

精巢上体精子による同種免疫雌マウスの 受精能に関する研究

古川茂典・内海恭三・湯原正高

(家畜繁殖学研究室)

Received June 30, 1977

Studies on Fertilization in Female Mice Isoimmunized with Epididymal Spermatozoa

Shigenori FURUKAWA, Kyozo UTSUMI and Masataka YUHARA

(Laboratory of Animal Reproduction)

The problem of depressed fertility of sperm immune animal has been under discussion. The present paper was designed to know the effect of antiserum rabbit heteroimmune serum on the fertility of germ cell of mice and to clarify the antifertility effect of sperm on isosperm immunized female mice.

The mouse sperm treated with mouse antisperm rabbit heteroimmune serum caused the failure of *in vivo* and *in vitro* fertilization. In addition, this antiserum showed the depression of fertility in mouse oocytes.

Antisera from isoimmunized female mice possessed a high sperm agglutination value, and oocytes from the female mouse decreased *in vitro* and *in vivo* fertility.

This suggests that the low fertility of isosperm immune female mice is due to the antifertility of the oocyte.

緒 言

血清中に高い抗精子凝集素価を有する動物において交配と排卵は正常に起こるが、受精率の低下と産子数の著しい低下を引き起こすことが知られている^{8,11,13}。しかしながら、抗精子抗体の受精現象におよぼす機序に関しては、未だ不明な点が多く残されている。

これまでに精巢上体精子それ自体の抗原性は弱く、精巢上体精子を用いての抗精子抗体形成は容易でないとされている。同種免疫された雌マウスの繁殖能に関する研究は過去に MAC LAREN 他^{1,4)}によっていくつか報告されているにすぎず、氏は、その繁殖能の低下は受精部位への精子の到達阻害による為であると考えた。近年、MENGE 他⁶⁾ (1974) は、家兎の同種精子免疫によって子宮分泌液が変化することを示し岡野他⁹⁾ (1976) は、家兎における同様の実験から雌性生殖道分泌液中の補体成分により、精子不動化が起こり受精が阻害されると考えた。このような子宮環境はさらに受精しても初期段階での胚の死や吸収⁹⁾、着床後の発育停止による吸収を起こす^{2,3)}という現象も、免疫学的見地から推論されている。極く最近、精子と卵子とくに精子と透明帯との間に共通抗原が存在することが示唆され^{11,12)}ており、その透明帯の免疫学的意義についても論ぜられるようになってきた。

本研究では、抗マウス精子家兎抗血清のマウス精子および卵子の受精におよぼす影響を調べると共に、同種精子で免疫された雌マウスの受精能を *in vivo* および *in vitro* で検索して、精子免疫の繁殖上の意義を明らかにしようとした。

材 料 と 方 法

実験に供した免疫動物は、自家繁殖の ICR 系成熟雄マウスを用い、被免疫動物として、体重 3 kg 以上の自家繁殖日本白色雄家兎と、8 週令の ICR 系処女雌マウスを用いた。

抗原の調整の為に、雄マウスの精巣上体より精子を採取して生理食塩水に懸濁させた。遠心分離、洗浄後精子濃度を $8 \sim 16 \times 10^6$ Cells/ ml に調整したものを抗原液とした。

免疫スケジュールとしては、まず異種免疫抗体（抗マウス精子家兎抗血清）の作製を行った。免疫前に被免疫雄家兎を採血して、マウス精子に対して抗体を持たないことを確認した。等量の精子懸濁液と Freund の complete adjuvant を十分に混合させた乳濁液を免疫注射に用いた。乳濁液 1 ml を免疫用家兎の背皮下内に 0.2 ml づつ 5 ケ所に分割注射した。免疫注射は週 1 回とし、3 週間あるいは 5 週間行った。対照動物には、生理食塩水と adjuvant の乳濁液を 3 週間注射した。同種免疫抗体の作製にあたっては、抗原液 0.5 ml /匹を週 3 回、7 週間雌マウス腹腔内に注射した。対照動物にはリン酸緩衝液のみを注射した。家兎抗血清の場合、最終注射後、2 週間目に心臓穿刺により採血し、血清を分離した。-56°C、30 分で不活化し、使用時まで -20°C で凍結保存した。血清の抗体価は MAC LAREN⁵⁾ (1964) の法に従い、精子凝集試験によって検定した。マウス抗血清の場合、免疫処理終了後、10~20 日の間に採血して血清を分離し、同様の精子凝集試験を行った。

抗マウス精子家兎抗血清で処理された精子および卵子の受精能が検定された。処理精子の検定は *in vitro* および *in vivo* で行なわれた。マウス精巣上体尾部より採取された精子は、豊田¹⁰⁾ (1971) のマウス体外受精用媒液に懸濁され、37°C で 30 分間 incubate 後、抗血清を含む培養液中へ移され、さらに 30 分間 incubate した。この一部は *in vitro*、一部は *in vivo* の受精試験に供された。体外受精に用いられるマウス卵は、過排卵処置されたマウス卵管膨大部より HCG 後、14~16 時間に排卵された。抗体処理精子とこの卵子を用いて常法に従って体外受精を行った。受精の有無の検定はラクモイド染色後位相差顕微鏡下で行った。*in vivo* 授精は、雌マウスに過排卵処置を施し、HCG 後、11~13 時間に開腹して、両子宮角に処理精子懸濁液 0.05 ml ($8 \sim 12 \times 10^6$ Cells/ ml) を注入した。授精後 12 時間で採卵し、受精の有無の判定を行った。

さらに、抗原処理卵の体外受精能が検定された。過排卵処置を施した成熟雌マウスの卵管より、HCG 注射後 13~15 時間に採卵した卵を抗血清を含む培養液中に浮遊させた。抗原処理 30 分後、血清を含まない培養液中で 3 回洗浄した後、1 時間の予備培養を行った正常精子と媒精させた。

精子の同種免疫試験として、マウス精子で同種免疫された雌マウスの受精能が *in vivo* および *in vitro* で調べられた。まず免疫雌マウスの交配試験が行なわれた。免疫処理終了後 10~20 日に常法による過排卵処置を施し、HCG 注射後正常雄マウスと同居させた。翌朝、腔栓を確認し、HCG 注射後 15~17 時間に、卵管より採卵して受精の有無を判定した。*in vitro* 受精能は、免疫処理終了後 10 日から 20 日に過排卵処置を施し、HCG 注射 13~15 時間後に採卵して、正常マウス精子との体外受精によって検定された。

結 果 と 考 察

1. マウス精子による異種免疫抗血清の受精阻害作用：異種精子免疫による抗体価の検定が行なわれた。本実験免疫スケジュールによって得られたマウス精巣上体精子に対する異種

Table 1 Spermagglutinin titres in the sera of rabbit injected with mouse spermatozoa

Rabbit No.	Normal* serum	Control serum	Anti serum	
			3 injection	5 injection
1	<16	32	—	—
2	<16	—	—	2048
3	<16	—	—	1024
4	<16	32	—	—
5	<16	—	1024	—
6	<16	—	512	—

* Before immunization

免疫抗血清の精子凝集抗体価を Table 1 に示す。免疫前の正常血清および対照血清中には、ほとんど精子凝集素の存在は認められなかったのに対して、抗血清中には高い精子凝集素価が認められた。特に、5 回免疫区では 1024~2048 と高い凝集素価を認めた。対照血清にみられた精子凝集が head-to-head の凝集塊であるのに対して、抗血清でみられる精子凝集はすべて head-to-tail, tail-to-tail であり、精子は網目状にからまっていた。このように凝集の様相は、免疫凝集の特徴を示し、高い凝集素価から、この作られた抗血清は、高い抗体価を持つ抗精子抗体を持つものと考えられ、以下の実験に供された。

Table 2 *In vitro* fertilizing ability of mouse spermatozoa treated with antisperm hetero immune serum

Treatment	Dilution	No. of Eggs	
		Examined	Fertilized(%)
Non-treatment		31	25(81)
Normal serum*	1/16—1/32	42	29(69)
Control serum	1/16—1/32	42	33(79)
	1/16—1/32	51	9(18)
Anti serum	1/128—1/512	28	11(39)

* Before immunization

家兔抗血清処理精子の受精能が検定された。*in vitro* 授精の場合 (Table 2), 無処理区、免疫前の正常血清区および対照血清区の受精率はそれぞれ 81%, 69%, 79% であった。それに対して抗血清処理精子での卵子の受精率は、18% および 39% と明らかに低い結果が得られた。子宮内授精 (*in vivo*) の場合 (Table 3), 抗血清で処理した精子での卵子の受精率は、無処理区および対照血清区に比較して明らかに低い値を示した。このように抗血清処理精子の受精率の低下は先の抗体の高い精子凝集素価からみて抗精子抗体によって精子の凝集、不動化が起こり、その受精能が失われたこともその一因と考えられる。抗精子抗体による供与者となった動物の精子の受精能の低下する事実は従来の諸家の報告と一致した。

次に抗精子家兔抗血清で処理したマウス卵で体外受精を行った (Table 4), その結果、精子の進入が妨げられ、受精率の低下が認められた。このように抗精子抗血清は精子だけではなく卵子の受精能にも何らかの影響を及ぼしていることが明らかとなった。このような事実から、抗体処理卵子にも受精能の低下させる因子の存在することが暗示された。

Table 3 Fertilization of mouse eggs following intrauterine insemination with spermatozoa treated with antisperm heteroimmune serum

Treatment	Dilution	No. of females	No. of Eggs	
			Recovered	Fertilized(%)
Non-treatment		2	38	31(82)
Control serum	1/8	3	44	24(55)
	1/32	2	18	13(72)
	1/512	2	32	26(81)
Anti serum	1/8	3	51	5(10)
	1/32	1	14	0(0)
	1/512	2	28	11(39)

Table 4 Effect of anti-sperm hetero-immune serum on *in vitro* Fertilization of mouse eggs

Treatment	Dilution	No. of Eggs	
		Examined	Fertilized(%)
Normal serum*	1/2-1/16	54	43(80)
Control serum	1/2-1/16	62	50(81)
Anti serum-1	1/2-1/16	58	24(41)
Anti serum-2	1/2-1/16	82	23(28)

* Before immunization

2. マウス精子による同種免疫化雌マウスの受精阻害：マウス精巣上体精子に対する雌マウスの同種免疫抗血清の抗体価の検定の為に、精子凝集抗体価が検定された (Table 5)。対照マウス血清中の精子凝集抗体価は16~128の範囲にあった。それに対して免疫マウスの血清中の抗体価は512~4296と高い値を示した。このような抗血清の高い精子凝集素価と抗受精効果との関係を明らかにする為に同種免疫された雌マウスでの *in vitro* および *in vivo* の受精能が調べられた。

被免疫雌マウスの交配試験 (Table 6) において交配させた対照マウスでは全て受精卵が

Table 5 Spermagglutinin titres in the sera of female mice iso immunized with sperm

Group	No. of mice	Titre of spermagglutinin								
		16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096
Control	10	8	1	—	1	—	—	—	—	—
Immunized	10	—	—	—	—	—	2	2	3	3

Table 6 *In vivo* fertilization of eggs from iso sperm immunized mice

Group	No. of females	No. of females with fertilized egg	No. of eggs	
			Recovered	Fertilized(%)
Control	5	5	105	87(83)
Immunized	5	3	65	18(28)

認められ、回収卵中の受精卵の割合は83%を示した。それに対して、交配させた5匹の免疫マウスのうち受精卵が認められたものは3匹だけで、しかもその受精率はいずれも低かった。また対照マウスの子宮および卵管腔内には、多数の精子の存在が認められたが、免疫マウスには、ほとんど、あるいは全く認められなかった。一方、*in vitro* 受精試験 (Table 7) においては、対照群に比較して、免疫群の受精率は明らかに低下し、*in vivo* 試験と同様の結果を示した。

Table 7 *In vitro* fertilization of eggs from iso sperm immunized mice

Group	No. of females	No. of eggs	
		Examined	Fertilized(%)
Control	5	122	89(73)
Immunized	5	55	21(38)

同種免疫によって引き起こされる繁殖能の低下の原因究明への研究は多くの研究者によってなされてきたが^{6,7)}、雌マウス卵の受精能に関する研究は、MAC LAREN 他^{4,5)}によっていくつか報告されているに過ぎない。氏は、同種免疫された雌マウスに起こる繁殖能の低下は、受精部位への精子の到達が不十分な為であると考えた。本研究においても、同種免疫された雌マウスは十分な抗体産生を引き起こし、そして受精能は有意に低下した。交配試験での免疫マウスの受精能の低下は、1つには受精部位への精子の到達が妨げられる為と考えられ、この点では MAC LAREN 他⁵⁾の観察を支持した。しかし、本研究から体外受精において被免疫マウス卵の受精率が低かったことは、受精部位に十分な量の精子が運動性を保持したまま存在していても、生殖器官内で抗精子抗体にさらされた卵の受精能は阻害されるものと思われる。

OIKAWA 他⁷⁾ (1975) は、ハムスターにおいて、卵管卵、卵巢、および卵母細胞が抗原性を持つことを示し、特に抗卵巣血清分画は、卵巣卵母細胞の透明帯に結合することを示した。これらのことから、免疫マウス卵も卵丘細胞、あるいは透明帯に抗精子抗体を保持していることが充分考えられる。その結果、受精の場においてその抗体と精子細胞が結合し、透明帯因子、即ち精子に含まれている透明帯溶解素はもはや透明帯物質と会合できなくなり、精子が受精できなくなるものと推察された。又一方、精子と卵子、特に透明帯との共通抗原の存在の可能性が論ぜられるようになったが、本研究の免疫雌の卵子の受精阻害から、それらの可能性をも、暗示させた。

摘 要

抗マウス精子家兎抗血清のマウス精子および卵子の受精におよぼす影響を調べると共に同種精子で免疫された雌マウスの受精能を *in vivo* および *in vitro* で検索した。

マウス精子に対して、家兎で産生させた異種免疫抗血清はマウス精子の *in vivo* および *in vitro* 受精能を有意に低下させた。また、抗精子血清は精子だけではなく卵子の受精能に対しても抑制効果を示した。

同種精子で免疫された雌マウスは十分な精子凝集素価を引き起こし、しかも、その卵子の受精能は *in vivo* においても *in vitro* においても、有意に低下した。

以上のことから、同種精子で免疫された被免疫雌マウスの卵子細胞に受精阻害要因の存在

することが示唆された。

文 献

- 1) BELL, E. B. and A. MACLAREN : J. Reprod. Fert. **22**, 345—356 (1970)
- 2) 香山浩二・磯島晋三 : 「母子の健康と生体要因に関する研究」, 58—62 (1974)
- 3) 香山浩二・磯島晋三 : 「心身障害発生防止に関する胎児環境的研究」 32—35 (1975)
- 4) MACLAREN, A. : Nature **203**, 50—53 (1964)
- 5) MACLAREN, A. : Nature **201**, 582—585 (1964)
- 6) MENGE, A. C. : J. Reprod. Fert. **18**, 67—74 (1969)
- 7) OIKAWA, T. and R. YANAGIMACHI : J. Reprod. Fert. **45**, 487—494 (1975)
- 8) 岡野彰・入谷明・西川義正 : ホルモンと臨床 **24**, 611—616 (1976)
- 9) 竹内正七・高橋威 : 代謝 **13**, 1593—1598 (1976)
- 10) 豊田裕 : 家畜繁殖誌 **19** suppl., 11—19 (1971)
- 11) TSUNODA, Y. and M. C. CHANG : J. Reprod. Fert. **46**, 379—382 (1976)
- 12) TSUNODA, Y. and M. C. CHANG : Biol. Reprod. **14**, 354—361 (1976)
- 13) TYLER, A. : J. Reprod. Fert. **2**, 473—506 (1961)

正 誤 表 (Errata)

頁 (Page)	行 (Line)	誤 (Erratum)	正 (Correct)
43	34	免疫学的意義についても	免疫学的意義について ⁹⁾ も
50	6	SITTMANN <i>et al.</i> ¹³⁾ .	SITTMANN <i>et al.</i> ¹³⁾
50	6	KULENKAM <i>et al.</i> ⁸⁾ .	KULENKAMP <i>et al.</i> ⁸⁾
52	Table. 2 5	0.0248±0.0030b	0.0248±0.0030 ^a
62	19	YAMAMOTO は ⁶⁾	YAMAMOTO ⁶⁾ は
88	2	IMF	IFO
90	10	68.8	98.8