

シンポジウム 卵の側からみた受精と着床をめぐる諸問題

ヒト卵の受精・初期発生期における環境要因

東北大学医学部産科学婦人科学教室

星 和 彦

共同研究者

星合 晃, 斉藤 晃, 桃野耕太郎, 長池 文康, 京野 広一, 対木 章
 今泉 英明, 森 良一郎, 上原 茂樹, 干田 智, 八日市谷隆, 永沼 孝子
 広瀬 洋子, 菅原 瑞穂

研究協力者

柳町 隆造教授 (ハワイ大学医学部)

研究指導者

鈴木 雅洲教授

緒 言

受精現象に関する研究は近年急速な進歩をみているが、その詳細なメカニズムについては未だ不明な点が数多く残されている。

受精・初期発生に至る諸過程には各々に必要な環境条件が存在し、さらにそれらの条件は動物の種別により全く異なっていると言つても過言でなく、ヒトではほとんど解明されていない。

本研究では受精から初期発生の一連の過程から、精子の受精能獲得・先体反応・精子の運動性変化・透明帯認識と接着・透明帯貫通・精子—卵融合・受精卵の初期発生経過をとりあげ、種々の環境要因がそれぞれの過程に与える影響を検討し、ヒトの受精と初期発生における最適環境条件とそのメカニズムを解明することを目的とした。

研究方法

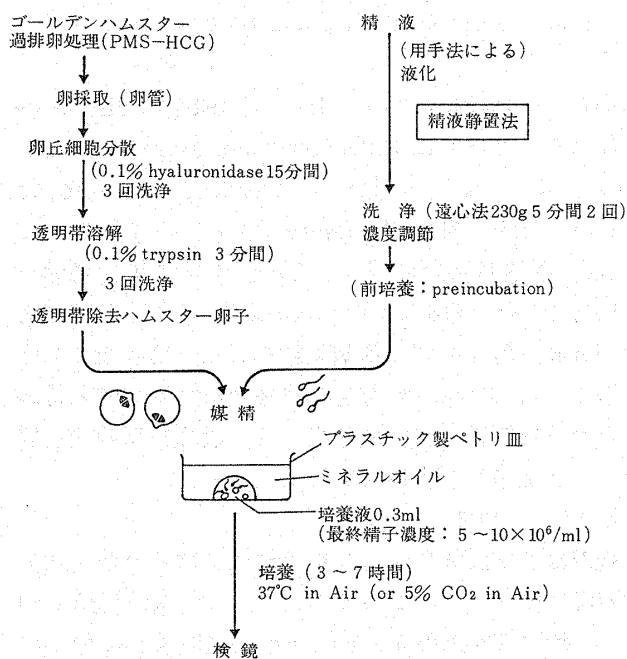
ヒト精子の受精能獲得・先体反応および精子—卵融合の研究は、代用ヒト卵として透明帯除去ハムスター卵を用いた *in vitro* 受精実験法で、透明帯認識・接着ならびに透明帯通過の検討は塩溶液内保存ヒト卵透明帯を使用した *in vitro* 接着・貫通実験法で行った。

なおヒト受精卵の初期発生経過は1983年に東北大学医学部付属病院産婦人科で施行された体外受精・胚移植の臨床成績を集計して考察した。

各々の研究方法について以下に記す。

1. 透明帯除去ハムスター卵を用いた *in vitro* 受精実験法

① 実験方法の概略

図1 透明帯除去ハムスター卵を用いたヒト精子 *in vitro* 侵入テスト法

透明帯除去ハムスター卵とヒト精子との *in vitro* 受精実験を行い、培養条件を変えて受精に与える影響を調べた。図1にその概略を示した。

② 培養液

研究に用いた基本となる培養液は modified Biggers, Whitten and Whittingham⁶⁾液 (mBWW 液) である。その組成は表1に示した。

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

表1 研究に用いた基本培養液の組成
modified Biggers, Whitten and Whittingham 液
(mBWW)

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

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

^b Purified human serum albumin, Norite-treated, (Sigma Chem., St. Louis, MO)

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

用いた。発情周期の第1日目 (postestrous discharge の認められた日) に PMS (pregnant mare's serum) 30IU, 第3日目に HCG (human chorionic gonadotropin) 30IU を腹腔中に注入して過排卵させ、HCG 注射後17時間に関腹して卵管中より未受精卵を採取した。その卵を0.1%hyaluronidase を含む培養液で15分間処理して卵丘細胞を除去した。培養液で2回洗浄後、0.1%trypsin を含む培養液にて3分間の処理を行って透明帯を完全に除去した。最後に新鮮な培養液で3回洗浄して実験に供した。

④ 精子の準備

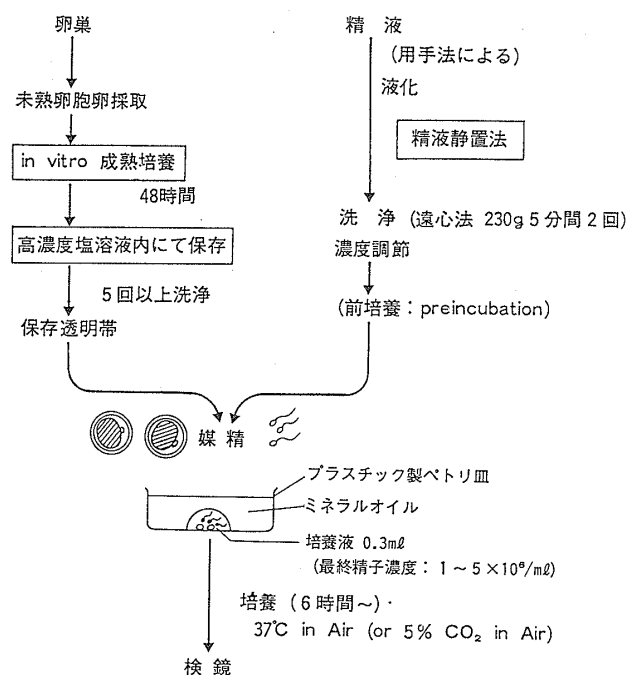
精液は健康成人男子より用手法にて得られた。20分間室温に置くことにより十分液化させた精液を0.5ml ずつ、培養液が2.0ml 入れられた小試験管底に静かに分注する。精液-培養液境界面が大きくなるように試験管を30°傾け、試験管口をパラフィルムでシールして37°Cに1時間静置する。

この間に、運動良好精子は精液中から培養液中に浮遊してくる²⁾。管底に残った精漿を捨て、残った培養液を集めて230×g 5分間遠心する。上清を捨て、培養液を加えて再度遠心洗浄し高濃度精子浮遊液にする。

⑤ in vitro 受精実験ならびに精子侵入の判定。

培養液 (3.5%ヒト血清アルブミンを含む) 0.3ml を 3.5×1.0cm の Petri Dish 内に入れ、その上をミネラ

図2 透明帯への精子接着・貫通テスト法



ルオイルでおおう。

培養液内にヒト精子高濃度浮遊液と透明帯除去ハムスター卵を入れ、37°C大気中もしくは5%CO₂大気中で一定時間培養する。最終精子濃度は5~10×10⁶/ml になるよう調節する。

精子侵入の有無は位相差顕微鏡下に観察して判定する。精子は卵に侵入後、頭部が膨化し雄性前核を形成するが、異種のすなわちハムスターの雌性前核と融合することはない。この意味でこの現象を“受精”と呼ぶことは不適當で、以後“卵への精子侵入”と表現する。

2. 塩溶液内保存ヒト卵透明帯を用いた、透明帯への精子接着・貫通実験法

① 実験方法の概略

高濃度塩溶液内にて保存されたヒト卵透明帯を洗浄後ヒト精子を加え、培養液内における精子の透明帯接着・貫通を調べた。図2はその概略である。

② 培養液

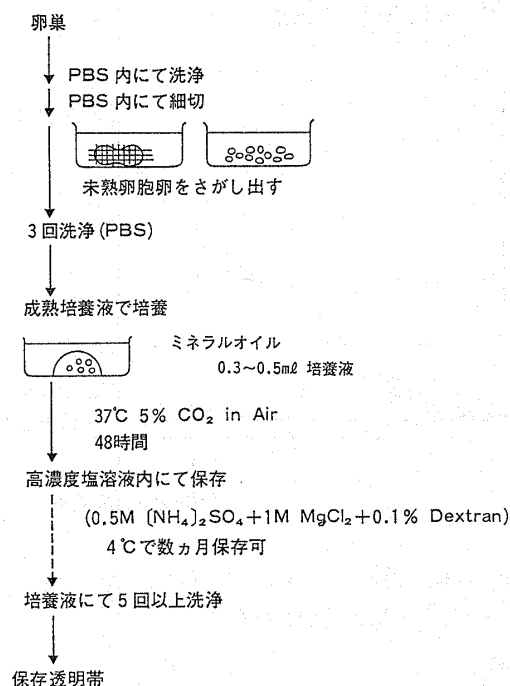
前述の実験法と同様 mBWW 液を用いた。

③ 透明帯の作製・保存法

概略を図3に図示した。

手術で得られたヒト卵巣を Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) 中で細切し、実体顕微鏡下に未熟ヒト卵を採取する。3~5回 PBS で洗浄後、成熟用培養液¹³⁾に入れ37°C 5%CO₂大気中で48時間培養して成熟させる。48時間後に卵をとり出し高濃度塩溶液

図3 透明帯の作製および保存



(0.5M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +1M MgCl_2 +0.1%Dextran) 中に入れ、実験に供するまで4℃で保存した。実験に際してはmBWW液で5回以上洗浄して用いた。

高濃度塩溶液に入れられることにより、卵実質はもちろん死滅するが、その透明帯は精子接着・通過性に対する性質を変えることなく保存可能なことが報告されている¹³⁾。

④ 透明帯接着・貫通実験およびその判定

培養液内に保存ヒト卵透明帯と精子を入れ、37℃大気中で一定時間培養する。最終精子濃度は $1\sim 5\times 10^6/\text{ml}$ になるよう調節する。

透明帯貫通の判定は、位相差顕微鏡下に観察して行う。囲卵腔内に1匹以上の精子が認められたとき“透明帯貫通”と判定する。

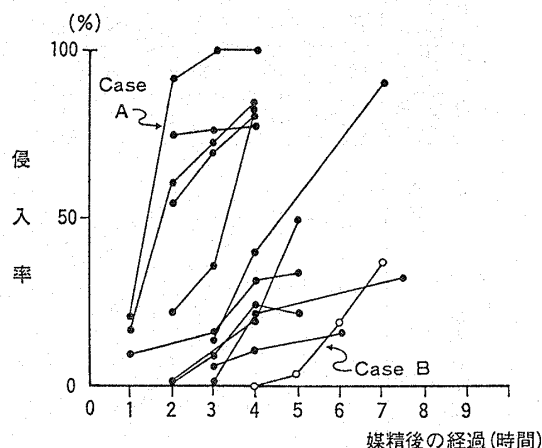
3. 精子の運動率・運動速度の測定

培養液中精子の運動率・運動速度の測定はMakler⁸⁾のmultiple exposure photography method (MEPM)にて行つた。すなわち1秒間に6回発光できる装置下に(位相差)顕微鏡写真を1秒の露出時間で撮影する。運動精子は6個の鎖状に、不動精子は1匹の精子として写し出されるので正確な運動率と速度が測定できる。なおこの測定には、1検体につき100匹以上の精子を写真上に求めて算出した。

成 績

1. 精子の受精能獲得・先体反応

図4 透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子侵入率の個人差



受精能を獲得し先体反応を完了したヒト精子が透明帯除去ハムスター卵に侵入可能¹²⁾なことを応用し、ヒト精子の受精能獲得・先体反応に与える環境条件の影響を検討した。

① 受精能獲得および先体反応の個人差

図4は16名の健康男性から得られた精子を用い、濃度を一定にして経時的に透明帯除去ハムスター卵への侵入率をみたものである。侵入率の推移に大きな個人差が存在する。

Case Aは媒精後、1時間で20%の卵に精子侵入が認められ、2時間で90%、3時間で100%を示すのに対し、Case Bでは4時間後でも侵入せず、5時間たつてはじめて3%に侵入が認められたにすぎない。

② 受精能獲得および先体反応の再現性

同一人から4日連続して精液を採ると、図5のように精子濃度、運動率、精液量とも順次低下し、運動性のある精子総数は4日目には1日目の1/5に減る。しかし精子濃度を一定にして実験すると図6のごとく侵入率の推移は極めてよく一致する。同一人の精子であれば、先体反応完了までに要する時間は常時一定と考えられる。

③ ヒト精子先体反応に与える Ca^{++} ・ Mg^{++} の影響

Ca^{++} が精子先体反応に不可欠な事は多くの動物で確認されている。そこでヒトの場合について Ca^{++} と、 Ca^{++} 同様2価の陽イオンである Mg^{++} の先体反応に与える効果を検討した。

図7は Ca^{++} ・ Mg^{++} の有無による4種類のmBWW液中での透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子侵入率をみたものである。

Ca^{++} と Mg^{++} を含むすなわち通常のmBWW液中

図5 精液所見の経日的変化

精子濃度 ($\times 10^6/\text{ml}$)	76	111	97	36
運動率 (%)	80.0	75.3	67.9	66.7
精液量 (ml)	1.6	1.2	1.0	0.8

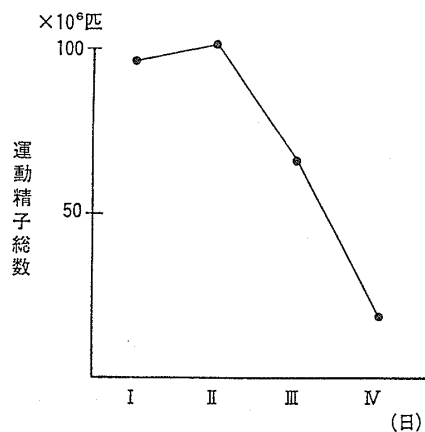
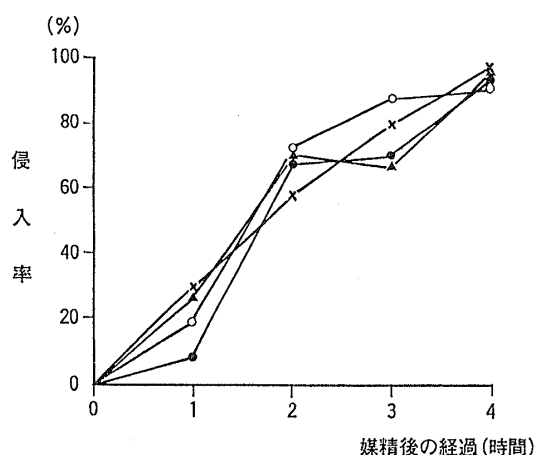
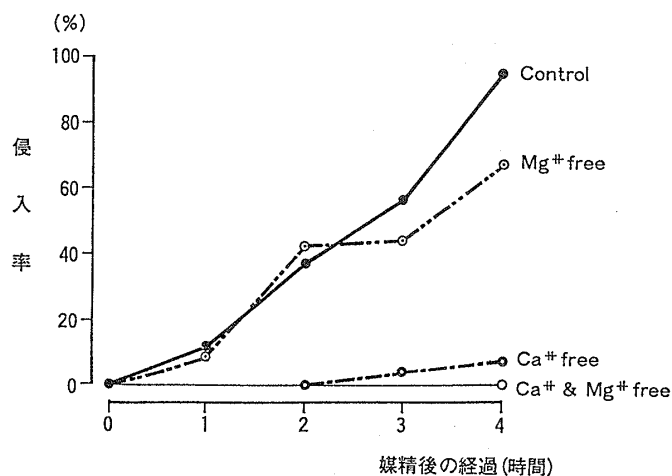
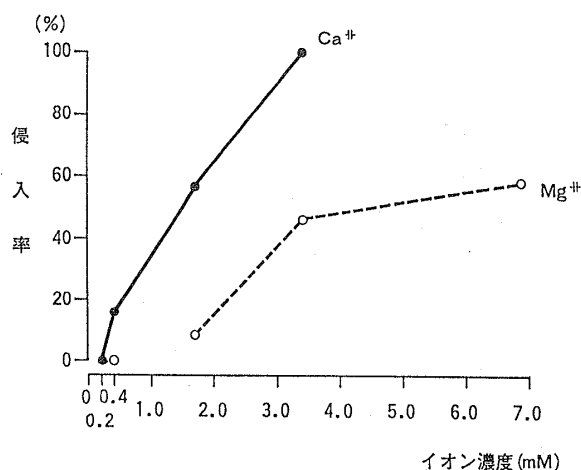


図6 同一精子における透明帯除去ハムスター卵への侵入率の経日的変化



(control)では媒精後1時間から侵入がみられ、時間の経過とともに侵入率が上昇して4時間で94.4%を示した。Ca⁺⁺のみを含む(Mg⁺⁺-free)培養液では前者と同様の傾向を示したが、侵入率は低値(4時間で67%)であった。Mg⁺⁺のみを含む(Ca⁺⁺-free)培養液では4時間後でも侵入率はわずか7%であり、Ca⁺⁺ & Mg⁺⁺-freeの培養液では4時間後でも受精を認めることができなかった。

培養液中のCa⁺⁺・Mg⁺⁺濃度と透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子侵入率の関係について示したのが図8である。媒精からの培養時間は4時間でCa⁺⁺やMg⁺⁺は各々単独で含まれている。Ca⁺⁺が0.40mMではじめて侵入がおこり、濃度の上昇とともに侵入率は

図7 透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子侵入に与えるCa⁺⁺・Mg⁺⁺の効果図8 透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子侵入に与えるCa⁺⁺・Mg⁺⁺濃度の影響

上昇し、3.42mM すなわち通常のmBWW液に含まれる倍量で100%を示した。Mg⁺⁺はCa⁺⁺では侵入のみられる0.40mMでは侵入がおこらず、1.19mMから認められ、Ca⁺⁺同様濃度の上昇とともに侵入率も上がるがCa⁺⁺よりはるかに低率であった。

次に同一精子を用い、以下のように培養条件を変えて実験した。Aはcontrolではじめから卵と培養する。Bは精子を3時間前培養したあとに卵を加えて培養する。Cは3時間の精子前培養をCa⁺⁺-freeの状態で行う。その成績については図9に示した。前培養の間に先体反応の進んでいるBの精子は加えられた卵に急速に侵入しAの曲線に接近する。しかし、Cの精子はBはおろかAの侵入率をもはるかに凌駕する。これはCa⁺⁺-freeの方がむしろ受精能獲得過程を短縮させている印象を与える。

図9 透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子侵入に与える Ca^{++} -free 状態での精子前培養の効果

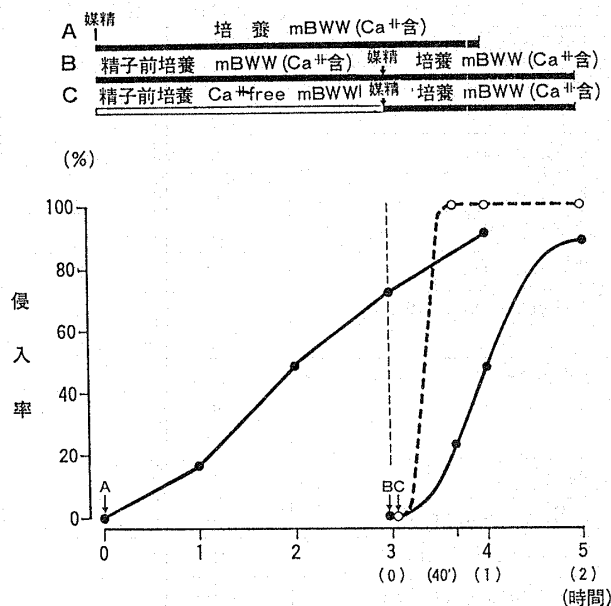
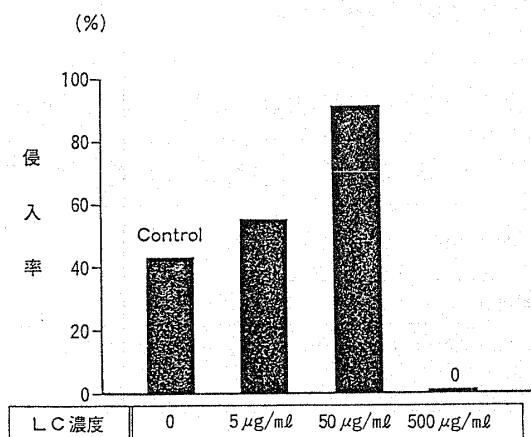


図10 透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子侵入に与えるライソホスファチジルコリン (LC) の効果



④ ヒト精子先体反応とライソホスホリピッド・脂肪酸

精子細胞膜のリン脂質がホスホリパーゼによつてライソホスホリピッドと脂肪酸に分解され、これで膜の不安定化がひき起こされて先体反応が進行すると考えられている¹⁴⁾。そこで、培養液にライソホスホリピッドや脂肪酸を加えて透明帯除去ハムスター卵への精子侵入をみてみた。図10はライソホスホリピッドの1つライソホスファチジルコリン、図11、12は代表的な脂肪酸であるオレイン酸・アラキドン酸を加えたときの成績である。各々有効に働く濃度は異なるが、いずれも侵入率を増加させ先体反応を促進させている。オレイ

図11 透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子侵入に与えるオレイン酸の効果

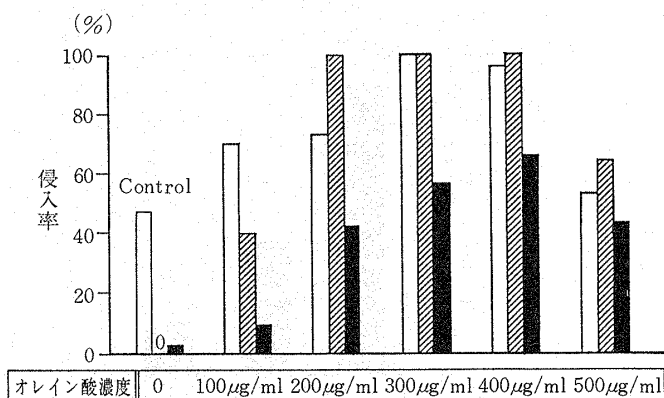
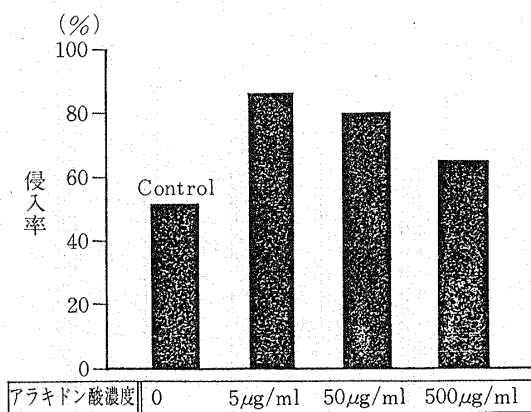


図12 透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子侵入に与えるアラキドン酸の効果



ン酸については3種類の精子で別々に検討したが、controlで侵入率0のものが200~400 μg/mlの添加で100%になる。

⑤ ヒト精子先体反応と p-bromophenacyl bromide (P-BPB)

特異的ホスホリパーゼ阻害物質である P-BPB を培養液に加えた場合の影響をみた成績が図13である。透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子侵入率が抑制され、先体反応が阻害されている。

2. ヒト精子の運動性の変化

培養液中でのヒト精子は、最初は蛇行様に鞭毛を動かしているが、次第にスクリュウ状に動かす精子が増加するのが観察される。そこで精子の直進スピードを測定してみた。図14はその成績である。実験に用いた精子は、4時間の培養で透明帯除去ハムスター卵への侵入率が94.4%を示したもので、この時点でほとんどが先体反応をおこしていたと考えられるが、大きな速度の変化は認められない。齧歯類に認められるような

図13 透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子侵入に与える p-bromophenacyl bromide (P-BPB) の影響

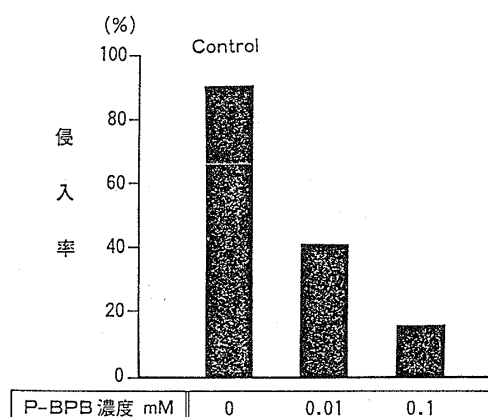
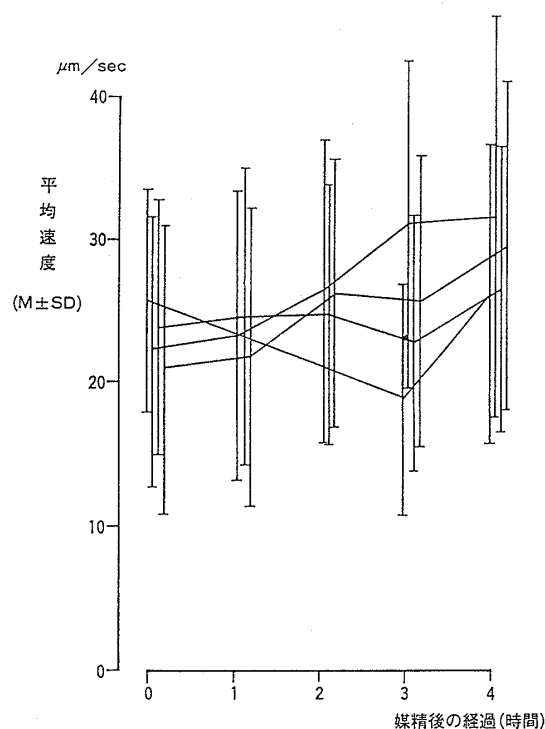


図14 培養液内におけるヒト精子運動速度の変化



明らかな運動性の亢進はヒトにはみられないと思われる。

3. ヒト精子の透明帯接着・貫通

塩溶液内保存ヒト卵透明帯を用い、ヒト精子の透明帯接着・通過性に与える諸条件を検討した。高濃度硫酸溶液内にて保存された透明帯は精子付着・通過性に対する性質が変化しないことが確認されている¹³⁾。

① 単糖類の透明帯接着に与える影響

培養液に過剰の各種単糖類を入れ、ヒト精子の透明帯接着に及ぼす影響を観察した。その成績は表2に示したが、今回用いた14種類では control と差がなく影

表2 精子—透明帯接着に対する単糖類の効果

単糖類	濃度 (mM)	精子—透明帯接着状態
D-Fructose	100	+
D-Galactose	50	+
	100	+
D-Mannose	100	+
D-Fucose	100	+
D-Glucosamine*	10	+
D-Galactosamine*	10	+
N-Acetylneuraminic acid*	10	+
	1	+
L-Fucose	100	+
	50	+
	10	+
Arabinose	100	+
D-Glucuronic acid*	10	+
D-Galacturonic acid*	10	+
N-Acetyl-D-glucosamine*	10	+
N-Acetyl-D-galactosamine*	10	+
N-Acetyl-D-mannosamine*	10	+
Control (None)		+

* 高濃度では精子運動性が低下する

表3 精子—透明帯接着に対する多糖類の効果

多糖類	濃度 (mg/ml)	精子—透明帯接着状態
Fucoidin	1.5	—
	0.1	—
Heparin	2.0	+
Chondroitin sulfate A	2.0	+
Control (None)		+

響は認められなかった。

② 多糖類の透明帯接着に与える影響

同様に3種類の多糖類を別々に加えたときの成績を表3に示した。ここで用いた多糖類は全て硫酸基を有するポリマーであるが、Fucoidin で著明に透明帯接着が抑制された。ヒト精子は、その表面膜蛋白で Fucoidin 類似物質を認識して接着することが考えられる。

③ 精子の前培養が透明帯貫通に与える影響

精子を透明帯とともに培養する前に、0～4時間前培養したときの透明帯貫通に与える影響をみた成績を表4である。ここで用いた精子では3時間以上の前培

表4 “透明帯貫通”に与える精子前培養 (preincubation) の影響

精子前培養時間	培養6時間	透明帯貫通率%	精子付着状態	精子存在部位
媒精	観察			
0時間	↓	83(5/6)	多	卵腔
1	↓	50(3/6)	多	卵腔
2	↓	33(2/6)	多	卵腔
3	↓	0(0/6)	少	透明帯内
4	↓	0(0/6)	極少	透明帯外側

表5 “透明帯貫通”に与える培養液中の基質の効果

培 養 液			透 明 帯 貫 通 率 %	精子付着状態
グルコース	ビルビン酸	乳 酸		
—	+	+	0 (0/4)	少
+	—	+	50 (2/4)	少
+	+	—	25 (1/4)	少
—	—	+	0 (0/3)	少
—	+	—	0 (0/3)	少
+	—	—	0 (0/3)	少
—	—	—	0 (0/9)	極少
+	+	+	89 (8/9)	多
(Control)				

養で透明帯通過が不可能になることが示された。

④ エネルギー基質の透明帯貫通に与える影響

培養液に含まれる3種類のエネルギー基質すなわちグルコース・ビルビン酸・乳酸がヒト精子の透明帯貫通に与える影響を調べた。3種の基質の有無による8種類のmBWW液を作製して行つた実験の成績が表5である。基質除去により透明帯通過性が抑制され、とくにグルコースが除去されると貫通がおこらなくなった。

4. 精子-卵融合

先体反応完了ヒト精子が卵細胞と融合する際の諸条件につき、透明帯除去ハムスター卵を用いた実験で検討した。

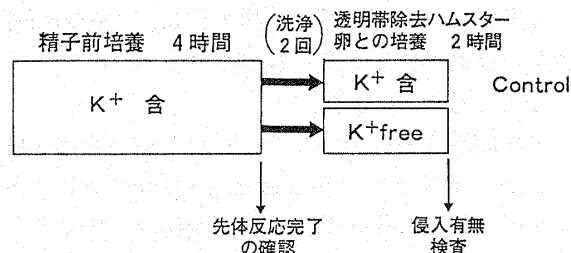
① 精子-卵融合に与える K^+ の効果

通常のmBWW液内でヒト精子を4時間前培養することで精子の先体反応完了を確認した(透明帯除去ハムスター卵への侵入が高率に認められることで)。次いで K^+ -free mBWW 液で精子を2回洗浄後、 K^+ -free mBWW 液内で透明帯除去ハムスター卵と2時間培養し、精子侵入の有無を検査した。成績は図15に示したが control にくらべ明らかに低い侵入率であった。

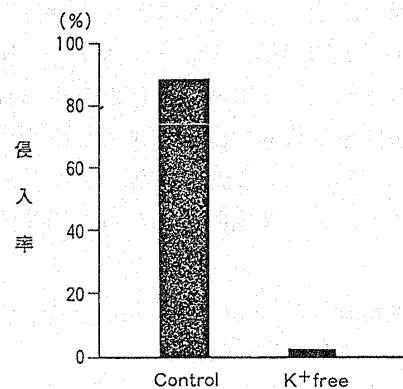
② 精子-卵融合に与える Ca^{++} ・ Mg^{++} の効果

図15 精子-卵融合に与える K^+ の影響

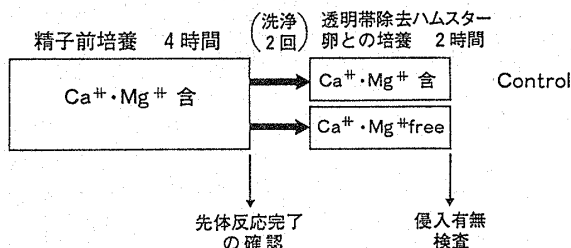
— 方 法 —



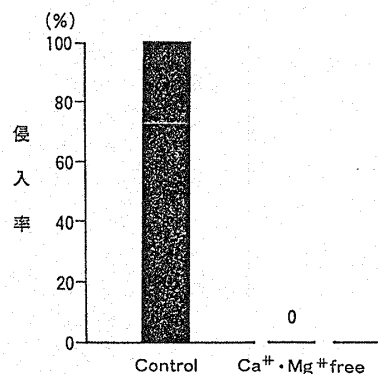
— 成 績 —

図16 精子-卵融合に与える Ca^{++} ・ Mg^{++} の影響

— 方 法 —



— 成 績 —



①と全く同様の実験を Ca^{++} and Mg^{++} -free の培養液を用いて施行した(図16)。control の侵入率は100%であつたが、 Ca^{++} and Mg^{++} -free では0%であつた。

表6は Ca^{++} -free および K^+ -free の培養液での精子の透明帯除去ハムスター卵への接着の程度を表したも

のである。平均接着精子数は Ca^{++} -free の場合は control と差がないが、 K^{+} -free ではその数が少なく、精子一卵融合に与える影響は同様であるが、その機序に両者間の差異があることが推察される。

5. 受精卵の初期発生

不妊症治療の一環として行われた体外受精・胚移植 in vitro fertilization and embryo transfer IVF-ET の臨床データから体外受精および受精卵培養による初期発生経過の成績をまとめた。

採卵直後の卵の状態から、卵の成熟度を良好な方から I~V に分類し³⁾、1983年に東北大学医学部付属病院産婦人科で施行されたのべ81例の症例から得られた卵の胚移植時の初期発生状態を表7にまとめた。東北大のプロプラム⁴⁾に基づく胚移植の時期、すなわち媒精から約52時間後では2~8細胞期になるのが順調な経

過と考えられるが、その割合は55.8%であつた。成熟度良好の卵 (Grade I~II) のみで集計するとその割合は63%を示している。

考 案

透明帯除去ハムスター卵にモルモット精子が侵入可能であることは1972年に Yanagimachi によつて報告されている¹⁰⁾。その後多数の異種哺乳動物精子でも同様の現象が確認され、1976年にはヒト精子でも侵入可能なことが証明されている¹²⁾。いずれの精子も透明帯除去ハムスター卵に侵入するためには受精能獲得現象と先体反応を完了していなければならない。そこでこの現象を実験に応用してヒト精子の侵入を確認すれば、先体反応完了の有無が間接的に検索できることになる。しかもその侵入過程を電子顕微鏡を用いて観察してみると⁵⁾、同種間受精と同様の機序で進行しており、この方法が信頼性の高いものであることも認められている。また、高濃度硫酸溶液内で保存されたヒト卵透明帯はその性質を殆ど変えることなく保存され得ることが知られている¹³⁾。

われわれは、入手困難な新鮮ヒト卵の代用としてこの透明帯除去ハムスター卵と保存ヒト卵透明帯を用いた in vitro での実験を行い、ヒト受精の一連の経過について種々の検討を加えてみた。

① ヒト精子の受精能獲得について

表6 透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子の接着に与える Ca^{++} と K^{+} の影響

培 養 液	精 子 接 着 状 態	
	接着精子数/卵子数	平均接着精子数
Ca^{++} -free	301/40	7.53
K^{+} -free	126/62	2.03
Control	734/80	9.18

表7 卵子の受精・初期発生状態

		Grade I	II	III	IV	V	合 計
自然 LH サージ 後排卵	受精せず	4	3	1	3	1	12
	受精 {	変性	8	3	3	1	15
		分割せず	3	3	2		8
		2細胞期	7				7
		~4細胞期	17	4	2		23
		~8細胞期	5				5
HCG 注射後 排卵	受精せず		1		1		2
	受精 {	変性	2	1	1		4
		分割せず	5				5
		2細胞期	8				8
		~4細胞期	8	3			11
		~8細胞期	4				4
合 計	受精せず	4	4	1	4	1	14
	受精 {	変性	10	4	4	1	19
		分割せず	8	3	2		13
		2細胞期	15				15
		~4細胞期	25	7	2		34
		~8細胞期	9				9

(数字は卵子数を示す)

実験成績から以下の結論が得られた。

ヒト精子の受精能獲得に要する時間にはかなりの個人差が存在する。しかし同一人の精子であればその時間は常時一定である。

環境条件としては Ca^{++} -free の方がむしろ受精能獲得過程を促進するようである。

② 先体反応について

Ca^{++} が先体反応に必要なことは多くの動物で確認されており、ウニでは海水に含まれる2/3以上の濃度が⁷⁾、モルモットでは0.2mM 以上が必要と報告されている¹¹⁾。われわれの実験ではヒト精子の先体反応にも Ca^{++} が必要であり、その最少必要濃度は0.4mM であることが示された。

Ca^{++} 同様2価の陽イオンである Mg^{++} はある程度 Ca^{++} の代用となり得るが、その効果ははるかに小さいことも証明された。

精子先体反応は、細胞膜のリン脂質がホスホリパーゼによつてライソホスホリピッドと脂肪酸に分解され、これが膜の不安定化をひきおこして胞状化を促し進行するものと考えられている¹⁴⁾。今回の実験で培養液に加えられたライソホスホリピッドや不飽和脂肪酸が先体反応を促進し、ホスホリパーゼ A_2 の阻害剤が先体反応を抑制することが確認され、ヒト精子においても前述の機序で先体反応が進行することが示唆された。

③ 精子の運動性の変化について

ハムスターなど齧歯類の精子では、受精能を獲得する頃になると運動性の亢進がおこり hyperactivation と呼ばれている⁹⁾。これは透明帯を突破するための合目的変化と理解される。

ヒト精子では齧歯類にみられるような明らかな運動性の亢進は観察されなかつた。

hyperactivation のみられる齧歯類とヒト精子の頭部形状を比較すると、前者は大型で鎌状を呈しており後者は円錐状である。透明帯侵入・通過には後者の方が明らかに適しており、ヒト精子に明らかな運動性の亢進がみられないのはこの頭部形状に関係しているのかも知れない。

④ ヒト精子の透明帯接着・認識について

精子が透明帯をいかにして認識し接着するかは受精の種特異性を考える上で極めて大きな課題である。透明帯を構成する糖蛋白のいずれかの糖鎖を精子表面の認識蛋白がつかまえるものと一般には解釈されている。そこで種々の単糖類・多糖類を培養液に過剰に加

えて、ヒト精子の透明帯接着に及ぼす影響をみてみた。その結果、Fucoidin により精子接着が著しく抑制された。Fucoidin はフコース硫酸とフコースからなるポリマーで、硫酸基を同様に有するヘパリンやコンドロイチン硫酸では抑制がみられないことから、この現象は Fucoidin に特異的なことである。

ヒト精子の認識蛋白と Fucoidin が結合し透明帯認識が不可能になつたものと考えられ、ヒト精子による透明帯認識部位は Fucoidin 類似物質であることが示唆される。

⑤ ヒト精子の透明帯貫通について

透明帯との培養をはじめる前に精子のみを前培養すると、3時間以上前培養した精子が透明帯を通過できなくなつた。前培養の間に先体反応が終了し先体酵素が放出されて透明帯溶解が不可能になつたためと考えられる。この実験に用いた精子は先体反応が速やかに完了するものであるが、貫通不可能になる時間は長くても先体反応終了後3時間以内と思われる。

エネルギー基質が除去されると透明帯貫通が抑制されることも示された。基質の中でも、グルコースの効果が最も大きい。基質の有無が先体反応惹起に無関係であることは予備実験で確かめられているので¹⁾、エネルギー基質は精子の運動性の維持に関与していると考えられる。

⑥ 精子-卵融合について

実験成績から、先体反応完了精子が卵と融合する際にも Ca^{++} ・ Mg^{++} が必要であることが認められた。配偶子融合も膜と膜との融合なので先体反応と同様の機序も考えられる。 K^{+} も配偶子融合に重要な役割を演じるが、これは先体反応完了精子の卵への接着に必要な物質と思われる。

⑦ 受精卵の初期発生経過について

受精の諸条件の基礎的検討をふまえて、不妊症治療の臨床で行われた IVF-ET の成績から受精卵の初期発生経過を集計した。IVF による受精率は総卵数の86.5%、成熟良好卵子では91%であつた。順調な初期発生経過をとつた卵は総卵数の55.8%、成熟良好卵子では63%であつた。

順調な初期発生経過には、採卵時の卵の成熟度が大きく関与しており、成熟度良好の卵を効率よく採取することが IVF-ET 成功の一つの要因であることが裏づけられた。

文 献

1. 星 和彦, 斉藤 晃, 鈴木雅洲, 林 恵子, 柳町

- 隆造：In vitro 受精システムを用いて検討した，培養液中の基質がヒトの受精に与える影響．日不妊会誌，27：439，1982.
2. 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．日不妊会誌，28：101，1983.
 3. 星 和彦，星合 昊，斉藤 晃，桃野耕太郎，京野広一，対木 章，鈴木雅洲：ヒト卵子の成熟度に関する Grade 分類の試み．日産婦誌，35：2300，1983.
 4. 鈴木雅洲，星 和彦，星合 昊，斉藤 晃，京野広一，対木 章，今泉英明，森良一郎，上原茂樹：対外受精・胚移植法による妊娠の成功と今後の課題．医学のあゆみ，127：740，1983.
 5. 対木 章，星 和彦，斉藤 晃，京野広一，星合 昊，鈴木雅洲，堀内俊孝：透明帯除去ハムスター卵子へのヒト精子の侵入機序—走査電子顕微鏡による経時的観察—．日産婦誌，35：1705，1983.
 6. 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.
 7. Dan, J.C.: Studies on the acrosome. III. Effect of calcium deficiency. *Biol. Bull.*, 107: 335, 1954.
 8. Makler, A.: A new multiple exposure photography method for objective human spermatozoal motility determination. *Fertil. Steril.*, 30: 192, 1978.
 9. Mohri, H. and Yanagimachi, R.: Characteristics of motor apparatus in testicular, epididymal and ejaculated spermatozoa. A study using demembrated sperm models. *Exp. Cell Res.*, 127: 191, 1980.
 10. Yanagimachi, R.: Penetration of guinea pig spermatozoa into hamster eggs in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 28: 477, 1972.
 11. Yanagimachi, R. and Usui, N.: Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp. Cell Res.*, 89: 161, 1974.
 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. Yanagimachi, R., Lopata, A., Odom, C.B., Mahi, C.A. and Nicolson, G.L.: Penetration of biologic characteristics of zona pellucida in highly concentrated salt solution: The use of salt-stored eggs for assessing the fertilizing capacity of spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 35: 562, 1979.
 14. Yanagimachi, R.: Mechanisms of fertilization in mammals. In “Fertilization and embryonic development in vitro” (eds. L. Mastroianni, Jr. and J.D. Biggers), 81. New York, Plenum Press, 1981.