

## 透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子受精：透明帯溶解剤の違いが受精に与える影響の検討

東北大学医学部産科学婦人科学教室

星 和彦 齊藤 晃 鈴木 雅洲

福井県立病院産婦人科

林 恵 子

ハワイ大学医学部解剖学・生殖生物学教室

柳 町 隆 造

### Effects of Agents Used for Removal of Zona Pellucida on Human Sperm Penetration into Zona-Free Hamster Egg

Kazuhiko HOSHI, Akira SAITO and Masakuni SUZUKI

*Department of Obstetrics and Gynecology, Tohoku University School of Medicine, Sendai*

Keiko HAYASHI

*Department of Obstetrics and Gynecology, Fukui Kenritsu-Hospital, Fukui*

Ryuzo YANAGIMACHI

*Department of Anatomy and Reproductive Biology, University of Hawaii School of Medicine, Hawaii*

**概要** 透明帯除去ハムスター卵とヒト精子との受精現象は1976年 Yanagimachi et al.によつて発見され、ヒト精子の受精能をスクリーニングするために臨床的にも利用されている。透明帯を除去するには一般に trypsin による処理が行われるが、他の蛋白分解酵素や S-S 還元剤でも溶解除去は可能である。著者らは種々の溶解薬剤を用いて種々の透明帯除去ハムスター卵を作製し、ヒト精子による受精率を trypsin 処理の場合と比較検討した。

透明帯溶解薬剤として 0.1% trypsin, 0.05% pronase, 0.1%  $\alpha$ -chymotrypsin, 300IU/ml Dispase (蛋白分解酵素), 0.05M mercaptoethanol, 0.025M dithiothreitol (DTT) (S-S 還元剤) を用いた。処理時間は 3 分と 20 分である。

1) 3 分間処理して得られた透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子受精率は以下の順であつた：trypsin 処理卵 76.4%, mercaptoethanol 処理卵 75.6%,  $\alpha$ -chymotrypsin 処理卵 64.7%, pronase 処理卵 63%, Dispase 処理卵 61%, DTT 処理卵 25.9%。

2) 20 分間処理の場合：mercaptoethanol 処理卵 83%, trypsin 処理卵 75.5%, Dispase 処理卵 63%, pronase 処理卵 54%,  $\alpha$ -chymotrypsin 処理卵 51%, DTT 処理卵 13%。

3) 3 分間処理と 20 分間処理の場合を各々で比較すると、受精率には両者間で大きな差はみられなかつた。

以上より、ヒト精子と透明帯除去ハムスター卵との *in vitro* 受精実験には trypsin もしくは mercaptoethanol 処理による透明帯除去ハムスター卵を用いるべきと思われた。

**Synopsis** In 1976, Yanagimachi et al. suggested that human sperm were capable of penetrating zona-free hamster eggs. Since that time, this *in vitro* penetration assay has been used to analyze human spermatozoal fertilizing ability.

In the present study, effects of proteinases and S-S reducing agents used for removal of zona pellucida on human sperm penetration into zona-free hamster eggs were investigated. 0.1% trypsin, 0.05% pronase, 0.1%  $\alpha$ -chymotrypsin and 300 IU/ml Dispase were proteinases used for this experiment, and 0.05 M

mercaptoethanol and 0.025 M dithiothreitol (DTT) were S-S reducing agents.

Results obtained were as follows:

1) When hamster eggs were treated for 3 minutes by these agents, percentages of eggs penetrated were 76.4% (trypsin), 75.6% (mercaptoethanol), 64.7% ( $\alpha$ -chymotrypsin), 63% (pronase), 61% (Dispase) and 25.9% (DTT).

2) When hamster eggs were treated for 20 minutes, the figures were 83% (mercaptoethanol), 75.7% (trypsin), 63% (Dispase) 54% (pronase), 51% ( $\alpha$ -chymotrypsin) and 13% (DTT).

3) There was no difference between human sperm penetration rates into zona-free hamster eggs treated for 3 minutes and those treated for 20 minutes.

These results suggest that trypsin and mercaptoethanol were very useful agents for removing zona pellucida of hamster eggs in this in vitro fertilization system.

**Key words:** Zona pellucida • Sperm • Fertilization • Zona-free hamster egg

## 緒言

1976年 Yanagimachi et al.<sup>12)</sup>は透明帯を除去したハムスター卵に先体反応を完了した異種の哺乳類の精子が in vitro で受精できることを発見して報告した。この現象はヒトの精子でもおこり得る。しかも受精能のない精子では受精がおこらないところから男性不妊症のスクリーニング検査として注目を集めており、最近臨床的な検討成績が相次いで発表されている<sup>2)3)6)8)10)11)13)</sup>。

Yanagimachi 原法ではハムスター卵の透明帯は trypsin 処理により溶解除去されるが、この弱酸性の糖蛋白からなる透明帯は他の蛋白分解酵素や薬剤によっても溶かすことが可能である。今回われわれは、trypsin 以外に3種の蛋白分解酵素と2種の S-S 還元剤を用いてハムスター卵透明帯を溶解させ、このようにして作製した透明帯除去卵へのヒト精子受精性を trypsin 処理の場合と比較し、この in vitro 異種間受精実験系を行う際にどの薬剤が最も優れた透明帯溶解剤となり得るかを検討した。

## 研究方法

### 1. 実験方法の概略

蛋白分解酵素あるいは S-S 還元剤処理により透明帯を除去されたハムスター卵とヒト精子との in vitro 受精実験を行い、受精率を調べて trypsin 処理卵と比較した。

実験法の概略は図1に示してある。

### 2. 培養液

受精実験の培養液としては modified Krebs Ringer 液を用い、表1にその組成を示した。以後文中ではこの培養液を modified Biggers, Whitten and Whittingham<sup>4)</sup>液 (mBWW 液) と

呼ぶ。

### 3. 透明帯除去ハムスター卵の作製

体重90~150gの成熟メスゴールデンハムスターを用いた。発情周期の第1日目 (post estrous discharge の認められた日) の午前中に PMS (pregnant mare's serum) 30iu, 第3日目に HCG (human chorionic gonadotropin) 30iu を腹腔中または皮下に注入して過排卵を誘導し、HCG 注射17時間後に開腹して卵管中より採卵した。

とり出した卵を0.1% hyaluronidase を含む mBWW 液で15分間処理して卵丘細胞を除去した。mBWW 液で2回洗浄後、後述する各透明帯溶解剤を含む mBWW 液で3分間あるいは20分

表1 受精実験に用いた培養液(mBWW液)の組成

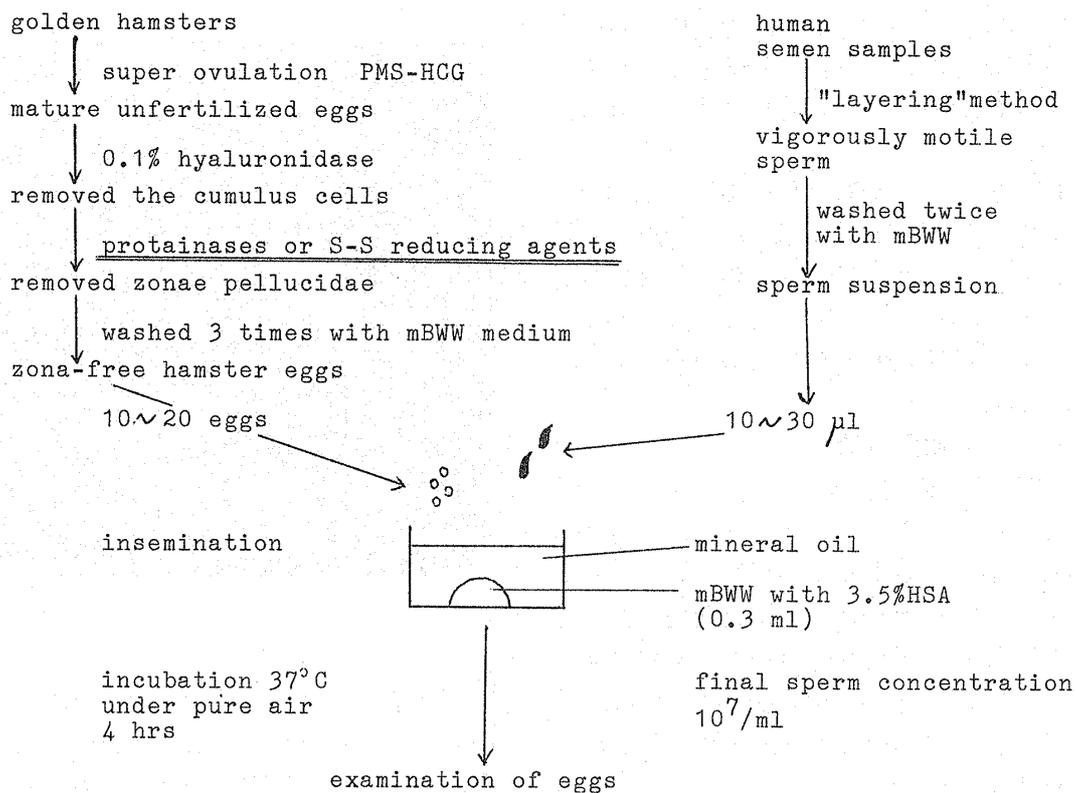
	g/l	mM
NaCl	4.910	84.00
KCl	0.356	4.78
CaCl <sub>2</sub>	0.189	1.71
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.162	1.19
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.294	1.19
NaHCO <sub>3</sub>	3.000	35.71
Na-pyruvate	0.028	0.25
Na-lactate	2.416	21.58 <sup>a</sup>
Glucose	1.000	5.56
Human serum albumin <sup>b</sup>	35.000	...
Antibiotics stock soln. <sup>c</sup>	1.0ml	...
mOsmol	308	

<sup>a</sup> DL-lactic acid, Na-salt (Sigma Chem., St.Louis, MO); 60% syrup, 3.68ml.

<sup>b</sup> Purified human serum albumin, Norite-treated, (Sigma Chem., St.Louis, MO)

<sup>c</sup> 100,000 iu/ml K-penicillin G and 50mg/ml streptomycin sulfate in distilled water, stored frozen until use.

図1 実験法の概略



間処理して（室温）透明帯を完全に溶解除去した。

その卵を新鮮な mBWW 液で 3 回洗浄して実験に供した。

4. 透明帯溶解に用いられた蛋白分解酵素および S-S 還元剤の種類と濃度

ハムスター卵の透明帯を溶解除去するために 0.1% trypsin, 0.05% pronase, 0.1%  $\alpha$ -chymotrypsin, 300iu/ml Dispase, 0.5M mercaptoethanol および 0.025M dithiothreitol (DTT) を用いた。今回用いたこれら蛋白分解酵素や S-S 還元剤は全てハムスター卵透明帯を溶解させ得ることが予備実験で確認されており、濃度設定にあたっては約 1 分間で完全に溶解させ得る最小濃度とした。

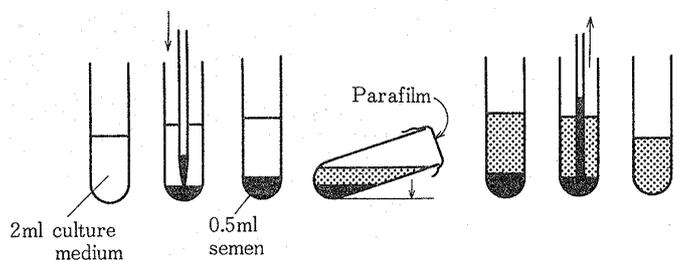
5. 精液からの精子の分離(精液静置法)<sup>1)</sup>

概略を図 2 に示した。

精液は健康男子より用手法にて得られた。20 分間室温に置くことにより十分液化された精液を 0.5ml ずつ 2.0ml の mBWW 液が入れられた小試験管底に静かに分注する。

精液・培養液境界面が大きくなるように試験管

図2 精液静置法



を 30° 傾け、試験管口をパラフィルムでシールして 37°C に 1 時間静置する。

この間に運動性良好精子は精液中から培養液中に浮遊して来る。管底に残った精漿を捨て、残った mBWW 液を集めて 230×g 5 分間遠心する。上清を捨て、新しい mBWW 液を 10ml 加えて攪拌し、再度遠心して上清を捨て sperm pellet を作製する。それに少量の mBWW 液を加えて高濃度ヒト精子浮遊液にする。

6. in vitro 受精実験および受精の判定

3.5% ヒト血清アルブミン (HSA) を含む mBWW 液 0.3ml を 3.5cm×1.0cm の Petri dish 内に入れ、その上をミネラルオイルでおおう。

培養液内に、種々の蛋白分解酵素や薬剤で処理された透明帯除去ハムスター卵と0.03mlの高濃度ヒト精子浮遊液を入れ、37°C大気中で4時間培養する。最終精子濃度は $1 \sim 2 \times 10^7$ /mlになるように調節した。

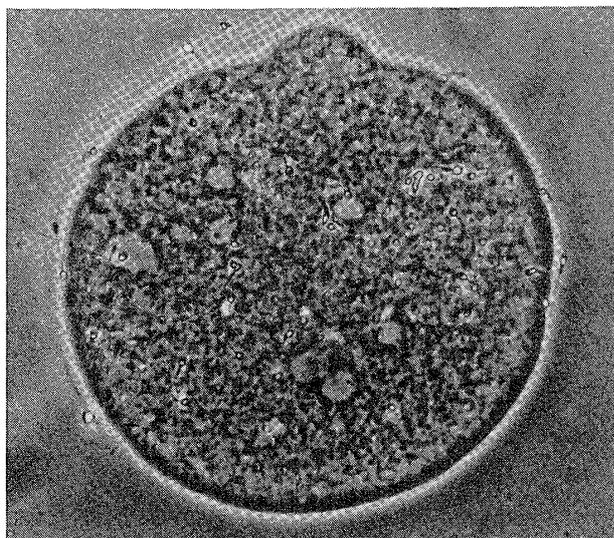
培養後、卵をとり出し受精の有無を位相差顕微鏡下に観察した。受精の判定は卵内に1個以上の膨化精子頭部もしくは雄性前核が認められた場合に“受精”とした。写真1は卵実質内に多数の膨化精子頭部を認め、受精と判定された透明帯除去ハムスター卵である。

### 研究成績

表2は各種蛋白分解酵素やS-S還元剤で3分間処理することにより透明帯を除去されたハムスター卵へのヒト精子受精率および平均受精精子数を示したものである。受精率・平均受精精子数とも trypsin 処理卵・mercaptoethanol 処理卵・ $\alpha$ -chymotrypsin 処理卵・pronase 処理卵・Dispase 処理卵・DTT 処理卵の順であつた。DTT 処理卵のが有意に低下していた。

表3は比較的長時間の処理による受精への影響を観察するために20分間処理を受けたハムスター

写真1 ヒト精子の受精が認められた透明帯除去ハムスター卵



×200

卵の受精率・平均受精精子数をみたものである。両者とも mercaptoethanol 処理卵・trypsin 処理卵・Dispase 処理卵・pronase 処理卵・ $\alpha$ -chymotrypsin 処理卵・DTT 処理卵の順であつた。3分間処理卵の場合と同様 DTT 処理卵に受

表2 蛋白分解酵素・S-S還元剤処理ハムスター卵へのヒト精子受精(3分間処理)

蛋白分解酵素 S-S還元剤	実験回数	実験に用いられた 卵総数	受精卵数(%)	受精精子/卵
Trypsin	9	157	120(76.4)*	2.41
Pronase	4	63	40(63)	1.43
$\alpha$ -chymotrypsin	4	102	66(64.7)	1.61
Dispase	4	94	57(61)	1.16
Mercaptoethanol	6	135	102(75.6)	2.38
Dithiothreitol	7	116	30(25.9)*	0.34

\*  $p < 0.001$

表3 蛋白分解酵素・S-S還元剤処理ハムスター卵へのヒト精子受精(20分間処理)

蛋白分解酵素 S-S還元剤	実験回数	実験に用いられた 卵総数	受精卵数(%)	受精精子/卵
Trypsin	7	107	81(75.7)*	1.59
Pronase	4	52	28(54)	0.98
$\alpha$ -chymotrypsin	3	41	21(51)	0.93
Dispase	3	38	24(63)	1.29
Mercaptoethanol	4	52	43(83)	2.23
Dithiothreitol	3	54	7(13)*	0.15

\*  $p < 0.001$

表4 2種類の薬剤で処理したハムスター卵へのヒト精子受精

蛋白分解酵素 S-S還元剤	実験回数	実験に用いられた 卵総数	受精卵数(%)	受精精子/卵
Trypsin +Dithiothreitol	4	71	3(4)	0.06
Mercaptoethanol +Dithiothreitol	4	74	18(24)	0.42
Trypsin +Mercaptoethanol	3	44	34(77)	2.11

精率・平均受精精子数の著明な減少が認められた。

短時間(3分間)処理の場合と比較的長時間(20分間)処理の場合を比較すると、Dispaseとmercaptoethanol以外は長時間処理卵の受精率が低下していたが大差は認められなかつた。

表4は2種類の透明帯溶解剤で3分間ずつ処理した場合の成績であるが、やはりDTTの処理を受けた卵への受精率は低下していた。

#### 考 案

動物の受精現象には種特異性が存在し通常は異種間受精は生じないが、Yanagimachi et al.はtrypsin処理により透明帯を除去したハムスター卵にはin vitroで異種哺乳類の精子が受精可能なことを発見した。現在までヒトをはじめマウス・ラット・モルモット・イルカ・ウサギ・ブタ・ウシ・ヒツジの精子の受精が確かめられている。この現象は哺乳動物の受精のメカニズムを解明する上で、またヒトの場合には男性不妊症の原因を探る上で画期的な役割を果たすことが期待されている。異種間受精のおこる理由としては、ハムスター卵の透明帯を除去することで透明帯表面に存在する精子付着部の種特異性が取去られたためと考えられている。しかしこのin vitro受精システムによる異種動物間の受精率は同種間受精(ハムスター精子とハムスター卵)にくらべると低く、ヒト精子をtrypsin処理による透明帯除去ハムスター卵に受精させるためにはかなり高い精子濃度が必要とされる<sup>5)14)</sup>。われわれのこれまでの実験でも $10^6 \sim 10^7$ /mlの精子濃度が必要であつた。

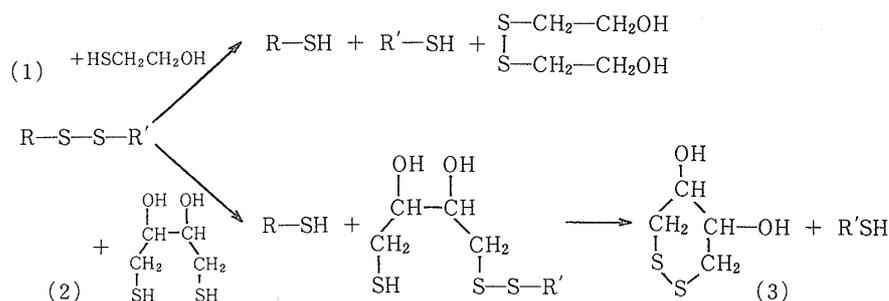
異種間の受精が同種間受精程度まで起こりやすくなれば研究上好都合でありさらに便利となる。そこで透明帯を原法のtrypsin以外の薬剤で溶解除去したとき受精が起こりやすくなるか否かをヒト精子を用いて検討してみた。透明帯は弱酸性の

糖蛋白からなる厚い無構造の膜であるが、その詳細は不明であり、動物の種類によっても成分はかなり異なるといわれる。しかしその溶解性や植物性凝集素に対する結合性からみてS-S結合が重要な役割を担っているようである<sup>7)9)</sup>。そこで透明帯を溶解させる薬剤として種々の蛋白分解酵素とS-S結合を還元的に切断する還元剤を用いてみた。蛋白分解酵素としてはtrypsin, pronase,  $\alpha$ -chymotrypsin, Dispaseを、S-S還元剤としてはmercaptoethanolとDTTを使用した。Dispaseは組織培養時の細胞剥離・分散のためにtrypsinと同様に使われる蛋白分解酵素である。いずれの薬剤も予備実験でハムスター卵透明帯を十分溶解させ得ることが確認されている。各薬剤間の溶解性の強さを一定にするため、各々の濃度は透明帯の完全溶解に要する時間が同一になるよう設定して実験が行われた。

実験の結果、今回使用した薬剤の中ではmercaptoethanolのみがtrypsinとほぼ同様のハムスター卵の種特異性減弱効果を示しただけであつた。これはいずれの薬剤を用いて透明帯を除去しても、ハムスター卵細胞膜には未だ若干の種特異性が残存することを示している。

同じS-S還元剤でもmercaptoethanol処理卵はtrypsin処理卵と同様の受精率を示したのに対し、DTT処理卵の受精率は極めて低値であつた。図3はmercaptoethanol(1)とDTT(2)の還元反応について示したものである。(1)の酸化還元電位はシスティンと同定度(-0.22V)なのでジスルフィドの還元には大過剰の試薬が必要であるが、(2)の酸化還元電位は-0.33Vで、ジスルフィドとの反応では環状の分子内ジスルフィド(3)の生成が促進されるので小過剰の試薬により蛋白質中のシスティンの還元ができる。すなわち反応の平

図3 S-S還元反応



衡はS-S結合の切断の方へ大きく傾いているので、用いるDTTの量は少なくすむはずである。DTT処理卵への受精抑制はこの還元反応力のちがいによるのかも知れない。しかしmercaptoethanolはDTTの2倍のモル濃度でしかも比較的長時間(20分)作用させても受精率は良好であること、またあらかじめ他の溶解剤で透明帯を除去したあとにDTT処理を加えた場合にも受精が著明に抑制されることから、DTTはハムスター卵細胞膜に特異的に作用してヒト精子付着部位を破壊していることも考えられる。

いずれにせよ、透明帯除去ハムスター卵を用いたヒト精子とのin vitro受精実験を行うときは、透明帯溶解剤としてDTTは用いるべきでなく、trypsinもしくはmercaptoethanolを用いるのが良策であろう。処理時間は短時間で十分と思われる。

#### 文 献

1. 星 和彦, 長池文康, 桃野耕太郎, 京野広一, 対木 章, 斉藤 晃, 鈴木雅洲, 林 恵子, 柳町隆造: われわれの行なっている精液静置法 "layering method" による, 精液中からの良好精子の分離. 不妊学会誌, 投稿中.
2. Barros, C., Gonzales, J., Herrera, E. and Bustos-Oregon, E.: Spermatozoa evaluated by actual penetration of foreign eggs. *Contraception*, 17: 87, 1978.
3. Barros, C., Gonzales, J., Herrera, E. and Bustos-Oregon, E.: Human sperm penetration into zona-free hamster oocytes as a test to evaluate the sperm fertilizing ability. *Andrology*, 11: 197, 1979.
4. Biggers, J.D., Whitten, W.K. and Whittingham, D.G.: The culture of mouse embryos in vitro. In *Methods in Mammalian Embryology*. (ed. J. C. Daniel), 86. Freeman., San Francisco, 1971.
5. Binor, Z., Sokoloski, J.E. and Wolf, D.P.: Penetration of the zona-free hamster egg by human sperm. *Fertil. Steril.*, 33: 321, 1980.
6. Hall, E.J.: Relationship between semen quality and human sperm penetration of zona-free hamster ova. *Fertil. Steril.*, 35: 457, 1981.
7. Inoue, M. and Wolf, D.P.: Comparative solubility properties of rat and hamster zonae pellucidae. *Biol. Reprod.*, 12: 535, 1975.
8. Karp, L.E., Williamson, R.A., Moor, D.E., Shy, K.K., Plymate, S.R. and Smith, W.D.: Sperm penetration assay: Useful test in evaluation of male fertility. *Obstet. Gynecol.*, 57: 620, 1981.
9. Oikawa, T., Yanagimachi, R. and Nicolson, G. L.: Species differences in the lectin-binding sites on the zona pellucida of rodent eggs. *J. Reprod. Fertil.*, 43: 137, 1975.
10. Overstreet, J.W., Yanagimachi, R., Katz, D.F., Hayashi, K. and Hanson, F.W.: Penetration of human spermatozoa into the zona-free hamster egg: A study of fertile donors and infertile patients. *Fertil. Steril.*, 33: 534, 1980.
11. Rogers, B.J., Camper, H.V., Ueno, M., Lambert, H., Bronson, R. and Hale, R.: Analysis of human spermatozoa fertilizing ability using zona-free ova. *Fertil. Steril.*, 32: 664, 1979.
12. Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. and Rogers, B.J.: The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 15: 471, 1976.
13. Zausner-Guelman, B., Blasco, L. and Wolf, D. P.: Zona free hamster eggs and human sperm penetration capacity: a comparative study of proven fertile donors and infertile patient. *Fertil. Steril.*, 36: 771, 1981.
14. Zukerman, Z., Rodriguez-Rigau, L.J., Smith, K. D. and Steinberger, E.: Frequency distribution of sperm counts in fertile and infertile males. *Fertil. Steril.*, 28: 1310, 1977.

(特別掲載 No. 5162 昭57・9・6受付)