす影響を調べた。値は、平均値±SE で表示した。

#（ ）内は、精子侵入卵子数／卵核胞崩壊供試卵子数

a, b, c, d 同一項目内の異なる肩文字を持つ値間に有意差あり（$P < 0.05$）

表４－８．タンパク質（BSA）および卵丘細胞が精子の受精能におよぼす影響

受精培地	卵丘細胞§	精子侵入卵子数／供試卵子数#	精子侵入卵子率（範囲）	単精子侵入卵子数（%）	平均侵入精子数± SE
FM-PVA	−	17/196	8.7 (2-20)[a]	15 (88.2)[a]	1.1±0.1[a]
	+	33/198	16.7 (2-28)[a]	25 (75.8)[a]	1.3±0.1[a]
FM-BSA	−	146/187	78.1 (50-100)[b]	45 (30.8)[b]	4.3±0.3[b]
	+	153/188	81.4 (57-100)[b]	32 (20.9)[b]	4.3±0.3[b]

§ −: 卵丘細胞剥離卵子、+: 卵丘細胞付着卵子

供試卵子は、卵核胞崩壊卵子を用いた

a, b 同一項目内の異なる肩文字を持つ値間に有意差あり（$P < 0.05$）

ことが示され、培地への添加タンパク質が精子の受精能を高めていること、また一方で、タンパク質に換えて合成高分子を添加した培地においても低率ながらも精子は卵子に侵入可能であることが明らかになった（実験１）。次に、精子の前培養時のタンパク質(BSA)および合成高分子(PVA)の効果を見るため、精子の前培養培地および受精培地にそれぞれBSAあるいはPVAを添加して体外受精を行った。その結果、精子の卵子への侵入能は、受精培地中のBSAの有無による影響を強く受け、精子の前培養中のBSAの有無による差異はなく、受精時のBSAが精子の受精能を高めていることが示された（実験２）。続いて、タンパク質(BSA)および精子濃度が精子の卵子への侵入におよぼす効果を検討したところ、精子と卵子の共培養時の精子濃度を高めることで、タンパク質（BSA）を添加していない受精培地を用いた場合であっても、精子侵入卵子率を高めることができた（実験３）。さらに、精子の卵子への侵入におよぼすタンパク質および卵丘細胞の効果を見た。卵子を取り囲んでいる卵丘細胞の有無による、精子の卵子への侵入能におよぼす影響はなく、タンパク質（BSA）の存在による精子の侵入能を上昇させる効果が認められたのみであった（実験４）。

第４節　新たな体外受精培地の開発とその有効性

本節では、これまで得られた知見をもとに、最適なブタ体外受精培地を明らかにするため、体外受精に適切であると考えられる受精培地を作成し、精子の侵入を指標として、現在までに報告されている培地と比較した。同時に、精子と卵子の共培養時間と受精培地の影響を調べた。まず、一般的にブタの体外受精に用いられているmBOと、新たに開発した受精培地（Pig-FM）の比較を、続いて異なる精子と卵子の共培養時間での精子の受精状況を４種類の培地で比較した。

１．材料および方法

精子の凍結保存と融解

精子は３頭の受胎能を持つことが確認されている雄ブタから採取し、凍結融解した射出精液を用いた。採取した精液はBwanga *et al.* (1990) の方法を参考に準備した。精液をBTS希釈液 (Pursel & Johnson, 1975) (32 ℃) で希釈し、徐々に15℃まで温度を下げた後、この温度で３時間保持した。その後、800 g, １０分間の遠心を行い、上清を除去し、沈殿した精子を、卵黄とラクトースを含む希釈液で、遠心前の容量まで希釈した（15 ℃）。精液温度を２時間かけて５℃にまで下げ、最終希釈液 (卵黄, lactose, Equex STM [Nova Chemical Sales, Inc., Scituate, MA, USA], glycerol) で精子濃度が 1×10^9 cells/mlとなるように希釈した (最終グリセロール濃度：3%)。希釈後の精液は、0.5 mlの凍結用プラスチック製ストローに入れ、プログラムフリーザー (Mini Digitcool 1300, IMV, France) で凍結した (5 to -5 ℃: 3 ℃/分、-5 to -140 ℃: 40 ℃/分)。凍結したストロー管は、使用まで液体窒素中で保存した (Eriksson & Rodriguez-Martinez, 2000)。凍結精液の融解は、第２章第４節の方法にしたがって行い、融解した精液は、4.5 mlのWS-PVAで希釈し、洗浄した (600 g, 8 分)。

卵子の準備および体外受精

卵子の準備および体外受精は第２章第２節の方法に準じた。卵子の体外成熟培養にはTCM199-FCSを用いて４５時間の培養を行った。また、精子の前培養は行わず、受精には数種類の培地（以下に記載）を使用し、精子濃度は、2.0×10^6 cells/mlに調整した。

受精培地

本節では、以下の５種類の培地を精子と卵子の共培養（受精）培地として用い、精子の卵子への侵入におよぼす効果を比較した。１）修正トリス緩衝培地(modified Tris-buffered medium: mTBM, Abeydeera & Day, 1997、付表２)、２）修正タイロード溶液(PM-BSAに同じ）、３）修正BO溶液、４）TCM 199、および５）新たに開発した受精培地、Pig-FMである。Pig-FMの組成は、表４－９に示した。この培地は、他の培地に比較して主にNaCl濃度が低く、KCl濃度が高いこと、およびグルコースを添加していないことで特徴付けられる。なお、いずれの受精培地も、8 mM $CaCl_2$、2 mMピルビン酸ナトリウム、2 mMカフェイン、および5 mg/ml BSAを含んでいる。なお、mBOの$CaCl_2$濃度は、2.25 mM以上では沈殿を生じるため、2.25 mMとした。

実験１．新たに開発した培地(Pig-FM)での精子の受精状況

本実験は、新たに開発した受精培地(Pig-FM)の有効性を検討することを目的として行った。凍結融解した射出精液由来の精子と９時間、Pig-FM中で共培養を行った。Pig-FMの有効性を見るため、ブタ体外受精に用いる受精培地として比較的広汎に用いられているmBOを用いて精子の卵子への侵入状況を比較した。

実験２．精子と卵子の共培養時間および受精培地が体外受精結果におよぼす影響

実験１ではPig-FMとmBOの比較を行ったが、本実験では、さらに３種の受精培地、

表４－９．Pig-FMの組成*

組成	濃度 (mM)
NaCl	90.0
KCl	12.0
$NaHCO_3$	25.0
$CaCl_2$	8.0
$MgSO_4$	0.5
NaH_2PO_4	0.5
Pyruvate	2.0
Lactate	10.0
Hepes	10.0
Caffeine	2.0
BSA	5 mg/ml
pH	7.5-7.6

*この培地は独自に開発したものである

mTBM, FM-BSA およびTCM 199 と Pig-FM との比較を行った。また、精子と卵子の共培養を 3, 6 および 9 時間行い、受精時間と精子の卵子への侵入状況との関係を調べた。

2．結　果

（1）新たに開発した培地 (Pig-FM) での精子の受精状況（実験 1）

Pig-FM の有効性を調べるため、ブタ体外受精に比較的広汎に用いられている mBO と Pig-FM の比較を行ったところ、Pig-FM を用いた場合、mBO に比較して精子侵入卵子率は 高く ($P < 0.01$)、一方、単精子侵入率は低かった ($P < 0.05$)。また、単精子効率に差は認められなかった。さらに、前核形成率は、mBO では 0% であったのに対して、Pig-FM で約 20% と高い傾向が見られたが統計的有意差は認められなかった（表４－１０）。したがって、Pig-FM は精子の受精能を高めていることが明らかになった。しかし、単精子侵入率は低く、また、単精子効率は mBO と違いがなかったことから、今後、これらを改善していくことが求められる。

（2）精子と卵子の共培養時間および受精培地が体外受精結果におよぼす影響（実験 2）

実験 1 で比較に用いた mBO 以外にブタの体外受精で用いられている受精培地、mTBM, FM-BSA, TCM199 と Pig-FM との受精培地の比較を行った。さらに、精子と卵子の共培養時間を変え、時間経過に伴う各培地での卵子への精子の侵入状況を調べた。その結果を表４－１１に示した。精子侵入卵子率は、培地 ($P < 0.01$) および共培養時間 ($P < 0.01$) 間で差が認められた。Pig-FM は高い精子侵入卵子率を示し、比較対照中で最も高い mTBM との間にいずれの培養時間でも統計的な有意差は認められなかった。また、３時間の共培養時間での精子侵入卵子率は、６および９時間区よりも低く ($P < 0.01$)、６と９時間区の間には差は見られず、FM-BSA 以外は６時間で精子の卵子への侵入はプラトーに達していることが示される。FM-BSA では、９時間まで精子侵入卵

表４－１０．Pig-FM あるいは mBO で受精させたときの精子の卵子への侵入[¶]

受精培地	供試卵子数[#]	精子侵入		単精子侵入		単精子効率	平均侵入精子数 ± SE	卵子数 (%)[§]	
		卵子数 (%)	範囲 (%)	卵子数 (%)	範囲 (%)			MPN	M & FPN
Pig-FM	73	63 (86)[a]	74 - 100	14 (22)[a]	0 - 35	19	2.8 ± 0.2[a]	13 (21)	12 (19)
mBO	73	11 (15)[b]	0 - 33	10 (91)[b]	83 - 100	14	1.1 ± 0.1[b]	0 (0)	0 (0)

[¶] 4 反復の結果

[#] M II 卵子

[§] MPN: 雄性前核形成卵子、M&FPN: 雌雄（両）性前核形成卵子

[a, b] 同一項目内の異なる肩文字を持つ値間で有意差あり ($P < 0.05$)

表４－１１．受精培地および精子と卵子の共培養時間が精子の卵子への侵入におよぼす影響の比較[¶]

精子と卵子の共培養時間	受精培地	供試卵子数[#]	精子侵入		単精子侵入		平均侵入精子数	
			卵子数 (%)	範囲 (%)	卵子数 (%)	範囲 (%)	±SE	単精子効率
3 h	mTBM	63	23 (37)^{ab}	11 - 54	15 (65)^{agh}	50 - 100	1.5 ± 0.7 ^{a}	24 ^{adg}
	FM-BSA	56	5 (9)^{c}	5 - 15	5 (100)^{ah}	100	1.0 ± 0.0 ^{a}	9 ^{bcf}
	TCM 199	57	3 (5)^{c}	0 - 10	3 (100)^{ach}	100	1.0 ± 0.0 ^{abcd}	5 ^{b}
	Pig-FM	50	19 (38)^{ab}	13 - 53	16 (84)^{a}	78 - 100	1.3 ± 0.8 ^{ad}	32 ^{ae}
6 h	mTBM	59	49 (83)^{de}	69 - 91	22 (45)^{bcgi}	31 - 64	1.9 ± 1.0 ^{b}	37 ^{a}
	FM-BSA	65	32 (49)^{a}	42 - 57	22 (69)^{ad}	50 - 80	1.3 ± 0.6 ^{a}	34 ^{ah}
	TCM 199	60	19 (32)^{b}	12 - 46	10 (53)^{dehi}	30 - 86	1.5 ± 0.7 ^{abd}	17 ^{cde}
	Pig-FM	47	39 (83)^{de}	68 - 100	13 (33)^{bej}	27 - 50	2.3 ± 1.2 ^{bcd}	28 ^{ade}
9 h	mTBM	64	50 (78)^{de}	59 - 96	17 (34)^{bej}	14 - 54	2.0 ± 1.0 ^{de}	27 ^{ade}
	FM-BSA	62	46 (74)^{d}	56 - 86	24 (52)^{dehi}	28 - 70	1.8 ± 1.1 ^{ae}	39 ^{a}
	TCM 199	60	20 (33)^{ab}	27 - 45	15 (75)^{ad}	67 - 100	1.3 ± 0.6 ^{a}	25 ^{ade}
	Pig-FM	48	43 (90)^{e}	86 - 100	9 (21)^{fj}	9 - 30	2.4 ± 1.3 ^{cd}	19 ^{efgh}

[¶] 3反復の結果

[#] M II 卵子

[a-j] 同一項目内の異なる肩文字を持つ値間で有意差あり ($P < 0.05$)

子率が上昇していた。単精子侵入率では、精子侵入率とは逆にPig-FMとmTBMは、FM-BSAとTCM199より低く、Pig-FMとmTBM、およびFM-BSAとTCM199との間に統計的な有意差はなかった。単精子効率は、6と9時間の共培養時間による違いは認められなかった。したがって、Pig-FMとmTBMは他の培地に比較して精子の卵子への侵入を促進しており、これらの培地を用いた場合、6時間（以内）の精子と卵子の共培養で精子の卵子への侵入は完了することが示唆された。また、実験1と同様に精子侵入卵子率が高まると単精子受精率は低下する問題を今後解決する必要がある。

（3）結果の要約

本節では、新たに開発した受精培地であるPig-FMの有効性を調べるため、ブタ体外受精に比較的広汎に用いられている受精培地とPig-FMの比較を行った。Pig-FMを用いて体外受精を行った場合、mBOに比較して精子侵入卵子率は高く、Pig-FMは精子の受精能を高めていることが示された（実験1）。さらに、実験2では、精子と卵子の共培養を3から9時間、Pig-FMとmTBM, FM-BSAおよびTCM199を用いて行い、共培養時間および受精培地を比較した。精子侵入卵子率は、共培養時間および培地の影響を受けていた。FM-BSA以外の受精培地では、6時間で精子の卵子への侵入はプラトーに達していることが示された。さらに、Pig-FMとmTBMは他の培地に比較して精子の卵子への侵入を促進していた。しかし、これらの培地を用いた場合、単精子侵入率は低く、今後改善していく必要がある。

第5節　考　察

1．精子の受精能に対する重炭酸（イオン）の重要性

本章の結果から、用いた培地のpHを厳密に調整することでpHの変動による結果の誤差を除去することにより、受精培地に添加した重炭酸塩には精子の受精能を高める効果のあることが示された。また、カフェインは単独では効果がなく、重炭酸の存在で精子の受精能を高めることが明らかになった。過去の報告では受精にとっての重炭酸の有用性が、マウス（Lee & Storey, 1986）や、モルモット（Bhattacharyya & Yanagimachi, 1988）、ハムスター（Boatman & Robbins, 1991）で報告されている。そして、多くの報告は、重炭酸が精子の活力と代謝を高めていることを示す結果を得ている（ウサギ: Hamner & Williams, 1964; ヒツジ: Murdoch & White, 1971; モルモット: Garbers *et al.*, 1982; ブタ: Tajima *et al.*, 1987; Okamura *et al.*, 1985）。しかし、重炭酸、CO_2、そしてpHの間には密接な相互関連性があるため、以前に示されている重炭酸の効果は、いくつかの場合、pHの変化によって引き起こされていた可能性は否めない（Salisbury & Lodge, 1962; Mann, 1964; Peterson & Freund, 1973）。したがって、そのような不確定さを回避することが必要である。本章の実験では、Umbreit (1957) の提唱した理論に基づき、重炭酸/CO_2組成を正確に調整した培地を作成した。平衡状態にあるpHは予測値に非常に近いものであった。したがって、重炭酸を添加した受精培地を用いたときの精子侵入卵子率の上昇は、pHの要因ではなく、重炭酸塩/CO_2の効果である。本章の結果は、BoatmanとRobbins (1991) の結果と一致しており、彼らは重炭酸はハムスター精子の透明帯への侵入を促進したことを示し、重炭酸の作用を受精能獲得を誘導する因子と解釈している。本研究の結果からは、重炭酸の影響は、明らかに精子の前培養時ではなく精子と卵子の共培養時に作用しており、また、卵子に対してよりも精子に対する影響によって重炭酸は受精に作用していると考えられる。すなわち、まず第一に、精子と卵子の共培養の直前まで、卵子は体外成熟培養時に重炭酸に接触している。卵子を介した影響が重炭酸無添加培地に移した直後に急激に変わるとは考

えにくい。第二に、重炭酸は多精子受精率を非常に高めていた。多精子受精率は精子侵入率と高い相関があり（Kendall rank 相関, $P < 0.001$, n=10; Campbell, 1974)、多精子受精の増加は、卵子を取り囲んでいる受精能を獲得した精子の数の増加の結果としてよく説明することができる (Rath, 1992)。最も強力な理由として、塩蔵卵子を用いた予備試験では、卵子がまったく活性を持っていない場合でも、重炭酸は精子の透明帯への接着や透明帯への侵入を促進していた (Clarke & Harrison, 1993) ことが挙げられる。

いろいろな培地や実験方法がブタ配偶子の体外受精を行うために用いられている (Hunter, 1990)。重炭酸を含んでいる培地が、ほぼ普遍的に用いられていることに加えて、一般的に二つの特徴がある。精子と卵子の共培養前に高濃度で精子の前培養を行うこと、および共培養時にカフェインを用いることである。本研究で、1から2日間保存した液状精液を用いた場合、重炭酸は前培養時には必要ではなかった。前培養に関しては、高濃度の精子懸濁液の pH は、代謝によって急激に低下することを強調するべきである。本研究でも、4×10^8 cells/ml で 90 分間の培養後、培地の pH は 7.8 から 7.5 に下がっていた。pH 7.8 の培地は Cheng (1985) によって開発され、それ以降精子の前培養培地に多く引用されているが、精子の培養時もその値を維持していたかどうかは定かではない。培養前に高い pH 値を示す前培養培地の有効性は、Cheng (1985) が指摘しているように、精子の代謝に損害を与える程度まで pH が低下することを避けるためだけなのかもしれない。Hepes などの緩衝剤を用いることで前培養培地の pH を維持させ、その時の効果を検討することで、今後前培養時の最適な pH を求めることができるだろう。

カフェインは、Cheng (1985) が最初に言及して以来、いくつかのグループでブタ体外受精に用いられている (Wang *et al.*, 1991)。本研究では、受精培地中のカフェインは重炭酸の存在下で精子侵入を促進していたが、重炭酸がない場合には受精を引き起こすことはできなかった。これに対し、重炭酸は単独（カフェイン無添加）で受精を成立させていた。これらの結果は、重炭酸は受精に必要不可欠な成分ではあるが、カフェインは促進的な効果のみを持つことを示唆する。

重炭酸とカフェインが、その影響をどのような機構で調節しているのかについては、現在のところ不明である。どちらもブタ精子の活力を高めることが報告されている（重炭酸: Tajima *et al.*, 1987; カフェイン: Garbers *et al.*, 1973; Bamba & Kojima, 1978）。しかし、両物質（成分）とも、本研究の体外受精に用いた手法と近似した条件下で、ブタ精子の細胞膜の不安定化の原因となっているという報告もある（Harrison *et al.*, 1993）。受精するために、精子は透明帯の表面で先体反応を起こすだけではなく、先体反応によって放出される酵素の作用と同時に、活力によって透明帯を通る経路を切り開く必要がある。重炭酸とカフェインは、どちらも類似した役割、すなわち先体反応の準備において精子の膜を不安定化させ、透明帯への侵入を容易にするために活力を高める役割を果たしているのかもしれない。その２つの物質は、類似した機構で作用している可能性がある。

２．タンパク質の必要性

体外受精時の血清あるいは血清アルブミンの役割は、いまだに未知な部分が多い（Sidhu & Guraya, 1989）。Zn^{2+} イオンは、マウス精子の体外での受精を阻害することが報告されており（Aonuma *et al.*, 1982）、BSA のひとつの役割として、この Zn^{2+} などの精子にとって有害な重金属イオンをキレートする作用があることが考えられている。Fraser（1984）は、アルブミンの役割として、精子表面に結合した受精を阻害する物質の除去を挙げており、アルブミンのない状態では先体反応が比較的緩慢に起こるのではないかと推測している。本研究では、アルブミン無添加培地を用いた場合、添加培地をに比較して低い精子侵入卵子率を示した。このことは、アルブミン欠如培地中では、精子は先体反応が遅延したこと、あるいは受精能獲得を起こし難かったことが考えられる。

アルブミン中の脂肪酸組成が、先体反応（AR）を調節しているとも考えられている（Lui & Meizel, 1977）。細胞膜の脂質二重層の組成が、その流動性に重要な役割をもっていることが知られている（Bretscher *et al.*, 1994）。リン脂質中のシス二重結合が多く存在する場合、あるいはコレステロール／リン脂質の比が低いと、細胞膜の流動性は

増加する。Davis (1981) および Davis ら (1980) は、精子細胞膜のリン脂質およびコレステロールの含量が精子の受精能獲得および先体反応に反映するとしている。すなわち、コレステロール／リン脂質の比が高い場合、受精能獲得に長い時間が必要であることを示唆している。アルブミンが、コレステロール／リン脂質比を変化させることで、速やかにかつ効果的に受精能獲得および先体反応を起こすことが推測されている (Davis, 1980)。本研究の結果では、BSA は、他の高分子合成物に比較して、精子の卵子への侵入を促進する効果が見られ、上述の推測を支持している。一方で、タンパク質無添加培地中でも、ブタ精子は卵子へ侵入が可能であることが示されたことから、BSA は、効果的に精子の受精能獲得および先体反応を引き起こすが、必ずしも必須ではないことが示唆された。

他の動物種では、タンパク質無添加培地を用いた体外受精が試みられている。ウシでは、BSA は精子の卵子への侵入に必須ではないことが報告されている (Saeki *et al.*, 1993)。Fraser (1985) は、アルブミンはマウスの体外受精時に必要であるが、少なくとも精子の受精能獲得には必要ではないとしている。今回の実験においても同様なことが示され、ブタ精子の前培養にはタンパク質は必要ではないが、受精時（精子と卵子の共培養時）には影響を与える結果が得られた。合成高分子である PVP は精子と卵子の相互作用にとって有害な物質を含んでいると考えられており (Fraser, 1985)、最近その代替合成高分子物質として、PVA が用いられている。しかしながら、少なくとも本研究結果からは PVP の卵子への精子の侵入に対する有害な作用は見い出せなかった。タンパク質および合成高分子の両者を添加していない培地 (FM-Free) 中では、卵子が容易にシャーレ表面に接着するため、取り扱いが難しく、また、精子と卵子の共培養直後からシャーレの表面に付着する多数の精子が観察された。このため、ピペットやシャーレ表面に精子および卵子が接着するのを避けるために PVA を用いたが、細胞付着による受精阻害を防ぐ効果以外の作用は PVA にはないと考えられる。

3．精子の受精能におよぼすその他の要因

Tesarik (1985) は、卵丘細胞の存在下でヒト精子が効果的に先体反応を起こすこと、Gwatkin ら (1972) はハムスター精子が卵丘細胞と共存することで効果的に受精能を獲得することを示した。しかし、体内での精子の受精能獲得に関与している主要なものは卵丘細胞や顆粒層細胞ではなく、雌性生殖道からの分泌物によるものであるとする報告 (Yanagmachi, 1994) もあり、体内で卵丘細胞が果たしている役割については不明である。今回の実験では卵丘細胞の有無により、精子侵入卵子率に差は認められず、卵丘細胞の精子の受精能に対する効果は認められなかった。おそらく卵丘細胞の役割として卵子が完全に成熟することに主たる作用があり、精子に対する効果は少ないと考えられる。Kikuchi ら (1993) は、卵丘細胞と顆粒層細胞の付着により卵子へのブタ精子の侵入率に差の見られない結果を示しており、今回の結果とも一致している。

精子と卵子の共培養時の精子濃度は、精子の卵子への侵入に大きな影響を与える。Niwa と Chang (1974) はラットの体外受精において、精子濃度は精子侵入卵子率に大きな影響を与えることを例証し、精子濃度が高い場合、あるいは、ある濃度から低い場合でも精子の侵入は起こりにくくなり、従って最適な精子濃度の設定が要求されると結論している。Siddiquey と Cohen (1982) は、マウスでは高い精子濃度で精子と卵子の共培養を行うと、精子侵入が促進されたことを報告している。また、Leibfried-Rutledge ら (1989) は、ウシの体外受精では、用いる精子の由来（提供雄）の違いによって、最適な精子濃度の設定が必要であるとしている。第３節実験１（表４－６）で、タンパク質無添加培地中での精子侵入卵子率は低かった一方で、精子と卵子の共培養時の精子濃度を高めると、BSA の存在しない場合でも精子侵入卵子率は高まった（第６節実験３、図４－２）。ウシ同様ブタでも精液を採取する雄個体毎に精子と卵子の共培養時の最適精子濃度を設定する必要があることは経験的には判明しているが、この点についてはさらなる研究が必要である。

４．新たに開発した培地の有効性

体外受精培地は、卵子と精子の生存に必要な緩衝作用、有害物質の除去、エネルギー源の供給、および適切な生理的環境の提供などにより最終的に配偶子が体外で受精することを可能にする多様でしかも重要な役割を担っている。本研究では、mTBM およびPig-FM 中での精子侵入卵子率は、mBO、TCM 199 あるいは FM-BSA に比較して高く、さらにmTBM と Pig-FM では、共培養6時間までにすでにプラトーに達していた。mTBM は、トリス緩衝の簡素な組成の溶液であり（Abeydeera & Day, 1997）、$NaHCO_3$ を含んでいない。ほとんどのブタ体外受精の研究では、$NaHCO_3$ を含む培地を体外受精用の培地として使用している（Nagai *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1995; Kikuchi *et al.*, 1999)。また、本章第２節の結果（表４－２）からは、$NaHCO_3$ は体外でブタ精子が受精するためには必須であることが明らかにされている。mTBM を用いて、気相条件が 5% CO_2 の培養器内で体外受精を行った本研究や以前の研究(Abeydeera & Day, 1997) でも、卵子内への精子の侵入が観察されていることから、少なくともこれらの条件では、精子の受精能を維持するために体外受精培地に $NaHCO_3$ を添加する必要はない可能性がある。しかしながら、重炭酸と CO_2 は非常に緊密な関係があり、また、ブタ体外受精はほとんどの場合 CO_2 ガスを導入した培養器内で行われていることに注目する必要がある。興味深いことに Abeydeera と Day (1997) は、大気中で mTBM 中では精子の侵入は見られなかったことを指摘している。本研究でも、Hepes で緩衝した重炭酸塩を添加しない受精培地を用い、大気と同一の気相条件下で体外受精を行った場合、非常に低い精子侵入卵子率を示している。したがって、ブタの体外受精に $NaHCO_3$ を添加しない培地を用いる場合には、少なくとも、ある一定の濃度の CO_2 は必須であり、気相中の CO_2 は培地に溶け込んで重炭酸イオンとなることから、重炭酸イオンが必須であることとは矛盾しない。培地成分が精子および卵子の機能におよぼす影響を観察する場合、組成の簡単なものを用いることが望ましい。TCM 199 は、通常すべての成分が粉末として包装された状態で入手するため、現在の体外受精を行う研究室でその組成構成を調製することは困難である。Pig-FM の特徴は、

他の受精培地に比較して添加されているKCl濃度が高く、逆に、NaCl濃度が低い。培地中の[K^+]を高めることで、精子の卵子への侵入能が高まることは第3章で明らかになり（表3－1）、細胞内[Ca^{2+}]を高める効果のあることが推定される。卵管内腔液の[K^+]は、体外受精に用いられている培地よりも高いことが知られており（第3章参照）、生体内での受精により近い環境であることが示唆される。ブタ精子は、個体および採取サンプル間で、その受精能にばらつきが認められる（第2章）。本章第4節では、3頭の雄から採取・作成した凍結融解精子を用いたが、Pig-FMを用いることによって、比較的安定して高い精子侵入卵子率を得ることができ、卵子への侵入能を高めるPig-FMは、これらの精子を用いた体外受精に有効に利用できることが期待できる。一方で、単精子受精率が低下する問題があるため、体内における受精時の環境を明らかにしていくことと同時に、それらを踏まえた培地のさらなる改善をしていく必要があろう。

第6節　要　約

本章では、体外受精に用いる培地の構成成分の中で、特に重炭酸およびタンパク質に着目して、これらが精子の受精能におよぼす影響について検討した。さらに、新たに開発した培地の効果を調べた。まず、pH を厳密に調整した受精培地を用いて体外受精を行ったところ、重炭酸欠如培地では精子の卵子への侵入は見られず、また、精子の前培養中には重炭酸が精子の卵子への侵入におよぼす効果は認められなかったことから、受精時に重炭酸は必要であることが明らかになった。また、カフェインは重炭酸と協調作用を持ち、精子の受精能を高めていることが示された（第2節）。続いて、培地のタンパク質が精子の卵子への侵入におよぼす効果を検討したところ、培地中にタンパク質が存在することで精子の卵子への侵入は促進され、その効果は受精時に見られるものであった。一方、タンパク質に替え、合成高分子を添加した培地であっても、低率ながら精子の卵子への侵入が見られ、タンパク質無添加培地での体外受精の可能性が示唆された。そこで、受精時の精子濃度を高めた結果、効率な精子侵入卵子率を得ることができた。さらに、タンパク質無添加培地において、卵丘細胞が精子の侵入におよぼす影響を調べたところ、卵丘細胞の有無による影響は見られなかった。これらのことから、ブタの体外受精は、タンパク質無添加培地を用いて行うことが可能となり、受精機構の解明に有効に利用できると考えられる（第3章）。さらに、新たに開発した受精培地である Pig-FM を用いて体外受精を行い、種々のいくつかの受精培地と比較したところ、精子の受精能が高められ、安定して高率な精子侵入卵子率が得られた。したがって、この新たに開発した培地が今後のブタの体外受精に利用できると思われる（第4節）。

第５章　単精子侵入率向上の方策

第１節　緒　言

正常な体外受精卵を効率的に作出することは、家畜の育種効率を高めるとともに、受精のメカニズムについての基礎的な情報を解き明かすためにも有用である。哺乳動物の多精子受精卵は、胎児にまで発生することができず(Hunter, 1996)、また、確実な単精子受精方策の解決はいまだにブタ体外受精の大きな課題の一つである(Funahashi & Day, 1997)。ブタ体外受精における多精子受精の問題を解決するために、多くのアプローチが試みられてきた(Niwa, 1993; Nagai, 1994; Funahashi & Day, 1997)。しかし、現在のところ、低い多精子受精率を高い再現性で実現する体外受精法は見出されていない。ブタ精子の受精する能力は、雄間、あるいは同一雄でも採取反復間で変動が非常に大きい(Wang *et al.*, 1995; 本研究第２章第２節)。ブタ体外受精で多精子受精を避けるために行われている方法では、低い多精子受精を示す特定の雄（サンプル）から採取した精液が使用されている。しかしながら最終的な目標は、どの雄から採取した精液を用いた場合でも、多精子受精が発生しない、あるいは最小限に抑制し、単精子受精を確実にすることである。

精子は精巣上体液や副生殖腺の分泌液からなる精漿(seminal plasma: SP)に浮遊した状態で射出され、特にブタでは、精漿は精液の主要な成分である。精漿は精子の機能や受精能に影響を与えていることが知られている(Okamura *et al.*, 1985; Juang *et al.*, 1990; Killian, 1992; Therien *et al.*, 1997; Maxwell & Johnson, 1999; Topper *et al.*, 1999)。精漿の存在下で前培養したブタ精子に体外受精能はほとんどなく、精漿成分が精子表面に強く結合し、受精する能力を阻害していると考えられている(Nagai *et al.*, 1984)。一方、精漿は、精子の微細構造を安定化させる作用を持ち、ブタ精子が凍結融解過程に損傷を受けずに生存する能力を高めることが示唆されている(Watson, 1995)。しかし、精漿がブタ精子の受精能獲得などの生理的変化にどのような影響をおよぼして

いるのかは明らかではない。

卵管内で、精子は排卵した卵子と直面する以前に、雌性生殖道の上皮細胞や卵子を取り囲む卵丘細胞といった細胞の他に、子宮液、卵管液、そして卵胞液とも接触する (Fazeli *et al.*, 1997; 1999; Mburu *et al.*, 1997; Myles & Primakoff, 1997; Hunter *et al.*, 1998)。卵管上皮細胞の細胞膜と接触することで、精子の生存性が維持されることや (Smith & Nothnick, 1997、ウサギ)、特にブタでは、体外受精において卵管上皮細胞が多精子受精を抑える効果を持つことが報告されている (Nagai & Moor, 1990; Kano *et al.*, 1994; Dubuc & Sirard, 1995)。また、卵丘細胞は体外での卵子への精子の侵入率を上昇させる (Wang *et al.*, 1995) 結果もあるが、本研究第 3 章では卵丘細胞の存在効果は認められなかった。したがって、精子の受精能におよぼす卵丘細胞の効果を明らかにするためにはさらに検討が必要である。

卵管上皮細胞、卵丘細胞、あるいは卵丘-卵子複合体 (COCs) が分泌する成分は、受精時の精子および卵子に影響を与えていることが推測される (Siiteri *et al.*, 1988; Kikuchi *et al.*, 1993)。卵子の体外成熟培養中にブタの COCs から放出されている物質の一つに、細胞外グリコサミノグリカン (glycosaminoglycan: GAG) ファミリーの一つである (Salustri *et al.*, 1992; Nakayama *et al.*, 1996; Rodriguez-Martinez *et al.*, 1997) ヒアルロン酸 (Hyaluronan, Hyaluronic acid: HA) がある (Rodriguez-Martinez *et al.*, 1998)。反芻類の子宮および卵管液中に多量のヒアルロン酸が検出されており (Lee & Ax, 1984)、さらにまたブタ卵管内に分布していることも抗体組織化学的に示され、精子に生理的変化を誘起する機能が示唆されている (Rodriguez-Martinez *et al.*, 1998)。また、ヒアルロン酸は、各種体細胞の機能を調節する作用があり (Laurent & Fraser, 1992)、体外受精に用いるウシ精子の調整時に精子を「清浄化」する効果のあることが明らかになっている (swim-up 法) (Shamsuddin & Rodriguez-Martinez, 1994)。しかし、ヒアルロン酸がブタの体外受精におよぼす影響、および精子におよぼす影響については研究報告がない。

本章では、体外受精で正常な単精子受精卵を効率的に作出することを目的とし、ヒア

ルロン酸、卵丘細胞の効果、および単精子受精卵の効率的作出に有効であることが報告されている卵管上皮細胞が多精子受精を減少させる効果について検討した。また、ヒアルロン酸、卵丘-卵子複合体の培養上清、および精漿に関しては、これらが精子の機能的な状態におよぼす影響を知るために、受精能獲得様の変化（capacitation-like changes）を識別可能なCTC法（Saling & Storey, 1979; Fraser *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995）で染色した染色パターンについても調べた。

第２節　卵管上皮細胞が単精子侵入におよぼす影響

本節では、多精子受精を抑制し単精子侵入卵作出に効果のあることが報告されている培養卵管上皮細胞およびその細胞が分泌する成分を含む培養上清を用いて体外受精を行い、有効性を調べた。

１．材料および方法

培地

卵子の体外成熟培養には、TCM 199-FCS を、卵子の洗浄には、TCM 199-Hepes を用いた。精子の洗浄には、WS-PVA を用いた。受精培地には、Pig-FM を用いた。卵管上皮細胞の培養には 10% FCS を添加した MEM/F12 等比混合培地 (Gibco) を用いた。

卵管上皮細胞の調整

卵管上皮細胞は、と畜場で採取した卵管から調製した。卵管を生理食塩水で洗浄後、内腔を露出させ、卵管峡部および膨大部の各部位別に上皮細胞をメスの刃で軽く削り取り、培養液に回収した。２回の遠心による洗浄 (600 g, 8 分) 後、細胞濃度が 1×10^6 cells/ml となるように希釈し、シャーレに移し、培養器内で培養を行い（39 ℃, 5% CO_2, 95% 空気）、シャーレ内の底面を敷き詰めるように分裂増殖し、コンフルエントに達した後に実験に用いた。コンフルエントに達した細胞を受精培地で洗浄後、さらに、体外受精と時間、気相および温度を同条件で受精培地で培養した後に上清を回収し、フィルター (0.22 μm) を通し、卵管上皮細胞培養上清とした。

卵子の準備

卵子は、第２章第２節の方法にしたがって準備した。卵子の体外成熟培養は４５時間

行った。

精子の準備

精子は第４章第４節の方法で作成した凍結射出精液由来の融解精子を用いた。なお、本節で用いた凍結融解精液は、冷却前に３時間、精漿と共存させた精液由来の精子を用いた。

体外受精

体外受精は第２章第２節の方法にしたがって行った。精子の前培養は行わなかった。卵管膨大部、峡部および全部位由来の卵管上皮細胞の培養上清（卵管上皮細胞培養上清）を用い、あるいは、コンフルエントに達した膨大部、峡部および全部位由来の卵管上皮細胞をシャーレに敷き詰めた状態で体外受精を行った（卵管上皮細胞との共培養）。また、対照区としてPig-FMを用いた。精子と卵子の共培養は６時間行なった後、卵子を洗浄し、TCM199-BSA中で４時間の培養を行った。受精時の精子濃度は、1.5－2.0 x 10^6 cells/mlに調整した。

培養上清中のヒアルロン酸濃度の測定

培養上清中、および、体外受精を行った後の培養液中のヒアルロン酸濃度を、Tienthaiら(2000)が報告した放射性同位体を用いた方法で測定した。

２．結　果

卵管の全部位、膨大部あるいは峡部の上皮細胞を培養した上清液を用いたとき、および同上皮細胞との共培養を行ったときの体外受精結果を、対照区としての合成培地であるPig-FMでの受精結果とともに表５－１に示した。卵管上皮細胞培養上清を用いた場合の精子侵入卵子率は、いずれの部位でも対照区よりも高い傾向があったが有意な差で

表５－１．卵管上皮細胞および卵管上皮細胞培養上清が精子の卵子への侵入におよぼす影響[¶]

処理	供試卵子数[#]	卵子数 (%)		単精子効率	平均侵入精子数 ± SD
		精子侵入	単精子侵入		
対照区	62	48 (77.4)	14 (29.2)	22.6	2.4 ± 1.3
卵管上皮細胞培養上清					
全部位	56	45 (80.4)	19 (42.2)	33.9	1.9 ± 1.0*
膨大部	59	51 (86.4)	13 (25.5)	22.0	2.7 ± 1.5
峡部	62	52 (83.9)	21 (40.4)	33.9	2.1 ± 1.3
卵管上皮細胞との共培養					
全部位	52	30 (57.7)*	19 (63.3)**	36.5	1.7 ± 1.2*
膨大部	67	27 (40.3)**	17 (63.0)**	25.4	1.5 ± 0.8**
峡部	51	38 (74.5)	22 (57.9)**	43.1*	1.9 ± 1.4

¶ 3反復の結果

M II 卵子

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 対照区に比較して有意差あり

はなかった。また、単精子侵入率も、全部位と峡部上皮細胞培養上清で高い傾向があったが有意な差ではなかった。一方、峡部の卵管上皮細胞との共培養では、精子侵入卵子率は、対照区および上皮細胞培養上清と有意差がなく高い値を示したが、全部位と膨大部の上皮細胞との共培養では有意に低かった。しかし、単精子侵入率については、いずれの部位の上皮細胞との共培養でも、対照区および細胞培養上清より有意に高く、単精子効率も高い傾向があり、特に峡部上皮細胞との共培養では43% と最も高かった。上皮細胞の卵管部位間については、培養上清を用いたときの精子侵入卵子率は差がなく高かったが、共培養の受精では、全部位と膨大部の上皮細胞で有意に低かった。しかし、単精子侵入率では、培養上清、共培養ともに卵管部位間に差はなかった。

受精培地に用いた卵管上皮細胞培養上清のヒアルロン酸濃度を図５－１に示した。全部位で最も高く(304 ng/ml)、次いで峡部 (217 ng/ml)、膨大部 (145 ng/ml) の順であったが、有意差は認められなかった。また、卵管上皮細胞との共培養で受精させた後の培地中のヒアルロン酸濃度は、峡部で高い傾向にあったが (563 ng/ml)、部位間に有意な差は認められず、培養上清よりも高濃度であった（図５－２）。

卵管上皮細胞との共培養での受精では、峡部の上皮細胞を用いた場合に単精子効率が高く、有意ではなかったが膨大部、全部位に比較してヒアルロン酸濃度が高い傾向があり、ヒアルロン酸が単精子侵入卵子を作出するために効果のあることが示唆された。また、卵管上皮細胞培養上清のヒアルロン酸濃度は、共培養で受精後の培地中よりも低く、ヒアルロン酸は卵子（卵丘細胞）から多量に分泌されていることが示唆された。

結果の要約

合成培地 (Pig-FM) での受精に比較して、卵管上皮細胞培養との共培養で受精させることで単精子侵入率が高まった。一方、卵管上皮細胞の培養上清にその効果はなかった。卵管上皮細胞上清には 145～304 ng/ml のヒアルロン酸が含まれ、共培養での受精後の培養液にはさらに高い濃度の 479～563 ng/ml が含まれていた。

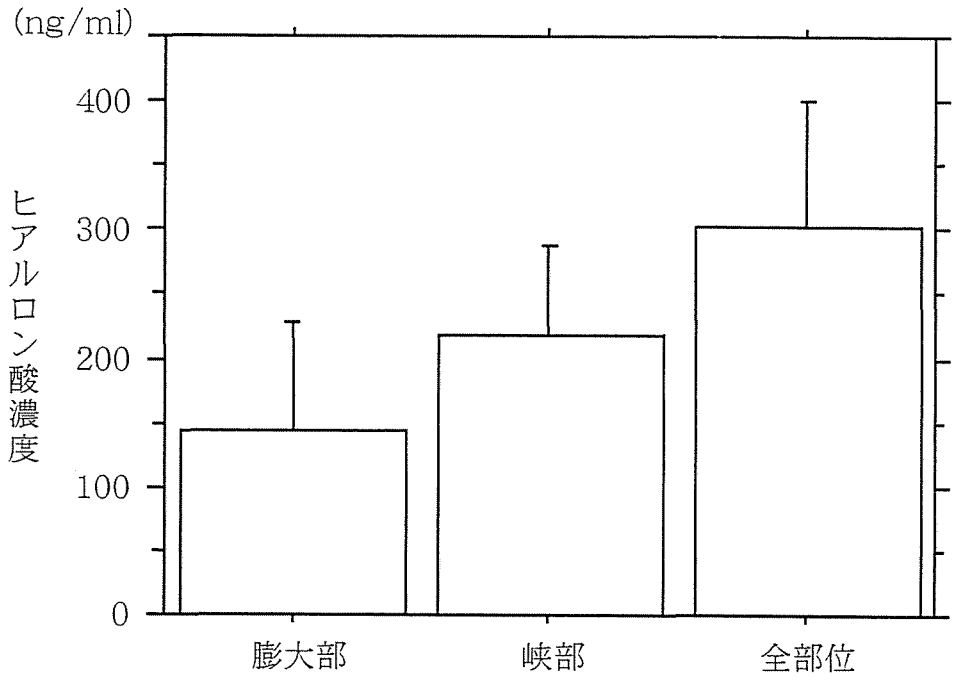

図５－１．卵管上皮細胞培養上清中のヒアルロン酸濃度

体外培養を行い、コンフルエントに達した卵管膨大部、峡部、および全部位由来の卵管上皮細胞を受精培地中で６時間培養した培養上清中のヒアルロン酸濃度を Tienthai ら (2000) の方法で測定した。

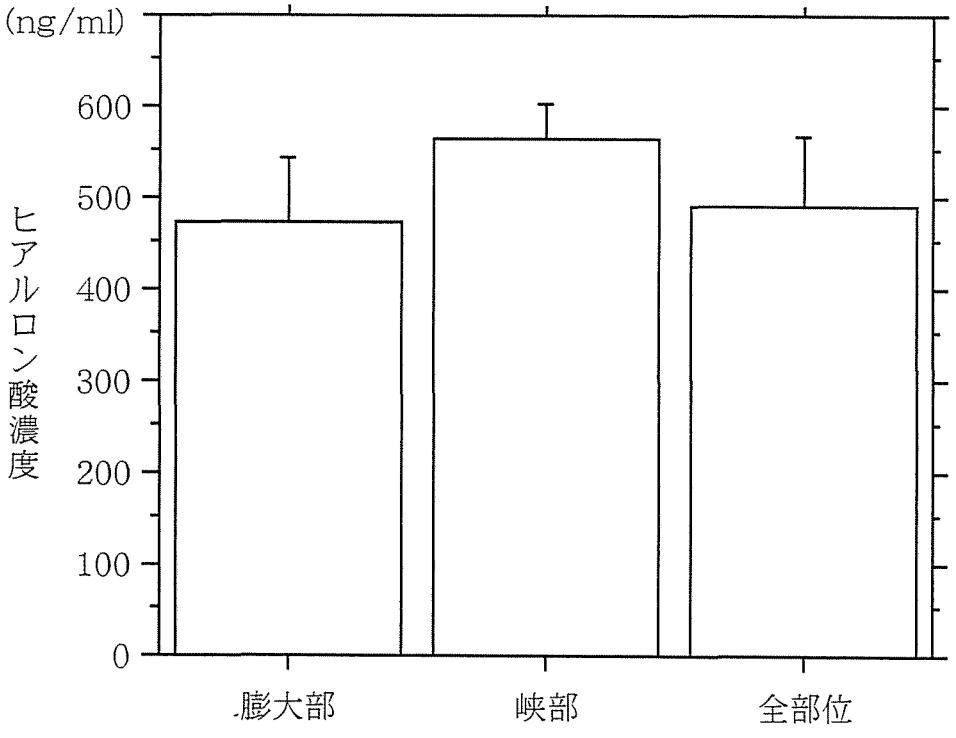

図５－２．精子と卵子および卵管上皮細胞の共培養を行った受精培地中のヒアルロン酸濃度

体外培養を行い、コンフルエントに達した卵管膨大部、峡部、および全部位由来の卵管上皮細胞を用いて受精培地中で６時間の精子と卵子の共培養後、上清中のヒアルロン酸濃度を Tienthai ら (2000) の方法で測定した。

第３節　ヒアルロン酸が単精子侵入におよぼす影響

前節で、卵管上皮細胞との共培養下で受精させたことで、単精子侵入率が有意に高まり、単精子効率が高まる傾向が見られ、受精培地にヒアルロン酸が 500 ng/ml 前後含まれていたことから、ヒアルロン酸が単精子侵入を効果的に起こさせていることが示唆された。また、体内の卵管内受精部位には高濃度のヒアルロン酸が存在していることから、本節では、ヒアルロン酸が精子の卵子への侵入、および単精子侵入におよぼす影響を明らかにすることを目的に行った。

１．材料および方法

培地

卵子の体外成熟培養には、TCM 199-FCS を、卵子の洗浄には、TCM 199-Hepes を用いた。精子の洗浄には、WS-PVA を用いた。精子の前培養培地には、PM-BSA、受精培地には、Pig-FM を用いた。ヒアルロン酸 (HA) は、 Bayer からの提供を受けた (Hyonate @ vet., Sweden) 。

精子および卵子の準備

精子は第４章第４節の方法で作成した凍結射出精液由来の融解精子を用いた。なお、本実験では、精液の凍結処理前に精液温度を 15℃ まで温度を下げた後、精漿の存在下で３ (Batch A)、１０ (Batch B)、あるいは２０時間 (Batch C) 保持した。卵子は、第２章第２節の方法にしたがって準備した。卵子の体外成熟培養は４５時間行った。

体外受精

体外成熟培養後、COCs は WS-PVA で２回、受精培地で２回洗浄し、受精培地の小滴中に移した。卵丘細胞剥離卵子は、COCs を、0.05% のヒアルロニダーゼ を含んで

いるWS-PVA中で、内径を狭くしたピペットで緩やかにピペッティングして作成した。精子は、血球計算盤で精子濃度を検査した後、希釈した。実験１、３および４は、受精培地で希釈した。実験計画にしたがい、希釈した精子を、卵子の入っている受精培地中に導入した。前培養処理をする精子の準備には、精液を前培養培地で希釈し、精子濃度を1×10^8 cells/mlにした。本節では、精子の前培養は39 ℃で１５分間行った（実験２）。前培養を行った精子は、遠心(600 g, 8分)で沈殿させた後、受精培地で懸濁し、受精培地に移した。受精時の精子濃度は$1.5 - 2.0 \times 10^6$ cells/mlに調整し、精子と卵子の共培養は９時間行った。

実験１．受精培地へのヒアルロン酸添加が単精子侵入におよぼす影響

前節で、卵管上皮細胞との共培養下で受精させたことで、単精子侵入率が有意に高まり、単精子効率が高まる傾向が見られ、受精培地中の濃度の測定結果から、ヒアルロン酸が単精子侵入を効果的に引き起こしていることが示唆された。本実験では、受精培地にヒアルロン酸を添加することにより受精成績の改善を試み、同時に卵丘細胞の作用について検討した。

ヒアルロン酸の有無による２種の培地を比較した。生体内での受精部位には0.5 mg/ml程度のヒアルロン酸が存在することが報告されていることから、ヒアルロン酸濃度を0および0.5 mg/mlとした。用いた培地は、1) 0 mg/mlヒアルロン酸、および4) 0.5 mg/mlヒアルロン酸である。いずれも、卵丘細胞が付着している卵子および剥離した卵子を用いてそれぞれを調査した。本実験では、精液の凍結処理前に精液温度を15℃まで温度を下げた後、精漿の存在下で２０時間保持したBach-C精子を用いた。

実験２．精子の前培養中のヒアルロン酸が単精子侵入におよぼす影響

実験１において、ヒアルロン酸は精子侵入卵子率あるいは単精子侵入率を高める効果が認められた。これらの効果が精子の受精能獲得など精子に対する効果か否かを確認するために精子の前培養培地へのヒアルロン酸の添加を試みた。洗浄した精子を２種類の

培地、1) 0 mg/ml ヒアルロン酸、 2) 0.5 mg/ml ヒアルロン酸添加、で前培養した。前培養後に遠心し、受精培地で再懸濁した後、卵子の入っている受精培地に精子を導入した。本実験では、精液の凍結処理前に精液温度を 15℃ まで温度を下げた後、精漿の存在下で２０時間保持した Bach-C 精子を用いた。

実験３．凍結前の精漿との接触時間の差が精子の卵子への侵入におよぼす影響

精漿は精子の受精能獲得を阻止することや凍結融解過程における精子の損傷を防ぐ作用を持つことが推察されたため、本実験では、精液の凍結処理前に精液温度を 15℃ まで温度を下げた後、精漿の存在下で３、１０、および２０時間保持した３種類の精子（それぞれ Batch-A, B および C）を用いて体外受精を行い、受精培地中のヒアルロン酸が精子侵入および単精子侵入におよぼす影響を見た。精子は洗浄後、 0.5 mg/ml ヒアルロン酸を添加、あるいは無添加の受精培地に導入した。いずれも、卵丘細胞付着卵および剥離卵子に関して検査した。

統計処理

それぞれの実験は４反復行った。得られたデータは、分散分析 (ANOVA) で解析を行った (Proc. GLM, Statistical Analysis System, 1994; StatView Version J-4.5 for Macintosh, Abacus Concepts, Inc.)。比率で表示されたデータは、アークサイン変換を行った後に解析した。さらに、体外受精結果は、カイ二乗検定、あるいは、フィッシャーの直接確率検定を行い、侵入卵子あたりの平均侵入精子数は、スチューデントの t 検定を用いて処理間の比較をした。

１．結　果

（１）受精培地へのヒアルロン酸添加が単精子侵入におよぼす影響（実験１）

卵丘細胞が付着、あるいは剥離した卵子を用い、受精培地にそれぞれヒアルロン酸無

添加と0.5 mg/ml添加したときの受精成績を表５－２に示した。卵丘細胞付着卵子と剥離卵子の間には、精子侵入卵子率に有意な差はなかったが、剥離卵子に比較して、付着卵子は単精子侵入率が低下し、平均精子侵入数は高まる傾向が認められた（$p<0.05$）。さらに、卵丘細胞付着卵子の精子侵入卵子率にヒアルロン酸が添加されている場合（72%）と添加されていない場合（52%）とで差が見られたが、単精子侵入率に差は見られなかった。加えて、卵丘細胞剥離した卵子を用いた場合、単精子侵入率は、ヒアルロン酸を添加している場合（78%）に、添加していない場合（57%）に比較して高い傾向見られたが、精子侵入卵子率に差は認められなかった。

（２）精子の前培養中のヒアルロン酸が単精子侵入におよぼす影響（実験２）

ヒアルロン酸を無添加、あるいは0.5 mg/ml添加した培地で前培養を行った精子を、卵丘細胞付着ないしは剥離卵子と体外受精したときの受精成績を表５－３に示した。その結果、精子の前培養培地へのヒアルロン酸の添加は、精子侵入卵子率には影響がなく単精子侵入率を高め（$P<0.05$）、平均侵入精子数を減少させていた（$P<0.05$）。また、卵丘細胞は、精子侵入卵子率を上昇させ（$P<0.05$）、単精子侵入率を低下させ（$P<0.01$）、平均侵入精子数を増加させていた（$P<0.01$）。さらに、ヒアルロン酸添加区（1.2）では、平均侵入精子数はヒアルロン酸無添加区（1.8）に比較して少なかった。前培養培地へのヒアルロン酸添加は、卵丘細胞付着卵子の単精子侵入率を増加させる傾向があった。

これらの結果、および実験１の結果から、ヒアルロン酸は、精子に作用し、単精子侵入を促進する効果があること、卵子の卵丘細胞は単精子侵入を阻害する作用を持つことが示された。

（３）凍結前の精漿との接触時間の差が精子の卵子への侵入におよぼす影響（実験３）

精液の凍結処理前に精漿との接触時間の異なる（３，１０，２０時間）３種の精液サンプル（Batch A, B, C）を用い、ヒアルロン酸を無添加（-）あるいは0.5 mg/ml添加し

表５－２．精子と卵子の共培養中のヒアルロン酸が精子の卵子への侵入におよぼす影響[¶]

ヒアルロン酸 (+/-)	卵丘細胞 (+/-)	供試 卵子数[#]	卵子率 ± SD (%) 精子侵入	単精子侵入	平均侵入精子数 ± SD
−	−	80	46 ± 17[a]	57 ± 13[a]	1.6 ± 1.0[ab]
+	−	85	44 ± 7[a]	78 ± 4[b]	1.3 ± 0.6[b]
−	+	66	52 ± 13[a]	50 ± 14[a]	1.9 ± 1.0[a]
+	+	78	72 ± 11[b]	50 ± 10[a]	2.0 ± 1.5[a]

[¶] 4反復の結果

[#] M II 卵子

[abc] 異なる肩文字を持つ値同士は同一列内で有意差あり($P < 0.05$)

[*] 値間にヒアルロン酸の有無による差あり($P < 0.05$)

表５－３．精子の前培養中のヒアルロン酸が精子の卵子への侵入におよぼす影響[¶]

ヒアルロン酸 (+/-) (前培養培地)	卵丘細胞 (+/-)	供試 卵子数[#]	卵子率 ± SD (%) 精子侵入	単精子侵入	平均侵入精子数 ± SD
−	−	90	44 ± 12[a]	50 ± 13[a]	1.8 ± 0.9[a]
+	−	74	35 ± 11[a]	81 ± 7[b]	1.2 ± 0.6[b]
−	+	83	80 ± 7[b]	35 ± 11[a]	2.3 ± 1.3[c]
+	+	80	81 ± 7[b]	46 ± 5[a]	2.0 ± 1.2[ac]

[¶] 4反復のデータ

[#] M II 卵子

[a,b,c] 異なる肩文字を持つ値同士は同一列内で有意差あり ($P < 0.05$)

[*] 値間にヒアルロン酸の有無による差あり ($P < 0.05$)

た受精培地(+)で、それぞれ卵丘細胞付着、あるいは剥離卵子を用いて受精させ、その結果を図５－３に示した。ヒアルロン酸は、単精子侵入率を上昇させ($p<0.01$)、卵丘細胞は精子侵入卵子率を上昇、単精子侵入率を減少、平均侵入精子数を増加させた($p<0.01$)。また、精子侵入卵子率、平均侵入精子数に精液サンプル間の差が認められた($p<0.05$)。精子侵入卵子率および単精子侵入率ともに、Batch-A では、受精培地へのヒアルロン酸の添加効果は認められなかった。Batch-B では、ヒアルロン酸を添加した場合(92% および 43%, それぞれ、卵丘剥離卵子、卵丘付着卵子を用いた場合)、添加しない場合(59% および 19%, それぞれ、卵丘剥離卵子、卵丘付着卵子を用いた場合)に比較して高い単精子侵入率を示している。一方で精子侵入卵子率には差は認められなかった。これらの結果から、ヒアルロン酸は、単精子侵入率を高める傾向があり、また、その効果は用いる凍結前の精漿との接触時間が異なる精液サンプル間で異なり、精漿と１０時間接触した精子でヒアルロン酸の効果が強く表れたことを示している（Batch C の結果は、表５－２より引用）。

（４）結果の要約

本節では、培地へのヒアルロン酸の添加および卵子の卵丘細胞が受精成績に与える効果について検討し、以下の結果が得られた。

卵丘細胞を剥離した卵子に比較して、付着卵子の単精子侵入率は低く、平均侵入精子数は多い傾向が見られた。一方、凍結処理前に精漿の存在下で異なる時間保存された精子サンプルによる精子侵入卵子率、平均精子侵入数には差が見られ、精子処理法が受精成績におよぼす影響が示された。いずれもヒアルロン酸と卵丘細胞、精子処理方法との交互作用は見られず、ヒアルロン酸の作用は単独の効果であることが示唆された。

これらの結果から、ヒアルロン酸は、精子に作用し、単精子侵入を促進させる作用をもつことが示唆された。

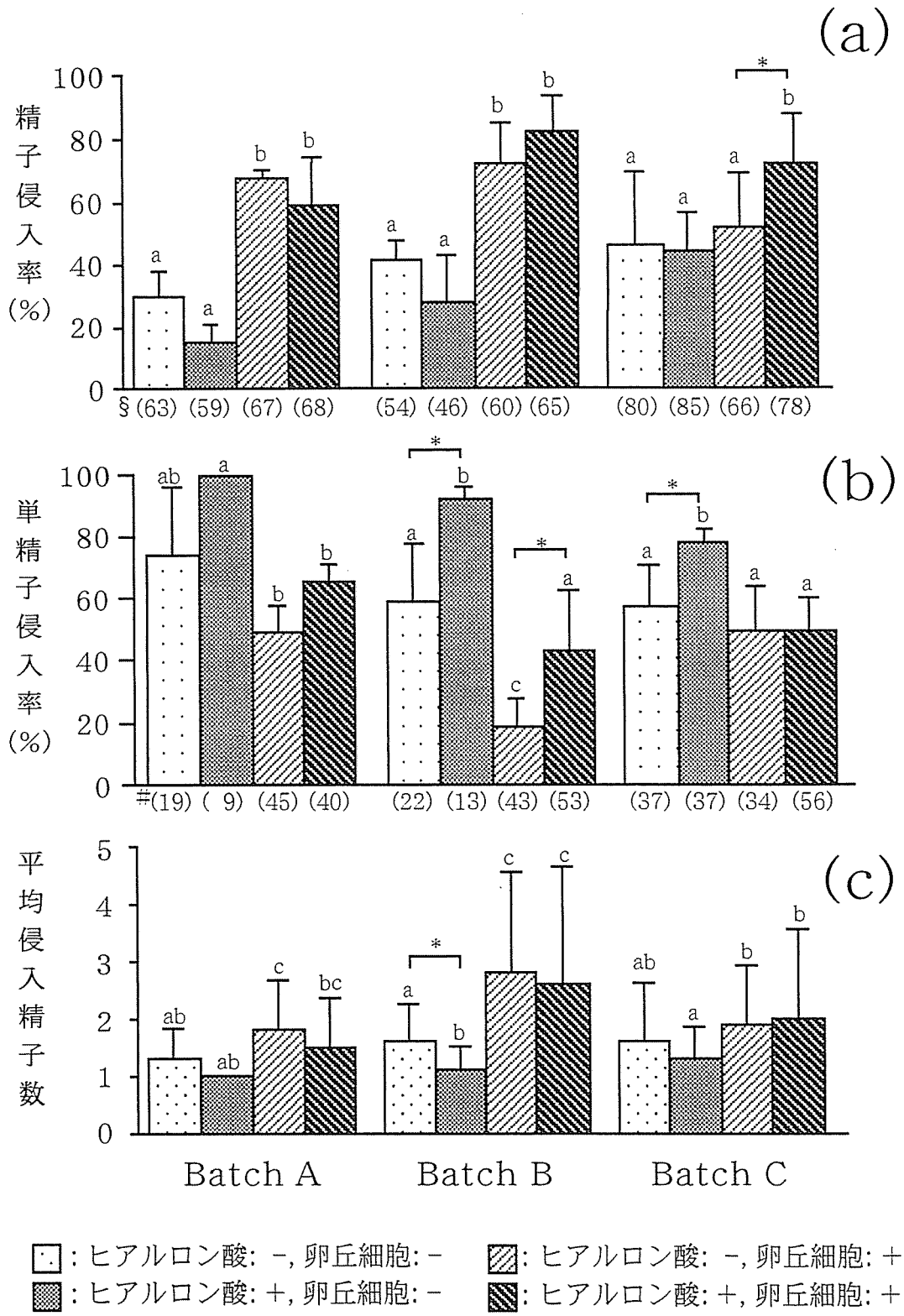

図５－３．ヒアルロン酸 (0.5 mg/ml) が精子侵入卵子率 (a)、単精子侵入率 (b)、平均侵入精子数 (c) におよぼす影響

凍結前に異なる時間精漿の存在下で保存 (Batch A, B および C はそれぞれ 3, 10 および 20 時間) した凍結融解精子を、卵丘細胞付着あるいは剥離卵子と９時間共培養した。§（　）は供試卵子数を、#（　）は侵入卵子数を示す。値は平均の割合 (a および b)、または平均の数 (c) ± SD で表記。異なる肩文字で示した値は互いに有意差があることを示す ($P < 0.05$)。* は、ヒアルロン酸の有無による有意差があることを示す。Batch C は、表５－２から引用。

第４節　ヒアルロン酸が精子の受精能獲得におよぼす影響

前節で得られた結果から、ヒアルロン酸は精子に作用し、効率的に単精子侵入率を高めることが明らかになった。さらに、凍結処理前に精漿との接触時間を変えた精液サンプルを用いた体外受精結果から、精子サンプルの違いによる精子侵入卵子率に差が認められ、精漿と精子の卵子への侵入能との係わりのあることが示唆された。しかし、精子が受精に備えて、どのような状態にあるのかは明らかではない。したがって、本節では、ヒアルロン酸、卵丘細胞あるいは精漿が精子におよぼす効果を見るため、ヒアルロン酸あるいは精漿の培地への添加、さらに卵丘-卵子複合体（COCs）の培養上清の効果について、精子の受精能獲得状況を判別可能なHoechst-CTC法で調べた。

１．材料および方法

培地

卵子の体外成熟培養用培地、洗浄用培地および基礎となる受精培地は、前節にしたがった。精子と卵子の共培養（受精）後の卵子の培養には、3 mg/ml BSA (Fraction. V) を添加したTCM199-BSAを用いた。

卵子および精子の準備

卵子は、前節の方法にしたがって準備した。精子は、射出凍結融解および液状保存精液由来の精子を用い、凍結融解精液は第４章第４節の方法にしたがって準備した。なお、凍結前に３時間、精漿と接触させた状態で保持した精子を用いた。液状保存精液は、採取後に希釈を行い（BTS希釈液）、16時間、20℃で保存した。融解した凍結精液および液状保存精液は、4.5 mlのWS-PVAに懸濁させて洗浄した（600 g、８分）。

体外受精

体外受精は、前節の方法にしたがって行った。なお、体外受精時の精子濃度は、2.0 x 10^6 cells/ml で 6 時間行い、体外受精後に卵子を洗浄し、TCM199-BSA 中で 6 時間の培養を行った。なお、本節では精子の前培養を行っていない。

Hoechst-CTC 法による精子の評価

本節で用いた Hoechst-CTC (chlortetracycline) 法は、Wang ら (1995) の方法にしたがって行った。精子を洗浄し、各培地中で培養 (0, 1, 3 および 6 時間) した後、792 μl の精子懸濁液を、まず、1 μg/ml Hoechst bis-benzimide 33258 で 3 分間、室温で染色後、3% PVP を含む 4 ml PBS の上層に精子懸濁液を静置し、1,400 g, 5 分間の遠心を行い、洗浄した。沈殿した精子を、45 μl の WS-PVA で再懸濁し、45 μl の CTC 溶液と十分に混合した。8 μl の 12.5% (w/v) パラホルムアルデヒド 溶液 (12.5% (w/v) paraformaldehyde、0.5 M Tris-HCl、pH 7.4) で固定した。10 μl の染色、固定した精子と、一滴の 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octane (DABCO) 溶液 (0.22 M DABCO、glycerol および PBS (9:1) の混合溶液) を、スライドガラス上で混和し、カバーガラスで覆い、軽く抑えた後、周囲を密封した。作成した精子の標本は、観察まで 4 ℃、暗所で保存し、2 日以内に観察した。精子の機能的な (受精能獲得) 状況は、蛍光装置を備えた、Leitz-Dialux 顕微鏡 (Leitz Wetzlar, Jena, Germany) で観察した。まず、Hoechst の染色状況を、励起波長 340-380 nm、吸収波長 400 nm のダイクロイックミラー (dichroic mirror) を用いて観察し、続いて同視野を、励起波長 400-440 nm、吸収波長 470 nm のダイクロイックミラーを用いて CTC 染色の観察を行った。生存精子 (Hoechst に不染) について CTC の蛍光パターンを分析した。CTC の染色パターンは、Fraser ら (1995) の報告にしたがってそれぞれ以下のように分類した；F-pattern: 精子頭部の全領域に蛍光が見られるものを反応の進行していない状態 (未反応)、B-pattern: 精子頭部の後帽部以外に蛍光の見られるものを受精能獲得をしている状態 (受精能獲得)、AR-pattern: 精子頭部全体に弱い蛍光のみが見られる、あるいは赤

道帯のみに明るい蛍光の帯が見られるものを先体反応を起こしている状態（先体反応）を示していると分類した。各実験区あたり２枚の精子標本を作製し、各スライドあたり100以上の精子を評価した。

精漿の準備

精漿は、２頭の雄豚射出精液（全分画）から採取した。精液を1,500 g、30分間で遠心分離し、上清を回収後フィルター（孔径0.45および0.22 μm）に通し、使用まで凍結保存（-20 ℃）した。

卵丘-卵子複合体の培養上清の調製

卵丘-卵子複合体（COCs）の培養上清（COCs-conditioned medium: CCM）は、体外成熟培養後のCOCsを培養した受精培地の上清から調整した。体外受精に用いる場合と同様の方法でCOCsを培養した後、受精培地で２回洗浄し、４ウェルディッシュ（Nunc）中の受精培地に移した（100 COCs/0.5 ml培地）。COCsは、精子と卵子の共培養（受精）と同条件で６時間の培養を行った。培養終了後、COCsを含む培地を試験管に移し、1,500 g、１０分間の遠心を行った。上清を回収し、フィルター（孔径0.22 μm）を通した後、冷蔵保存した（5 ℃、１８時間以内に使用）。

実験１．精漿およびヒアルロン酸が液状保存射出精液由来精子の受精能および機能的変化におよぼす影響

精漿およびヒアルロン酸が液状保存射出精液由来精子の体外受精能および機能的変化におよぼす効果を明らかにするため、体外受精は1) Pig-FM（対照区）および2) 10 %（v/v）精漿を含むPig-FM（SP）で行い、対照区には卵丘細胞付着あるいは剥離卵子を、SP区には卵丘細胞付着卵子を用いた。Hoechst-CTC法による評価は、1) Pig-FM（対照区）, 2) 凍結融解CCM（FT-CCM）および3) 10 %（v/v）精漿を含むPig-FM（SP）で０、１、３、６時間培養した精子について行った。

実験２．卵丘-卵子複合体培養上清、精漿およびヒアルロン酸が凍結融解射出精液由来精子の受精能および機能的変化におよぼす効果

卵丘-卵子複合体培養上清(CCM)、精漿およびヒアルロン酸が、凍結融解射出精液由来精子の受精能および機能的変化におよぼす効果を明らかにすることを目的として行った。実験１で用いた液状保存精液由来精子は、受精前の洗浄処理までの間、精漿と共存しているため、本実験で凍結融解精液由来精子を用いることにより、受精前の精漿が精子におよぼす効果を見ようとした。さらに、CCM、受精培地に添加した精漿およびヒアルロン酸が与える影響について液状保存と凍結融解精液由来精子の差異を明らかにしようとした。

凍結融解精子は、凍結融解後に洗浄した精子を卵丘細胞付着および剥離卵子と共培養し、また、受精能獲得様の変化をHoechst-CTC法で評価した。用いた受精培地は、1) Pig-FM(対照区), 2) CCM, 3) 10%精漿を含むPig-FM(SP), 4) 10 μg/mlヒアルロン酸を含むPig-FM(HA10)、および5) 500 μg/mlヒアルロン酸を含むPig-FM(HA500)である。

統計的分析

統計的分析は前節の方法にしたがって行った。

２．結　果

（１）精漿およびヒアルロン酸が液状保存射出精液由来精子の受精能におよぼす影響（実験１）

精漿が液状保存射出精液由来精子の受精能におよぼす効果を調べるため、液状保存精液由来精子を２種類の受精培地(Pig-FM（対照区）およびPig-FM(SP区))を用いて卵子と共培養し、受精結果を表５－４に示した。

対照区では、卵丘細胞を剥離した卵子を用いた場合、卵丘細胞が付着している卵子を

表５－４．精漿(SP)が液状保存精液由来精子の卵子への侵入におよぼす影響¶

受精培地	卵丘細胞	供試卵子数#	精子侵入		単精子侵入		単精子効率	平均侵入精子数 ± SE	卵子数 (%)$	
			卵子数 (%)	範囲 (%)	卵子数 (%)	範囲 (%)			MPN	M & FPN
対照区	−	48	45 (94) [a]	88 − 100	4 (9) [a]	0 − 19	8	9.6 ± 1.1 [a]	15 (33) [a]	15 (33) [a]
	＋	50	32 (64) [b]	35 − 96	11 (34) [b]	13 − 89	22	4.1 ± 0.6 [b]	19 (59) [b]	19 (59) [b]
SP¥	＋	37	0 (0) [c]	0	−	−	−	−	−	−

¶ 3反復の結果
# M II 卵子
$ 前核 (MPN: 雄性前核、M & FPN: 雌雄前核) 形成卵子
¥ 対照区 ＋ 10 % (v/v) 精漿
[a,b,c] 同列内で異なる肩文字を持つ値の間に有意差あり ($P < 0.05$)

用いた場合に比較して高い精子侵入卵子率を示した。単精子侵入率および前核形成率は、卵丘細胞剥離卵子に比較して付着卵子で高い傾向が見られ、平均侵入精子数は少ない傾向があった。さらに、対照区（卵丘細胞付着卵子）における精子侵入卵子率は35～96％であったのに対して、精漿を含むPig-FM(SP)中で受精させた卵子に精子の侵入は見られず、明らかに精漿には精子の卵子への侵入を阻害する作用があった。

これらの結果からは、10%精漿を添加した受精培地は精子の卵子への侵入を阻害していることから、受精阻害作用を持つことが示唆される。また、卵丘細胞が付着している卵子を用いることで、精子侵入卵子率は低められ、単精子侵入率は高められ、凍結融解精子を用いた前節の結果とは異なっており、それぞれの精子について機能的状態を検討する必要がある。さらに、対照区では、卵丘細胞付着卵子の前核形成率は剥離卵子よりも高く、卵丘細胞は卵子に作用して前核形成能を高めていることが示唆されるため、今後、受精後の発生試験を行い、卵子の発生能を調べる必要がある。

（2）精漿およびヒアルロン酸が液状保存射出精液由来精子の受精能獲得におよぼす効果（実験1）

精漿およびヒアルロン酸が液状保存射出精液由来精子の機能的変化に与える効果について検討するため、受精培地としてPig-FM（対照区）、HA500およびSPを用いた。前項で受精試験に用いた精子に関して、これらの培地で培養後、精子の機能的変化をHoechst-CTC法で評価した各培養時間後の結果を図5－4に示した。

分散分析結果からは、受精培地の違いは未反応率、受精能獲得率には影響を与えなかったが、先体反応率には差が見られ、対照区はHA500区よりも高い傾向のあることが示された。また、培養時間が長くなると未反応率は低下傾向に、先体反応率は増加傾向にあることが明らかになった。一方、未反応率、先体反応率ともに、3と6時間の培養時間の間には差は見られず、3時間までにこれらの値がプラトーに達する傾向があった。6時間の培養を行った精子の未反応率は、対照区に比較してSP(精漿)区で高かった。また、培養時間が長くなるにしたがい、受精能獲得率が高まり、培養前に比較して3お

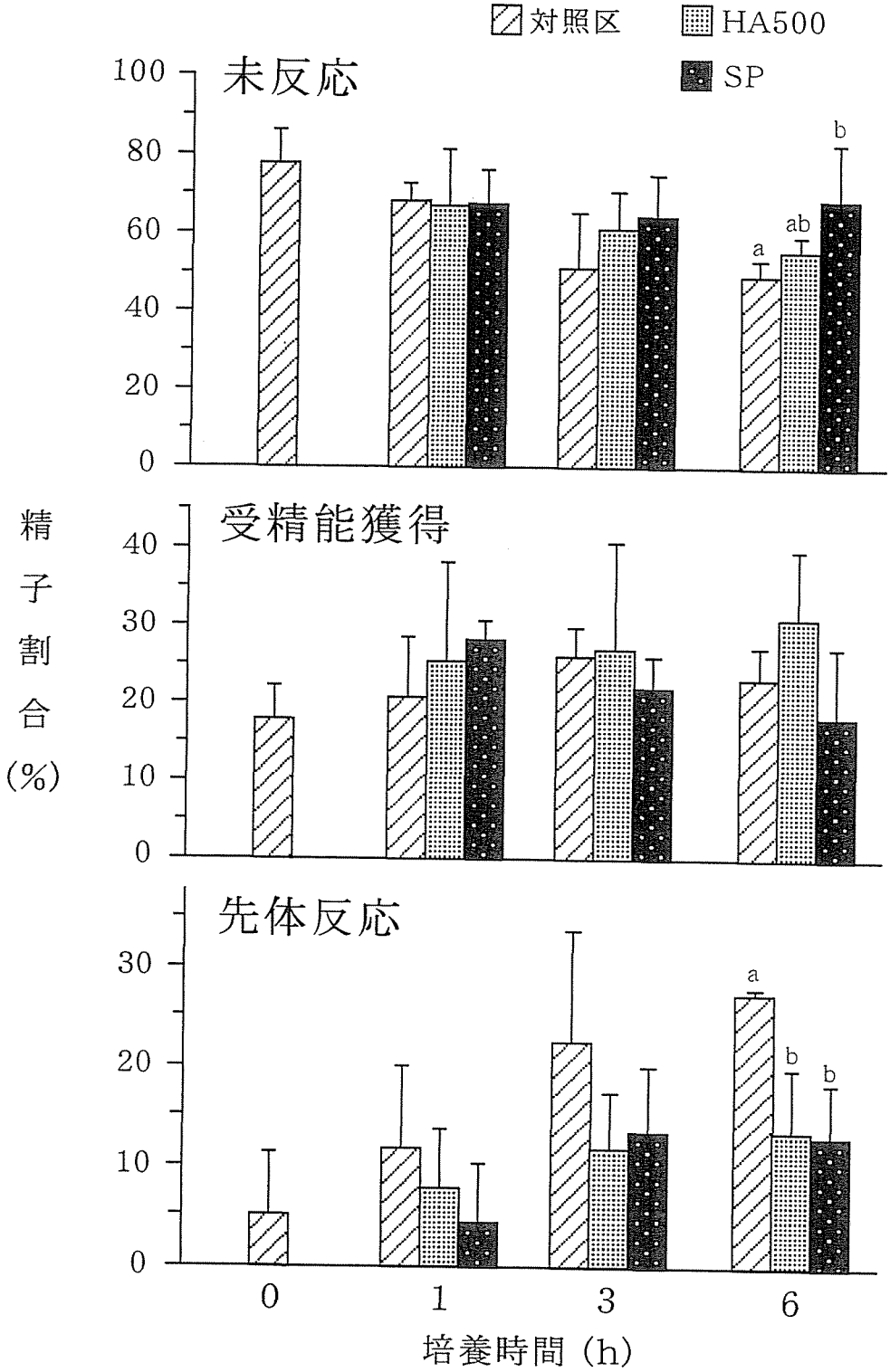

図５－４．受精培地 (Pig-FM) 中のヒアルロン酸 (500 μg/ml: HA500) および 10% (v/v) 精漿 (SP) が、液状保存精液由来精子の受精能獲得状況 (CTC-パターン) におよぼす影響

それぞれの受精培地で、0, 1, 3, および 6 時間の培養を行った精子に Hoechst-CTC 染色を施した。Hoechst に不染の精子を生存精子とし、さらに CTC 染色状況を観察した。CTC 染色パターンを、「未反応」、「受精能獲得」および「先体反応」（それぞれ、Fraser ら (1995) の分類である 'F-pattern', 'B-pattern', および 'AR-pattern' に対応）に分類した。値は、生存精子の数に対する各々のパターンの精子数の割合±SDで表示した。異なる肩文字を持つ値間に有意差あり ($P < 0.05$)。

よび6時間の培養で高い値が得られたことから、培養時間の延長にともなって受精能獲得が進行することが示唆された。さらに、6時間の培養を行ったHA500区の受精能獲得率は、SP区に比較して高い傾向が見られたが、統計的に有意ではなかった（P= 0.06）。対照区の精子は、すべての培養時間で、他の区に比較して先体反応率が高い傾向を示し、6時間培養した対照区の先体反応率は、SP区およびHA500区よりも高かった。

これらのことから、液状保存射出精液由来精子を用いた場合、1）対照区では培養時間が長くなるにつれ、未反応の精子が減少し、先体反応が進行すること、2）精漿は精子の反応を抑制し、未反応な状態にとどめておく作用のあること、3）ヒアルロン酸は（有意ではないが）精子の先体反応までの変化を抑え、受精能獲得状態を保つ作用のあることが示された。

（3）精漿が凍結融解射出精液由来精子の受精能におよぼす効果（実験2）

培地への精漿の添加が凍結融解精液由来精子の卵子への侵入におよぼす影響を明らかにするため、受精培地として、1) Pig-FM（対照区）および2) 10%精漿を含むPig-FM（SP区）を用いて体外受精試験を行った。SP区には卵丘細胞付着卵子を、対照区には卵丘細胞付着および剥離卵子をそれぞれ使用し、結果を表5－5に示した。

SP区では、精子の侵入は見られず、精子の卵子への侵入に対して明らかな阻害作用があった。さらに、単精子侵入率は卵子の卵丘細胞付着の有無による差は見られず、単精子効率は卵丘細胞付着卵子を用いた対照区で剥離卵子に比較して高い値を示したが、統計的な有意差は認められなかった。また、卵丘細胞剥離卵子に比較して卵丘細胞付着卵子の前核形成率は高く、受精時に卵子を取り囲む卵丘細胞が前核形成を促進する効果のあることが示唆され、この後の発生能が高い可能性がある。

（4）卵丘-卵子複合体培養上清と卵丘細胞が精子の受精能におよぼす影響（実験2）

本項では、卵丘-卵子複合体培養上清（CCM）が精子の受精能におよぼす効果を検討するため、卵丘細胞付着および剥離卵子を用い、Pig-FMを用いた対照区およびCCM

表５－５．精漿(SP)が凍結融解精液由来精子の卵子への侵入におよぼす影響[¶]

受精培地	卵丘細胞	供試卵子数[#]	精子侵入		単精子侵入		単精子効率	平均侵入精子数 ± SE	卵子数(%)[$]	
			卵子数(%)	範囲(%)	卵子数(%)	範囲(%)			MPN	M & FPN
対照区	−	60	45 (75)[a]	59 − 95	22 (49)	22 − 71	37	2.1 ± 0.2	14 (31)	14 (31)
	+	75	59 (79)[a]	71 − 89	34 (58)	46 − 71	45	1.8 ± 0.1	43 (73)	41 (70)
SP[¥]	+	64	0 (0)[b]	0	−	−	−	−	−	−

[¶] 3反復の結果
[#] M II 卵子
[$] 前核 (MPN: 雄性前核、M & FPN: 雌雄前核) 形成卵子
[¥] 対照区 + 10 % (v/v) 精漿
[a,b] 同列内で異なる肩文字を持つ値の間に有意差あり ($P < 0.05$)

を用いたCCM区で受精試験を行った。

結果を表５－６に示した。卵丘細胞の有無による効果は、いずれの受精結果においても認められず、また、受精培地による効果は、平均精子侵入数でCCM区に比較して対照区で多い傾向が見られた以外には認められなかった。対照区で卵丘細胞付着卵子の精子侵入卵子率(88%)は、剥離卵子(73%)よりも高い傾向が認められたが、CCM区では卵丘細胞の有無による差は認められなかった。単精子侵入率は、CCM区で高い傾向があったが有意ではなく、単精子効率も同様であった。また、平均侵入精子数は、対照区で卵丘細胞付着卵子を用いた時(3.0)、剥離卵子(2.4)よりも多い傾向があったが、CCM区では卵丘細胞の有無による差は認められなかった。雄性および雌雄前核形成率は、卵丘細胞剥離卵子を用いたCCM区で最も高い値を示し、CCMが卵子の発生能を促進している効果を持つことが期待されたが、統計的な有意差はなく、また、卵丘細胞の有無による一定の傾向も見られなかった。

対照区で、卵丘細胞付着卵子は剥離卵子よりも精子侵入卵子率が高く、CCM区では卵丘細胞の有無による差が見られなかったことから、卵丘-卵子複合体培養上清は、卵丘細胞剥離卵子で、卵丘細胞付着卵子を用いたときと同程度に精子の卵子への侵入能を高めていることが示唆される。また、本項では、前項までの凍結融解卵丘-卵子複合体培養上清(FT-CCM)に見られた精子の卵子への侵入を阻害する作用は認められず、凍結融解処理は、卵丘-卵子複合体培養上清の組成などを変化させ、精子の受精能を阻害することが示唆された。

（５）ヒアルロン酸濃度が精子の受精能におよぼす影響（実験２）

実験１の結果から、ヒアルロン酸が精子の受精能獲得を促進していることが、また、単精子侵入率を上昇させていたことが示されたため、受精培地のヒアルロン酸濃度が受精結果におよぼす効果を検討した。まず、本節で用いた体外受精方法で、卵丘-卵子複合体(COCs)から培地に分泌されているヒアルロン酸濃度を、Tienthaiら(2000)の方法で測定した。得られた値は、COC１個あたり、１mlの培地に分泌されるヒアルロン

表５－６．COCs 培養上清（CCM）が凍結融解精液由来精子の卵子への侵入能におよぼす影響 ¶

受精培地	卵丘細胞	供試卵子数#	精子侵入		単精子侵入		単精子効率	平均侵入精子数 ± SE	卵子数（%）$	
			卵子数（%）	範囲（%）	卵子数（%）	範囲（%）			MPN	M & FPN
対照区	−	62	45 (73) [a]	53 − 95	14 (31)	22 − 40	23	2.4 ± 0.2 [ab]	12 (27)	12 (27)
	+	72	63 (88) [bc]	75 − 96	18 (29)	9 − 61	25	3.0 ± 0.3 [b]	19 (30)	19 (30)
CCM ‡	−	66	47 (71) [a]	56 − 82	18 (38)	28 − 50	27	2.2 ± 0.2 [a]	18 (38)	17 (36)
	+	70	58 (83) [ac]	69 − 91	21 (36)	20 − 56	30	2.2 ± 0.2 [a]	16 (28)	16 (28)

¶ 3 反復の結果
# M II 卵子
$ 前核（MPN: 雄性前核、M & FPN: 雌雄前核）形成卵子
‡ 液状保存 COCs 培養上清
¥ 対照区 + 10 %（v/v）精漿
a,b,c 同列内で異なる肩文字を持つ値の間に有意差あり（$P < 0.05$）

酸量で示した。その結果、分泌するヒアルロン酸は、29.7 ng/ml/COC であった。この結果から、本実験で用いた体外受精法では、COCs から受精培地に分泌されるヒアルロン酸濃度は、おおよそ 10 μg/ml であることが算出された。この値は、本章第 2 節で得られた卵管上皮細胞の培養上清に分泌されている値 (145~304 ng/ml) に比較して高濃度であった。続いて、COCs が分泌するヒアルロン酸濃度が、受精結果におよぼす影響を明らかにするため、受精培地のヒアルロン酸濃度を 2 種類設定し (0 および 10 μg/ml、それぞれ対照区および HA10 区)、それぞれ卵丘細胞剥離あるいは付着卵子を使用した。

受精結果を表 5 － 7 に示した。卵丘細胞には、精子侵入卵子率、雄性、雌雄性前核形成率を高め、平均侵入精子数を増加させる効果が認められた。一方、ヒアルロン酸濃度の違いによる影響は、平均侵入精子数に見られ、HA10 区で多い傾向が見られた。精子侵入卵子率および平均侵入精子数は、卵丘細胞付着卵子で剥離卵子に比較して高いあるいは多い傾向が見られ、単精子侵入率および単精子効率は HA10 区の卵丘細胞剥離卵子で付着卵子に比較して高い傾向が認められた。雄性あるいは雌雄性前核形成率は、HA10 区の卵丘細胞付着卵子で剥離卵子に比較して高い傾向が見られた。

これらのことから、卵丘細胞は精子の卵子への侵入能を高めていること、卵子の前核形成を高めていることが明らかとなった。ヒアルロン酸の存在 (10 μg/ml) 下で単精子効率が高い傾向が見られたが有意ではなく、ヒアルロン酸が単精子侵入を促進する効果は明らかにはならなかった。わずかに、ヒアルロン酸が平均侵入精子数を増加させており、精子の卵子への侵入を促進している可能性を示唆するのみであった。

（6）卵丘-卵子複合体培養上清、精漿およびヒアルロン酸が精子の機能的変化におよぼす影響（実験 2）

第 3 節の結果からは、ヒアルロン酸は主に精子に作用し、単精子侵入率を高める効果が認められ、ヒアルロン酸無添加培地では受精に備えた精子の変化が短時間の間に多くの精子で起こってしまい、その結果多精子侵入率を高め、一方、ヒアルロン酸添加培地

表５－７．受精培地のヒアルロン酸（HA）濃度が凍結融解精液由来精子の卵子への侵入におよぼす影響[¶]

受精培地[†]	卵丘細胞	供試卵子数[#]	精子侵入		単精子侵入		平均侵入精子数		卵子数（%）[§]	
			卵子数（%）	範囲（%）	卵子数（%）	範囲（%）	単精子効率	± SE	MPN	M & FPN
対照区	−	103	78 (76)[a]	53 − 95	26 (33)[a]	22 − 41	25[ab]	2.3 ± 0.1[a]	21 (27)[ab]	21 (27)[ab]
	+	121	110 (91)[b]	75 − 96	32 (29)[ac]	9 − 61	26[ab]	2.9 ± 0.2[b]	38 (35)[a]	38 (35)[a]
HA10	−	83	64 (77)[a]	62 − 88	27 (42)[a]	35 − 56	33[a]	2.0 ± 0.1[a]	13 (20)[b]	12 (19)[b]
	+	94	90 (96)[b]	92 − 100	17 (19)[bc]	5 − 46	18[b]	3.4 ± 0.3[c]	33 (37)[a]	33 (37)[a]

† HA10 は対照区（Pig-FM）にヒアルロン酸を 10 μg/ml 含む
¶ 3 反復の結果
# M II 卵子
§ 前核（MPN: 雄性前核、M & FPN: 雌雄前核）形成卵子
a,b,c 同列内で異なる肩文字を持つ値の間に有意差あり（$P < 0.05$）

ではその変化が緩慢に起こることが推測される。さらに、ヒアルロン酸は卵子に作用し、多精子侵入阻止能力を高める可能性もある。また、本節実験１では、ヒアルロン酸の添加は、有意ではなかったが液状保存射出精液由来精子の受精能獲得率を高める傾向が見られた。これらのことから本項では、ヒアルロン酸濃度、卵丘細胞、卵丘-卵子複合体培養上清(CCM)、および精漿が凍結融解精子の受精能獲得状況におよぼす影響について検討した。５種の受精培地、Pig-FM（対照区）、CCM、10%の精漿を含むPig-FM (SP), 10または500 μg/mlのヒアルロン酸を含むPig-FM (それぞれHA10およびHA500)を用い、０，１，３および６時間培養した精子をHoechst-CTC法で評価し、その結果を図５－５に示した。

受精培地の違いは、未反応、受精能獲得、先体反応の各パターンに影響をおよぼし、未反応パターンの比率はSP区、CCM区、対照区の順で高い傾向が見られた。受精能獲得パターンの比率は、対照区に比較してHA10およびHA500で高く、また、先体反応パターンの比率は対照区で最も高く、SP区で最も低く、対照区では自然発生的な先体反応を高率に引き起こし、SP区では未反応な状態に維持する傾向があった。さらに、ヒアルロン酸は、受精能獲得率を高めていることが示唆される。培養時間が長くなるにしたがい、未反応パターンの比率は低下し、受精能獲得パターンの比率は培養３時間から６時間の間に増加し、さらに、先体反応パターンの比率は１時間から３時間の間に増加する傾向が認められた。未反応パターンの比率は、培養１時間では、対照区でSP区およびCCM区より低く、それ以降はSP区で他より高値を示し、精漿が精子の受精に備えた反応を阻止していることが示唆される。受精能獲得パターンの比率は、培養３時間で対照区、SP区に比較してCCM区、HA10区で高く、また、HA500区ではSP区より高かった。また、培養６時間で対照区、SP区に比較してCCM区、HA500区で高く、また、HA100区ではSP区より高く、ヒアルロン酸は受精能獲得を促進している可能性が指摘される。先体反応パターンの比率は、培養１時間では、対照区でもっとも高く、SP区でもっとも低い値を示し、３時間では、対照区でCCM区、HA10区、HA500区よりも高く、また、HA500区でSP区よりも高かった。さらに、６時間では、

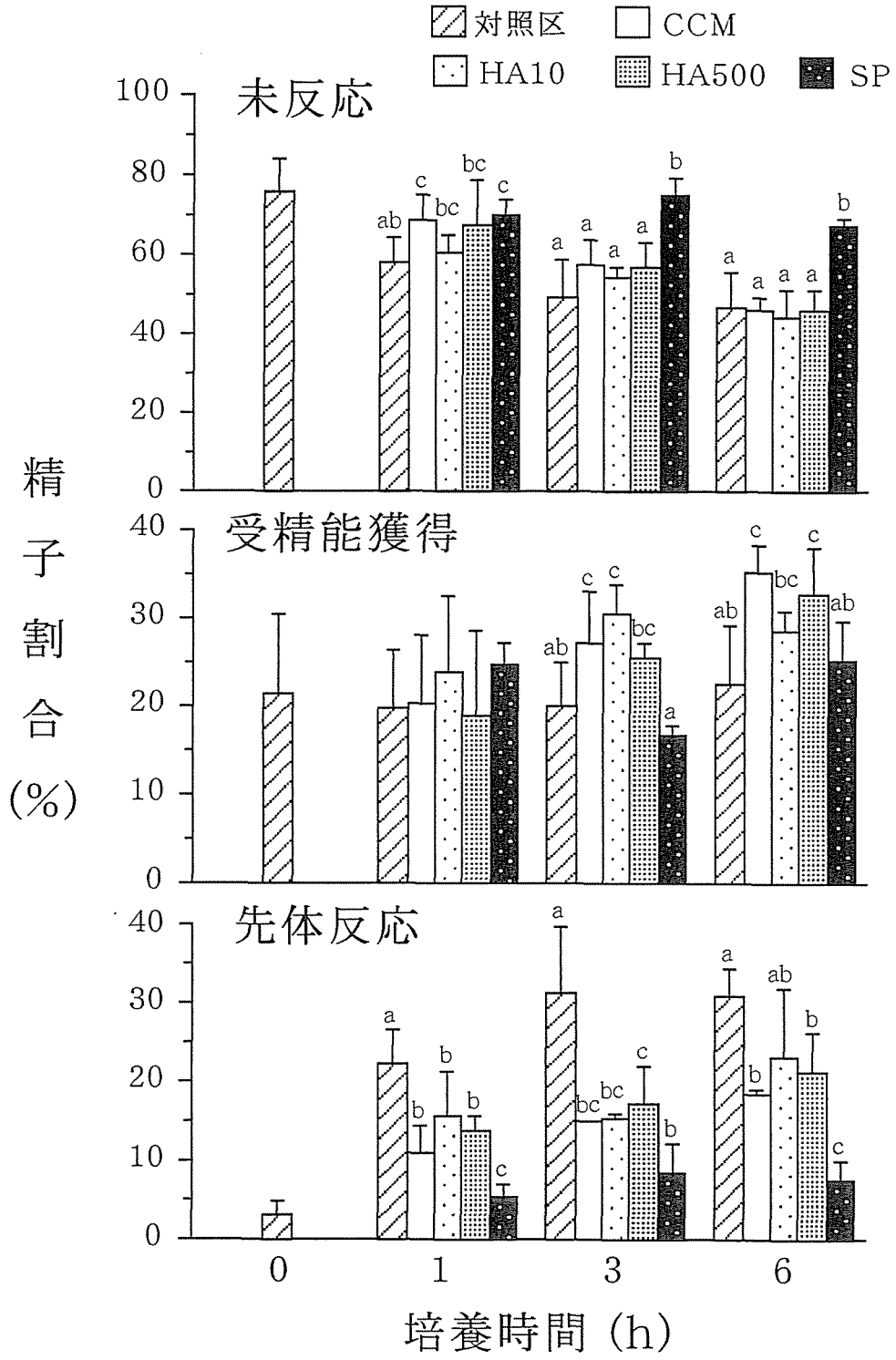

図５－５．受精培地 (Pig-FM) 中のヒアルロン酸 (10 μg/ml: HA10; 500 μg/ml: HA500)、10% (v/v) 精漿 (SP)、および COCs 培養上清 (CCM) が、凍結融解精液由来精子の受精能獲得状況 (CTC-パターン) におよぼす影響

それぞれの受精培地で、0, 1, 3, および 6 時間の培養を行った精子を Hoechst-CTC 染色を施した。Hoechst に不染の精子を生存精子とし、さらに CTC 染色状況を観察した。CTC 染色パターンを、「未反応」、「受精能獲得」および「先体反応」（それぞれ、Fraser ら (1995) の分類である 'F-pattern', 'B-pattern', および 'AR-pattern' に対応）に分類した。値は、生存精子数に対する各々のパターンの精子数の割合±SDで表示した。異なる肩文字を持つ値間に有意差あり ($P < 0.05$)。

対照区でCCM区およびHA500区に比較して高く、SP区では、CCM区、HA10区およびHA500区に比較して低い値を示しており、通常の方法で精子を培養した場合、時間経過とともに先体反応率が上昇する一方、精漿は先体反応率の上昇を起こさず、ヒアルロン酸や卵丘-卵子複合体からの分泌物はこれらの中間の値を取っていた。

これらの結果からは、1）受精培地で精子を培養したとき、培養時間が長くなるにつれ、精子は未反応な状態から先体反応を起こす状態に推移し、受精能獲得の状態に留まらないこと（対照区）、2）精漿は精子を未反応な状態に維持させる作用を持つこと（SP区）、さらに3）ヒアルロン酸および卵丘-卵子複合体からの分泌物は精子の先体反応を引き起こさせず、受精能獲得状態を保たせることを示している。

（7）結果の要約

前節で得られた結果から、ヒアルロン酸は、精子に作用することで、効率的に単精子侵入卵子を作出することが明らかになったが、この場合に精子が受精に備えて、どのような状態にあるのかは明らかにはされていない。このため、受精時に重要な作用を持つことが考えられるヒアルロン酸、卵丘細胞、精漿が精子におよぼす効果についてCTC法を用いて検討した。

液状保存射出精液由来精子を用いた場合（実験1）、10%精漿を添加した受精培地(SP)は精子の卵子への侵入を阻害しており、受精阻害作用を持つことが示唆された。Hoechst-CTC法の結果からは、精漿は精子の反応を抑え、未反応な状態にとどめておく作用のあること、一方、ヒアルロン酸の受精培地への添加は、精子の先体反応を抑え、受精能獲得状態を保つ作用のあることが示唆された。

凍結融解射出精液由来精子を用いた場合（実験2）、卵丘-卵子複合体培養上清(CCM)は受精能獲得パターンを示す精子割合を高めていた。さらに、受精培地に卵丘-卵子複合体から分泌されるヒアルロン酸濃度を測定したところ、本節で行った体外受精方法では、おおよそ10 μg/mlであることが明らかとなった。この濃度に合わせ、ヒアルロン酸を添加した培地で培養した精子についてHoechst-CTC法で得られた結果

からは、ヒアルロン酸は先体反応パターンを示す精子割合を抑え、受精能獲得パターンを示す精子割合を増加させており、効果的に精子に受精能を獲得させる作用のあることが示唆された。卵丘細胞剥離卵子に比較して卵丘細胞付着卵子の前核形成率は高い傾向があり、受精時に卵子を取り囲む卵丘細胞が前核形成を促進する効果のあることが示唆され、この後の高い発生能を期待できる。一方、精漿は精子の卵子への侵入を完全に阻止しており、精子を未反応な状態に維持させる作用を持つことが示された。

第5節　考　察

卵管上皮細胞およびその培養上清が単精子侵入におよぼす影響を調べたところ、合成培地(Pig-FM)での受精に比較して、卵管上皮細胞培養との共培養で受精させることで単精子侵入率が高まったが、卵管上皮細胞の培養上清にその効果はなかったことから、培地中への分泌物ではなく、細胞との物理的な接触によるものであることが示唆された。卵管上皮細胞上清には145～304 ng/mlのヒアルロン酸が含まれていたが、COCs培養上清および報告されている生体内の濃度(Kano *et al.*, 1998)に比較して、非常に低い値であったことから、ヒアルロン酸濃度が低いことによる低い単精子侵入率であることも推測される（第2節）。続いて、培地へのヒアルロン酸の添加および卵子の卵丘細胞が受精成績に与える効果について検討し、まず、卵丘細胞剥離した卵子を用いた場合、単精子侵入率は、受精培地にヒアルロン酸を添加したとき(78%)、添加していないとき(57%)に比較して高い傾向見られ、卵丘細胞は単精子侵入率を低下させた。また、精子の前培養培地へのヒアルロン酸の添加は、単精子侵入率を高めた。いずれも、ヒアルロン酸は、単精子侵入を高める傾向があり、その効果は用いる精液サンプルによって異なることを示していた。したがって、ヒアルロン酸は精子に作用し、単精子侵入を促進させる作用を持つことが示唆された（第3節）。ヒアルロン酸が精子におよぼす効果を見るため、液状保存射出精液由来精子の受精能獲得状況をHoechst-CTC法で調べたところ、ヒアルロン酸は精子の先体反応までの変化を抑え、受精能獲得状態を保つ作用のあることが示唆された。また、卵丘細胞が付着している卵子では、精子侵入卵子率は低められ、単精子侵入率は高められており、凍結融解精液由来精子を用いた前節の結果とは異なっていた。ヒアルロン酸を添加した培地で培養した凍結融解射出精液由来精子の機能的変化の結果からは、ヒアルロン酸は先体反応パターンを示す精子割合を抑え、受精能獲得パターンを示す精子割合を増加させており、自然発生的な先体反応を抑え、効果的に精子に受精能を獲得させる作用のあることが示唆された（第4節）。

雄の精巣で産生された哺乳動物精子は、精漿とともに雌の生殖道に射出される。子宮

を通過した後、卵管峡部に入り、卵子が排卵されるのを待つために、一時的に待機する。卵子が排卵されると、精子は卵管峡部から離れ、受精部位である卵管膨大部に到達し(Rodriguez-Martinez *et al.*, 1998)、卵子と接触した一部の精子は受精に関与することができる（図１－１）。そして、精子は卵子を取り囲んでいる卵丘細胞と接触した後、透明帯を貫通し、受精が起こる。精子が通過するこれらの経路では、それぞれの部位からの分泌液や細胞が存在しており、精子に影響を与え、受精を効果的にしていることが推測される。卵管液には、アルブミンやグロブリンなどのタンパク質やイオン、プロテオグリカンや糖タンパク質、さらに、酵素などが存在しており、生殖道内にある細胞の寄与が大きい(Harper, 1994)。本章では、卵管液に存在する物質の中で、受精卵の発生率を高める効果のあることが報告されているヒアルロン酸(Kano *et al.*, 1998)に着目し、受精におよぼす影響について検討した。

本章で得られた結果（図５－１および第４節実験２）から、ヒアルロン酸は、卵管上皮細胞の培養上清、および培養卵管上皮細胞の存在下で精子と卵子の共培養を行った培養液に、それぞれおおよそ150~300 ng/ml、および500 ng/ml含まれていた。また、本研究で用いた体外受精環境では、培養した卵丘-卵子複合体(COCs)は受精培地中に、約10 μg/mlのヒアルロン酸を分泌していた。したがって、ヒアルロン酸の分泌は、卵丘細胞で卵管上皮細胞に比較して多いことが示された。Kanoら(1994)は、受精試験の結果から、卵管上皮細胞の培養上清は、単精子侵入率を上昇させる効果を持つことを示しているが、本章ではその効果は見られなかった。ヒアルロン酸濃度はCOCsからの分泌量に比較してごく低濃度であったことが影響していた可能性がある。卵管上皮細胞の培養条件（培地量など）によって、培養上清のヒアルロン酸濃度は異なるため、Kanoら(1994)の研究で用いた卵管上皮細胞の培養上清には本章で用いた培養上清に比較して高濃度のヒアルロン酸が含まれていた可能性もある。同様な結果はNagaiとMoor(1990)によって示されており、糖タンパク質が単精子侵入に効果的であることを仮定している。一方、本研究では峡部卵管上皮細胞との共培養を行ったとき、精子侵入卵子率を低下させず、高率な単精子侵入率が得られた。生体内では、雌の生殖道内を上

向した精子は、卵管峡部の上皮細胞に捕捉され、排卵が起こる時期に同調して細胞から放出される（Rodriguez-Martinez *et al.*, 1998）ことから、卵管上皮細胞に接触することでリガンド・レセプターを介した精子の受精能力の効果的な調整が行われていることが示唆される。ヒアルロン酸を含むグリコサミノグリカンは雌性生殖道中に存在している（Lee & Ax, 1984）。体内の受精部位（卵管）におけるヒアルロン酸濃度は、過去の研究からおおよそ0.04から1.83 mg/mlであることが算出されている（Kano *et al.*, 1998）。したがって、本章で用いた0.5 mg/mlのヒアルロン酸濃度は、生理的な濃度であることを示している。一方、Tienthaiら（2000）は、発情期の卵管液のヒアルロン酸濃度は10 μg/ml程度であることを指摘しており、これは本章で得られたCOCsによる分泌濃度に等しい。正確な濃度を明らかにするためにはさらなる調査が必要である。

興味深いことに、卵子の周りを取り囲んでいる卵丘細胞が精子侵入におよぼす影響は、実験間で異なっていた。液状保存精液由来精子を用いた場合、対照区での卵丘細胞剥離卵子の精子侵入卵子率は、付着卵子よりも高く（表５－４）、一方、凍結融解精液由来精子を用いた場合、対照区における卵丘細胞付着卵子の精子侵入卵子率は、剥離卵子よりも高い（表５－６，７）、あるいは同程度の値（表５－５）であった。これらの相反する結果からは、体外での卵子への精子侵入におよぼす卵丘細胞の影響を結論付けることは難しい。受精時に卵丘細胞間にあるほとんどの精子は先体反応を起こしており、先体酵素であるヒアルロニダーゼの働きにより、ヒアルロン酸を大量に含む細胞間マトリックスを消化する。このため、それらの精子は先体反応を起こしていない精子であっても透明帯に到達できる通路を開いていると示唆されている（Krogenaes *et al.*, 1994; Rodriguez-Martinez, 1999）。したがって、この通路を開く役割を持つ精子が少ない場合には精子侵入卵子率が低下すると考えられる。卵丘細胞が精子侵入におよぼす影響について、これまでの研究結果は液状保存射出精液由来精子を用いた場合に卵丘細胞の有無で精子侵入卵子率に差が見られない（表４－８）、あるいはそれとは異なり、凍結融解射出精子は卵丘細胞剥離卵子に比較して卵丘細胞付着卵子に高率に侵入したこと（Wang *et al.*, 1995）を指摘している。実験時の卵丘細胞の状態が異なっていた可能性

もあるが、これらの結果と本章の結果は、卵丘細胞の精子侵入に対する有効性は、精子の由来や処理方法に依存していることを示唆している。

第4節で、CCMで培養した精子は、CTC法で高率な受精能獲得パターンを示したことから、CCMは精子の受精能獲得を促進し、効果的に受精する準備を促しているように見える。統計的有意差は認められなかったが、体外受精結果においてCCM中では、対照区に比較して単精子侵入率および単精子効率が高い傾向が見られた。一方、受精能獲得状態をHoechst-CTC法で評価した時、ヒアルロン酸を10 μg/ml含む培地で培養した精子とCCM中で培養した精子は同様な染色パターンを示した。したがって、CCMの精子に対する主要な役割の一つをヒアルロン酸が担っている可能性がある。

本章第3節の結果からは、ヒアルロン酸は精子侵入卵子率を下げることなく単精子侵入率を上昇させると考えられた。また、精子サンプル間で体外受精結果におよぼすヒアルロン酸の効果は異なっていたことから、精子サンプル間で精子におよぼすヒアルロン酸の効果に差があることが推察されるが、その原因は本章の結果からは明らかではない。第4節でCOCsは培地にヒアルロン酸を分泌していることが明らかになった。過去の報告でも同様な結果が示されている(Salustri *et al.*, 1992; Rodriguez-Martinez *et al.*, 1997)、また、本章第3節実験1および2では卵丘細胞剥離卵子を用いたとき、ヒアルロン酸は単精子侵入を促進していた。一方、卵丘細胞付着卵子を用いた場合、卵丘細胞から分泌されたヒアルロン酸がすでに存在していたことが添加効果が表れない原因となったと考えられる。

ヒアルロン酸は、細胞外マトリックス中に存在するグリコサミノグリカンファミリーの中で硫酸基を持たず(Laurent & Fraser, 1992)、配偶子の機能に影響を与えていることが示唆されている(Rodriguez-Martinez *et al.*, 1998)。Rodriguez-Martinezら(1998)は、CTC法を用いて精子の受精能獲得状態について検査を行い、ヒアルロン酸を含む培地で培養した精子は対照区に比較して先体反応を伴わない受精能獲得パターンを示す割合が高い結果を得ている。同様に、本章でヒアルロン酸添加培地で培養した精子をHoechst-CTC法で精子を検査したところ、先体反応パターンを示す精子割合の

上昇は抑えられ、一方、受精能獲得パターンを示す精子割合は増加していた。したがって、受精の場に精子が到達する以前に起こる自然発生的な、あるいは受精に適切な状態に達していない精子の先体反応を防止する役割をヒアルロン酸は持っており、一方で精子の受精能獲得を促進する役割を持っていることが推測される。Shamsuddin と Rodriguez-Martinez (1994) は、ウシの体外受精における swim-up 法による凍結融解ウシ精子の選別効果におよぼすヒアルロン酸の影響について調べ、ヒアルロン酸添加培地を用いた swim-up 法で分離した精子は、対照区に比較して高い活力を持っており、精子以外の夾雑物の混入も少なかったことを報告している。ヒアルロン酸は、雌性生殖道中で精子を効果的に選別し、さらに受精能獲得を起こさせ、また自然発生的な先体反応を抑制することで卵子に到達する精子を減らし、多精子侵入を抑制している可能性がある。

ヒアルロン酸は、ブタ精子のプロアクロシンからアクロシンへの変換を促進していることが報告されている (Parrish *et al.*, 1980)。すなわち精子の卵子への侵入能力を高めているといえる。さらに、ラット精子中のヒアルロン酸結合糖タンパク質 (HA-binding glycoprotein) の存在がすでに明らかにされていることから (Ranganathan *et al.*, 1994)、ヒアルロン酸は、精子の細胞膜に結合し、精子の機能を調節していることが示唆される。線維芽細胞では、ヒアルロン酸は結合タンパク質を介して細胞の代謝を調節しており、プロテインキナーゼ活性もこれに含まれている (Laurent & Fraser, 1992)。精子に対して同様な役割を担っているとすれば、ヒアルロン酸によって、代謝活性が高まることで効果的に受精が起こることが考えられる。しかし、ヒアルロン酸結合糖タンパク質がブタ精子に存在しているかどうかはまだ明らかではなく、今後の研究に期待される。その他のヒアルロン酸の精子に対する作用として、精子が卵子の透明帯に到着するまでの間、細胞膜を保護する作用とともに細胞膜に変化をおよぼすことなくヒト精子の移動速度を高める作用 (Huszar *et al.*, 1990)、さらに透明帯によって引き起こされるサル精子の先体反応を加速させる作用が報告されている (Vandevoort *et al.*, 1997)。いずれも、ヒアルロン酸は、体内で精子の受精能に重要な

影響を与えていることが示唆されるが、現在のところ精子におよぼすヒアルロン酸の作用は明らかにはされておらず、今後、受精能獲得および卵子への侵入能との係わりを明らかにすることが必要である。

本章の体外受精では、比較的安定した精子侵入率を得ることができた。複数の雄から採取した精液を混和して用いたので、雄個体の影響を除去、あるいは最小限に抑えることができたと考えられる。第3節実験3では3種類の精液サンプルを用いた。精液は3頭の生殖能力を持つ雄ブタから採取し、冷却・凍結前に異なった時間、精漿に接触させている。その結果、精液サンプル間でヒアルロン酸に対する異なった反応が見られた。凍結前に10時間精漿に接触させた精液は、ヒアルロン酸が単精子侵入に与える影響をはっきりと示した。このことから、精漿の働きによって凍結融解の際に精子の細胞膜は保護され、また、精漿成分とヒアルロン酸の相互作用があることが示唆される。凍結融解処理は、精子の部分的な受精能獲得を引き起こすことが推測されている(Watson, 1995)。しかし、本章の結果では、液状保存精子と凍結融解精子の受精能獲得パターンの間には差は見られなかった（図5-4および図5-5中の対照区間の比較）。これらの実験は並行には行っておらず、また、それぞれの精子サンプルのために用いた雄の数が異なっていた（液状保存：2頭、凍結融解：3頭）ため、保存方法が異なる精子でも受精能獲得状況が類似した結果となった可能性もある。明確な結論を得るためには、各雄個体ごとの精子サンプルにおける受精能獲得状況を並行して比較する必要がある。

精漿は射出精液中の精子濃度を希釈する。いくつかの精子に対する異なった精漿の役割が報告されており、たとえば、ウシ精巣上体精子の受精能獲得を調節していること(Lee *et al.*, 1985; Florman & First, 1988)、凍結時にヒト精子に対する有害な影響を取り除くこと(Grizard *et al.*, 1999)、ブタ精子のアデニル酸シクラーゼ活性を上昇させること(Okamura & Sugita, 1983)、そしてブタ精子の活力を高めること(Okamura *et al.*, 1985; Rodriguez-Martinez *et al.*, 1990)、などがある。また、ブタ精漿中のリラキシン様物質が活力の制御に関係していることも報告されている(Juang *et al.*, 1990)。体外受精の結果、受精培地に10%添加した精漿は完全に精子の卵子への侵入を阻止し

ていた。Nagai ら (1984) は、同様に精漿に接触させた精巣上体および射出精液由来の精子は、たとえ洗浄した場合でも体外で卵子に侵入しなかったことを示している。また、精子の受精能に対する精漿の悪影響はウサギ精子にも見られており (Chang, 1957)、さらに Iwamoto ら (1992) は、精漿はブタ精子の活力を低下させることを示している。CTC 法による解析の結果からは、精漿は精子を未反応な状態に保つ作用があるように見える。Maxwell と Johnson (1999) も同様な結果を報告している。精子は排卵までの間、しばらく雌性生殖道内に待機している。したがって、この精漿による精子の受精能獲得抑制作用は体内における主要な作用であり、受精能獲得反応を抑えることで、自然発生的な先体反応、あるいは退化的な反応を起こさせず、受精可能な精子を確保している可能性がある。このように仮定される精漿の作用を主とした精子の保護が体内でどのように解除され、精子が受精可能な状態に移行するのかは、今後、雌体内から得た精子を用いて詳細に確かめる必要がある。また、Lee ら (1985) は、精漿はグリコサミノグリカンを含んでおり、これらのグリコサミノグリカンがウシ精子の機能を調節している可能性を示唆している。本研究では、凍結融解前にあらかじめ精漿にさらしておいた精子は、処理をしていない精子に比較して効果的に受精能獲得を起こした可能性がある。しかしながら、精漿は他のグリコサミノグリカン (0.25-1.6 mg/ml) に比べると、低濃度 (0.004 mg/ml) のヒアルロン酸のみを含んでいることが示されている (Lee *et al.*, 1985) ことから、精漿中のヒアルロン酸の役割および精子に対する作用について詳細に検討する必要がある。第 3 節では、射出精液由来精子を用いており、これらの精子はすでに精漿と接触している。精漿と多精子受精、および精子の生理的な変化との関係を明らかにするためには、精巣上体と射出精液由来の精子を比較した実験を行うことが求められる。

ブタでは、受精の場に多数の精子が存在すると卵子に 2 つ以上の精子が細胞質内に侵入してしまう。これはたとえ体内であっても起こる (Hunter, 1973)。したがって、ブタ卵子は、元来多精子侵入の防御機構が限定されており、卵子の成熟状態よりも受精の場における状態が強く単精子侵入に影響しているようにも見える (Nagai, 1994)。本節

で得られた結果から、ヒアルロン酸は精子の受精能獲得を効果的に誘起し、また、単精子侵入率を高めていた。ヒアルロン酸は体内において、受精の場に大量に存在し、精子の受精能獲得を促進し、また、卵子と接触する前の精子が先体反応を起こすことを抑制していることが推測される。したがって、単精子侵入卵子を効率的に得るためには、ヒアルロン酸を培地に添加が有効であることが示された。本研究では、体外受精後の卵子（受精卵）を体外培養していない。今後、その発生能について確認する必要がある。

第6節　要　約

本章では、精子の受精能獲得、先体反応および卵子への侵入能力におよぼすヒアルロン酸、卵丘-卵子複合体培養上清(CCM)、精漿の影響を調べた。ヒアルロン酸は体外成熟ブタ卵子の単精子侵入率を効果的に増加させることが示され、また、CCMはヒアルロン酸を含むことが確認された。しかし、精子侵入率および単精子侵入率に対するヒアルロン酸の影響は、用いる精子の凍結前処理、すなわち精漿との接触時間の違いによって異なっていた。Hoechst-CTC法で精子の受精能獲得状態を評価した結果、通常の方法で精子を処理したとき（対照区）、精子の先体反応は容易に引き起こされた。ヒアルロン酸およびCCMは精子の受精能獲得を効果的に起こさせるのに有効であり、一方、精漿は精子を未反応な状態に保つ作用を持つことが示唆された。また、用いた精子サンプルによっては、単精子侵入におよぼすヒアルロン酸およびCCMの効果が明らかではない場合があり、用いた精子サンプルの違いがヒアルロン酸の精子に対する作用に影響している可能性もある。精漿とヒアルロン酸の精子に対する協調作用は、射出精子のみではなく、精巣上体精子を用いた比較を行うことで明らかにする必要がある。体内では、精子は雌性生殖道内で細胞からの分泌液や細胞と直接接触する。卵管上皮細胞は、単精子侵入率を高めており、この効果は細胞の培養上清には認められず、培地内に分泌されているヒアルロン酸の効果ではなかった。このため、ヒアルロン酸以外に単精子受精を引き起こす要因があると考えられる。体内では、単精子侵入がどのようにして起こるのかについて明らかにするためには、今後受精部位における精子を追跡し、詳細に検討する必要がある。

第6章　総　括

本研究では、ブタ体外受精の問題を解決し、受精機構の解明に必要な基礎知見を得るため、1）体外受精に用いる精子の処理法の違いが受精結果におよぼす影響を検討し、2）培地成分が精子の受精能におよぼす作用を調べ、3）単精子侵入卵子の高率的作出を試みた。

1）受精結果におよぼす精子処理法の影響

用いる精子（雄）の違いにより体外受精結果に大きな差が見られ、また、精子の前培養時間は精子の卵子への侵入能に影響を与え、適切な培養時間は精子サンプルによって異なっていた。

さらに、ウシ精子に広く適用されている精子の分離法であるパーコール法を用いて選別した精子を受精試験に用い、その有効性を調べたところ、射出精液由来精子では元来の受精する能力が高く、パーコール法の明確な効果を認めるには至らなかったものの、このときに用いた精子サンプルには前培養が必要ではないことが同時に示された。精巣上体精液由来の凍結融解精子を異なったパーコールで分離し、その効率を検討したところ、45 から 60% および 60 から 75% のパーコール濃度間で分離能が大きく変化することが明らかになった。次に、パーコール法で分離した精子の運動特性を CASA で調べた結果、分離精子の運動精子率および激烈に運動する精子割合の上昇が見られた。受精試験の結果、パーコール法を用いない場合に比較して精子侵入卵子率を上昇させる効果が見られたが、精子サンプルを採取した雄によってはその効果が認められないものもあった。また、精子侵入卵子率と、運動性との明確な関係は見られなかった。

2）受精結果におよぼす培地の影響

体外受精に用いる最適な培地を開発することを目的に、培地成分が精子の受精能におよぼす効果を検討した。その結果、培地のカリウムイオン濃度を高めることで精子侵入卵子率は上昇した。高濃度のカリウムイオン培地では、浸透圧調整のためナトリウムイオン濃度を低下させている。したがって、高濃度カリウムイオン培地で精子の受精能が

高められたのは、ナトリウムイオン濃度を低下させたことによる可能性があった。そこで、浸透圧およびカリウムイオン濃度を一定にして、ナトリウムイオン濃度を変化させた培地で受精試験を行ない、ナトリウムイオン濃度を低下させても精子の受精能は上昇しなかったことから、カリウムイオン濃度を高めることが精子の受精能を上昇させることが明らかになった。細胞内カルシウムイオンは、精子の受精能に重要な役割を持つことが知られているため、異なるカリウムイオン濃度の培地で培養した精子の細胞内カルシウムイオン濃度を測定した。高濃度のカリウムイオンを含む培地で培養したとき、精子の細胞内カルシウムイオン濃度は、通常濃度のカリウムイオンを含む培地で培養したときに比較して高い傾向が見られた。また、受精培地のカリウムイオン濃度を低下させたとき、精子侵入卵子率は減少し、カリウムイオンがない場合には精子は卵子へ侵入できなかった。細胞内カリウムイオンを細胞外に流出させる作用を持つカリウムチャネルの阻害剤は、精子の受精能を阻害していたことから、高濃度のカリウムイオンを含む培地では、精子の膜電位依存性のカルシウムチャネルの作用によってカルシウムイオンが細胞内へ流入し、精子の受精能を高めていることが推察された。

次に、重炭酸が精子の受精能におよぼす効果を検討したところ、重炭酸が受精培地に添加されていない場合、精子の卵子への侵入は見られず、精子は受精するために重炭酸が必須であることが明らかになった。

さらに、培地に添加するタンパク質が精子の受精能におよぼす効果を検討したところ、培地にタンパク質を添加しない場合であっても、卵子への精子の侵入は見られ、また、受精時の精子濃度を調整することで高率な精子侵入卵子率を得ることができたことから、受精時の培地にタンパク質は必須ではないことが明らかになった。

続いて、本研究で得られたこれまでの結果から、ブタ体外受精に用いる受精培地、Pig-FM を新たに開発し、その受精結果を調べた。いくつかの受精培地との比較を行ったところ、Pig-FM は常に安定して高率な精子侵入卵子率が得られたことから、この受精培地の有効性が確かめられた。

3）単精子侵入卵子の効率的作出

ブタの体外受精で問題となっている多精子侵入を抑え、単精子侵入卵子を効率的に作出する方法を確立することを目的として、受精時の卵管内に大量に存在するヒアルロン酸に着目し、単精子侵入率におよぼすその効果を調べた。その結果、受精培地にヒアルロン酸を添加することでは単精子侵入率は高まる傾向が見られた。一方、精子侵入卵子率および単精子侵入率に対するヒアルロン酸の効果は、用いる精子の凍結前処理、すなわち精漿との接触時間の違いによって異なっていた。Hoechst-CTC 法で精子の受精能獲得状態を評価した結果、ヒアルロン酸および卵丘細胞の培養上清は、精子の受精能獲得を効果的に起こさていたが、精漿は精子の機能的変化の進行を阻止していた。

これらの結果から、ブタの体外受精において、低精子侵入卵子率を示す精子サンプルでは、適切な精子の前培養時間を設定し、さらにパーコール法で分離した精子を用いることが有効である。これらの方法で精子の卵子への侵入が見られない場合であっても、本研究で開発した受精培地で安定して高い精子侵入卵子率を得ることができること、また、ヒアルロン酸添加培地を用いることで単精子侵入卵子を効率的に作出できることが明らかになった。本研究では、作出した体外受精卵の発生能については調べておらず、今後検討する必要がある。

謝　辞

本論文は、平成２(1992)年から平成１２(2000)年までに行った研究をまとめたものであり、農林水産省東北農業試験場（盛岡）、AFRC（イギリス）、およびスウェーデン農科大学（スウェーデン）との共同研究による結果を含んでいる。

本論文を取りまとめるにあたり、主査清水弘教授には大変お世話になった。副査田中桂一教授、中嶋　博教授、上田純治助教授からは懇切丁寧なご校閲をいただいた。森匡　助手には終始ご指導いただき、感謝の言葉も見つからない。また、研究に入り込むきっかけを作っていただいた永井卓博士、R. A. P. Harrison 博士には心よりお礼申し上げる。スウェーデンにおける研究を支えていただいた H. Rodriguez- Martinez 博士には、彼の地での研究生活に関して並ならぬご配慮をいただいた。農学部附属農場中小家畜分野技官、千葉勇氏、原田誠氏、原田進氏、大嶋栄喜氏、假屋洋人氏、および附属農場教官、技官、事務官の方々、家畜生産学講座家畜改良増殖学分野の学生諸氏には大変お世話になった。これら関係各位には御礼申し上げるとともに、指導力不足のために十分な指導を行うことができなかった指導学生諸氏には、この場をお借りしてお詫び申し上げる。

本論文の一部は、農林水産省、STINT（スウェーデン）、栗林財団、ホクサイテック財団の研究助成による援助を受けて行われたものである。

2001年３月（２１世紀の始まりの年）、札幌にて

引用文献

Abeydeera, L. R. & Day, B. N. (1997) In vitro penetration of pig oocytes in a modified Tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology* **48**, 537-544.

Aitken, R. J. (1999) The Amoroso Lecture: The human spermatozoon-a cell in crisis? *J. Reprod. Fertil.* **115**, 1-7.

Aitken, R. J., Buckingham D., West, K., Wu, F. C., Zikopoulos, K. & Richardson, D. W. (1992) Differential contribution of leukocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. *J. Reprod. Fertil.* **94**, 451-462.

Aonuma, S., Okabe, M., Kishi, Y., Kawaguchi, M. & Yamada, H. (1982) Capacitation inducing activity of serum albumin in fertilization of mouse ova in vitro. *J. Pharm. Dyn.* **5**, 980-987.

Arora, M., Carver-Ward, J. A., Jaroudi, K. A. & Sieck, U. V. (1994) Is Percoll safe for in vivo use? *Fertil. Steril.* **61**, 979-981.

Austin, C. R. (1951) Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res. Ser. B.* **4**, 581-596.

Austin, C. R. (1952) The "capacitation" of the mammalian sperm. *Nature* **170**, 326.

Avery, B. & Greve, T. (1995) Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. *Theriogenology* **44**, 871-878.

Babcock, D. F., Rufo, G. A. & Lardy, H. A. (1983) Potassium-dependent increases in cytosolic pH stimulate metabolism and motility of mammalian sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 1327-1331.

Bamba, K. & Kojima, Y. (1978) Evaluation of boar sperm motility by caffeine-slide. *Jpn. J. Anim. Reprod.* **24**, 100-104.

Behalova, E., Pavlok, A., Motlik, J. & Fulka, J. (1993) In vitro fertilisation of pig ova: Effects of various factors on penetration, polyspermy and male pronucleus development. *Anim. Reprod. Sci.* **32**, 127-133.

Berger, G., Davis, A., Wardrip, N. J. & Hedrick, J. L. (1989) Sperm binding to the pig zona pellucida and inhibition of binding by solubilized components of the zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.* **86**, 559-565.

Bhattacharyya, A. & Yanagimachi, R. (1988) Synthetic organic pH buffers can support fertilization of guinea pig eggs, but not as efficiently as bicarbonate buffer. *Gamete Res.* **19**, 123-129.

Bhattacharyya, A., Roldan, E. R. S. & Yanagimachi, R. (1986) Requirement of monovalent cations in the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *Gamete Res.* **15**, 285-294.

Boatman, D. E. & Robbins, R. S. (1991) Bicarbonate: carbondioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. *Biol. Reprod.* **44**, 806-813.

Boldt, J., Casas, A., Whaley, E., Creazzo, T. & Lewis, J. B. (1991) Potassium dependence for sperm-egg fusion in mice. *J. Exp. Zool.* **257**, 245-251.

Bolton, V. N., Warren, R. E. & Braude, P. R. (1986) Removal of bacterial contaminants from

semen for in vitro fertilization or artificial insemination by the use of buoyant density centrifugation. *Fertil. Steril.* **46**, 1128-1132.

Borland, R. M., Hazra, S., Biggers, J. D. & Lechene, C. P. (1977) The elemental composition of the environments of the gametes and preimplantation embryo during the initiation of pregnancy. *Biol. Reprod.* **16**, 147-157.

Brackett, B. G. & Mastroianni, L. (1974) Composition of oviductal fluid. In: *The oviduct and its functions*, eds: Johnson, A. D. & Foley, C. W., pp. 133-159. Academic Press: New York.

Brackett, B. G. & Oliphant, G. (1975) Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* **12**, 260-274.

Bretscher, M., Henderson, R., Simons, K. & Springer, T. (1994) Membrane Structure. In: *Molecular Biology of the Cell* 3rd edn, Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D., eds, pp477-506. New York, Garland Publishing, Inc.

Bwanga, C. O., de Braganca, M. M., Einarsson, S. & Rodriguez-Martinez, H. (1990) Cryopreservation of boar semen in mini- and maxi-straws. *J. Vet. Med.* Ser. A, **37**, 651-658.

Burkman, L. J., Overstreet, J. W. & Katz, D. F. (1984) A possible role for potassium and pyruvate in the modulation of sperm motility in the rabbit oviductal isthmus. *J. Reprod. Fertil.* **71**, 367-376.

Campbell, C. R. (1974) *Statistics for Biologists.* 2nd Edn., Cambridge University Press, Cambridge.

Chang, M. C. (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature (Lond)* **168**, 697-698.

Chang, M. C. (1957) A detrimental effect of seminal plasma on fertilizing capacity of sperm. *Nature* **179**, 258-259.

Chang, M. C. (1959) Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature* **184**, 466-467.

Cheng, W. T. K., Polge, C. & Moor, R. M. (1986) In vitro fertilization of pig and sheep oocytes. *Theriogenology, abstr.* **25**, 146.

Cheng, W. T. K. (1985) In vitro fertilization of farm animal oocytes. *PhD thesis* Council for National Academic Awards, London, UK.

Chung, H. M., Uhm, S. J., Oh, J. H., Lee, H. T. & Chung, K. S. (1993) Optimal treatments for maturation, fertilization and subsequent development of porcine follicular oocytes in vitro. In: *Proceedings of World Conference on Animal Production, abstr.* pp.318-319., Edmonton.

Clarke, N. & Harrison, R. (1993) The use of salt-stored eggs to study sperm capacitation and fertilization in the pig. *J. Reprod. Dev., Suppl., abstr.* **39**, 127.

Claassens, O. E., Kaskar, K. & Coetzee, K. (1996) Comparison of motility characteristics and normal sperm morphology of human semen samples separated by Percoll density gradient centrifugation. *Arch. Androl.* **36**, 127-132.

Correa, J. R. & Zavos, P. M. (1996) Preparation and recovery of frozen-thawed bovine spermatozoa via various sperm selection techniques employed in assisted reproductive technologies. *Theriogenology* **46**, 1225-1232.

Cross, N. L. & Meizel, S. (1989) Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol. Reprod.* **41**, 635-641.

Davis, B. K. (1981) Timing of fertilization in mammalis: Sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7560-7564.

Davis, B. K., Byrne, R. & Bedigian, K. (1980) Studies on the mechanism of capacitation: Albumin-mediated changes in plasma membrane lipids during in vitro incubation of rat sperm cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1546-1550.

Dubuc, A. & Sirard, M. A. (1995) Effect of coculturing spermatozoa with oviductal cells on the incidence of polyspermy in pig in vitro fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* **41**, 360-367.

Eriksson, B. M. & Rodriguez- Martinez, H. (2000) Deep freezing of boar semen in plastic film "Cochettes". *J. Vet. Med., Ser. A* **47**, 89-97.

Fazeli, A., Hage, W. J., Cheng, F. P., Voorhout, W. F., Marks, A., Bevers, M. M. & Colenbrander, B. (1997) Acrosome-intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida in vitro. *Biol. Reprod.* **56**, 430-438.

Fazeli, A., Duncan, A. E., Watson, P. F. & Holt, W. V. (1999) Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biol. Reprod.* **60**, 879-886.

Ferguson, W. J., Braunschweiger, K., Braunschweiger, W. R., Smith, J. R., McCormick, J. J., Wasmann, C. C., Jarvis, N. P., Bell, D. H. & Good, N. E. (1980) Hydrogen ion buffers for biological research. *Anal. Biochem.* **104**, 300-310.

Florman, H. M. & First, N. L. (1988) Regulation of acrosomal exocytosis II. The zona pellucida-induced acrosome reaction of bovine spermatozoa is controlled by extrinsic positive regulatory elements. *Dev. Biol.* **128**, 464-473.

Fraser, L. R. (1983) Potassium ions modulate expression of mouse sperm fertilizing ability, acrosome reaction and hyperactivated motility in vitro. *J. Reprod. Fertil.* **69**, 539-553.

Fraser, L. R. (1984) Mouse sperm capacitation in vitro involves loss of a surface-associated inhibitory component. *J. Reprod. Fertil.* **72**, 373-384.

Fraser, L. R. (1985) Albumin is required to support the acrosome reaction but not capacitation in mouse spermatozoa in vitro. *J. Reprod. Fertil.* **74**, 185-196.

Fraser, L. R. (1986) Both taurine and albumin support mouse sperm motility and fertilizing ability in vitro but there is no obligatory requirement for taurine. *J. Reprod. Fertil.* **77**, 271-280.

Fraser, L. R. (1994) Na^+ requirements for capacitation and acrosomal exocytosis in mammalian sperm. *Int. Rev. Cytol.* **149**, 1-46.

Fraser, L. R., Umar, G. & Sayed, S. (1993) Na^+-requiring mechanisms modulate capacitation and acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* **97**, 539-549.

Fraser, L. R., Abeydeera, L. R. & Niwa, K. (1995) Ca^{2+}-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol. Reprod. Dev.* **40**, 233-241.

Funahashi, H. & Day, B. N. (1997) Advances in in vitro production of pig embryos. *J. Reprod.*

Fertil., *Suppl.* **52**, 271-283.

Funahashi, H., Stumpf, T. T., Terlouw, S. L., Cantley, T. C. Rieke, A. & Day, B. N. (1994) Developmental ability of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* **41**, 1425-1433.

Funahashi, H., Kim, N. H., Stumpf, T. T., Cantley, T. C. & Day, B. N. (1996) Presence of organic osmolytes in maturation medium enhances cytoplasmic maturation of porcine oocytes. *Biol. Reprod.* **54**, 1412-1219.

Funahashi, H., Cantley, T. C. & Day, B. N. (1997) Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyryl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following in vitro fertilization. *Biol. Reprod.* **57**, 49-53.

Gadea, J., Matas, C. & Lucas, X. (1998) Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hIVP) assay. *Anim. Reprod. Sci.* **56**, 95-108.

Garbers, D. L., First, N. L., Gorman, S. K. & Lardy, H. A. (1973) The effects of cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors on ejaculated porcine spermatozoan metabolism. *Biol. Reprod.* **8**, 599-606.

Garbers, D. L., Tubb, D. J. & Hyne, R. V. (1982) A requirement of bicarbonate for Ca^{2+}-induced elevations of cyclic AMP in guinea pig spermatozoa. *J. Biol. Chem.* **257**, 8980-8984.

Gilmore, J. A., Du, J., Tao, J., Peter, A. T. & Critser, J. K.(1996) Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *J. Reprod. Fertil.* **107**, 87-95.

Grant, S. A., Long, S. E. & Parkinson, T. J. (1994) Fertilizability and structural properties of boar spermatozoa prepared by Percoll gradient centrifugation. *J. Reprod. Fertil.* **100**, 477-483.

Gravance, C. G., Champion, Z. J., Sax-Gravance, S. K. & Casey, P. J. (1998) Percentage of normal sperm heads is significantly increased by Percoll separation of semen. *Int. J. Androl.* **21**, 116-119.

Grizard, G., Chevalier, V., Griveau, J. F., Le Lannou, D. & Boucher, D. (1999) Influence of seminal plasma on cryopreservation of human spermatozoa in a biological material-free medium: study of normal and low-quality semen. *Int. J. Androl.* **22**, 190-196.

Grunert, J. H., De Geyter, C., Bordt, J., Schneider, H. P. G. & Nieschlag, E. (1989) Does computerized image analysis of sperm movement enfance the predictive value of semen analysis for in-vitro fertilization results? *Int. J. Androl.* **12**, 329-338.

Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R. Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450.

Gwatkin, R. B. L., Andersen, O. F. & Hutchinson, C. F. (1972) Capacitation of hamster spermatozoa in vitro: The role of cumulus components. *J. Reprod. Fertil.* **30**, 389-394.

Harper, M. J. K. Gamete and Zygote Transport. In: *The physiology of Reproduction*, (eds. Knobil, E & Neill, J. D.), pp.123-187, Ravan Press, Ltd, New York.

Hall, J. A., Fishel, S. B., Timson, J. A., Dowell, K. & Klentzeris, L. D. (1995) Human sperm morphology evaluation pre- and post-Percoll gradient centrifugation. *Human Reprod.* **10**,

342-346.

浜野晴三、豊田裕(1986)高濃度で前培養された射出精子による豚卵子の体外受精　家畜繁殖誌32, 177-183.

Hamano, S., Naito, K., Fukuda, Y. & Toyoda, Y. (1989) In vitro capacitation of boar ejaculated spermatozoa: effect of conditioned media prepared from preincubated sperm suspension. *Gamete Res.* **24**, 483-489.

Hamner, C. E. (1973) Oviductal fluid-composition and physiology. In: *Handbook of Physiology*, Section 7, Vol II, Part 2, ed. Greep, R. O., pp. 141-151. American Physiological Society, Washington, DC.

Hamner, C. E. & Williams, W. L. (1964) Identification of sperm stimulating factor of rabbit oviduct fluid. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **117**, 240-243.

Harrison, R. A. P. & Vickers, S. E. (1990) Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* **88**, 343-352.

Harrison, R. A. P., Jacques, M. L., Pascual Minguez, M. L., Miller, N. G. A. (1992) Behaviour of ejaculated spermatozoa from bull, boar and ram during thin-layer countercurrent partition in aqueous two-phase systems. *J. Cell Sci.* **2**, 123-132.

Harrison, R. A. P., Mairet, B. & Miller, N. G. A. (1993) Flow cytometric studies of bicarbonate-mediated Ca^{2+} influx in boar sperm populations. *Mol. Reprod. Dev.* **35**, 197-208.

Hunter, R. H. F. (1972) Fertilization in the pig: Sequence of nuclear and cytoplasmic events. *J. Reprod. Fertil.* **29**, 395-406.

Hunter, R. H. F. (1973) Polyspermic fertilization in pigs after tubal deposition excessive numbers of spermatozoa. *J. Exp. Zool.* **183**, 57-64.

Hunter, R. H. F. (1990) Fertilization of pig eggs in vivo and in vitro. *J. Reprod. Fertil., Suppl.* **40**, 211-226.

Hunter, R. H. F. (1996) Ovarian control of very low sperm/egg ratios at the commencement of mammalian fertilization to avoid polyspermy. *Mol. Reprod. Dev.* **44**, 417-422.

Hunter, R. H., Huang, W. T. & Holtz, W. (1998) Regional influences of the fallopian tubes on the rate of boar sperm capacitation in surgically inseminated gilts. *J. Reprod. Fertil.* **114**, 17-23.

Huszar, G., Willetts, M. & Corrales, M. (1990) Hyaluronic acid (Sperm Select) improves retention of sperm motility and velocity in normospermic and oligospermic speciments. *Fertil. Steril.* **54**, 1127-1134.

Hyne, R. V. (1984) Bicarbonate- and calcium-dependent induction of rapid guinea pig sperm acrosome reactions by monovalent ionophores. *Biol. Reprod.* **31**, 312-323.

Hyne, R. V., Higginson, R. E., Kohlman, D. & Lopata, A. (1984) Sodium requirement for capacitation and membrane fusion during the guinea-pig sperm acrosome reaction. *J. Reprod. Fertil.* **70**, 83-94.

Imai, H., Niwa, K. & Iritani, A. (1977) Penetration in vitro of zona-free hamster eggs by ejaculated boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* **51**, 495-497.

Iritani, A., Gomes, W. R. & VanDemark, N. L. (1969) Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in ewes. *Biol. Reprod.* **1**, 72-76.

Iritani, A., Nishikawa, Y., Gomes, W. R. & VanDemark, N. L. (1971) Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in rabbits. *J. Anim. Sci.* **33**, 829-835.

Iritani, A., Sato, E. & Nishikawa, Y. (1974) Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in sows. *J. Anim. Sci.* **39**, 582-588.

Iritani, A., Niwa, K. & Imai, H. (1978) Sperm penetration in vitro of pig follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fertil.* **54**, 379-383.

Iwamonto, T., Tsang, A., Luterman, M., Dickson, J., de Lamirande, E., Okuno, M., Mohri, H. & Gagnon, C. (1992) Purification and characterization of a sperm motility-dynein ATPase inhibitor from boar seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.* **31**, 55-62.

Jeulin, C., Feneux, D., Serres, C., Jouannet, P., Guillet-Rosso, F., Belaisch-Allart, J., Frydman, R. & Testart, J. (1986) Sperm factors related to failure of human in-vitro fertilization. *J. Reprod. Fertil.* **76**, 735-744.

Juang, H. H., Musah, A. I., Schwabe, C. & Anderson, L. L. (1990) Immunoactive relaxin in boar seminal plasma and its correlation with sperm motility. *Anim. Reprod. Sci.* **22**, 47-53.

Kano, K., Miyano, T. & Kato, S. (1994) Effect of oviductal epithelial cells on fertilization of pig oocytes in vitro. *Theriogenoloy* **42**, 1061-1068.

Kano, K., Miyano, T. & Kato, S. (1998) Effect of glycosaminoglycans on the development of in vitro-matured and -fertilized porcine oocytes to the blastocyst stage in vitro. *Biol. Reprod.* **58**, 1226-1232.

Katayama, K. P., Stehlik, E. & Jeyendran, R. S. (1989) In vitro fertilization outcome: glass wool-filtered sperm versus swim-up sperm. *Fertil. Steril.* **52**, 670-672.

Kikuchi, K., Nagai, T., Motlik, J., Shioya, Y. & Izaike, Y. (1993) Effect of follicular cells on in vitro fertilization of pig follicular oocytes. *Theriogenology* **39**, 593-599.

Kikuchi, K., Nagai, T., Ding, J., Yamauchi, N., Noguchi, J. & Izaike, Y. (1999) Cytoplasmic maturation for activation of pig follicular oocytes cultured and arrested at metaphase I. *J. Reprod. Fertil.* **116**, 143-156.

Killian, G. J. (1992) Fertility factors in seminal plasma. In: *Proceedings of the 14th Technical Conference on Artificial Insemination & Reproduction,* pp. 33-38.

Krogenœs, A., Andersen Berg, K., Hafne, A. L. & Engeland, E. (1994) Membrane alterations in bull spermatozoa after freezing and thawing and after in vitro fertilization. *Acta Vet. Scand.* **35**, 17-26.

Kruger, T. F., Menkveld, R., Stander, F. S. H., Lombard, C. J., Van der Merwe, J. P., Van Zyl, J. A. & Smith, K. (1986) Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* **46**, 1118-1123.

Laurent, T. C. & Fraser, J. R. E. (1992) Hyaluronan. *The FASEB Journal,* **6**, 2397-2404.

Lee, C. N. & Ax, R. L. (1984) Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. *J. Dairy Sci.* **67**, 2006-2009.

Lee, C. N., Handrow, R. R., Lenz, R. W. & Ax, R. L. (1985) Interactions of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrosome reactions in bovine spermatozoa in vitro. *Gamete Res.* **12**, 345-355.

Lee, M. A. & Storey, B. T. (1986) Bicarbonate is essential for fertilization of mouse eggs: mouse sperm require it to undergo the acrosome reaction. *Biol. Reprod.* **34**, 349-356.

Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Parrish, E. S. & First, N. L. (1989) In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* **31**, 61-74.

Lui, C. W. & Meizel, S. (1977) Biochemical studies of the in vitro acrosome reaction inducing activity of bovine serum albumin. *Differentiation* **9**, 59-66.

Liu, D. Y. & Baker, H. W. G. (1992) Tests of human sperm function and fertilization in vitro. *Fertil. Steril.* **58**, 465-483.

Maas, D. H. A., Storey, B. T. & Mastroianni, L. (1977) Hydrogen ion and carbon dioxide content of the oviductal fluid of the rhesus monkey (Macacca mulatta). *Fertil. Steril.* **28**, 981-985.

Mahadevan, M. M. & Trounson, A. O. (1985) Removal of the cumulus oophorus from the human oocyte for in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* **43**, 263-267.

Mann, T. (1964) *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract.* Muthuen: London.

Marrable, A. W. (1971) *The Embryonic Pig, A Chronological Account* Pitman Medical.

Martinez, E. A., Vazquez, J. M., Matas, C., Gadea, J., Alonso, M. I. & Roca, J. (1996) Oocyte penetration by fresh or stored diluted boar spermatozoa before and after in vitro capacitation treatments. *Biol. Reprod.* **55**, 134-140.

桝田博司、川倉一彦、渡辺伸也、小栗紀彦、相間正、小島敏之、小野寺道寛(1988)パーコール密度勾配遠心法による豚精子の分離　*家畜繁殖技術研究会誌* 10, 108-111.

Mattioli, M., Bacci, M. L., Galeati, G. & Seren, E. (1989) Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* **31**, 1201-1207.

Maxwell, W. M. C. & Johnson, L. A. (1999) Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology* **52**, 1353-1362.

Mburu, J. N., Rodriguez-Martinez, H. & Einarsson, S. (1997) Changes in sperm ultrastructure and localisation in the porcine oviduct around ovulation. *Anim. Reprod. Sci.* **47**, 137-148.

Meizel, S., Lui, C. W., Working, P. K. & Mrsny, R. J. (1980) Taurine and hypotaurine: Their effects on motility, capacitation and the acrosome reaction of hamster sperm in vitro and their presence in sperm and reproductive tract fluids of several mammals. *Develop. Growth Differ.* **22**, 483-494.

Mori, T., Hirayama, M., Suzuki, K., Shimizu, H. & Nagai, T. (1996) Effect of casein phospho peptides and Ca^{2+} on penetration of boar spermatozoa into pig oocytes matured in vitro. *Biol. Reprod.* **55**, 364-369.

Mortimer, D., Aitken, R. J., Mortimer, S. T. & Pacey, A. A. (1995) Workshop report: clinical CASA-the quest for consensus. *Reprod. Fertil. Dev.* **7**, 951-959.

Mrsny, R. J. & Meizel, S. (1981) Potassium ion influx and Na^+, K^+-ATPase activity are required

for the hamster sperm acrosome reaction. *J. Cell Biol.* **91**, 77-82.

Mrsny, R. J., Siiteri, J. E. & Meizel, S. (1984) Hamster sperm Na^+, K^+-adenosine triphosphatase: Increased activity during capacitation in vitro and its relationship to cyclic nucleotides. *Biol. Reprod.* **30**, 573-584.

Murdoch, R. N. & White, I. G. (1971) Studies on the stimulating effect of bicarbonate on the metabolism of ram spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* **25**, 231-242.

Murphy, S. J., Roldan, E. R. S. & Yanagimachi, R. (1986) Effects of extracellular cations and energy substrates on the acrosome reaction of precapacitated guinea pig spermatozoa. *Gamete Res.* **14**, 1-10.

Murphy, S. J. & Yanagimachi, R. (1984) The pH dependence of motility and acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *Gamete Res.* **10**, 1-8.

Myles, D. G. & Primakoff, P. (1997) Why did the sperm cross the cumulus ? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol. Reprod.* **56**, 320-327.

Nagai, T. (1994) Current status and perspectives in IVM-IVF of porcine oocytes. *Theriogenology* **41**, 73-78.

Nagai, T. (1996) In vitro maturation and fertilization of pig oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* **42**, 153-163.

Nagai, T. & Moor, R. M. (1990) Effect of oviduct cell on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* **26**,377-382.

Nagai, T., Niwa, K., Iritani, A. & Leidl, W. (1983) Improved rates of sperm penetration in vitro of pig follicular oocytes matured in culture. *Jap. J. Fertil. Steril.* **28**, 313-318.

Nagai, T., Niwa, K. & Iritani, A. (1984) Effect of sperm concentration during pre-incubation in a defined medium on fertilization in vitro of pig follicular oocytes. *J. Reprod. Fertil.* **70**, 271-275.

Nagai, T., Takahashi, T., Masuda, H., Shioya, Y., Kuwayama, M., Fukushima, M., Iwasaki, S. & Hanada, A. (1988) In-vitro fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* **84**, 585-591.

Nagai, T., Takahashi, T., Shioya, Y. & Oguri, N. (1990) Maturation and fertilization of pig follicular oocytes cultured in pig amniotic fluid. *Theriogenology* **34**, 195-204.

Nagai, T., Miura, K., Kikuchi, K. & Okamura, N. (1993) Effects of caffeine on in-vitro fertilization of pig follicular oocytes. *J. Reprod. Dev.* **39**, 347-352.

Naito, K., Fukuda, Y. & Toyoda, Y. (1988) Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured in vitro. *Gamate Res.* **21**, 289-295.

Nakayama, T., Inoue, M. & Sato, E. (1996) Effect of oocytectomy on glycosaminoglycan composition during cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes cultured in vitro. *Biol. Reprod.* **55**, 1299-1304.

Neill, J. M. & Olds-Clarke, P. (1987) A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. *Gamete Res.* **18**,

121-140.

Niwa, K. (1993) Effectiveness of in vitro maturation and in vitro fertilization techniques in pigs. *J. Reprod. Fertil., Suppl.* **48**, 49-59.

Niwa, K. & Chang, M. C. (1974) Optimal sperm concentration and minimal number of spermatozoa for fertilization in vitro of rat eggs. J. *Reprod. Fertil.* **40**, 471-474.

Oehninger, S., Franken, D. R., Sayed, E., Barroso, G. & Kolm, P. (2000) Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta-analysis. *Human Reprod. Update* **6**, 160-168.

Okamura, N. & Sugita, Y. (1983) Activation of spermatozoan adenylate cyclase by a low molecular weight factor in porcine seminal plasma. *J. Biol. Chem.* **258**, 13056-13062.

Okamura, N., Tajima, Y., Soejima, A., Masuda, H. & Sugita, Y. (1985) Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **260**, 9699-9705.

Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L. & First, N. L. (1985) Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. *Theriogenology* **24**, 537-549.

Parrish, J. J., Susko-Parrish, J., Winer, M. A. & First, N. L. (1988) Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* **38**, 1171-1180.

Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Handrow, R. R., Sims, M. M. & First, N. L. (1989) Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol. Reprod.* **40**, 1020-1025.

Parrish, J. J., Krogenaes, A. & Susko-Parrish, J. L. (1995) Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Therigenology* **44**, 859-869.

Parrish, R. F., Wincek, T. J. & Polakoski, K. L. (1980) Glycosaminoglycan stimulation of the in vitro conversion of boar proacrosin into acrosin. *J. Androl.* **1**, 89-95.

Pavlok, A. (1981) Penetration of hamster and pig zona-free eggs by boar ejaculated spermatozoa preincubated in vitro. *Int. J. Fertil.* **26**, 101-106.

Peterson, R. N. & Freund, M. (1973) Effect of (H^+), (Na^+), (K^+) and certain membrane-active drugs on glycolysis, motility, and ATP synthesis by human spermatozoa. *Biol. Reprod.* **8**, 350-357.

Pousette, Å., Åkerlöf, E., Rosenborg, L. & Fredricsson, B. (1986) Increase in progressive motility and improved morphology of human spermatozoa following their migration through Percoll gradients. *Int. J. Androl.* **9**, 1-13.

Pursel, V. G. & Johnson, L. A. (1975) Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.* **40**, 99-102.

Ranganathan, S., Ganguly, A. K. & Datta, K. (1994) Evidence for presence of hyaluronan binding protein on spermatozoa and its possible involvement in sperm function. *Mol. Reprod. Dev.* **38**, 69-76.

Rath, D. (1992) Experiments to improve in vitro fertilization techniques for in vivo-matured porcine oocytes. *Theriogenology* **37**, 885-896.

Roblero, L., Fernandez, E., Guadarrama, A., Hochschild, F. Z. & Ortiz, M. E. (1988) High potassium concentration improves the rate of acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertil. Steril.* **49**, 676-679.

Rodriguez-Martinez, H. (1999) The oviduct of the pig: do intraluminal glycosaminoglycans play a role in tubal function? In: *Proceedings of IV International Conference on Boar Semen Preservation,* Beltsville, USA, p. O18.

Rodriguez-Martinez, H., Ekstedt, E. & Einarsson, S. (1990) Acidification of epididymal fluid in the boar. *Int. J. Androl.* **13**, 238-243.

Rodriguez-Martinez, H., Han, Y., Song, X., Funahashi, H., Niwa, K. & Pertoft, H. (1997) Production of hyaluronic acid by porcine oocyte-cumulus cells complexes during in vitro maturation. In: *Proceedings of 5th International Conference on Pig Reproduction,* Kerkrade, Holland, p. 139.

Rodriguez-Martinez, H., Larsson, B., Pertoft, H. & Kjellen, L. (1998) GAGs and spermatozoon competence in vivo and in vitro. In: *Gamete Development and Function,* (eds. A. Lauria *et al.*), pp239-272. Serono Symposia, Rome.

Rogers, B. J., Ueno, M. & Yanagimachi, R. (1981) Fertilization by guinea pig spermatozoa requires potassium ions. *Biol. Reprod.* **25**, 639-648.

Saeki, K., Nagao, Y., Hoshi, M. & Kainuma, H. (1993) In vitro fertilization of bovine oocytes in a protein-free medium and subsequent development to the blastocyst stage. *Theriogenology, abstr.* **39**, 302.

Saling, P. M. & Storey, B. T. (1979) Mouse gamete interactions during fertilization in vitro. Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J. Cell Biol.* **83**, 544-555.

Salisbury, G. W. & Lodge, J. R. (1962) Metabolism of spermatozoa. *Adv. Enzymol.* **24**, 35-104.

Salustri, A., Yanagishita, M., Underhill, C. B., Laurent, T. C. & Hascall, V. C. (1992) Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle. *Dev. Biol.* **151**, 541-551.

Sanchez Sarmiento, C. A., Coetzee, K., Kruger, T. F., van der Merwe, J. P., Stander, F. S. H., Henkel, R. R. & Lombard, C. J. (1996) Comparison between swim-up and glass wool column filtration of human semen in a gamete intrafallopian transfer program. *Arch. Androl.* **36**, 155-160.

Shamsuddin, M. & Rodriguez-Martinez, H. (1994) A simple, non-traumatic swim-up method for the selection of spermatozoa for in vitro fertilization in the bovine. *Anim. Reprod. Sci.* **36**, 61-75.

Shellenbarger, D. L. & Shapiro, B. M. (1980) Effect of the inhibitors of ion movements, verapamil and tetraethylammonium, on fertilization of mouse eggs in vitro. *Gamete Res.* **3**, 1-7.

Siddiquey, A. K. S. & Cohen, J. (1982) In-vitro fertilization in the mouse and the relevance of different sperm/egg concentrations and volumes. *J. Reprod. Fertil.* **66**, 237-242.

Sidhu, K. S. & Guraya, S. S. (1989) Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Int. Rev. Cytol.* **118**, 231-280.

Siiteri, J. E., Dandekar, P. & Meizel, S. (1988) Human sperm acrosome reaction-initiating activity associated with the human cumulus oophorus and mural granulosa cells. *J. Exp. Zool.* **246**, 71-80.

Sirard, M. A., Dubuc, A., Bolamba, D., Zheng, Y. & Coenen, K. (1993) Follicle-oocytes-sperm interactions in vivo and in vitro in pigs. *J. Reprod. Fertil., Suppl.* **48**, 3-16.

Smith, S., Hosid, S. & Scott, L. (1995) Use of postseparation sperm parameters to determine the method of choice for sperm preparation for assisted reproductive technology. *Fertil. Steril.* **63**, 591-597.

Smith, T. T. & Nothnick, W. B. (1997) Role of direct contact between spermatozoa and oviductal epithelial cells in maintaining rabbit sperm viability. *Biol. Reprod.* **56**, 83-89.

Tajik, P., Niwa, K. & Murase, T. (1993) Effects of different protein supplements in fertilization medium on in vitro penetration of cumulus-intact and cumulus-free bovine oocytes matured in culture. *Theriogenology* **40**, 949-958.

Tajima, Y., Okamura, N. & Sugita, Y. (1987) The activating effect of bicarbonate on sperm motility and respiration at ejaculation. *Biochim. Biophys. Acta* **924**, 519-529.

高橋敏方、永井卓（1990）プリザーベーション法で処理された射出精子による豚卵子の体外受精　*家畜繁殖技術研究会誌*　12, 98-103.

Tesarik, J. (1985) Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 74, 383-388.

Thérien, I., Soubeyrand, S. & Manjunath, P. (1997) Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol. Reprod.* **57**, 1080-1088.

Thompson, J. G. (1997) Comparison between in vivo-derived and in vitro-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* **9**, 341-354.

Tienthai, P., Suzuki, K., Pertoft, H., Kjellén, L. & Rodriguez-Martinez, H. (2000) Production of glycosaminoglycans by the porcine oviduct in relation to sperm storage. *Reprod. Domest. Anim.* **35**, 167-170.

Tomlinson, M. J., Kessopoulou, E. & Barratt, C. L. R. (1999) The diagnostic and prognostic value of traditional semen parameters. *J. Androl.* **20**, 588-593.

Topper, E. K., Killian, G. J., Way, A., Engel, B. & Woelders, H. (1999) Influence of capacitation and fluids from the male and female genital tract on the zona binding ability of bull spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* **115**, 175-183.

Toyoda, Y. & Chang, M. C. (1974) Capacitation of epididymal spermatozoa in a medium with high K/Na ratio and cyclic AMP for the fertilization of rat eggs in vitro. *J. Reprod. Fertil.* **36**, 125-134.

Umbreit, W. W. (1957) Carbon dioxide and bicarbonate. In: *Manometric Techniques.* 3rd Edn., eds. Umbreit, W. W., Burris, R. H. & Stauffer, J. F., pp. 18-27. Burgess: Minneapolis,

USA.

Vandevoort, C. A., Cherr, G. N. & Overstreet, J. W. (1997) Hyluronic acid enhances the zona pellucida-induced acrosome reaction of macaque sperm. *J. Androl.* **18**, 1-5.

Wales, R. G. & White, I. G. (1958) The interaction of pH, tonicity and electrolyte concentration on the motility of dog spermatozoa. *J. Physiol.* **141**, 273.

Wang, W. H., Niwa, K. & Okuda, K. (1991) In-vitro penetration of pig oocytes matured in culture by frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* **93**, 491-496.

Wang, W. H., Abeydeera, L. R., Fraser, R. L. & Niwa, K. (1995) Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and in vitro fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *J. Reprod. Fertil.* **104**, 305-313.

Wang, W. H., Hosoe, M. & Shioya, Y. (1997) Induction of cortical granule exocytosis of pig oocytes by spermatozoa during meiotic maturation. *J. Reprod. Fertil.* **109**, 247-255.

Wang, W. H., Abeydeera, L. R., Prather, R. S. Day, B. N. (1998) Morphologic comparison of ovulated and in vitro-matured porcine oocytes, with particular reference to polyspermy after in vitro fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* **49**, 308-316.

Wang, Z. K., Wei, P. H., Wang, J. Z., Lei, C. & Kou, M. Q. (1992) Maturation and fertilization of porcine oocytes in vitro. *Theriogenology* **37**, 733-739.

Watson, P. F. (1995) Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* **7**, 871-891.

Working, P. K. & Meizel, S. (1983) Correlation of increased intraacrosomal pH with the hamster sperm acrosome reaction. *J. Exp. Zool.* **227**, 97-107.

Xu, X., Ding, J., Seth, P. C., Harbison, D. S. & Foxcroft, G. R. (1996) In vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes: effects of boar and ejaculate fraction. *Theriogenology* **45**, 745-755.

Yanagimachi, R. (1994) Mammalian Fertilization. In: *The physiology of Reproduction*, (eds. Knobil, E & Neill, J. D.), pp.189-317, Ravan Press, Ltd, New York.

Yanagimachi, R. & Bhattacharyya, A. (1988) Acrosome-reacted guinea pig spermatozoa become fusion competent in the presence of extracellular potassium ions. *J. Exp. Zool.* **248**, 354-360.

Yanagimachi, R. & Chang, M. C. (1963) Fertilization of hamster eggs in vitro. *Nature* **200**, 281-282.

Yoshida, M. (1987) In vitro fertilization of pig oocytes matured in vivo. *Japan J. vet. Sci.* **49**, 711-718.

Yoshida, M., Ishizaki, Y. & Kawagishi, H. (1990) Blastocyst formation by pig embryos resulting from in-vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *J. Reprod. Fertil.* **88**, 1-8.

Yoshida, M., Mizoguchi, Y., Ishigaki, K., Kojima, T. & Nagai, T. (1993) Birth of piglets derived from in vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology* **39**, 1303-1311.

Zalata, A. A., Christophe, A. B., Depuydt, C. E., Schoonjans, F. & Comhaire, F. H. (1998) White blood cells cause oxidative damage to the fatty acid composition of phospholipids of

human spermatozoa. *Int. J. Androl.* **21**, 154-162.

Zheng, Y. S. & Sirard. M. A. (1992) The effect of sera, bovine serum albumin and follicular cells on in vitro maturation and fertilization of porcine oocytes. *Theriogenology* **37**, 779-790.

Zhou, R., Shi, B., Chou, K. C. K., Oswalt, M. D. & Haug, A. (1990) Changes in intracellular calcium of porcine sperm during in vitro incubation with seminal plasma and capacitating medium. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **172**, 47-53.

付表１．培地の組成表（１）[§]

組成 (mM)	WS-PVA*	WS-BSA*	PM-Hepes-BSA[¶]	PM-PVA[¶]	PM-BSA[¶]	FM-PVA[¶]	FM-BSA[¶]
NaCl	140.0	140.0	112.0	95.0	95.0	111.0	111.0
KCl			3.1	3.1	3.1	3.1	3.1
$NaHCO_3$				40.0	40.0	15.0	15.0
$CaCl_2$			2.0	2.0	2.0	4.6	4.6
$MgSO_4$			0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
NaH_2PO_4			0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Glucose			5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Pyruvate			1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Lactate			21.7	21.7	21.7	21.7	21.7
Hepes	20.0	20.0	20.0				
Caffeine						2.0	2.0
BSA		1 mg/ml	3 mg/ml		3 mg/ml		5 mg/ml
PVA	1 mg/ml			1 mg/ml		1 mg/ml	
pH	7.4	7.4	7.6-7.8	7.6-7.8	7.6-7.8	7.5-7.6	7.5-7.6

[§]本研究で用いた培養液には、最終濃度10 μg/ml のフェノールレッド、および以下の抗生物質のうちいずれかを添加している。
1) 100 μg/ml ストレプトマイシン、 100 IU/ml ペニシリンを混合したもの、2) 25-50 μg/ml ゲンタマイシンあるいは3) 50 μg/ml カナマイシン
*生理食塩水を修正
[¶]Parrish ら (1988) により修正されたタイロード溶液を改変

付表２．培地の組成表（２）[§]

組成 (mM)	mBO[¶]	Pig- FM[‡]	mTBM[*]	BMOC-2[†]
NaCl	112.0	90.0	113.1	119.0
KCl	4.02	12.0	3.0	4.8
$NaHCO_3$	37.0	25.0		25.0
$CaCl_2$	2.25	8.0	8.0	1.7
$MgSO_4$		0.5		1.2
$MgCl_2$	0.52			
NaH_2PO_4	0.83	0.5		
KH_2PO_4				1.2
Glucose	13.9		11.0	5.6
Pyruvate	1.25	2.0	5.0	0.25
Lactate		10.0		20.4
Hepes		10.0		
Tris			20.0	
Caffeine	2.0	2.0	2.0	
BSA	5 mg/ml	5 mg/ml	5 mg/ml	1 mg/ml
PVA				
pH	7.5-7.6	7.5-7.6	7.5-7.6	7.4

[§]本研究で用いた培養液には、最終濃度10 μg/ml のフェノールレッド、および以下の抗生物質のうちいずれかを添加している。
1) 100 μg/ml ストレプトマイシン、 100 IU/ml ペニシリンを混合したもの、2) 25-50 μg/ml ゲンタマイシン、あるいは
3) 50 μg/ml カナマイシン
[¶] Brackett & Oliphant (1975) を改変, [‡]新たに開発した培地, [*] Abeydeera & Day (1997) を改変, [†] Cheng (1985) を改変