

特別講演

受精機構の解明と生殖補助医療への応用

山形大学医学部産科婦人科学教室

教授 廣 井 正 彦

Elucidation of the Mechanism of Fertilization and Clinical Application
of Assisted Reproductive Technology

Masahiko HIROI

Department of Obstetrics and Gynecology, Yamagata University School of Medicine, Yamagata

Key words: Fertilization • Calcium oscillation • Glucose metabolism •
Oviduct specific glycoprotein • Microinsemination of sperm

はじめに

近年，わが国でも体外受精など新しい生殖医療に対する補助的な技術が臨床に応用され，妊孕性の向上に大きく貢献してきている。

そこで，この度，伝統ある本学会にて特別講演をする機会が与えられたので，私達のデータをもとに「受精」のメカニズムと，わが国の生殖医療の現況などを中心に解説したい。

受精とは

生殖現象の初期の段階をみると，卵子や精子の発生からその成熟にはじまり，成熟した卵子と受精能を獲得した精子が卵管膨大部にて合体することからはじまる。これには，図1のごとく多くの段階をふみ「受精」が完了し，卵管内で受精卵が分割し，胞胚期で子宮内膜に着床することになる。

このように極端に大きさの異なった卵子と精子の核が融合し，遺伝情報の組替えを行い，新しい遺伝物質をもった個体を発生させるのが受精現象である。この結果DNAの修復に基づく核(細胞)を若返らせると共に遺伝的に多様性を増し，子孫を次の世代に送る生殖にとって極めて重要な現象である。

そこで今回は，

1. 卵胞と卵子の成熟，
2. 受精とカルシウムの変動，
3. エネルギー代謝の側面，

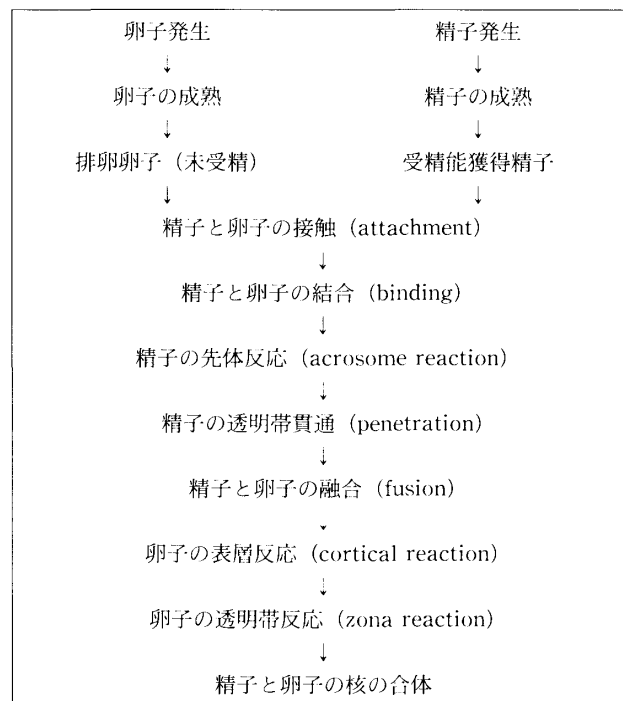


図1 受精にみられる主な現象

4. 卵管分泌液の役割，
 5. 顕微授精の問題，
 6. 生殖医療への応用，
- などの6点にしぼって記述することにした。

卵胞の発育と卵子の成熟

1. 哺乳動物の卵胞の運命
- 多くの動物では，妊孕性の開始の時期では卵巣内の卵子はかなり多くみられるが，妊孕期間中に

表1 いろいろな動物にみられる卵胞の運命
(Byskov, 1978)

動物の種類	妊孕性開始時期の卵子総数	妊孕期間中に排卵する卵子数	閉鎖卵胞となつて消失する卵胞の割合(%)
ヒト	390,000	360	99.9
サル	200,000	280	99.9
イヌ	70,000	60	99
モルモット	15,000	270	98
ブタ	100,000	1,190	87
マウス	3,000	630	77
ラット	5,000	1,260	75

排卵まで達する卵子は極めて少なく、ヒトやサルでは99.9%が、マウス、ラットでは75~77%が閉鎖卵胞に至り消失していく(表1)。

これを婦人の月経周期をとってみると、月経周期の1~3日目には下垂体より主としてFSHの作用で卵胞の発育がリクルートされ、やがて1個の主席卵胞が選択されると、リクルートされた他の卵胞は閉鎖の過程に入ることになる。そして選択された1個の卵胞のみが排卵し、やがて黄体、白体となり卵胞の働きを終えることになる。

2. 卵胞発育の調節因子

卵胞の発育は下垂体からのFSH, LHなどにより調節されていることはすでに明らかにされている。しかし、未熟ラットにPMS 5単位と、未熟又は成熟卵胞液を同時に投与し、24時間後に卵巣の肥大と排卵数に及ぼす影響を観察すると、成熟卵胞液を投与した場合には、PMSによる卵胞の肥大と排卵数を有意に抑制していることが明らかになった。

また、顆粒膜細胞にandrostenedioneとPMSを加えて培養すると、成熟卵胞液を加えた時に著明にestradiolへのaromatizationが抑制された。

これらのデータは、主席細胞への選択が行われた後には、この主席細胞から分泌される特殊な物質が、他の卵胞を発育するに充分量のgonadotropinが存在しても、その他の卵胞の発育を抑制するように働いていることを意味しており、重要な所見である。

3. 卵胞内ステロイド濃度

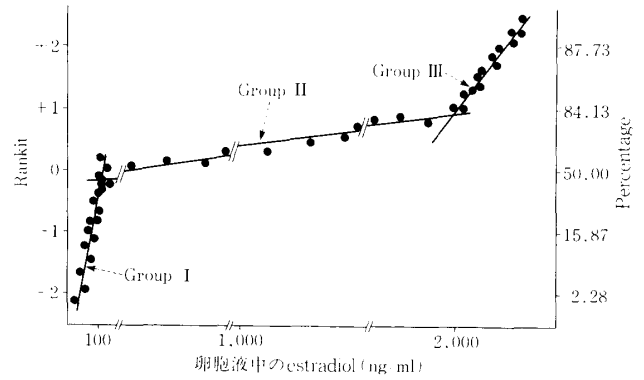


図2 排卵前期における卵胞中のestradiolの濃度

妊孕性を有している婦人から同意を得て開腹時卵胞内のestradiolをradioimmunoassayで測定し、これをrankit分析すると、3群に分けることができる。すなわちGroup Iがリクルートされた比較的初期の卵胞で、Group IIはその後の発育卵胞、Group IIIが主席細胞にほぼ相当する(図2)。

この卵胞の大きさと、卵胞液中のestradiolとtestosterone濃度は逆相関を示すのでestradiol/testosterone値は卵胞の成熟につれ大きくなる。一方、dihydrotestosterone binding capacity (ABP)も卵胞のestradiolと同様に増加する。このことから卵胞内のsteroidは強い生物学的活性を余りもっていないといえる。

体外受精の際に卵胞液を吸引した時の卵胞液中の各種ステロイドをHPLCで測定し、受精との関係を調べた。

受精をした、いわゆる良好卵はestradiolが低く、estradiolとestriolの中間に出てくる部分が低値で、progesteroneは有意に高値を示した。これはhCG投与35時間後に採卵しているために、むしろestradiolの産出が抑制され、progesteroneが増加してきているという卵胞液内の環境を物語っている。

4. 壁側顆粒膜細胞と卵丘細胞

近年、アポトーシスが問題になってきているが、これを採卵時のヒト顆粒膜細胞で観察した。これを採卵時の壁側顆粒膜細胞塊と卵丘細胞塊で比較すると、受精した卵子はアポトーシス小体の出現率が有意に低下していた。

このことから、採卵した卵のqualityを顆粒膜

のアポトーシスからある程度推察できることが明らかとなった。

顆粒膜細胞の細胞外基質との関係を調べるために、hMG, hCG 投与によって成熟させたヒト卵胞より、壁側及び卵丘側に分けて顆粒膜細胞を採取し、ヒアルロニダーゼで処理し、これらの細胞を卵巣の細胞外基質であるコラーゲンやヒアルロン酸などの添加の有無により4系統に分けて7日間培養した。さらに、これらの細胞よりメッセンジャーRNAを抽出し、顆粒膜細胞特異的遺伝子であるアロマターゼ、ハウスキーピング遺伝子である β -アクチン、グリセロアルデヒド3 燐酸脱水素酵素(GAPDH)の発現量をノザンプロット解析

にて解析した。壁側顆粒膜細胞においては、ヒアルロン酸を添加することにより、アロマターゼ遺伝子の発現がコントロールに比べて4倍以上に誘導された。このことより、卵胞における主たる細胞外基質のヒアルロン酸は、壁側顆粒膜細胞の分化形質の発現保持に重要であることが示唆された。

5. 卵胞の発育に関与する調節因子や卵子の成熟に関与する因子

このように卵胞の成熟に関与する調節因子には今日まで多くの研究が行われ、中には分子量や構造まで明らかにされているものがあるが、多くは糖蛋白かペプチドであると推定されている。こ

表2 卵胞成熟に関与する主な調節因子

名 称	作 用	種 類	分 子 量 と 構 造	報 告 者 (報 告 年)	
Oocyte Maturation Inhibitor (OMI)	卵細胞の成熟を抑制	ブタ	1,500	ペプチド	Tsafriri (1976)
		ヒト	2,000以下	〃	Channing (1982)
		ウサギ	〃	〃	
		ハムスター	〃	〃	
Follicle Regulatory Protein (FRP)	卵巣重量増加及び血清 E_2 値上昇を抑制	ブタ	16,000	糖蛋白	Kling (1983)
		ヒト	〃	〃	di Zereza (1983)
		ウシ	〃	〃	
FSH Binding Inhibitor (FSHBI)	FSH と顆粒膜細胞との結合を抑制	ウシ	500~1,000		Fletcher (1982)
		ブタ	500~5,000		Sluss (1984)
Luteinization Inhibitor (LI)	黄体化を抑制	ブタ			Ledwitz-Righy (1977)
		ウシ			Amsterdam (1979)
		ヒト			Channing (1970)
Granulosa Cell Factor	meiosis を抑制	ウシ ブタ	6,000以下 3,000以下		Sato (1984)
Inhibin	FSH 分泌を抑制	ウシ	58,000 (44,000+14,000)	糖蛋白	Robertson (1985)
		ヒト	23,000	〃	Simon (1985)
		ブタ	32,000 (18,000+14,000)	〃	Lig (1985)
Angiogenesis Factor	血管新生を起こす	ヒト ブタ			Frederick (1985) Frederick (1985)
Ovarian Luteinization Stimulator	FSH による LH 結合能誘導を増加させる	ブタ			Channing (1984)
LH Receptor Binding Inhibitor	LH が LH receptor に結合するのを抑制する		3,800		Yay (1976)
Pregnancy Associated Plasma Protein A	elastase を抑制	ヒト	820,000	糖蛋白	Sinusich
Arginin Vasopressin		ヒト			Wathes (1984)
Oocyte Meiosis Initiation stimulatory Factor	meiosis initiation を増加させる	ヒト			Mc Natty (1984)
Gn RH-like substance		ラット	1,000~10,000		Aten
Placental Protein 5	plasmin を抑制	ヒト			Seppala (1984)
Placental Protein 12		ヒト		糖蛋白	Seppala (1984)
Placental Protein 14		ヒト	42,000	糖蛋白	
Relaxin	蛋白分解酵素産生を増す	ヒト ブタ			Weiss (1976)
Plasminogen Activator	plasmin 産生	ラット ブタ			Reich (1985)
Glycosaminoglycan					Eppig (1981)
Prostaglandin		ヒト			Siebe (1985)

これらの因子が下垂体からのホルモン分泌などと関連しあい、複雑な機構のもとで卵胞の発育や排卵、卵の成熟に関与していると考えられる(表2)。

一方、卵子の成熟についても gonadotropin や、ステロイドのほかにも多くの成熟促進因子や阻止因子が関与していることが明らかにされている。

受精と卵細胞内カルシウムの変動

卵細胞内カルシウム濃度測定に用いられた装置は山形大学医学部第一生理学教室で作製したものをを用いた。光源のキセノンランプより発せられた光によりマウス細胞質内に導入されたカルシウム感受性蛍光色素を励起し、卵細胞より発せられた蛍光をランダムアクセスカメラで取り込み、そのデータをコンピューターで処理している。

1. 新鮮卵, 加齢卵におけるカルシウムオシレーション

受精時に観察されるカルシウムオシレーションの排卵後の時間経過を示したのが図3である。上の図が排卵後2時間、つまり新鮮卵ということになる。通常受精もこの時間までは起こっているタイミングである。一方、下の図は同様に排卵後8時間、つまり加齢卵のものである。二つのカルシウムオシレーションを比較すると、そのパターンに大きな違いがあることがわかる。カルシウムオシレーションの加齢による変化を Frequency についてまとめると、卵の加齢に伴い Frequency は増加していくことがわかる。このことはマウス

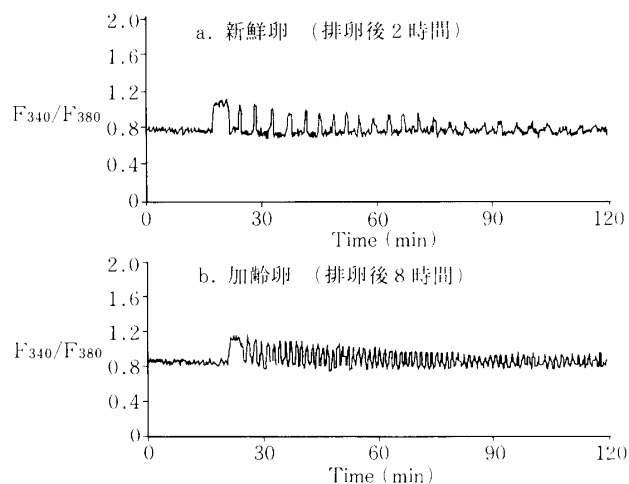


図3 マウス新鮮卵 (a) 及び加齢卵 (b) における受精時の細胞内カルシウム濃度変動

卵の加齢に伴い細胞内のカルシウムハンドリングに大きな変化が生じている可能性を示唆するものである。

2. 高細胞外カルシウム負荷時のカルシウムオシレーション

加齢に伴う細胞内カルシウムハンドリングの変化を検討するために細胞外に高カルシウムを負荷した。新鮮卵ではカルシウムオシレーションの Frequency が増加する。この現象は加齢卵でも観察される。しかし、一つ一つのスパイクの幅を比

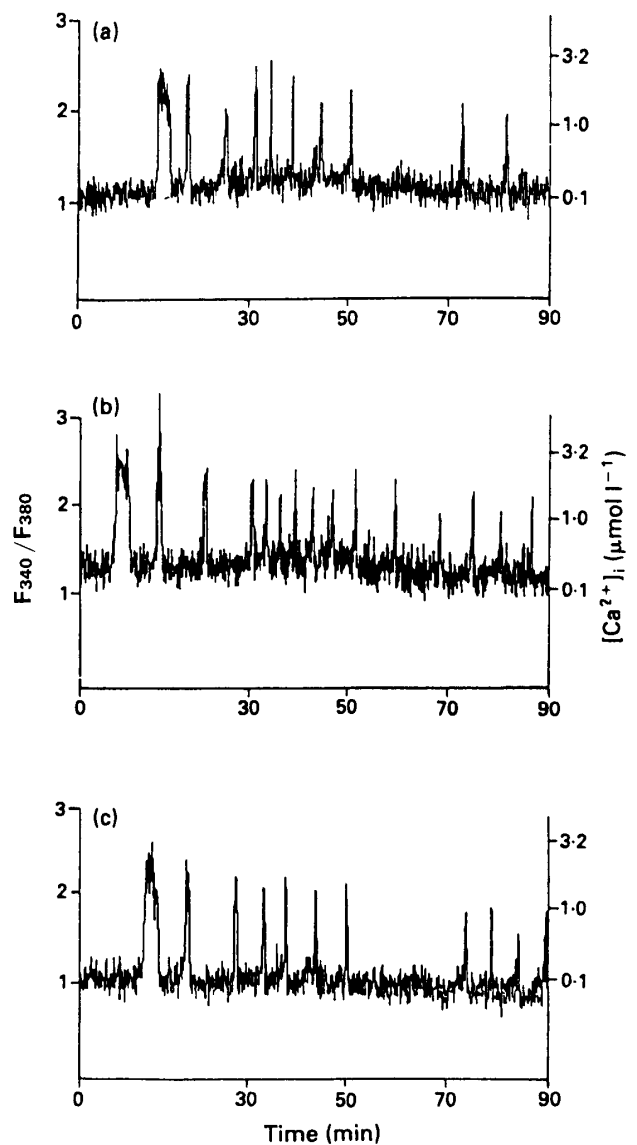


図4 カルシウムチャンネルアンタゴニストの卵細胞質内カルシウムの変動 (a) (b) 10 μmol verapamil/l, (c) 30 μmol nifedipine/l

較すると、加齢卵では徐々に延長していきカルシウムオシレーションが崩壊していくことがわかる。

3. カルシウムオシレーションとカルシウムチャンネルアンタゴニストの関係

図4はカルシウムチャンネルアンタゴニストの verapamil, nifedipine をそれぞれ50分から70分の間細胞外液に加えて観察したものである。カルシウムチャンネルアンタゴニストにより細胞外からのカルシウム流入が阻害されカルシウムオシレーションが消失している。

4. 精子, 卵子結合の細胞内シグナル伝達のメカニズム

カルシウムオシレーションのメカニズムについては、二つの有力な説がある。一つは精子レセプター説で卵細胞膜表面上のレセプターに精子が結合し、この刺激が小胞体の IP3レセプターに結合してカルシウム放出を起こすというものである。二つめは精子細胞質内の卵活性化因子説であるが、これは精子、卵細胞間の膜融合により精子の細胞質が卵細胞内に流入し、これによって、小胞体からのカルシウム放出が起こるといものである。

最近では膜の融合を介さない精子の細胞質内注入によってもカルシウムオシレーションが起こることから、この説が有力となっている。

5. 表層顆粒の開口分泌及び減数分裂再開のメカニズム

図5は受精時の細胞内カルシウム濃度上昇に

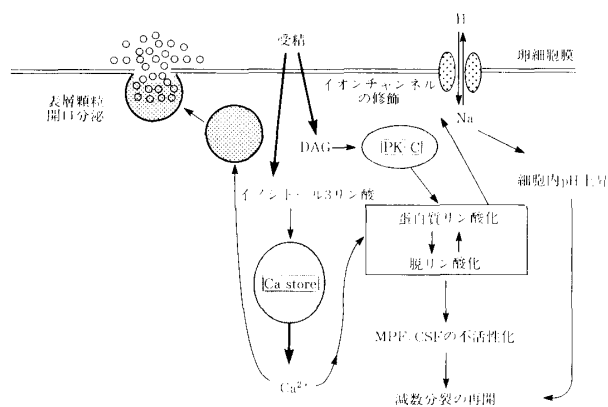


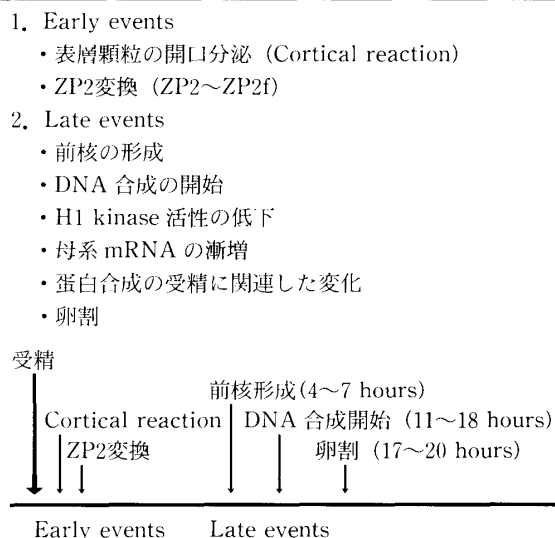
図5 表層顆粒開口分泌と減数分裂再開メカニズム

よって引き起こされる、表層顆粒の開口分泌、減数分裂の再開のメカニズムを示したものである。受精時にはおそらくフォスホライペーシス c を介して細胞膜上のフォスファチジルイノシトール 2リン酸から、イノシトール 3リン酸や、ジアシルグリセロールが作られる。この時作られたイノシトール 3リン酸は、細胞内カルシウムストアよりカルシウムを放出する。これによる細胞内カルシウム濃度上昇により表層顆粒の開口分泌が起こる。また、ジアシルグリセロールはプロテインカイネシス c を動かし、これは細胞内カルシウムの上昇と共に、減数分裂を停止させていた Maturation-Promoting Factor, Cytostatic Factor を不活性化させ、減数分裂を再開させる。

6. 卵細胞の発育における細胞内カルシウム濃度上昇の役割

受精に伴う細胞内カルシウム濃度上昇の役割は、大まかに細胞内カルシウム濃度上昇後数分単位で起こる Early events と、数時間単位で起こる Late events がある (表3)。Early events は表層顆粒の開口分泌、そして透明帯上での ZP2 から ZP2f への変換など多精子受精の防御に関わる。Late events は第2減数分裂再開に伴う前核の形成、DNA 合成の開始など代謝的賦活過程に関わる。このように、受精に伴うカルシウム変動はま

表3 マウス卵受精後の細胞内カルシウム濃度変動の役割



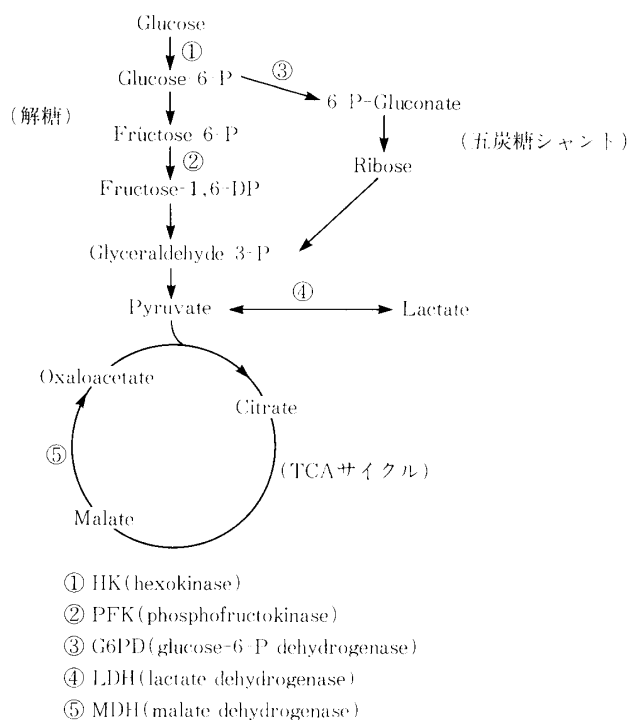


図6 糖代謝路と主要酵素

さに dramatic である。

受精に伴う卵細胞の energy 代謝

1. 糖代謝

卵細胞も受精に伴い細胞分裂を繰り返しながら発育するために、いくつかの energy 代謝を経なければならぬ。

そこで卵細胞内で行われている糖代謝を解糖系の酵素とそれぞれの glucose の変化との関係で観察した。

糖代謝と各種酵素の作用部位を図示したのが図6である。

2. 各種酵素の変化

受精に伴う glucose 代謝に関与する酵素の変化をまとめると、受精卵の発育により hexokinase は上昇するが、glucose-6 phosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase はむしろ低下し、malate dehydrogenase は余り変化しない所見がみられた。

3. glucose の取り込み

これらの酵素の出現により胚の発育につれて glucose, deoxyglucose, deoxyglucose 6 phosphate の取り込みが増加してくることがわかる。

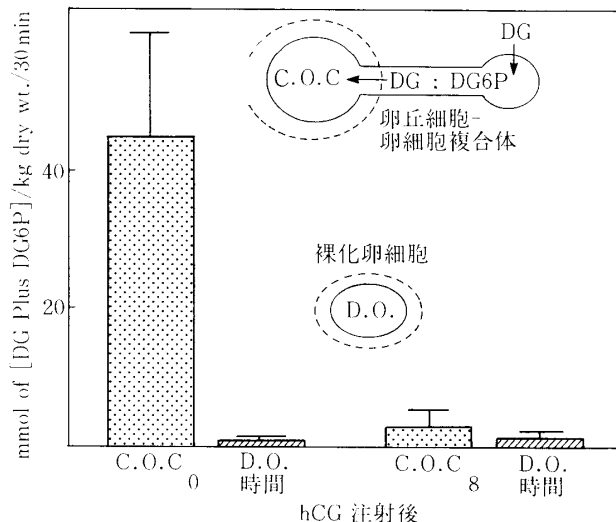


図7 卵丘細胞-卵細胞複合体はギャップジャンクションを通して DG と DG6P を増加させる

卵の glucose の取り込みの仕方についてみると、卵丘細胞と卵細胞の複合体である cumulus-oocyte complex ではギャップジャンクションを通して deoxyglucose 及び deoxyglucose 6 phosphate が増加するのに比して、これらの複合体を除去したいわゆる裸化卵子はこれらの取り込みがほとんどない。このことから卵の発育にも複合体が重要な働きをしているといえる (図7)。

4. 未熟卵胞の培養と glucose 代謝

未熟な卵胞を体外で培養し、成熟させることは臨床極めて重要な研究課題である。

そこで3週齢の未熟マウスの卵巣内卵胞を採取し、50 μ l の微小培養液にて培養し、glucose 消費量を検討した。卵胞の直径が200 μ m を超えると有意に増加し、pure FSH を添加することによりさらに増強された。

5. FSH receptor

RT-PCR 法にて cDNA を作製増幅し、電気泳動にて FSH receptor の mRNA の発現を検討した。卵胞の直径が200 μ m 以上になると、出現することがわかった。このことは卵胞が一定の大きさに発育すると FSH に対する receptor が発現し、FSH 依存性の卵胞が発育することを意味し、このためにも glucose 代謝が重要な働きをもっていることを示している。

6. まとめ

以上のように卵細胞は発達分裂を繰り返しながら energy 代謝を変えて行っていることがわかる。

卵管特異糖タンパク質

1. 受精と卵管分泌液

哺乳動物では、卵管内で卵子と精子が出会い受精が成立する。卵管は、受精が起こる場所として知られていたが、今まで単に配偶子の通路以上の立場は与えられていなかった。

これは卵管を介さない体外受精などによる妊娠が可能となったことにより、その傾向が強くなってきた。

ところが、ハムスターの卵透明帯の SDS 電気泳動像では、排卵後卵管内に取り込まれた卵透明帯には従来より見出されていた ZP1, ZP2, ZP3 の三つの成分以外にも、平均分子量が約200K dalton の卵巣内の卵透明帯には存在しない糖タンパク質が卵管より付加されることを、及川らが発見し、この物質を ZP0 と名付けられた。

2. 卵管分泌性特異糖タンパク質のモノクローナル抗体

卵管より粗精製した透明帯修飾活性を有する分画を、免疫したマウスから作製したモノクローナル抗体を用いると、この抗体は、排卵後卵管内より回収した透明帯にのみ特異的に反応することが判明した。

さらにこのモノクローナル抗体は濃度依存性にハムスターの体外受精を阻害した(図8)。この結果は、多くの哺乳動物に普遍的に同定されている“卵管特異糖タンパク質”と総称される物質の生殖過程における関与の可能性を示唆した報告として注目されるようになった(表4)。

3. cDNA 塩基配列

1980年代半ば頃より、ヒトを含めた種々の哺乳動物は、卵管液中に分泌される特異糖タンパク質が、卵を修飾することが相次いで報告され、生殖過程に重要な生理活性を示す物質である可能性が推定されてきた。

これらの分子のうち、Verhage は1991年、ヒヒの卵管特異糖タンパク質の部分 cDNA の塩基配

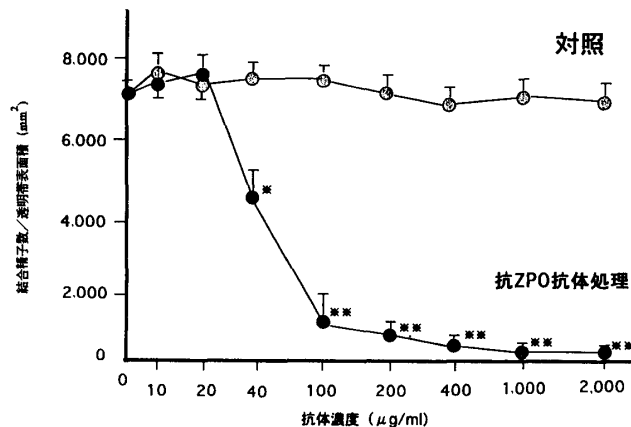


図8 抗ZP0抗体の精子・透明帯結合に与える影響 (平均±SD, * p < 0.05, ** p < 0.01)

表4 哺乳類卵管由来卵修飾活性をもつ糖蛋白質

動物種	報告者	掲載誌	(発表年)
ウサギ	Shapiro et al.	J Reprod Fertil	(1974)
ハムスター	Fox & Shivers	Fertil Steril	(1975)
	Araki et al.	J Reprod Immunol	(1987)
	Leveille et al.	Biol Reprod	(1987)
マウス	Oikawa et al.	Gamete Res	(1988)
	Kapur & Johnson	Dev Biol	(1985)
ブタ	Brown & Cheng	J Embryol Exp Morph	(1986)
	Hedrick et al.	J Exp Zool	(1987)
ヒツジ	Sutton et al.	J Reprod Fertil	(1984)
	Gandolfi et al.	Development	(1989)
ヒヒ	Boice et al.	Biol Reprod	(1986)
ウシ	Wegner & Killian	Mol Reprod Dev	(1991)

列を報告した。そこで、まず、このヒヒ卵管特異糖タンパク質のハムスターにおけるホモログ分子、並びに実験動物として遺伝子工学的に大きな利点をもつマウスにおけるホモログ分子の同定を試みた。

ハムスター及びマウスのヒヒ卵管特異糖タンパク質のホモログ分子の cDNA クローニングにより、推定されたアミノ酸配列を決定した。

N 末端側には、精製した ZP0 より決定した ZP0 の N 末端のアミノ酸配列と完全に一致する配列を確認した。

また、ハムスター・マウスの同分子はその C 末端側にセリン/スレオニンを豊富に含む種特異的

な繰り返し配列の存在が明らかになった。

4. ノザンプロット解析

この cDNA をプローブに用いてハムスター各臓器に対するノザンプロット解析を試みたところ、卵管にのみ単一のバンドが認められた。

5. 種々の哺乳動物の卵管特異糖タンパク質の構造の比較

このハムスター及びマウス卵管特異糖タンパク質の一次構造を、最近相次いで報告されたウシ、ヒト、ヒヒの卵管特異糖タンパク質の構造と比較すると、その N 末端側は各種間でかなり高い保存性を示している。しかし、C 末端側は前述した繰り返し構造を含めて種特異的な構造を認めた (図 9)。

6. in situ hybridization

この分子の遺伝子発現をハムスターを用い、in situ hybridization 法で検討した。メッセージは、通常の性周期では estrous 期に最も多量の発現を認め、di-estrous の day 1 に最も減少するという周期性の変化を認めた。

個体発生では性成熟の完成する 28 日齢までに、ほぼ成熟個体と同様のメッセージの発現を認めた。

estrogen 欠乏状態を作成するためには、両側卵

巣摘出を行えばよいが、卵管もこの際障害を受けたり感染したりするので、GnRH アナログを投与して、LH, FSH の低下を来し、それにより estrogen 欠乏状態を作成した。GnRH アナログ処理により、有意なメッセージ量の減少を認めた。

このように処理した動物に estrogen を補充すると、その遺伝子発現を誘導できることになり、ハムスターにおける卵管特異糖タンパク質の発現は estrogen 依存性であることが示唆された。progesterone の負荷は遺伝子発現には弱い抑制効果を示した。

7. 卵管特異糖タンパク質

以上の結果を含め、哺乳動物に広く存在する卵管特異糖タンパク質の特徴をまとめるとヒトを含めた多くの哺乳動物に存在していること、比較的高分子であること、エストロゲンに依存性が高いこと、卵透明帯に結合していること、精子膜表面に結合することを、モノクローナル抗体により受精が阻止されることなどである。

これらの基礎データを基に、プロモーター領域の解析、さらに in vivo における活性解明のために、現在私達は同分子欠損マウス (ノックアウトマウス) の作製を試みているところである。

8. マストミス

国立予防衛生研究部よりいただいたアフリカ産の小型ゲッ歯類であるマストミスは胃癌が自然に発生することより癌に関する研究で広く用いられている。しかし、自然の交尾や子宮内への精子注入による人工受精でも受精卵を得ることができるのに、体外では受精できないことが知られている。このことは卵管特異糖タンパク質の卵及び精子に与える影響によるものと推定され、現在研究続行中である。

この意味でも、この動物は今後の「受精における卵管の役割」の研究によりモデルといえる。

顕微授精による受精

1. 顕微授精の分類

普通の体外受精により受精し得ない場合には、顕微鏡下で操作して受精の補助的な役割を果たす方法を顕微授精と総称する。

この方法には大きく分けると三つに分類するこ

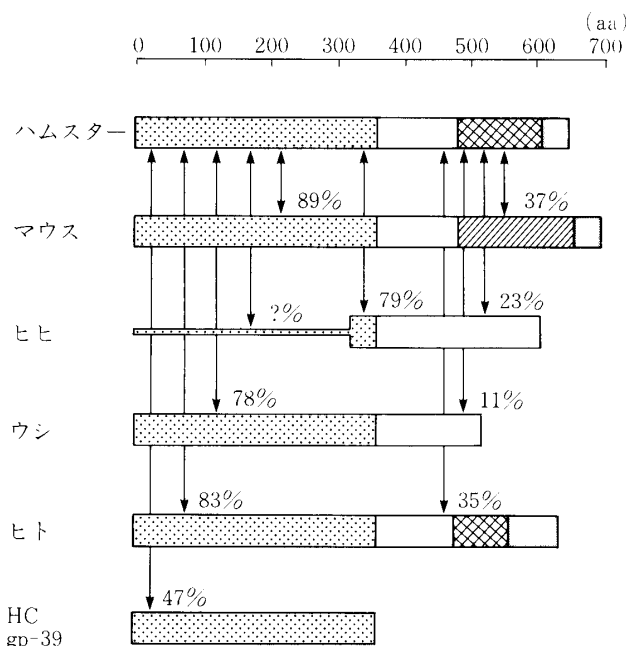


図 9 各動物種間の卵管特異糖タンパク質のコアタンパク質構造の相同性比較

とができる。

1) 透明帯を機械的に開口する方法でこれは自然に開口された部より精子が侵入して受精するものである。

2) 卵細胞膜を取り巻く囲卵腔内に精子を注入することにより受精させるもので、囲卵腔内精子注入法 (SUZI) といわれる。

3) 1個の精子を細胞質内に注入させる方法で細胞質内精子注入法 (ICSI) といわれる。

近年、運動性不良の精子を用いて行えうる後者二つの方法が注目されている。

2. 顕微授精による基礎的・臨床的研究

顕微授精法による基礎的研究は、表5のごとくすでに1962年ウニによってはじめられたが、その後、多くの哺乳動物にまで及んだ。

近年では臨床に広く応用され、ヒトの精巣内精子や円形精子細胞などにも受精や妊娠に成功するに至った。しかし、ヒト円形精子細胞の臨床応用にはいまだ安全性が充分確認されていないので慎重であるべきである (表6)。

3. ハムスターテストと mmSPA 法

精子の受精能を検査する方法として、いわゆるハムスターテスト sperm penetration assay (SPA) が広く用いられている。しかし、運動能力の乏しい精子の受精能はこれでは検査できない。そこでハムスターの囲卵腔内に直接精子を注入する方法を考案した (図10)。

ハムスターテスト (SPA) の値を縦軸に表示し、これを改良した私共の方法、modified micro sperm penetration assay (mmSPA) を横軸に表示すると、卵子への侵入率が mmSPA の方がはるかに増加する。これは従来あきらめていたものでも顕微授精を用いることにより精子が受精能を有していることを示している。

4. マウスの精巣及び精巣上体より採取した精子の受精能

マウスの精巣及び精巣上体より採取した精子を通常の体外受精法と囲卵腔内精子注入法とによる受精率を比較すると、明らかに精巣上体頭部・体部の精子でも顕微授精によると受精能力を有していることがわかる。

表5 顕微授精による受精の研究 (動物実験)

報告年	動物種	方法	成績	報告者
1962	ウニ	ICSI	脱凝縮	Hiramoto
1966	カエル	ICSI	前核期	Graham
1969	マウス	SUZI	2細胞期	Lin
1972	ヒツジ	SUZI		Moore
1976	ハムスター	ICSI	前核期	Uehara et al.
1982	マウス	PZD	生 仔	Thadani
1983	マウス	ICSI	胞胚期	Markert
1986	マウス	PZD	生 仔	Gordon et al.
1988	ウサギ	ICSI	生 仔	Hosoi et al.
1988	マウス	SUZI	生 仔	Mann
1988	ウシ	ICSI	生 仔	Goto et al.
1991	マウス	SUZI	受精せず ¹⁾	Lacham et al.
1993	ハムスター	ICSI	2細胞期 ²⁾	Ogura et al.
1994	マウス	SUZI	2~8細胞期 ³⁾	Lacham et al.
1994	マウス	SUZI	生 仔 ³⁾	Ogura et al.
1995	マウス	ICSI	生 仔	Kimura et al.

¹⁾精巣内精子 ²⁾円形精子細胞 ³⁾円形精子細胞—電氣的融合

表6 顕微授精による受精の研究 (臨床的研究)

報告年	方法	成績	報告者
1985	SUZI	4細胞期	Metta et al.
1988	ICSI	前核期	Lanzendorf et al.
1988	SUZI	妊娠—生児	Ng et al.
1989	PZD	生 児	Malter et al.
1990	SUZI	生 児	Fisher et al.
1992	ICSI	生 児	Palermo et al.
1993	ICSI	生 児	Steirteghem et al.
1993	ICSI	4細胞期 ¹⁾	Schoysman et al.
1995	ICSI	妊娠 ²⁾	Sofkitis et al.

¹⁾精巣内精子 ²⁾円形精子細胞

5. ヒト精巣内及び精巣上体精子の受精能

ヒトの精巣内及び精巣上体内精子及び射出精子をハムスターの卵を用い、SUZI と ICSI で受精率を比較すると、ICSI の方が高い受精率を獲得することができる。

6. 不妊症患者で運動精子と不動精子の比較

不妊症患者で全然運動性のない精子と運動性を有している精子とで、それぞれ細胞質内に注入し

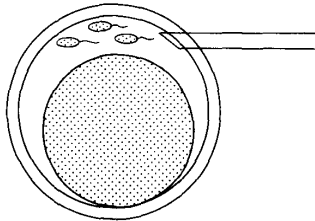
ハムスターの卵

- ・ PMS-hCG注射
- ・ 卵子を回収
- ・ ヒアルロニダーゼで卵丘細胞を除去
- ・ 透明帯正常の卵子を集める

ヒトの精子

- ・ 精液を採取
- ・ 精子を回収
- ・ 培養液とて培養

精子をハムスター卵卵腔内に注入



37°C, 5% CO₂ in air 下で4時間培養

図10 modified micro sperm penetration assay (mmSPA)

て受精率とその後の分割率を検討すると、運動性を全く有していない精子でも40%の受精率と25%の分割率を有していることがわかった。

7. 精子の顕微授精を用いた染色体解析

精子は頭部に凝縮したDNAをもっているために、in vitro系で受精という型をとらないと染色体構築を解析することは不可能である。重度の乏精子症や運動能を有していない精子をハムスターの卵細胞質内へ直接に精子を注入してはじめてこれら精子の染色体解析が可能になった。運動性のない精子でも顕微授精を用いて染色体分析が明らかになると共に、どの段階の精子で妊孕力があるかも推察することが可能になった。

8. XO マウス

XO, XX マウスの交尾74時間目に開腹し、胎仔の発育状況を調べると、XO マウスではXY, XX も発育が極めて遅れ、平均細胞数も有意に少ないことがわかった。

このことは母体由来の遺伝子量が半減し、すべての核型の初期胚の発育に影響すると考えられ、受精やその後の胚発育のモデルとしてXO マウスは興味ある動物である。

9. まとめ

顕微授精のうち ICSI は精子の未熟な段階でも

妊娠・出産が報告され、最近では睾丸内の第2精母細胞でも受精が可能であるとの報告もあり、この技術は今後の臨床的研究へのかなりの可能性を示すようになった。このように顕微授精法の確立により、新しい観点より受精の機構をより詳細に明らかになってきている。

生殖医療への応用

以上、受精に関する基礎的・臨床的な研究について述べたが、新しい生殖医療への応用の現況について述べてみたい。

1. 不妊症患者の精神心理

不妊症患者は子供を生めないという身体的劣等感から、「まだできないのか」「孫の顔を見たい」など家族内や外部からの言動により大きなストレスが負荷されている。不妊期間が4年を過ぎると家族外の言動が大きなストレスとなることを示した。

これを体外受精のために来院している患者のみについて State-trait anxiety inventory (STAI) の状態不安得点で評価すると、コントロールに比して各年齢層とも精神的に不安定な状態が持続していることを示している。

このことを不妊期間別に体外受精患者の不安得点でみると、不妊期間が増加するにつれてやや得点が高くなる傾向にあった。

不妊症患者の感情の動きに対し、Sue Craig は結婚年数がたつにつれて変化することを示し、結婚10年たって、一見落ちついているようにみえても「いまだ、不妊の悩みは完全に消えない」と述べているほどである。

2. 日本産科婦人科学会の取り組み

昭和58年(1983年)、日本産科婦人科学会は体外受精・胚移植 (IVF-ET) に関する見解を公表し、事実上その実施を許可した。

昭和61年 (1986年)、登録報告制を義務化した。これに基づきわが国の新しい生殖医療技術の施行状況が把握できることになった。最近では年間に約27,000周期に及ぶ位に施行されており、また顕微授精が著しく増加しているのが特徴になっている (図11)。

これと全体の治療周期の割合でみると、顕微授

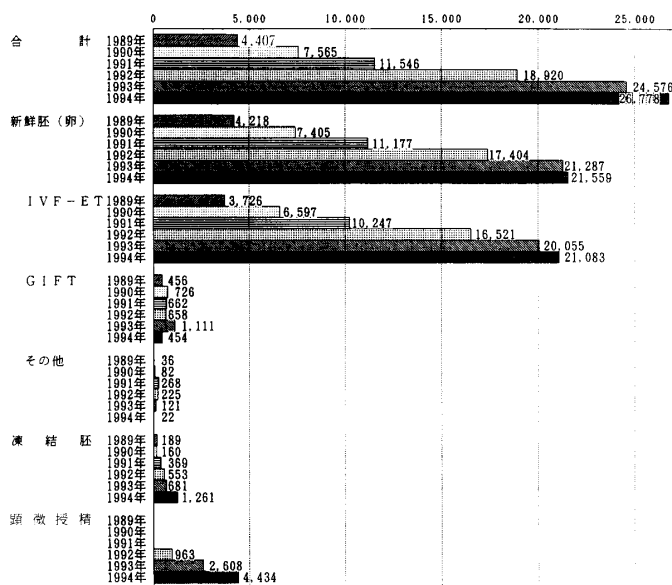


図11 最近のわが国における生殖補助医療技術による治療周期総数の推移

精が全体の16.6%にもみられるようになり、着実に年々上昇してきている(図12)。

生産分娩数でみると、年間3,000人近くが、これらの新しい生殖の補助技術により出産しており、そのうち1994年では顕微授精による分娩例が年間300例を超えてきている。

とくに新鮮卵を用いた例のみでみると、実にその95%がIVF-ETで占められており、配偶子卵管内移植(GIFT)、ZIFTなど少ないようである。

3. 山形大学の取り組み

私達もIVF-ET, GIFTをはじめ、新しい生殖医療技術の安全性の検討を行い、その臨床応用に努めてきた。1ml中数個しかみられない乏精子症患者より採取した精子を卵胞内に注入して正常児を出産した児を示した。

無精子症で妊娠の可能性が全くないといわれてきた患者の精巣上体精子を採取し顕微授精により正常の児を出産したときの所見も示した。

このように無精子症でも症例により妊娠・出産する可能性がでてきている。

4. 胚凍結

近年、減数手術と共に多胎がクローズアップされてきた。多胎の予防には排卵誘発時のgonadotropin投与量や投与方法も重要であるが、

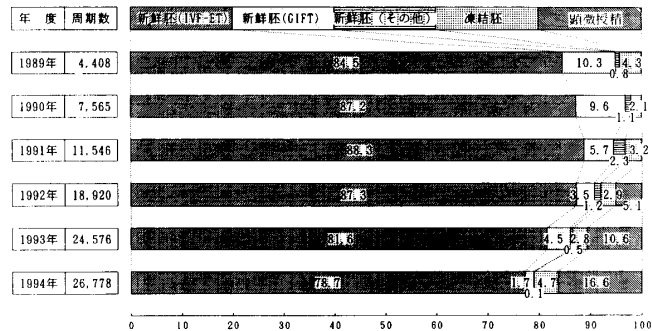


図12 最近のわが国における生殖補助医療技術による治療周期総数の治療方法別割合の推移

体外受精の際に移植胚を少なくすることが大切である。そのために余剰胚の凍結保存法が重要な課題である。今まで行われてきたslow-cooling法は比較的安全であるが、時間がかかるために余り普及されておらない憾みがあった。そこで私達は急速凍結法を開発し、これにより出産した例を認めた。今後多くの施設で簡易法が検討されるかと思われる。

5. まとめ

以上、新しい生殖医療に対する補助的技術法について解説し、臨床応用の現況について述べた。

おわりに

以上、私達の研究をもとに卵胞の発育から最近著しく進歩発展してきた生殖医療の現況など受精機構との関連で述べてきた。このような妊孕性現象の初期の段階を少しのぞいてみただけでも、自然に営まれる妊孕現象の神秘性には驚かざるを得ない。

今後も微力ながら教室員と共にこの問題を追求し、倫理の面をふまえながら臨床医学への発展に寄与したい。

謝 辞

本学会に特別講演の機会を与えて下さいました水口弘司学会長、また座長の労をおとり下さいました恩師鈴木雅洲名誉会員に心よりお礼申し上げます。この研究にご指導・ご協力下さいました下記の先生方および協同研究者の皆様へに深甚なる謝意を捧げます。

研究協力者

土居勝彦教授(山形大学・生理学)、仙道富士郎教授(同・免疫・寄生虫学)、石川喜一教授(同・生化学)、白井敏雄

教授 (同・解剖学), 外崎 昭教授 (同・解剖学), 遠藤 晃教授 (同・衛生学), 渡辺 皓教授 (同・解剖学), 中田 瑛浩教授 (同・泌尿器科学), 千葉ひろ子教授 (同・看護学), 森岡由起子助教授 (同・看護学), 加藤精彦教授 (横浜市立大学), 前原澄子教授 (千葉大学)

協同研究者

(教室員)

齋藤英和, 小宮雄一, 平山寿雄, 荒木慶彦, 手塚尚広, 酒井伸嘉, 中原健次, 椎名有二, 木原香織, 小宮ひろみ, 齋藤隆和, 伊藤真理子, 赤塚和彦, 高橋一広, 太田信彦, 野原 理, 鈴木吉也, 鈴木弘二, 五十嵐秀雄, 大内久子, 小島原敬信ら教室員一同

(教室同門会山王会)

千村哲朗, 川越慎之助, 小田隆晴, 金杉 浩, 齋藤憲康, 大野 勉, 高橋秀幸, 長谷川剛志, 藤森克彦, 佐藤文彦, 小川哲司, 高木潤一, 金子尚仁, 木村和彦, 酒井安子, 小池教与, 阪西通夫ら山王会員一同

(機能性ペプチド研究所)

及川胤昭, 千代 豊, 星 宏良

(東京大学薬学部) 倉田祥一郎

(国立予防衛生研究所) 小倉淳郎, 内貴正治

(日本ロシユ研究所) 真貝洋一

参考文献

1. 広井正彦. カレントレビュー-生殖. a. 受精現象. 日産婦誌 1993; 45: 871-880
2. 生殖・内分泌委員会報告. 平成5年度生殖医学登録報告 (第5報・続報): 平成4年 (1992年) 分の臨床実施成績-国際統計報告書. 日産婦誌 1995; 47: 577-592
3. 生殖・内分泌委員会報告. 平成6年度生殖医学登録報告 (第6報): 平成5年 (1993年) 分の臨床実施成績-国際統計報告書. 日産婦誌 1995; 47: 1199-1218
4. Saito H, Hiroi M. Correlation between the follicular gonadotropin inhibitor and the maturity of the ovum-corona-cumulus complex. *Fertility Sterility* 1986; 46: 66-72
5. Hirayama T, Hasegawa T, Hiroi M. The measurement of hyaluronidase activity in human spermatozoa by substrate slide assay and its clinical application. *Fertil Steril* 1989; 51: 330-334
6. Saito N, Kanasugi H, Kimura K, Suzuki T, Komiya Y, Ogawa H, Hiroi M. Estrogen-binding protein in blood and follicular fluid, and its biochemical properties in human females. *Gynecol Obstet Invest* 1989; 28: 87-93
7. Saito H, Sato F, Hirayama T, Saito T, Kawagoe S, Hiroi M. Factors promoting embryo implantation in in vitro fertilization and embryo transfer. *Horm Res* 1992; 37: 64-68
8. Saito H, Koike K, Saito T, Nohara, M, Kawagoe S, Hiroi M. Aging changes in the alignment of chromosomes after human chorionic gonadotropin stimulation may be a possible cause of decreased fertility in mice. *Horm Res* 1993; 39: 169-171
9. Ono T, Komiya Y, Kawagoe S, Hiroi M. Effect of aromatase inhibitor in human follicular fluid on DNA synthesis of granulosa cells, theca cells, and follicles. *Gynecol Obstet Invest* 1993; 35: 169-171
10. Saito H, Hirayama T, Koike K, Saito T, Nohara M, Hiroi M. Cumulus mass maintains embryo quality. *Fertil Steril* 1994; 62: 555-558
11. Shiina Y, Kaneda M, Matsuyama K, Tanaka K, Hiroi M, Doi K. Role of the extracellular Ca^{2+} on the intracellular Ca^{2+} changes in fertilized and activated mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 1993; 97: 143-150
12. Koike K, Watanabe H, Hiroi M, Tonosaki A. Gap junction of stratum granulosum cells of mouse follicles: Immunohistochemistry and electron microscopy. *Electron Microsc* 1993; 42: 94-106
13. Saito T, Hiroi M, Kato T. Development of glucose utilization studies in single oocytes and preimplantation embryos from mice. *Biol Reprod* 1994; 50: 266-270
14. Araki Y, Kurata S, Oikawa T, Yamashita T, Hiroi M, Naiki M, Sendo F. A monoclonal antibody reacting with the zona pellucida of the oviductal egg but not with that of the ovarian egg of the golden hamster. *J Reprod Immunol* 1987; 11: 193-208
15. Sakai Y, Araki Y, Yamashita T, Kurata S, Oikawa T, Hiroi M, Sendo F. Inhibition of in vitro fertilization by a monoclonal antibody reacting with the zona pellucida of the oviductal egg but not with that of the ovarian egg of the golden hamster. *J Reprod Immunol* 1988; 14: 177-189
16. Takagi J, Dobashi M, Araki Y, Imai Y, Hiroi M, Tonosaka A, Sendo F. The development of porcine zona pellucida using monoclonal antibodies: 11. Electron microscopy. *Biol Reprod* 1989; 40: 1103-1108
17. Banzai M, Omoe K, Ishikawa H, Endo A. Viability, development and incidence of chromosome anomalies of preimplantation embryo from XO mice. *Cytogenet Cell Genet* 1995; 70: 273-277
18. Suzuki K, Sendai Y, Onuma T, Hoshi H, Hiroi M, Araki Y. Molecular characterization of a hamster oviduct-specific glycoprotein. *Biol Reprod* 1995; 53: 345-354

Synopsis

Fertilization is the process including many events such as maturation of egg and sperm, attachment, binding, acrosomal reaction, penetration, fusion, cortical reaction, zona reaction and nuclear fusion of both gamete, whereby individual gametes from the female and male unite to create offspring. Although the reason for mechanism of fertilization is still not clearly understood, this process may accelerate the rate adaptation in evolution. In this special lecture, I would like to present our experimental and clinical results especially concerning with morphological, physiological, biochemical and molecular approach on the mechanism of fertilization.

1. Development and maturation of follicles and oocytes.

It is well known that pituitary FSH, LH control the ovarian function. Follicular development and ovum maturation are also controlled by both pituitary gonadotropins and local factors such as autocrine and paracrine agents. When hMG is injected during 1—6 day of menstrual cycle, several dominant follicles are developed. If hMG is injected after selection of dominant follicles, only one dominant follicle develop in the ovary. When PMS-treated immature rats were injected with immature or mature follicle fluids, rats injected with mature follicular fluid showed strongly suppress in the ovarian weights and numbers of ovulated follicles. Also mature follicle suppress aromatization from androstenedione to estradiol. These findings mean that mature follicular fluid contains inhibitory factors. Apoptosis of granulosa cells and follicular steroids are related to fertilization.

2. Intracellular calcium of oocyte.

Intracellular calcium concentration is known to start to increase in a periodic manner after fertilization in oocytes of mammals. In 65% of tested mouse oocytes, fertilization occurred during 4 hours observation after sperm insemination in vitro. An initial long lasting intracellular calcium concentration was observed and followed by periodic manner. This calcium oscillation is inhibited by calcium blockers such as verpamil and nifedipine, but increased by high concentration of extracellular calcium concentration in the medium. Role of increase of intracellular calcium are understood to prevent polysperm and activate metabolism of oocytes.

3. Glucose metabolism of oocytes.

Mouse embryo utilizes pyruvate as an essential nutrient until the 8-cell stage, and glucose thereafter. We have devised non-radiometric and enzymatic microassay method to measure glucose, deoxyglucose, deoxyglucose 6-phosphate incorporated into individual mouse oocytes and preimplantation embryo. In parallel, the activities of several enzymes of glycolytic pathway were also determined. In this study, glucose metabolism is necessary to develop in fertilized ova with changing activity of enzymes.

4. Molecular bases of ovarian fluid.

The zona pellucida ZP is involved in a number of events in fertilization, all these fertilization events occur in the oviduct. Oviductal glycoprotein 200—240 KD has been indentified from oviductal zona pellucida. Monoclonal antibody of oviductal glycoprotein reacted with ZP of oviductal egg but not with the ovarian egg. Anti-ZPO antibody inhibit to bind sperm to ZP. Sequences in mouse and hamster oviduct specific glycoprotein are estimated, this glycoprotein mRNA was observed in only oviduct by northern blotting method. These molecular gene expression was observed by in situ hybridization in the oviduct of estrous cycle of hamster.

5. Microinsemination of sperm.

Microinsemination of sperm into oocyte is widely used in clinical medicine. Sperm penetration assay (hamster test) is useful method to estimate fertilization capacity of sperm. But immotile sperm cannot estimate it. So modified micro sperm penetration assay was established to estimate fertilization capacity of sperm by using micro-manipulator. Subzonal sperm injection (SUZI) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) promotes fertilization and cleavage rate in immotile sperm.

6. Clinical application.

Infertile couples are willing to get their babies, but they are stressfully influenced and emotionally unstable. Assisted reproductive technology (ART) are widely used and many children were born in Japan by these technique. However mechanism of fertilization is not still completely understood yet. So we would like to continue these works with our staffs continuously.