

シンポジウム1 受精機構とその異常

卵細胞膜と精子の相互作用

—ヒト卵細胞膜多精子受精防御機構の解析の視点から—

旭川医科大学産婦人科学教室

千 石 一 雄

Interaction of Oocyte Plasma Membrane and Spermatozoa
—Plasma Membrane Block to Polyspermy in Human Oocytes—

Kazuo SENGOKU

Department of Obstetrics and Gynecology, Asahikawa Medical College, Asahikawa

Key words : Plasma membrane · Polyspermy block · ICSI · Parthenogenetic activation · Integrin

緒 言

受精は卵子と精子の相互作用によるものであり、受精の成立には1) 精子の卵子透明帯への結合, 侵入, 2) 精子細胞膜と卵細胞膜の結合, 融合, 侵入, 3) 卵子の活性化の各ステップが正常に機能しなければならない。また, 単一精子による受精すなわち多精子受精防御機構の作動が正常受精の成立に不可欠であることはいうまでもない。多精子受精防御の作動部位は動物種で異なることはよく知られた事実であり, ヒト卵においても, 受精後の表層顆粒の放出による透明帯の構造・機能の変化が多精子受精防御に重要な役割を担っていることが報告されている。しかし, ヒト卵細胞膜の多精子受精防御機構に関してはその存在を含め不明な点が多い。卵子と精子の相互作用に関しては, 精子細胞膜上のADAMs family とくに fertilin, cyritestin と卵細胞膜上のインテグリンが卵細胞膜と精子の結合, 融合に関与することが報告されており¹⁾²⁾, 最近, 卵細胞膜上のCD9がノックアウトマウスの実験から精子と卵子の融合に直接関与する成績が報告されている³⁾。しかし, これらの接着分子と多精子受精防御機構の関連に関してもいまだ未解明である。本研究は卵細胞膜と精子の相互作用の一端を解明するべく, ヒト卵細胞膜の多

精子受精防御機構に焦点を当て, その存在の有無, 作用機序の解明を主な目的とした。さらに, 精子細胞膜と卵細胞膜の相互作用を介さない受精, すなわち卵細胞質内精子注入法(ICSI)による授精卵の細胞遺伝学的正常性を明らかにすることより, 受精障害および異常受精症例の安全性の高い受精法を確立することを第2の目的とした。

研究方法および成績

1. ヒト卵の多精子受精防御作動部位

ヒト卵子における多精子受精防御の主要な作用部位を明らかにするため, 体外受精時の多精子受精発生頻度および発生に関与する因子を体外受精の臨床成績より検討した。また, 透明帯をバイパスした受精である囲卵腔内精子注入法(SUZI)と通常 of 体外受精の多精子受精発生率の比較検討からヒト卵子の多精子受精防御作動部位を検討した。

排卵誘発法別の多精子受精率は Clomid/hMG 法(39周期), hMG 単独(50周期), GnRHa/hMG 法(421周期)の排卵誘発法の違いによる差は認められず, 全体の多精子受精率は6.2%であった。また, 母体年齢は多精子受精率に影響を与えず30歳未満, 30~35歳, 36歳以上の各群とも6.1~6.7%の多精子受精率を示した。卵子成熟度と多精子受精率

の検討では、未成熟卵では受精率は40.9%と成熟卵の80.4%に比し有意に低値を示し、逆に多精子受精率は未成熟卵で成熟卵に比し有意に高値を示した。媒精濃度と多精子受精率との関係では、媒精濃度と多精子受精発生頻度に相関が認められ、媒精濃度10万/ml以下では多精子受精率は3.6%であったのに対し20万/ml以上では有意な上昇が認められ、卵子の未熟性と媒精精子数の増加が多精子受精の増加に関連することが明らかとなった。一方、SUZI 54周期の受精率は30.5%で通常の体外受精時の受精率と比べ有意な低値を示したが、多精子受精率は反対に34.5%認められ、明らかに高率であった(図1)。したがって、透明帯をバイパスした受精法で多精子受精が高率に認められることより、ヒト卵では透明帯が多精子受精防御の主要な役割を担うことが確認された。

2. ヒト卵細胞膜多精子受精防御

ヒト卵において受精後、精子の卵細胞膜への結合、卵細胞質内への侵入を阻害する機構が存在するか否かを検討した。まず、その解析モデルの確立を目的として、体外受精時に受精の認められない1 day 又は2 day old 未受精卵を用いた透明帯除去卵により卵細胞膜への精子結合・侵入の評価が可能か否かを解析した。なお、以下の実験に用いた精子、卵子は患者の同意および施設の承認を得て使用した。体外受精時の未受精卵を0.1%pronase、又は、酸性タイロド液のいずれかをを用い透明帯を除去し3時間の回復時間をおいた後、10万/mlの濃度でcapacitationを誘起した精子を媒精、18~20時間後の侵入精子数、前核形成数を検討した。

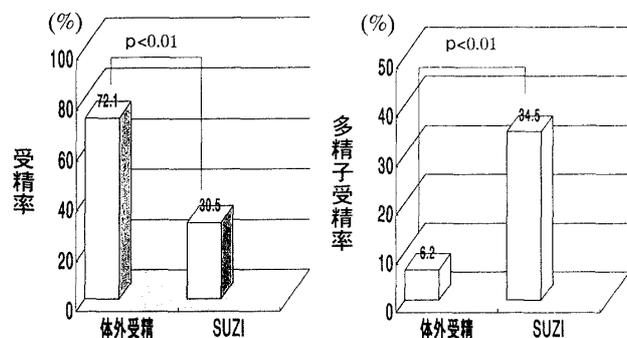


図1 体外受精とSUZIの受精率・多精子受精率の比較

また、精子侵入に及ぼす精子側の影響を分析するため体外受精時の受精率ごと(受精率>30%, <30%, 0%)に分類した精子を媒精し検討するとともに、卵子側の影響を分析するため同様に体外受精時の受精率0%(原因不明群, 男性因子群)群と受精率70%以上群より得られた卵子に正常精子を媒精し精子侵入率、前核形成数を検討した。その結果、患者精子を用いた場合、体外受精時の受精率と精子侵入率、前核形成数は相関を示し、ヒト透明帯除去卵への精子侵入には精子自体の受精能が影響することが明らかとなった。一方、正常精子を媒精した際には、卵子のsourceに関係なく各群とも85%以上の精子侵入率が認められた(表1)。したがって、体外受精時の未受精卵を用いた透明帯除去卵により卵細胞膜への精子の結合・侵入の評価が可能であり、しかも、卵子の質に影響されないことより卵細胞膜多精子受精防御機構解析モデルとして、このモデルが有用であることが示された。

この解析モデルを使用し、受精後ヒト卵細胞膜において精子結合・侵入を阻害する機構が存在するか否かを検討するため、ヒト透明帯除去卵に10万/ml又は1万/mlの濃度で正常精子を媒精し、経時的に3時間までの結合および侵入精子数を検討した。精子結合・侵入の評価は媒精前にあらかじめHoechst 33342(1μg/ml)で卵を培養し、dye transfer techniqueを用い評価した。さらに、媒精2時間後に洗浄し再媒精した再媒精群と非再媒精群の結合・侵入精子数を比較した。受精卵の卵細胞膜精子結合能を評価するため前核期卵、初期分割卵を用い透明帯を除去後同様に処理し精子結合

表1 ヒト透明帯除去卵精子侵入に及ぼす精子側および卵子側の影響

卵子側の影響	受精率>70%	受精率0%	
		男性因子	原因不明
精子侵入卵数(%)	89.3	84.7	88.9
前核形成数	5.5±1.8	5.8±1.8	5.5±1.7
精子側の影響	受精率>30%	受精率<30%	受精率0%
		p<0.01	
精子侵入卵数(%)	90.0	72.7	45.3
前核形成数	5.4±1.6	3.8±1.2	3.1±1.0

・侵入を検討した。

結合・侵入精子数の経時的変化の検討では、侵入精子は30分後からすでに認められ、媒精濃度の上昇に従い増加を示すが、いずれも2時間後には最大となりその後の新たな精子侵入は認められなかった。結合精子数も同様に、媒精濃度が高いほど増加するが、いずれの媒精濃度においても時間の経過とともにやや減少する同様のパターンを示した(表2)。この結果は、媒精後2時間以降は卵細胞膜レベルで精子の結合・侵入を阻害する機構が成立することを示唆するものと考えられた。さらに、再媒精実験では非再媒精群と再媒精群の侵入・結合精子数は各々 5.4 ± 0.8 , 3.8 ± 0.7 , 5.8 ± 0.7 , 3.4 ± 0.6 と差は認められず卵細胞膜における精子結合・侵入阻害機構の存在を確認した(表3)。受精卵の検討では、前核期卵では25卵中2卵のみに精子侵入が認められ、結合精子数も未受精卵に比

し有意に低値を示し、2細胞期以降では侵入精子は認められず結合精子数も極端な減少を示すことから、卵細胞膜の精子結合阻害は受精後継続し、また、胚発生の進行とともに強固なものになると推測された。

3. ICSI 授精卵, 単為発生卵の卵細胞膜における精子結合

通常の受精と異なり精子細胞膜と卵細胞膜の融合を介さない受精である ICSI, 単為発生による受精卵の卵細胞膜における精子結合能を検討するため、体外受精時の未受精卵に ICSI を施行し得られた前核期卵, $5 \mu\text{M}$ カルシウムイオノホア- (CaA) で5分処理後, $10 \mu\text{g/ml}$ puromycin で単為発生を誘起し得られた前核期卵を機械的に透明帯を除去後媒精し結合・融合・侵入精子数を検討した。対照として未受精卵の透明帯除去後1万/mlの精子を媒精し得られた前核期卵を用いた。結合, 融合, 侵入精子は前核が消失した時点で dye transfer technique を用い評価した。Hoechst 33342の濃度を $0.1 \sim 0.2 \mu\text{g/ml}$ に減少させることにより結合精子と融合精子の鑑別が可能となった。ICSIを施行した60卵中30卵(50%), CaA-puromycin 処理した50卵中35卵が前核期まで発生し、また、対照卵として35個の前核期卵を実験に使用した。対照卵では35卵中2卵のみに精子侵入を認め、融合精子数および結合精子数は 0.2 ± 0.1 , 0.6 ± 0.2 を示した。一方、ICSI卵, 単為発生卵では大部分の卵子で平均3匹の精子侵入が認められた。融合, 結合精子数はICSI卵, 単為発生卵の間では差は認められないが(3.5 ± 0.6 , 4.3 ± 0.6 , ICSI卵 3.0 ± 0.3 , 3.8 ± 0.4 単為発生卵), 対照卵に比し有意に高値を示した(表4)。この結果より、精子と卵細胞膜の融合を介さないICSI卵, 単為発生卵では卵細胞膜における精子の結合, 融合阻害が成立しないことが示唆された。

表2 ヒト透明帯除去卵への結合・侵入精子数の経時的変化

	媒精後の時間(分)				
	30	60	90	120	180
媒精濃度($10^4/\text{ml}$)					
侵入精子数	1.2 ± 0.2	1.7 ± 0.2	2.4 ± 0.3	2.6 ± 0.4	2.6 ± 0.5
結合精子数	2.3 ± 0.2	1.7 ± 0.2	1.7 ± 0.2	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.2
媒精濃度($10^5/\text{ml}$)					
侵入精子数	1.3 ± 0.3	2.9 ± 0.4	5.0 ± 0.6	5.5 ± 0.6	5.6 ± 0.7
結合精子数	3.0 ± 0.6	3.4 ± 0.6	3.2 ± 0.6	2.9 ± 0.5	2.8 ± 0.5

表3 ヒト透明帯除去卵における媒精および再媒精後の結合, 侵入精子数の比較

	卵子数	侵入精子数/ 卵(M \pm SE)	結合精子数/ 卵(M \pm SE)
媒精	55	5.4 ± 0.8	3.8 ± 0.7
再媒精	56	5.8 ± 0.7	3.4 ± 0.6

表4 受精卵, ICSI 授精卵, 単為発生卵の結合・融合・侵入精子数の比較

	卵子数	精子侵入卵数(%)	侵入精子数	融合精子数	結合精子数
受精卵	35	2(5.7)	0.06 ± 0.04	0.2 ± 0.1	0.6 ± 0.2
ICSI卵	30	29(96.7)	3.1 ± 0.3	3.5 ± 0.6	4.3 ± 0.6
単為発生卵	35	34(97.1)	2.7 ± 0.2	3.0 ± 0.3	3.8 ± 0.4

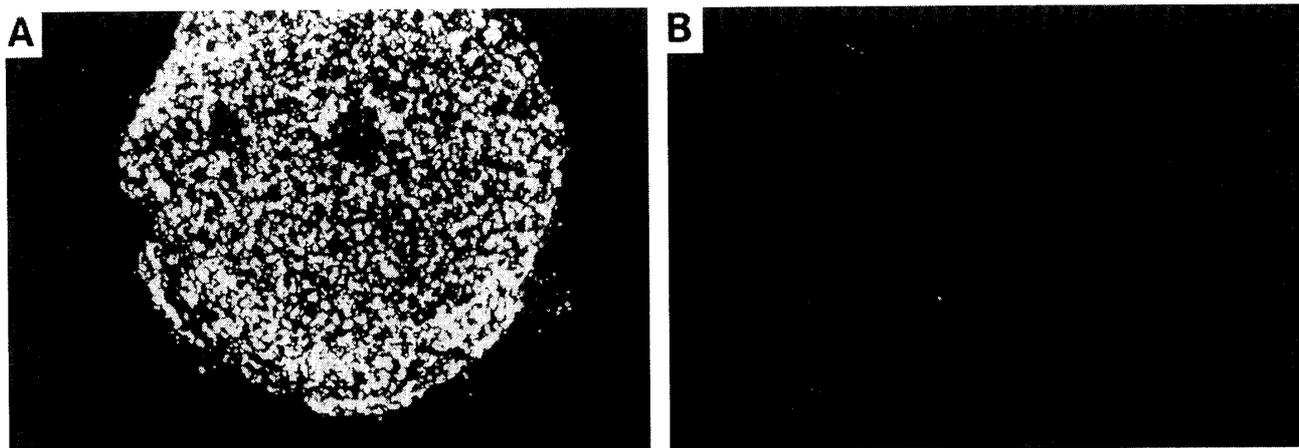


写真1 卵細胞質内表層顆粒
A. 未受精卵, B. ICSI 授精卵

4. ICSI 卵, 単為発生卵, 受精卵の表層顆粒放出動態

ICSI 卵, 単為発生卵と通常の受精卵の表層顆粒放出動態を比較検討するため, 上記の方法で得られた ICSI, 単為発生前核期卵, 対照の前核期卵また未受精卵の卵細胞質内表層顆粒を蛍光染色し比較した(写真1). 染色は3.7%パラホルムアルデヒドで30分固定後, 0.1%Triton 処理し10 μ g/ml LCA (lens culinaris agglutinin)により染色した. 未受精卵の表層顆粒密度は平均 $35 \pm 2.3/100\mu\text{m}^2$ であったのに対し, 通常の受精卵, ICSI 授精卵, 単為発生卵では各々 3.1 ± 0.5 , 3.3 ± 0.6 , $3.8 \pm 0.7/100\mu\text{m}^2$ で3群間に差は認められないが, 未受精卵に比し有意に低値を示した. また, 各々の卵子間で表層顆粒の染色に相違が認められ, 実際に受精卵, ICSI, 単為発生卵で表層顆粒の完全放出を認めた卵は49%程度であった. ICSI 授精卵, 単為発生卵の表層顆粒の放出は通常の受精卵と同等であったことより, 受精後の卵細胞膜における精子結合・融合阻害の成立に表層顆粒の放出は直接的には関与しないことが示唆された.

5. 卵細胞膜における精子結合, 融合阻害への接着分子(CD9およびインテグリン)の関与

ヒト卵細胞膜と精子の結合, 融合過程および卵細胞膜における精子結合阻害の成立に関する接着分子の役割を明らかにするため, 特にCD9とインテグリンに着目し検討した. まず, 未受精卵, 通

常の受精卵, ICSI 授精卵の卵細胞膜 CD9の発現動態を蛍光抗体法により比較した. 体外受精時の未受精卵を用い上記の方法で得られた未受精卵, ICSI による前核期卵, 通常の受精による前核期卵の透明帯を酸性タイロイド液(pH 2.5)で除去後4%パラホルムアルデヒドで45分間固定, マウス抗ヒト CD9抗体を一次抗体として30分処理, FITC-家兎 IgG を二次抗体として染色後蛍光顕微鏡下に卵細胞膜上の発現を観察した. また, 未受精卵の透明帯除去後抗ヒト CD9抗体200 μ g/ml で30分処理洗浄後媒精し, 結合, 融合, 侵入精子数に関し dye transfer technique により無処置卵と比較検討した. CD9は未受精卵および ICSI 卵細胞膜上に発現を認め, 体外受精後の受精卵では発現が認められなかった(写真2). 抗 CD9抗体処理卵では結合, 融合精子数は 10.6 ± 3.3 , 0.4 ± 0.5 と無処置卵の 16.6 ± 4.9 , 3.6 ± 1.6 と比較し結合精子数には差は認められないが融合精子数は有意な減少を認めた. さらに, 侵入精子は無処置卵で 1.3 ± 0.8 であったのに対し抗 CD9処理卵ではまったく認められず, CD9はヒト卵細胞膜と精子の融合ならびに卵細胞膜における精子結合・融合阻害の成立に関与する可能性が示唆された(表5).

また, 未受精卵, 受精卵, ICSI 授精卵の卵細胞膜上インテグリンの発現動態を CD9と同様の方法で比較検討した(写真3). α サブユニットに関しては未受精卵細胞膜上には $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$,

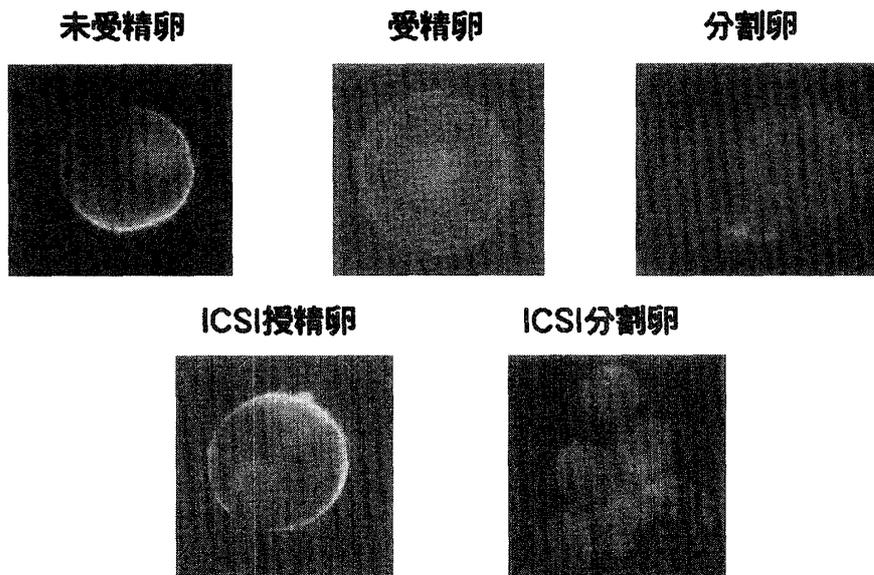


写真2 卵細胞膜上のCD9の発現

表5 抗CD9抗体処理の精子結合・融合・侵入に及ぼす影響

	結合精子数	融合精子数	侵入精子数
未受精卵	16.6±4.9 (10~25)	3.6±1.6 (1~5)	1.3±0.8 (1~2)
抗CD9抗体処理卵	10.6±3.3 (5~15)	0.4±0.5 (0~1)	0

p<0.01

$\alpha 6$, αV , αM の発現が認められ, ICSI 授精卵でも上記の α サブユニットの発現を認めた. 体外受精卵では $\alpha 3$, $\alpha 6$, αV , αM の発現は認められなかったが, それ以外のサブユニットの発現を認めた. 一方, β サブユニットに関しては未受精卵, ICSI 授精卵において $\beta 1 \sim 6$ の発現を認めたが, 体外受精卵では $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 6$ の発現は認められなかった. 未受精卵, ICSI 授精卵で発現を認め, 受精卵で発現が消失するインテグリン α , β サブユニットのヘテロダイマーの組み合わせを考慮すれば, α , β サブユニットの両者が変化するものとして $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 6$, $\alpha 6\beta 4$ があげられ, そのリガンドとしてビトロネクチン, フィブロネクチン, ラミニンが報告されている. 一方, 片方のサブユニットのみが変化する組み合わせとして $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha M\beta 2$ が考えられそのリガンドとしてフィブロネクチン, ビトロネクチン

のほかに $\text{fertilin } \beta$, C3b が考えられる(表6). したがって, 精子と卵細胞膜の結合・融合過程また, 受精後の卵細胞膜における精子の結合・融合阻害に複数のインテグリンの消退が関与する可能性が示唆された.

6. ICSI 授精卵の細胞遺伝学的正常性

ICSI による授精卵の卵子と精子の染色体を個別に検討するため, マウス卵とヒト精子の異種間 ICSI を施行した. B6D2F1 マウスを 5 単位 PMSG, 5 単位 hCG で過排卵誘起し卵管から排卵卵子を採取した. ヒアルロニダーゼで卵丘細胞を除去後正常ヒト精子をピエゾドライブを用い ICSI を施行した. 前核形成を認めた後 $0.006 \mu\text{g/ml}$ vinblastine 添加 CZB 培養液中で 10 時間培養後の第 1 卵割中期の染色体を解析した. 染色体標本は漸進空気乾燥固定法 (Kamiguchi et al.)⁵⁾ により作製した. また, マウス卵では紡錘体が観察可能であり, 紡錘体を避け 90 度ずれた部位に ICSI 針を刺入する通常の ICSI と紡錘体近傍に ICSI した際の活性化率, 卵発育能, 染色体正常性に関しても同時に検討した. 卵子活性化率は通常の ICSI では 97.2% に活性化を認めたのに対し, 紡錘体近傍 ICSI では 86.1% と有意に低率であった. また, 第 1 卵割中期までの発生率は ICSI では 82.3% であったのに対し紡錘体近傍 ICSI では 65.2% と有意に低値

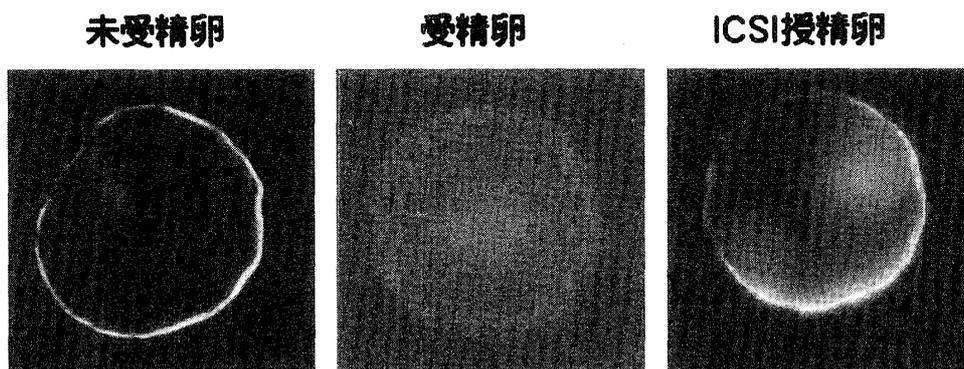
写真3 卵細胞膜上のインテグリン αV サブユニットの発現

表6 多精子受精防御に関与する可能性のあるインテグリンとリガンド

$\alpha V\beta 3$	ビトロネクチン フィブロネクチン	$\alpha 6\beta 1$	ラミニン, fertilin β
$\alpha V\beta 6$	フィブロネクチン テネイシン C ビトロネクチン	$\alpha 3\beta 1$	ラミニン, フィブロネクチン
$\alpha 6\beta 4$	ラミニン	$\alpha V\beta 1$	フィブロネクチン
		$\alpha V\beta 5$	ビトロネクチン
		$\alpha M\beta 2$	C3bi, ICAM-1, 2

表7 第2減数分裂中期卵, および1細胞期胚におけるマウス卵子の染色体分析

	分析卵数	染色体異常率(%)			
		異数性	倍数性*	構造	計*
MII	120	1(0.8)	0(0)	0(0)	1(0.8)
ICSI	112	4(3.6)	9(8.0)	0(0)	13(11.6)
紡錘体 ICSI	49	0(0)	4(8.2)	0(0)	4(8.2)

*ICSI VS. non-ICSI ($p < 0.01$)

を示した。マウス卵の染色体分析では異数性異常はICSI 3.6%, 紡錘体近傍 ICSI 0%と低率であり, この結果は metaphase II の異数性異常頻度(0.8%)と同様の成績であった(表7)。しかし, ICSI 授精卵では針の刺入部位にかかわらず第2極体放出抑制による倍数性異常が10%程度認められた。精子の染色体分析の結果ではICSIでは異数性異常6.9%, 構造異常3.4%, 紡錘体近傍 ICSI では異数性異常4.2%, 構造異常8.2%で2群間に差は認められなかった。また, この異常率は透明帯除去ハムスター卵にヒト精子を用いて体外受精した場合の精子の染色体異常率(異数性異常1.3%, 構造異常13.4%)と比較しほぼ同様の成績であることよ

り⁹⁾, ICSIによる精子の染色体異常の増加も認められない結果であった(表8)。

考 察

ヒト卵においては精子の卵細胞膜への融合・侵入により卵子が活性化しカルシウム oscillation の誘起, 表層顆粒の放出による透明帯, 特に透明帯上の精子受容体である ZP3の構造・機能の変化により精子の透明帯への結合・侵入が阻害されることが多精子受精防御の主要な機序と推測されている。本研究成績からも透明帯をバイパスした受精であるSUZI症例の精子は通常の体外受精症例の精子と比較し受精能が低下しているものと考えられるにもかかわらず, SUZIの多精子受精率が明らかに高値を示すことから, 透明帯におけるblock機構がヒト卵の多精子受精防御の主要なメカニズムであることが確認された⁷⁾。また, 多精子受精に影響する因子として媒精精子濃度, 卵子の未熟性があげられ⁸⁾, 特に未成熟卵においては表層顆粒の卵表層への移動の遅延, 小胞体におけるIP3受容体の数や親和性の減少が指摘されており, 受精後の表層顆粒の放出不全が多精子受精の増加に関与するものと推測される。

表8 1細胞期胚におけるヒト精子の染色体分析

	第1卵割 中期卵数	分析卵数	染色体異常率(%)			
			異数性	倍数性	構造	計
ICSI	108	87	6(6.9)	0(0)	3(3.4)	9(10.3)
紡錘体 ICSI	66	49	2(4.0)	0(0)	4(8.2)	6(8.2)
体外受精 (透明帯除去 ハムスター卵)		2,668	38(1.4)	0(0)	363(13.6)	401(14.7)

(Kamiguchi et al. Am J Hum Genet, 1986)

一方、卵細胞膜における多精子受精防御の存在も種々の動物で報告されており、家兎では、従来より短時間に強固な卵細胞膜多精子受精防御が成立することが知られており、ハムスター卵においても透明帯のブロックと比較し弱いながらも卵細胞膜における精子融合阻止機構の存在が報告されている⁹⁾。また、マウス卵細胞膜においても精子結合障害は媒精後60分程度で成立することが報告されている¹⁰⁾。

しかし、ヒト卵細胞膜の多精子受精防御に関しては、これまで利用可能な卵子数に制限があることなど方法論的に解析が困難であり十分な検討が行われていなかった。本研究により、体外受精時に受精の認められなかった卵を用いた透明帯除去卵が卵細胞膜における精子の結合・侵入の解析モデルとして有用性が高いことが明らかとなり、この解析モデルを用いた卵細胞膜への精子結合・侵入の経時的変化および再媒精実験の結果から、媒精後2時間までにヒト卵細胞膜においても精子の結合・侵入を阻害する機構が成立することが明らかとなった。阻害機構の成立に2時間を要する結果は、マウス卵と比較しヒト卵細胞膜の精子結合・侵入阻害は比較的slowな現象であることを示すものであると考えられる。また、低濃度の精子(1万/ml)を媒精した場合も同様の結果を示すことから、この成績は卵細胞質の侵入精子を膨化する能力の限界を示すものではなく、真の卵細胞膜の精子結合阻害を反映するものと考えられる¹¹⁾。一方、活性化法の異なる単為発生卵、ICSIによる授精卵では卵細胞膜における精子の結合・融合阻害は成立せず、また、透明帯での多精子受精防御に関与する表層顆粒の放出は卵細胞膜の精子結合

阻害の成立には直接関与しない結果が得られた。単為発生卵、ICSI卵は受精卵で認められる卵細胞膜と精子細胞膜の融合を介さないことから、卵細胞膜における精子の結合・融合阻害の成立には卵細胞膜と精子細胞膜の融合が必要不可欠であり、両配偶子細胞膜の融合により卵細胞膜に何らかの変化が生じその結果、精子の結合阻害が誘起されるものと推測される¹²⁾。

精子と卵細胞膜の結合・融合過程に関してはマウスを中心に多くの研究報告が認められ、精子細胞膜上のfertilin, CD46, フィブロネクチン, ビトロネクチンとそれに対応する卵細胞膜上の各種のインテグリンが受容体として作用することが推測されている^{13)~16)}。また、最近、ノックアウトマウスの実験からtetraspan-membrane proteins(TM4)スーパーファミリーに属するCD9が精子と卵細胞膜の融合に不可欠であることが報告された。本研究成績からヒト未受精卵において卵細胞膜上にCD9の発現を認め、また、抗ヒトCD9抗体で処理した未受精卵では融合精子数が有意に減少する結果は、ヒト卵においても精子と卵細胞膜の融合にCD9が関与することを示唆するものと考えられる。また、受精後の前核期卵では発現が消失し、精子結合・融合阻害が成立しないICSI受精卵ではCD9の発現が保たれていることより、受精後の卵細胞膜における精子結合・融合阻害にCD9の消退が関与している可能性が示唆される。インテグリンに関しては、CD9同様、未受精卵、ICSI卵で発現を認め、受精卵で発現が消失するものとして、 $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 6$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha M\beta 2$ などの複数のインテグリンがあげられ、また、これらインテグリンのリガンドに相

当するものはいずれも精子にその存在が報告されていることより、卵細胞膜と精子の結合、受精後の卵細胞膜における精子結合阻害に複数のインテグリンが関与する可能性を示唆する成績であると考えられる。

ICSIにより出生した児に関しては、自然妊娠、体外受精により出生した児の先天異常率、染色体異常率と比較し問題がないとする報告が多いが¹⁷⁾、性染色体異常頻度が高いとする報告も認められ¹⁸⁾、また、Y染色体の microdeletion などの男児への遺伝も問題としてあげられている¹⁹⁾。ヒト初期胚の FISH 法を用いた染色体の検討では、ICSI と体外受精では異数性異常に差を認めないとされているが²⁰⁾、ICSI における第2極体放出不全の頻度の増加を指摘する報告も認められる²¹⁾。本研究では精子と卵子の染色体を個別に評価するためマウス卵とヒト精子の異種間 ICSI モデルを用いて検討した結果、マウス卵染色体の異数性、構造異常は低値であり、紡錘体近傍に ICSI した場合でも異常率に差は認められない成績が得られた。本来コントロールとすべきヒト精子とマウス卵を用いた体外受精による染色体分析は困難であることから、報告されているマウス卵とマウス精子の体外受精により得られたマウス卵の染色体異常率と比較したが、ICSI による異常率の増加は認められない²²⁾。しかし、10%程度に第2極体の放出抑制を認め、この頻度は ICSI 針の刺入部位により差が認められないことより、第2極体放出抑制は紡錘体への直接障害よりは ICSI 操作時の細胞骨格に対する影響によるものと推測される。しかし、排卵誘発の影響、ICSI 時の高濃度のカルシウムの流入による影響も否定できず、今後のさらなる検討が期待される。ヒト精子の染色体異常に関しても構造異常を主として認めたが、異常率は透明帯除去ハムスター卵子とヒト精子の体外受精による異常率と同程度であることより⁶⁾、ICSI 操作による精子染色体への影響は少ないものと考えられる。このように、精子と卵細胞膜の融合を介さず、受精後の卵細胞膜の精子結合阻害が誘起されない ICSI 卵においても染色体レベルでの正常性が保たれることが明らかとなった。

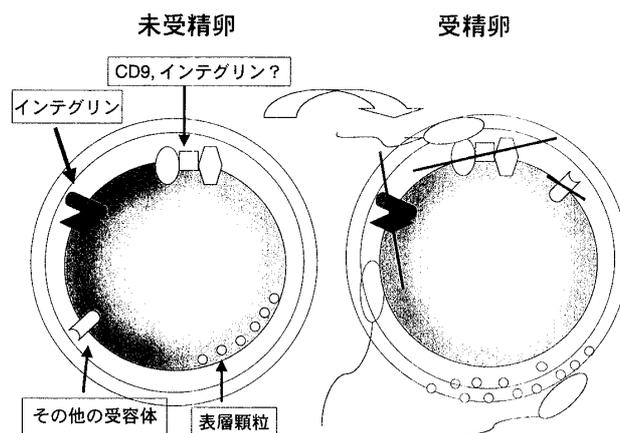


図 2

まとめ

ヒト卵においては受精時の表層顆粒の放出による透明帯反応が多精子受精防御の主要な役割を担うが、卵細胞膜にも slow な block ではあるが卵細胞膜多精子受精防御ともいえる精子の結合・融合を阻害する機構が存在することを明らかにした。また、阻害機構の成立には卵細胞膜と精子細胞膜の融合が不可欠であり、両配偶子の膜融合により卵細胞膜上の複数のインテグリン、CD9の発現が変化し、その結果、精子の結合・融合阻害が成立する可能性を示唆した(図2)。しかし、近年、fertilin β 、 α 6インテグリンのノックアウトマウスによる実験成績²³⁾²⁴⁾から従来、精子と卵細胞膜の結合・融合に関与すると考えられていた因子が決して必須のものではないことが明らかにされつつある。精子の卵細胞膜への結合・融合はマルチステップな現象であり、複数の因子が相互に関連し、その作用を補完している可能性も考えられる。いずれにしても、複数のインテグリンの相互関連、CD9とインテグリンの関連、インテグリン以外の融合蛋白の関与など、精子と卵細胞膜の相互作用を解明するため今後明らかにすべき課題も多く残されているといえる。

謝 辞

本講演の機会を与えて頂きました藤本征一郎会長ならびに座長の労をお取りいただいた星 和彦教授および吉村泰典教授に深謝いたします。

研究指導者

石川陸男(旭川医科大学産婦人科学教室教授)

共同研究者

旭川医科大学産婦人科:

田熊直之, 和田恵子, 玉手健一, 高岡康男, 堀川通晴,
小森春美, 碁石勝利, 吉田俊明, 林 博章, 山下 剛,
中田俊之, 小島貴志

Michigan State University:

W.R. Dukelow

文 献

1. Primakoff P, Hyatt H, Tredick-kiline J. Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *J Cell Biol* 1987; 104: 141—149
2. Yuan R, Primakoff P, Myles DG. A role for the disintegrin domain of cyritestin, a sperm surface protein belonging to the ADAM family, in mouse sperm-egg plasma membrane adhesion and fusion. *J Cell Biol* 1997; 137: 105—112
3. Miyado K, Yamada G, Yamada S, et al. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* 2000; 287: 321—324
4. Le Naour F, Rubinstein FE, Jasmin C, et al. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science* 2000; 387: 319—321
5. Kamiguchi Y, Rosenbusch B, Sterzik K, et al. Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes prepared by a gradual fixation-air drying method. *Hum Genet* 1993; 90: 533—541
6. Kamiguchi Y, Mikamo K. An improved, efficient method for analyzing human sperm chromosomes using zona-free hamster ova. *Am J Hum Genet* 1986; 38: 724—740
7. Sengoku T, Tamate K, Takaoka Y, et al. The use of zona-free aged unfertilized human oocytes as a predictor for successful subzonal insemination. *Fertil Steril* 1995; 64: 122—127
8. Sengoku K, Ishikawa M, Tamate K, et al. Polynuclear fertilization in various stimulation protocols in in vitro fertilization. *Int J Fertil* 1994; 39: 45—51
9. Stewart-Savage J, Bavister BD. A cell surface block to polyspermy occurs in golden hamster eggs. *Develop Biol* 1988; 128: 150—157
10. Wolf DP. The block to sperm penetration in zona-free mouse eggs. *Devel Biol* 1978; 64: 1—10
11. Sengoku K, Tamate K, Horikawa M, et al. Plasma membrane block to polyspermy in human oocytes and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil* 1995; 105: 85—90
12. Sengoku K, Tamate K, Takaoka Y, et al. Requirement of sperm-oocyte plasma membrane fusion for establishment of the plasma membrane block to polyspermy in human pronuclear oocytes. *Mol Reprod Dev* 1999; 52: 183—188
13. Anderson DJ, Abbott AF, Jack RM. The role of complement component C3b and its receptors in sperm-oocyte interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10051—10055
14. Bronson R, Peresleni T, Golightly M, et al. Vitronectin is sequestered within human spermatozoa and liberated following the acrosome reaction. *Mol Hum Reprod* 2000; 11: 977—982
15. Fenichel P, Durand-Clement M. Role of integrines during fertilization in mammals. *Hum Reprod* 1998; 13 (Suppl. 4): 31—46
16. Bronson RA, Fusi FM. Integrines and human reproduction. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 153—168
17. Talatzis BC, Billi H. Survey on intracytoplasmic sperm injection: report from the ESHRE ICSI Task Force. *Hum Reprod* 1998; 13 (Suppl. 1): 165—177
18. Luetjens M, Payne C, Schatten G. Non-random chromosome positioning in human sperm and sex chromosome anomalies following intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 1999; 353: 1240
19. Martin R. The risk of chromosomal abnormalities following ICSI. *Hum Reprod* 1996; 11: 924—925
20. Munne S, Marquez C, Reing A, et al. Chromosome abnormalities in embryos obtained after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998; 69: 904—908
21. Flaherty SP, Payne D, Matthews CD. Fertilization failure and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13 (Suppl. 1): 155—164
22. Martin-Deleon PA. Analysis of the chromosome complement in outbred mouse sperm fertilizing in vitro. *Gemete Res* 1989; 22: 71—81
23. Cho C, Bunch DO, Faure JE, et al. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin β . *Science* 1998; 1857—1859
24. Miller BJ, Georges-Labouesse E, Primakoff P, et al. Normal fertilization occurs with lacking the integrin $\alpha 6 \beta 1$ and is CO9-dependent. *J Cell Biol* 2000; 149: 1289—1295

Abstract

An effective block to multiple sperm penetration in mammalian oocytes is critical for normal fertilization and subsequent embryonic development. It has been speculated that the human oocyte relies primarily on the zona reaction to prevent polyspermy. However, the role and the mechanisms concerning the oocyte plasma membrane block in human oocyte are poorly understood. We firstly investigate a main mechanism of polyspermy block in human oocytes. Secondary, the existence, time course and mechanisms of the human plasma membrane block to polyspermy were investigated by an *in vitro* fertilization assay using zona pellucida-free unfertilized oocytes.

The total incidence of polypronuclear fertilization in our IVF program was 6.2%. A significantly higher polyspermic fertilization was observed after SUZI (34.5%), indicating that zona reaction mainly involved in polyspermy block in human oocytes. Sperm penetration assay using the zona-free human oocytes demonstrated that the number of penetrating spermatozoa reached a maximum by 2 h after insemination. A reinsemination experiment also revealed that the number of penetrating and binding spermatozoa were not significantly different between control and reinsemination oocytes, suggesting that the plasma membrane block plays an important role in the prevention of polyspermy in the human oocyte.

It has not been determined if there is a requirement for sperm-oocyte membrane fusion for the establishment of a block to sperm penetration at the oocyte plasma membrane level in the human. Therefore, we investigated whether the incorporation of the sperm plasma membrane into the oolemma contributes to the plasma membrane block to polyspermy, using zona-free oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) or activated by parthenogenetic activation. Only two of the 35 pronuclear oocytes fertilized spermatozoa (control) demonstrated one single penetrating spermatozoa. In contrast, ICSI or parthenogenetically activated oocytes at pronuclear stage could still be penetrated by and fuse with excess spermatozoa, and this did not result in a block response. These findings suggest that the establishment of the plasma membrane block to sperm penetration in the human oocyte may require a fusion process between sperm and oocyte plasma membrane. The plasma membrane block to polyspermy does not involve cortical granule exocytosis, because release of CG contents was observed in both control and non-sperm-fertilized oocytes.

To clarify the role of CD9 or integrins concerning the polyspermy block at oolemma, we investigated expression of CD9 and integrins on plasma membrane in unfertilized oocytes, sperm-fertilized and ICSI fertilized pronuclear oocytes. CD9 protein was expressed on plasma membrane in unfertilized oocytes and ICSI fertilized pronuclear oocytes, however, was not observed in sperm-fertilized pronuclear oocytes. Similarly, 4 of 7 α -subunits and 3 of 6 β -subunits examined were detected in unfertilized and ICSI fertilized oocytes but not sperm-fertilized oocytes. Treatment of oocytes with anti-CD9 antibody inhibited fusion and penetration processes of spermatozoa. Thus, changes of expression of CD9 or integrins may contribute to oocyte plasma membrane block to sperm fusion and penetration.

Heterologous fertilization was performed to assess the chromosomal normality of mouse-human hybrid embryo at the first cleavage metaphase after ICSI. ICSI procedure do not cause an increase in the frequency of aneuploidy and structural aberrations in both paternal and maternal chromosomes.

In conclusion, we have clarified the existence and mechanism of human oocyte plasma membrane block to sperm penetration. These results would facilitate understanding of the mechanism of human sperm-oocyte interaction.