

ヒト精子の Zona induced acrosome reaction に与える頸管粘液の効果

福島県立医科大学産科婦人科学教室

吉松 宣弘 菅野 孝子 星 和彦 佐藤 章

Effect of Cervical Mucus on Zona Induced Acrosome
Reaction of Human SpermatozoaNobuhiro YOSHIMATSU, Takako SUGANO, Kazuhiko HOSHI
and Akira SATO*Department of Obstetrics and Gynecology, Fukushima Medical College, Fukushima*

概要 ヒト精子の zona induced acrosome reaction の存在について調べるとともに、頸管粘液の acrosome reaction に与える影響についても検討した。

Percoll 法と swim up 法を併用して回収された精子の acrosome reaction 発現を、精子だけ 6 時間培養したときと salt stored human egg とともに培養したときについて、FITC labelled PSA 染色法を用いて比較検討した。さらに、頸管粘液を通過させた精子についても同様の検討を行った。

1. Human egg の透明帯に付着した精子のうち acrosome reacted sperm (zona induced acrosome reaction) は $35.7 \pm 17.7\%$ で、この割合は spontaneous acrosome reaction の $2.8 \pm 1.9\%$ に比べ有意に高値であった。

2. 頸管粘液を通過した精子の acrosome reacted sperm の割合は非通過精子のそれと差を認めなかった ($3.5 \pm 2.6\% : 2.6 \pm 2.0\%$)。

3. 頸管粘液通過精子の zona induced acrosome reaction は $51.6 \pm 6.8\%$ で、非通過精子の $25.6 \pm 9.4\%$ に比べ有意に高値であった。

以上の成績から、ヒト精子にも他の哺乳動物と同様に zona induced acrosome reaction が存在することが確認された。頸管粘液は acrosome reaction を誘発することはないが、その後の zona induced acrosome reaction が増加することから capacitation を促進することが示唆された。

Synopsis Zona induced acrosome reaction of human spermatozoa was examined by FITC labelled PSA staining.

When human spermatozoa were incubated with salt stored human eggs for 6 hours, the percentage of acrosome reacted spermatozoa was $35.7 \pm 17.7\%$. The zona induced acrosome reaction rate was significantly higher than that of the spontaneous acrosome reaction ($2.8 \pm 1.9\%$). These data indicate that the zona pellucida of the human egg have the ability to induce the acrosome reaction as in other mammalian zona.

Additionally the effect of cervical mucus on the acrosome reaction was examined. Spermatozoa which passed through the cervical mucus were collected and examined for the rate of spontaneous and zona induced acrosome reaction. The rate of spontaneous acrosome reaction was almost the same as the control, but the rate of zona induced acrosome reaction ($51.6 \pm 6.8\%$) was significantly higher than that of the control ($25.6 \pm 9.4\%$). These data suggest that spermatozoa appear to complete capacitation by passing through cervical mucus.

Key words: Acrosome reaction • Zona pellucida • Cervical mucus

緒 言

哺乳動物精子の先体反応 (acrosome reaction) には、培養液中で誘起される spontaneous acrosome reaction と透明帯 (zona pellucida) に結合した後誘起される zona induced acrosome reaction が知られている。しかしヒトについての

知見は乏しく、acrosome reaction が受精現象の重要なプロセスの一つと考えられている現在、ヒト精子の zona induced acrosome reaction の存在を確認しておくことは急務と思われる。

今回われわれは salt stored human egg の透明帯を用いてヒト精子の zona induced acrosome

reaction について検討を加え、同時に acrosome reaction 発現に与える頸管粘液の影響も調べたので報告する。

方 法

1. 精子の回収と処理

健康男子から用手法にて得られた精液を室温に30分間静置して液化後、45%percoll 2.0ml に層積し、900×g で20分間遠心した。得られた sperm pellet に modified Biggers, whitten and whittinghams 液 (以下 mBWW と略す) を3.0ml 加えて攪拌し、再度300×g で10分間遠心した後上清を除去して約0.5ml の高濃度精子浮遊液を作成した。この精子浮遊液に mBWW を2.0ml 層積して30分の swim up 法を施行し、mBWW 中から運動良好精子を回収した。回収精子の運動率は90~100%を示し、最終精子濃度を 10×10^6 /ml になるように調整して実験に供した。

2. 頸管粘液通過精子の回収

1ml のツベルクリン注射器に mBWW 0.2ml と成熟婦人から排卵日に採取した頸管粘液 (cervical mucus: 以下 CM と略す) 0.2ml を混合しないように充填し、CM 層が下方になるようにして精子浮遊液中に垂直に立て、5%CO₂ in air, 37℃の incubator 内に静置した。2時間後、頸管粘液と培養液の境界部を注射器ごと切断して培養液を取り出し、その中に移行した精子を回収した。

3. Salt stored human egg の作成、保存、処理

手術で得られた卵巣を phosphate buffered solution (PBS) 中で細切し、実体顕微鏡下に卵胞卵を探し出した。卵採取にあたっては勿論患者の同意は得てある。

卵胞卵を成熟用培養液 (表1) に移して48時間培養した。

形態学的に成熟したと認められた卵子を1.0M (NH₄)₂SO₄+40mM Hepes+0.5% Dextran (pH 7.0) の高濃度塩溶液に浸して4℃で保存した。

使用時は0.9%NaCl+20mM Hepes+0.3% human serum albumine (HSA)(pH 7.4)の溶液に1時間静置することで十分に洗浄して実験に供した。

表1 ヒト卵子成熟用培養液

Material	Amount
TC Medium 199 ^{a)}	80ml
Fetal calf serum ^{b)}	20ml
Lactate/Pyruvate stock soln. ^{c)}	5ml
Antibiotics stock soln. ^{d)}	0.1ml
NaHCO ₃	160mg
Distilled water	20ml

This mixture has pH 7.3 under 5% CO₂ in air and an osmolality of about 290mOsmol.

^{a)} Hank's solution; base; Difco Lab., Detroit, MI.

^{b)} Heat-inactivated; Grand Island Biol. Co., Grand Island, NY.

^{c)} 200mM Na-lactate and 20mM Na-pyruvate in distilled water, stored frozen until use.

^{d)} 100,000IU K-Penicillin G and 50mg/ml streptomycin sulfate in distilled water, stored frozen until use.

4. Zona induced acrosome reaction の誘起

ペトリ皿に0.5ml の mBWW を用意し、その中に濃度が 10×10^6 /ml になるように調整した精子と2~5個の salt stored human eggs を入れミネラルオイルでカバーして5%CO₂ in air, 37℃で培養した。3時間後、mBWW 内で静かに洗浄してから精子が付着した状態のままの salt stored eggs を新しい mBWW に移しさらに培養を続けた。3時間後 micropipette で pipetting を繰り返すことにより透明帯から付着精子をできる限り離脱させ、それを回収して後述の方法で acrosome reaction の状態を調べた。また CM 通過精子は回収後に salt stored human eggs に媒精し1時間後に新しい mBWW に移しさらに3時間培養を続けた。なお、対照群は mBWW 内で2時間前培養した後、同様の処理を行った。

5. Acrosome reaction の観察方法

被検精子をスライドガラス上に塗抹し、自然乾燥の後95%メタノール中に2時間おいて固定した。その後新しい蒸留水に10分間ずつ3度浸して洗浄し、遮光下に30ug/ml Fluorescein isothiocyanate (FITC) labelled pisum sativum agglutinin (PSA)溶液と3時間反応させた。再度同様に蒸留水に浸して洗浄し蛍光顕微鏡下に精子頭部の状態を観察した。蛍光顕微鏡は0—530barrier filter, DM-500+0515 dichroic-mirror, BG12 ex-

citation filter を用い, 1 検体につき50~100個の精子を1,000倍油浸レンズで観察した. Acrosome intact の精子は写真1のように acrosome cap の



写真1 先体反応 (acrosome reaction) を起こす前の精子. FITC labelled PSA 染色

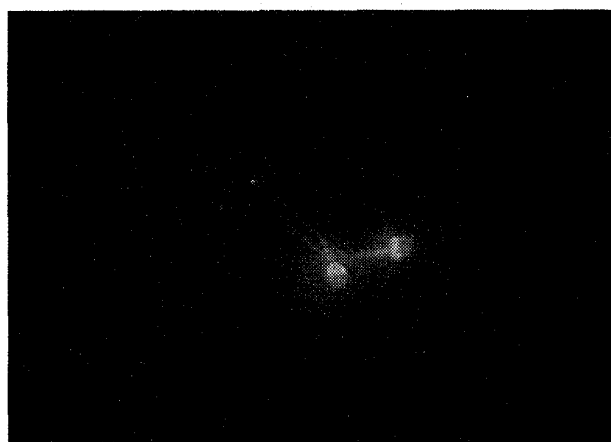


写真2 先体反応終了後の精子 (acrosome reacted sperm). FITC labelled PSA 染色

部分に蛍光を認めるが, acrosome reacted の精子は equatorial segment の部分にのみ蛍光を認め, acrosome cap の部分の蛍光は消失している (写真2). 両者の中間, すなわち均一な蛍光を認めず一部分に認めたものは modified と分類した.

結 果

精子のみを培養したときに誘起される spontaneous acrosome reaction は培養 6 時間後で $2.8 \pm 1.9\%$ (実験回数 9 回) の精子に観察された. 透明帯に接着させたときは, 同じ培養時間で精子全体の $35.7 \pm 17.7\%$ (実験回数 9 回) が acrosome reaction を起こしており, これは spontaneous acrosome reaction に比べ有意に高値である ($p < 0.01$, 表2). なおこの時点では両群とも依然 90~100%の運動率を維持していた.

CM を通過した精子を 2 時間後に回収し, さらに 1 ないし 4 時間培養した時の acrosome reacted sperm の割合はそれぞれ $3.5 \pm 2.6\%$, $6.9 \pm 6.0\%$ (実験回数 5 回) で, これは control の $2.6 \pm 2.0\%$, $1.8 \pm 0.6\%$ (実験回数 5 回) と差を認めなかった. しかし詳細にみると, acrosome reaction

表2 培養 6 時間後における Acrosome reacted sperm の割合

Existence of Zona pellucida in medium	% of Acrosome reacted spermatozoa (Mean $\pm$ SD)
- (n=9)	2.8 ± 1.9
+ (n=9)	35.7 ± 17.7 *

* $p < 0.01$

表3 CM 通過精子の Acrosome reaction

Groups	Existence of Zona pellucida in medium	% of Acrosome reacted spermatozoa (Mean $\pm$ SD)	
		Incubation time	
		3 hrs ^{a)}	6 hrs ^{b)}
Control	- (n=5)	2.6 ± 2.0 *	1.8 ± 0.6 **
	+ (n=5)		25.6 ± 9.4 ***
Sperm passed through CM	- (n=5)	3.5 ± 2.6	6.9 ± 6.0
	+ (n=5)		51.6 ± 6.8

^{a)} 1 hr after passage through CM

^{b)} 4 hrs after passage through CM

* NS ** NS *** $p < 0.002$

が modified と判定された精子は CM 通過精子に多く認められ、それぞれ $26.7 \pm 14.3\%$, $33.0 \pm 17.2\%$ で control の $7.0 \pm 7.0\%$, $6.9 \pm 7.3\%$ に比べ有意に高値を示していた ($p < 0.05$).

次に CM 通過 (2 時間) 後透明帯に 4 時間接着させた精子を調べてみると, acrosome reacted sperm の割合は $51.6 \pm 6.8\%$ (実験回数 5 回) を示し, これは CM を通過させないで透明帯に接着させた場合 control の $25.6 \pm 9.4\%$ (実験回数 5 回) に比べ有意に増加していた ($p < 0.002$) (表 3).

考 察

精子の acrosome reaction が受精現象に不可欠な過程であることはよく知られた事実である. そしてこれには培養液中で誘起される spontaneous acrosome reaction と, 透明帯に結合した後に誘起される zona induced acrosome reaction が確認されている^{10)~12)}. Acrosome reaction 発現のメカニズムについてはレセプターレベルでの解析もなされている⁵⁾⁶⁾が, その実体はいまだ不明な点が多く, ヒト精子においてはなおさらである. しかし Cross et al.⁸⁾は凍結保存後融解したヒト卵の透明帯に精子を付着させ, 透明帯ごと染色観察してヒト精子にも他の哺乳動物同様 zona induced acrosome reaction のあることを報告している. われわれは同様の検討を salt stored human eggs を使用して, acrosome を蛍光染色することで行ってみた. この場合 salt store された透明帯が新鮮卵のと同様の機能を保持しているかどうかの問題であるが, 既に salt stored hamster eggs の透明帯が acrosome reaction 誘起に関して新鮮透明帯と全く変らないことを確認しており³⁾¹³⁾, 透明帯の組成から見てもヒトにも同じことが言えるものと考えている. Acrosome reaction の確認は FITC labelled PSA 染色法を用いたが, 本法は Cross et al.⁷⁾により確立された方法である. PSA は精子先体内部に存在する glycoconjugate に反応する物質であり, これに FITC をラベルすることにより精子の先体反応を光学顕微鏡レベルで簡単に確認できる. また pipetting の acrosome reaction に及ぼす影響についても考慮しなくてはならない. 6 時間の前培養の後の

spontaneous acrosome reaction と培養後 pipetting を行つた群との acrosome reaction の比較検討を行っていた. Control 群は reacted $19.3 \pm 3.8\%$, modified $45.4 \pm 15.0\%$: Pipetting 群は reacted $22.8 \pm 6.3\%$, modified $41.3 \pm 16.0\%$ と両群間に差は認めず, 本実験系に関する限り pipetting の影響はないと判断された. なおこれらの数値は個体差, 実験条件によりかなりの差を生じる場合があり, 本実験の結果の数値と若干異なることを付記しておく. 今回の実験で, 透明帯に付着した精子の acrosome reaction は, spontaneous acrosome reaction に比べ明らかに多く, ヒト精子における zona induced acrosome reaction の存在が追認されたものと考えている. In vivo で精子が卵に到達するまでに通過しなくてはならない環境の代表的なものとして頸管粘液と顆粒膜細胞層があげられるが, これらの acrosome reaction に及ぼす影響も無視することができない. そこで今回は従来から capacitation 促進作用が示唆されている¹⁴⁾⁹⁾頸管粘液の影響について検討を加えることにした. その結果, 頸管粘液通過直後の精子は acrosome reaction を完了していないが, その後 zona induced acrosome reaction が control に比して有意に高率に起こること, また通過後に modified と分類される精子が多く認められる事実が判明した. Modified と分類された精子の概念としては, acrosome reaction 進行途上の精子と考えているが, acrosome reaction 完了とは言えない状態であり, 精子が透明帯上のレセプターに結合, ないしは何らかのシグナルに接した段階で速やかに acrosome reaction が進行する状態と推測している. 頸管粘液通過精子を引き続き培養していても spontaneous acrosome reaction の割合は control と差を認めない事実から, modified の状態は acrosome reaction 準備完了段階であり, この状態の精子が, 頸管粘液通過精子に多く認められるということは, 頸管粘液内で capacitation の過程が促進されていることを強く示唆するものである. 頸管粘液がどのような機序で capacitation を誘起するのかという問題については, 頸管粘液による洗浄効果と考えられる.

Capacitation という概念が精子表面の decapacitation factor の除去と考えられている現在, in vivo における最も効果的な洗浄過程は, 頸管粘液の通過と思われる。なお, 顆粒膜細胞層については, capacitation, acrosome reaction を共に誘起しないことは, 既に報告してある²⁾。ヒト精子にも zona induced acrosome reaction が存在すること, そして頸管粘液に capacitation 促進効果のあることは in vivo における受精現象の巧妙さを示すもので, より有効な vitro の受精を検討するうえで極めて示唆に富むものとする。

文 献

1. 伊熊健一郎, 須野成夫, 長谷川昭子, 香山浩二, 磯島晋三: ヒト精子の頸管粘液内通過の意義—試験管内受精実験による精子の受精能獲得についての検討—。日産婦誌, 41: 167, 1989.
2. 菅野孝子, 吉松宣弘, 柳田 薫, 星 和彦, 佐藤章: ヒト精子 acrosome reaction 発現と顆粒膜細胞群。日本受精着床会誌, 8: 190, 1991.
3. 吉松宣弘: Salt-stored egg の透明帯機能保存に関する研究。福島医誌, 38: 385, 1988.
4. Barros, C., Jedlicki, A., Herrera, E., Argello, B., Vigil, P., Villaseca, P. and Leontie, E.: Human sperm-cervical mucus interaction and the ability of spermatozoa to fuse with zona-free hamster oocytes. J. Reprod. Fert., 82: 477, 1988.
5. Bleil, J.D. and Wasserman, P.M.: Mammalian sperm-egg interaction: Identification of glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. Cell, 20: 873, 1980.
6. Bleil, J.D. and Wasserman, P.M.: Sperm-egg interactions in the mouse: Sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. Dev. Biol., 95: 317, 1983.
7. Cross, N.L., Motaes, P., Overstreet, J.W. and Hanson, F.W.: Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. Gamete Res., 15: 213, 1986.
8. Cross, N.L., Morales, R., Overstreet, J.W. and Hanson, F.W.: Induction of acrosome reactions by the human zona pellucida. Biol. Reprod., 38: 235, 1988.
9. Overstreet, J.W., Gould, J.E., Katz, D.F. and Hanson, F.D.: In vitro capacitation of human spermatozoa after passage through a column of cervical mucus. Fertil. Steril., 34: 604, 1980.
10. Uto, N., Yoshimatsu, N. and Yanagimachi, R.: The zona-induced acrosome reaction of hamster spermatozoa. J. Exp. Zool., 248: 113, 1988.
11. Yanagimachi, R.: Mammalian fertilization. In "The Physiology of Reproduction" (eds. E. Knobil and J.D. Neil), 135. Raven Press, New York, 1988.
12. Yoshimatsu, N. and Yanagimachi, R.: Effects of cations and other medium components on the zona-induced acrosome reaction of hamster. Dev. Growth Diff., 30: 651, 1988.
13. Yoshimatsu, N., Yanagimachi, R. and Lopata, A.: Zonae pellucidae of salt-stored hamster and human eggs: Their penetrability by homologous and heterologous spermatozoa. Gamete Res., 21: 115, 1988.

(No. 7107 平3・11・5 受付)