

P-143 マウス卵細胞質内精子注入法における卵細胞内カルシウムイオン画像解析

順天堂大, 東女医大 第2生理学*

中野義宏, 佐藤雄一, 豊成由佳, 淡路正則,
武内裕之, 三橋直樹, 桑原慶紀,
白川英樹*, 宮崎俊一*

【目的】受精時の卵細胞内カルシウム(Ca)濃度の上昇は卵活性化の必須因子である。ヒトをはじめ哺乳動物卵の通常の受精では, 小胞体からのCa遊離による精子結合部位からの伝播性Ca波(Ca wave)と反復性Ca増加(Ca oscillation)が起こる。昨年の本学会において我々はマウス細胞質内精子注入法(ICSI)においても, Ca oscillationが起こることを報告したがそのメカニズムは解明されていない。このため我々は注入された精子周囲に通常の受精と同様にCa waveが発生するか否かに焦点をあて画像解析を行った。

【方法】BDF1マウスの成熟卵にpiezo micro manipulatorを用いる方法によりICSIを行い, 翌日に受精(2細胞胚以上に発育)が確認された卵5個について検討した。共焦点レーザー走査顕微鏡(Zeiss LSM310)を用い, Calcium Greenを指示薬として, 精子による最初のCa増加反応の卵細胞内分布を2秒ごとに60分まで解析した。対照として, 通常の体外受精の最初のCa増加反応を解析した(n=3)。

【結果】ICSIでは精子注入直後の培養液流入によると思われる一過性のCa増加が終了した後, 精子注入後30分以内に1回目のCa増加を認めた。対照では受精直後より16-28 $\mu\text{m}/\text{sec}$ の速さでCa waveが反復性に観察されるのに対し, ICSI卵では全体にほぼ均一なCa濃度の上昇が観察されたのみであった。その後のCa oscillationは両者とも同様に認めた。

【結論】ICSIでは通常の受精のように精子周囲から発するCa waveは認められず, Ca oscillationの誘起は通常の受精とは異なった機序で起こる可能性が示された。

P-144 円形精子細胞注入マウス卵の活性化法: 非分解性IP3アナログの利用

順天堂大, 東京女子医大 第二生理学*

佐藤雄一, 桜井明弘, 中野義宏, 豊成由佳,
淡路正則, 武内裕之, 三橋直樹, 桑原慶紀,
宮崎俊一*

【目的】円形精子細胞(RS)の卵内注入は新しい不妊治療法として期待されている。マウスではRS注入のみでは卵の活性化が起こらず, 人為的な活性化が必要である。正常受精時には卵細胞内Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)上昇が反復して起こるが, これは主にIP3レセプターを介する小胞体からのCa²⁺遊離によることが知られている。我々はRSの卵注入時の卵活性化と雄性前核の形成における非分解性IP3アナログ(アデノホスチン:ADP)の有効性とその機序について検討した。

【方法】BDF1マウス精巣を細切濾過し, 細胞の大きさと形態からRSを選別した。過排卵処理で同種雌卵管から成熟卵を得, 卵丘細胞を除去し, RSとADP(A群n=342), RSのみ(B群n=14), ADPのみ(C群n=14)をそれぞれ顕微注入した。一部の注入卵では予めCa²⁺結合性蛍光指示薬fura-2を取り込ませ, 画像解析装置により[Ca²⁺]_iを測定した。

【成績】1. 卵活性化と前核形成。A, B, C各群における生存率は各々90, 86, 92%, 二次極体+雌雄前核形成率は54, 0, 0%, 二次極体+雌前核形成率は39, 0, 100%, 二分割率は97, 0, 100%であった。2. ADPによる[Ca²⁺]_i増加反応。注入(ピペット内濃度10 μM)直後から, 正常受精時と同様に一過性の[Ca²⁺]_i増加反応(ピーク値約500nM)が規則的に反復しておこり, 徐々に振幅が減衰, 間隔が延長しつつ2~3時間持続した。低濃度(5, 2 μM)の注入では持続時間が約40分, 15分と短縮した。

【結論】RSの注入卵はADPによって高率に活性化され, RSの核は, 50%以上雄性前核に発達した。反復性[Ca²⁺]_i増加は, 胚の発生率や質を向上させることが示唆されており, この方法はRS注入時の卵活性化に有効であることが示された。