

★P-361 多分化能を有する胚性幹細胞 (ES) の新たな樹立方法の確立

茨城・石渡産婦人科病院¹, 聖マリアンナ医大², 慈恵医大解剖学³
 岡根夏美¹, 石渡 勇¹, 時枝由布子¹, 石渡千恵子¹, 木口一成², 石川 博³

【目的】多分化能を有する胚性幹細胞 (ES) の新たな樹立方法の確立【方法】 ddY 系マウス2細胞期胚をヒト子宮頸部扁平上皮癌無血清細胞株 SKG-II-SF の培養上清から部分精製した胎児成長因子 (ETFs) を添加した10%FCS 含有 α MEM 溶液で培養し, 平坦型に増殖している3胚葉胚 (種々の形態を示す細胞の混在) から多層増殖する小型円形細胞を colonial cloning した。クローニングした細胞を白血球細胞抑制因子 (LIF) 10 ng/ml および ETFs を添加した10%FCS 含有 Ham's F12培養液で静置培養した。培養系は0.25%trypsin にて1:2の希釈で継代培養した。培養系の細胞生物学的性状(形態, 増殖能, 染色体, 異種移植, 細胞分化誘導) について検討した。また, 内細胞塊から樹立した ES 株についても検討した。【成績】2つの方法で樹立した ES 株は, ともに円形類円形の細胞が密な単層培養シートを形成した。細胞は培養シャーレ底面に一杯になると容易に多層増殖した。倍化時間は約52時間であった。染色体は2倍体で核型は正常マウス型であった。ヌードマウス皮下に移植すると三胚葉性の奇形腫を形成した。ES 細胞が産生する腫瘍マーカーは TPA であった。【結論】ES 細胞株の樹立としての常用法は胚盤胞内細胞塊から細胞を採取し, LIF 添加培養液で培養し樹立するもので, 成功率は極めて低い。今回我々は新たな方法を開発し, ES 細胞の樹立に成功した。内細胞塊から樹立した株と細胞生物学的な差異は認められなかった。

P-362 精子ミトコンドリア活性と受精能との関連性

山梨医大

笠井 剛, 小川恵吾, 水野薫子, 永井聖一郎, 内田雄三, 大田昌治, 藤江道子, 星 和彦

【目的】蛍光色素 JC-1 を用いて, 精子のミトコンドリア膜電位と, 精子自動分析装置 (CASA) で分析しうる運動性パラメーター及び体外受精・胚移植 (IVF-ET) における受精率との関連を検討した。【方法】対象は IVF-ET を施行した26例で, 用いた精子を Informed consent を得た後, 実験に供した。精液を HEPES-HTF にて洗浄後, 精子濃度 $5 \sim 10 \times 10^6$ /ml の浮遊液を作成し, 最終濃度 $2 \mu\text{M}$ の JC-1 を加え遮光し, 大気圧下 37°C で30分培養した後, FACSCalibur を用いて分析した。蛍光パターンからミトコンドリアの膜電位を分析し高膜電位優位のを A 群 ($n=16$), 低膜電位優位のを B 群 ($n=10$) として分類した。同時に CASA で運動率, 前進運動率, average path velocity (VAP), straight line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), %hyperactivated 精子 (%HA) を測定した。【成績】運動率 (%) は, A 群: 90.8 ± 4.8 (Mean \pm SD), B 群: 68.3 ± 23.6 , 前進運動率 (%) は, A 群: 44.8 ± 13.2 , B 群: 48.0 ± 29.5 , VAP ($\mu\text{m/s}$) は A 群: 65.8 ± 15.5 , B 群: 48.7 ± 3.79 , VSL ($\mu\text{m/s}$) は, A 群: 49.6 ± 14.1 , B 群: 40.0 ± 7.72 , VCL ($\mu\text{m/s}$) は, A 群: 120.6 ± 29.8 , B 群: 80.1 ± 9.91 , %HA (%) は, A 群: 21.7 ± 10.0 , B 群: 5.0 ± 4.16 で, 受精率 (%) は A 群: 85.3 ± 14.4 , B 群: 37.9 ± 43.8 であった。両群間で運動率, VCL, %HA, 受精率に有意差を認めた ($P < 0.05$)。【結論】精子ミトコンドリア膜電位が高いほど精子の運動性は高くなり, IVF-ET における受精率も高くなることが明らかになった。精子ミトコンドリア膜電位が低い場合, 顕微授精も考慮しなければならず, JC-1 染色による精子のミトコンドリア活性測定法は精子機能検査法として有益であることが示唆された。

P-363 プロゲステロン添加による精子細胞内カルシウムイオン濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の変化と hyperactivation との関係

東京医歯大

ミルハス ムムニレ, 清水康史, 坂田 優, 水口玲子, 麻生武志

【目的】hyperactivation は capacitation の完了によりおこり, 精子の受精能獲得のために必要な変化である。capacitation も acrosome reaction と同様に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化が関係しているといわれている。今回, hyperactivated sperm の比率を測定し, プロゲステロン添加後の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化との関係について検討した。【方法】同意を得た不妊症患者の精液検査時の精子および妊孕性の確認されたドナーの精子49例を対象とした。BWW/HSA5mg/ml にて60分間 swim up し回収した精子, および swim up 後 BWW/HSA30mg/ml にて18時間培養した精子をそれぞれ Computer Assisted Sperm Analyzer (CASA) により解析し, hyperactivated sperm の比率を測定した。CASA は HTM-IVOS を使用し, hyperactivation は Burkman および Mortimer の基準を用いた。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定は, fura-2 を用いプロゲステロン $1 \mu\text{g/ml}$ 添加後の変化を測定した。【成績】18時間培養後の精子について hyperactivated sperm の比率を Burkman の基準の平均値 (6.92%) により二群に分けたところ, プロゲステロン添加による baseline から peak までの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加率は hyperactivated sperm 高値群 ($n=20$) では 348 ± 204 (M \pm S.D.) %, 低値群 ($n=29$) では 275 ± 398 % で高値群で高かった ($p=0.016$)。また, baseline から plateau までの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加率は hyperactivated sperm 高値群 ($n=20$) では 184 ± 153 %, 低値群 ($n=29$) では 95 ± 107 % で高値群で高かった ($p=0.003$)。【結論】プロゲステロンによる精子 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇は in vitro capacitation 後に hyperactivation を多く起こした精子群で大きかった。