



研究ノート

モノクローン性抗体による精子の受精能の測定技術

三 村 務* 岡 部 勝**

1. はじめに

「精子」というと、卵と出合うためにできあがった特殊な細胞で、一般には、当然「受精能」を持つと思われている。しかし、これまでの研究から、哺乳類の精子の場合、射精された状態では受精能を持っておらず、雌性の生殖路内において、何らかの生理的機能変化をとげ、はじめて受精能を獲得することが明らかにされた。はなはだしい例として、こうもりでは、交尾後に冬眠に入り、3ヵ月後に受精をおこすことが知られている。そして、精子が受精能を獲得する現象は、capacitation と呼ばれ、生化学的な面から、さまざまな研究が行なわれてきた。いまなお、不明な点が数多く残されているものの、capacitation に留意することによって、試験管内におけるヒトの体外受精が可能になってきたのである。その成功率がまだまだ低い原因のひとつに、体外受精を行なう条件が、必ずしも最適でないことが指摘されるが、倫理上の問題もあり、最適条件の設定のための基礎的実験を、家畜や実験動物の場合と同様に行なうことができず、そのため、精液の量、含まれる精子の数、運動性を持つものの割合などが、従来調べられてきた。しかし、受精能の測定法としては、先にも述べたように、採取直後の精子には受精能がそなわっていないので、これらは満足すべき検査法とはいえない。最近では、女性の頸管粘液を通過する能力をみるテストや、ハムスターの卵が、ヒトの精子と融合する能力を有することから、異種卵との融合能により、精子の受精

能を測定するという特別な方法も行なわれている¹⁾が、どこの病院でも簡単に行ないうる方法ではない。

さて、精子が射精されてから受精能を獲得するまでにおこす変化のひとつに、精子膜表層構造の変化も含まれている。我々は、この点に着目して、より簡便な新しい精子の受精能の測定技術を開発することを目的とし、細胞融合の技術を用いて、精子膜表層抗原に対するモノクローン抗体をつくり、精子の受精能の測定に応用する研究を行なっている。ここに、我々の得た最近の知見をまとめてみた。

2. モノクローン抗体の生成

一般に、抗体産生細胞をひとつひとつとり出して、試験管内で培養すれば、特異性の厳密に規定されたモノクローン抗体を得ることができる。このような厳密性は、通常の免疫操作によって血中にあらわれてくるポリクローン抗体では、決して得られないもので、膜表面の微細な変化をとらえる場合などに非常に都合がよい。現在のところ、ひとつの抗体産生細胞を、試験管内で増殖させていくことができないので、抗体産生細胞とガン細胞とを、ポリエチレングリコールなどの作用により融合させて、増殖能と抗体産生能を兼ねそなえた、ハイブリドーマ(雑種細胞)を作成して、モノクローン抗体をつくらせている。

著者らは、まず、雌性のマウスに対して、同種マウスの精子を用いて、数回にわたり免疫した。次いで、抗体産生細胞が多く含まれている脾臓をすりつぶして、細胞を集め、腹水ガン細胞株であるP3U1株と融合させた。

一回の融合実験により、10万~100万個程度のハイブリドーマができるので、クローニングと呼ばれる操作で、目的とするような抗体を産

*三村 務 (Tsutomu MIMURA), 大阪大学, 薬学部, 薬学科, 微生物薬品化学教室, 助教授, 薬学博士, 微生物薬品化学

**岡部 勝 (Masaru OKABE), 大阪大学, 薬学部, 薬学科, 微生物薬品化学教室, 助手, 薬学博士, 免疫学

生しているものを選別する。限界希釈法を何度かくり返して、安定な株にする。得られた抗体産生ハイブリドーマは、腹水ガン細胞としての性質も有しているので、マウスに投与すると、図1のように腹水中でも増殖し、目的とする抗体を産生する。目的とする抗体が、腹水中に産生されているかどうかを調べるには、図2に示す方法を用いた²⁾。



図1 腹腔内でハイブリドーマを増殖させたマウス (右) (左：正常マウス)

3. モノクローン抗体と精子との反応性

上述のようにして得られた、モノクローン抗体産生株のうち OBF 13は、精子に対して不均一な反応性を示した。その様子を図3に示した。この抗体は、新鮮な精子に対しては、全く反応性を示さない(A)が、精子を incubation すると(言い換えれば、受精能を獲得させると)、頭部全体が反応するようになる(E)。精子が、受精能を獲得したことを確かめるためには、卵子に侵入できる能力を調べればよいので、(F)に示すように、卵内に侵入した精子との反応性をみたところ、例外なくすべて頭部全体が染色されていた。従って(A)~(E)は、精子の capacitation の間におこる膜表層の変化を示しているのではないかと考えられる³⁾。この結果から、精子検体の OBF 13に対する反応性をみることにより、精子の受精能を測定できるのではないかと推論した。そこで、まず、OBF 13の認識する抗原の性質について調べた。もし、OBF 13が認識するのが、受精能の獲得にともなってあらわれる抗原であれば、受精に何らかの役割を果たしているはずであるから、その抗原の生理的役割は、抗体によってブロックされると考えられる。そこで、OBF 13存在下に、体外受精を行ない、

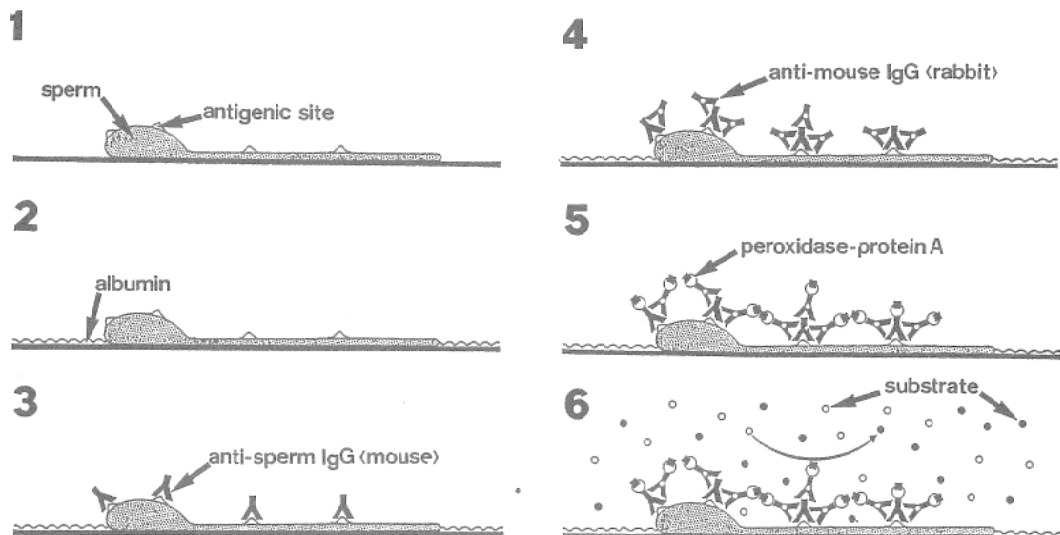


図2 抗精子抗体を検出する ELISA アッセイの原理

- (1)抗原(精子)をプレートに吸着させ、(2)余分な場所をアルブミンでブロックする。
- (3)ハイブリドーマの培養上清と反応させ、(4)次いで抗マウス抗体を結合させる。
- (5)これを酵素で標識した proteinA を用いて(6)検出する。

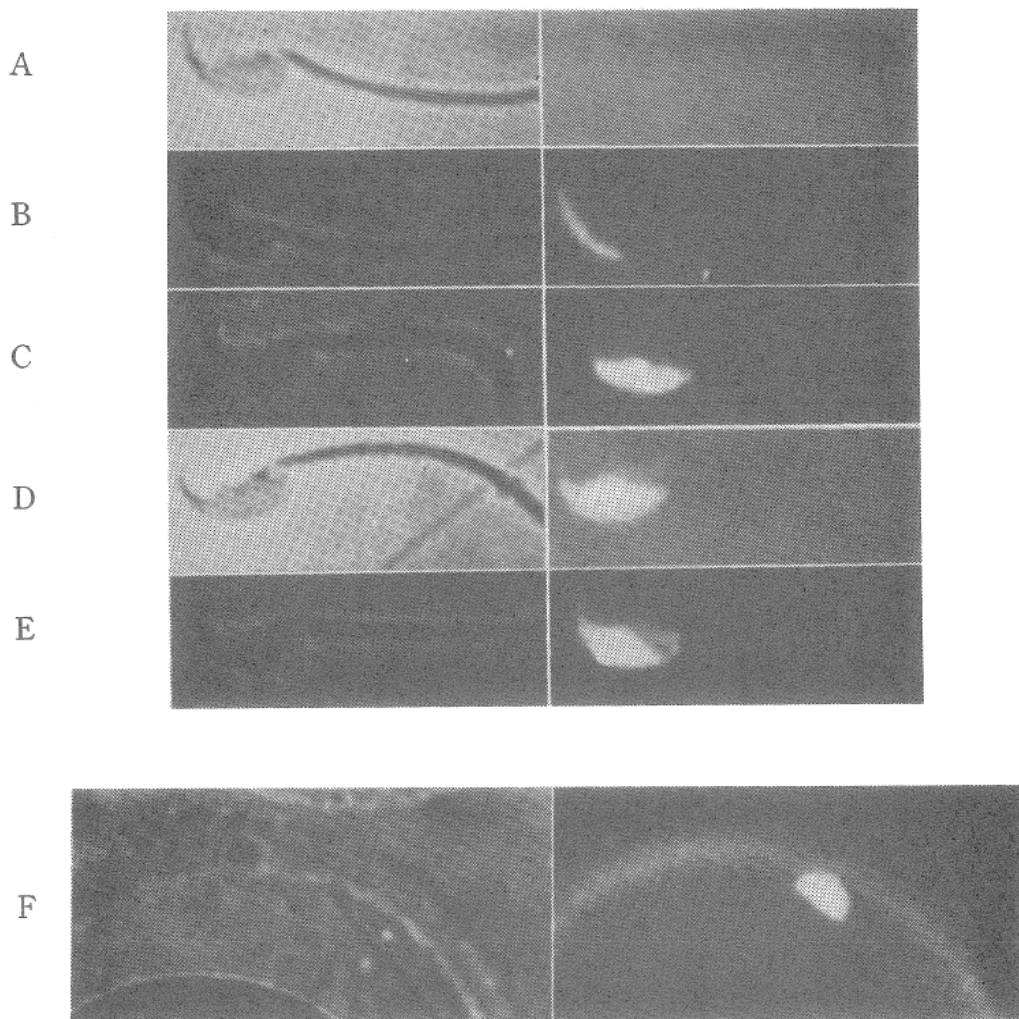


図3 OBF 13抗体を精子との反応性（蛍光抗体法）

その受精に及ぼす影響を、精子の卵 zona pellucida 層の通過能力で観察したところ、OBF 13 は全く阻害しなかった。このステージは、精子の受精能の有無を判別するのに適しており、これまで我々は、この検定系を用いて、受精能の検定を行なってきたので、この結果は、予期に反するものであった（表Ⅰ）。そこで、次のステップである、精子と卵黄との融合における、OBF 13の影響をみてみたところ、腹水（前述のように、OBF 13株を増殖させたもの）の2000倍希釈では完全に、また、10000倍希釈でも、有意に受精を阻害することが認められた（表Ⅱ）。これらの結果は、OBF 13が、精子の受精能獲得の際にあらわれてくる抗原のうち、卵黄との融合に必要な抗原、あるいはその近傍を認識している可能性を示唆するものであった。

OBF 13の認識する抗原と、精子の受精能との間には、密接な関係があると思われたので、次に、この両者の関係について検討を加えた。精子の受精能の測定は、体外受精系における、卵 zona pellucida の通過能及び、卵黄との融合能の二つのステージで行なった。OBF 13に対する反応性は、精子を種々の条件で incubation したり、染色したりする実験を行なった結果にもとずき、図2の(C)～(E)に示されるものを反応陽性として、処理した。両者の関係を示したのが図4⁴⁾である。いずれの方法で測定した受精率との間にも、有意な相関性が認められた。ただし、受精は、精子の受精能獲得のみで行なわれるのではなく、卵側の能力にも支配されているので、図4で測定した、卵を用いた精子の受精能の測定という方法は、最も適切な方法では

表 I zona pellucida 内への精子の侵入により検討したOBF13抗体の体外受精に及ぼす影響

Dilution of ascites ^{a)}	No. of ova examined	Ova in stage I (%)
1 —	209	65±7.7
1/10000	214	66±6.2
1/2000	211	51±7.2
1/400	201	51±9.5
1/80	220	55±6.7

平均値±標準誤差(例数9)

a) CBF 1 マウスにOBF 13株(1×10⁷ cells)を腹腔内に投与し、約2週間後に同マウスより採集した腹水

表 II 卵黄と精子の融合により検討したOBF13抗体の体外受精に及ぼす影響

Dilution of ascites ^{a)}	No. of ova examined	Ova in stage II (%)
—	210	59±11.2
1/10000	223	17±3.8 **
1/2000	202	0
1/400	214	0
1/80	221	0

平均値±標準誤差(例数9)

a) 表 I のものと同じ腹水

** コントロール群に対して有意な差を認めた (P<0.01)

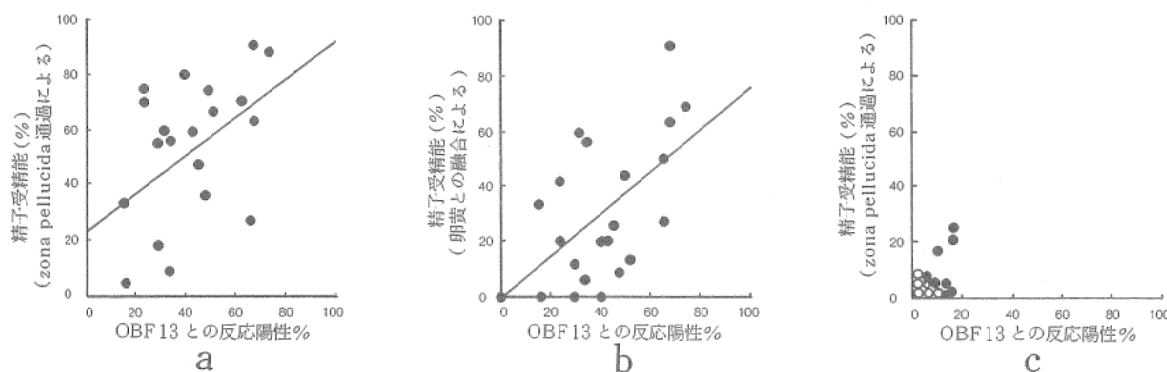


図4 体外受精により測定した精子の受精能と、OBF 13に対する反応性との相関性

a. bは正常群の雄からの成熟精子を用いて測定したもの

cの○は、未成熟精子によるもの●は成熟精子を30℃でインキュベーションして受精能獲得を阻害した場合

あるが、卵が変われば受精能も変わるという、根本的な弱点をも持っている。また図4 a-bは、正常群の雄から得た精子の受精能のバラツキと、OBF 13に対する反応性との関係をみたものであり、未成熟な精子や、低温処理精子のような、非正常群の精子を用いた場合には、あきらかに正常群とは異なったところに分布がみられた(図4 C)。以上の結果、免疫学的な手法によって、精子の受精能の変化を調べることが可能になったと考えている。

4. おわりに

生殖生理学の分野は、試験管ベビー、男女生み分けなど、現在急展開をとげており、医学を

超えた問題をも含んでいる。しかし、これらの手法が、一朝一夕にできあがったわけではなく、精子の基礎生理の研究に負うところは大きい。今後、応用の部門のみが、先走りしないようにするためにも、ますます基礎的研究が重要になると考えられる。我々の得た、モノクローン抗体の認識する抗原が、受精に重要な役割を果たしている物質である可能性があり、今後も研究を続けていきたいと考えている。さらに、臨床応用面として、ヒト精子の受精能の測定のための臨床診断薬の開発への展開も考えている。

参考文献

- 1) Yanagimachi, R. : Zona-free Hamster Eggs—Their Use in Assessing Fertilizing Capacity and Examining Chromosomes of Human Spermatozoa. *Gamate Research*, 10, 187—232 (1984).
- 2) Okabe, M., Takada, K., Adachi, T., Kohama, Y. and Mimura, T. : Studies on sperm capacitation using monoclonal antibody—Disappearance of an antigen from the anterior part of mouse sperm head. *J. Pharmacobio-Dyn.*, 9, 55—60 (1986).
- 3) Okabe, M., Takada, K., Adachi, T., Kohama, Y. and Mimura, T. : Inconsistent reactivity of an anti-sperm monoclonal antibody and its relationship to sperm capacitation. *J. Reprod. Immunol.*, 9, 67—70 (1986).
- 4) Okabe, M., Adachi, T., Oda, H., Yagasaki, M. and Mimura, M. : Inconsistent reactivity of Anti-mouse sperm Monoclonal antibodies and their relationship to sperm capacitation. Fifth International Symposium on Spermatology, Fujiyoshida Japan August (1986).

