



マウス胚の胞胚腔形成に及ぼす抗雄特異抗血清の影響

宮野, 隆
猶原, 兼人
橘川, 恒久
加藤, 征史郎
苅田, 淳

(Citation)

神戸大学農学部研究報告, 19(1):63-67

(Issue Date)

1990-01

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/00200518>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00200518>



マウス胚の胞胚腔形成に及ぼす抗雄特異抗血清の影響

宮野 隆*・猶原兼人*・橘川恒久*

加藤 征史郎*・荏田 淳*

(平成元年8月10日受理)

EFFECT OF ANTI-MALE ANTISERUM ON THE BLASTOCOEL FORMATION OF MOUSE EMBRYOS

Takashi MIYANO, Kenji NAOHARA, Tsunehisa KIKKAWA,
Seishiro KATO and Sunao KANDA

Abstract

Antiserum was produced in C57BL/6 female mice by repeated immunizations of syngeneic male spleen cells. The specificity of the antiserum was tested in sperm cytotoxicity test. Female spleen cell-absorbed antiserum with complement killed sperm dose-dependently, while specific killing of sperm was not detected for male spleen cell-absorbed (control) antiserum with complement, indicating that the antiserum contains antibody against the male specific antigen. The effect of the antiserum on the blastocoel formation of 4-cell and 8-cell mouse embryos was examined *in vitro*. Although most of the embryos developed to blastocysts at the end of culture in either medium supplemented with male or female spleen cell-absorbed antiserum, the blastocoel formation was delayed in the medium supplemented with female spleen cell-absorbed antiserum.

緒 言

近交系マウスにおける雌雄間での皮膚移植試験によって雄に特異的な組織適合性抗原が発見され¹⁾、哺乳類のY染色体を持つ細胞に共通して存在することが報告されている¹⁴⁾。また、雄特異抗原に対する抗体（以下抗雄特異抗体と略記）と補体を用いた細胞溶解試験によれば、マウス8細胞期の雄胚には、すでに雄特異抗原が出現していることが報告されており⁷⁾、この抗雄特異抗体を用いた初期胚の性判別が試みられ始めている²⁾。

補体依存性の細胞溶解による初期胚の性判別法では雄の産子は得られないが、胚を抗雄特異抗体で処理した後、蛍光色素で標識した二次抗体で処理する間接蛍光抗体法では、雌雄両性の性判別が可能である^{13, 15—18, 20)}。しかし、間接蛍光抗体法には、蛍光を励起する際に使用される紫外線が胚の生存性を低下させるという問題点が残されている。

近年 UTSUMIら¹²⁾は、ラット桑実胚を抗雄特異抗体とともに培養すると、雄胚の胞胚腔形成が特異的に抑制されると報告し、この方法による性判別の可能性を示唆した。この方法は従来の方法に比べ、胚に対する傷害が少なく、また多数の胚を同時に処理できることから、有効な性判別法であると考えられる。

本研究では、C57BL/6系雌マウスを用いて雄特異抗原に対する抗血清を作製し、まず抗血清中に抗雄特異抗体が存在することを精子傷害性試験によって確認した後、マウス4細胞期胚および8細胞期胚を抗血清を含む培養液中で培養し、抗血清の胞胚腔形成に及ぼす影響を検討した。

材料および方法

1) 抗血清の作製および吸収

KOOとGOLDBERG⁶⁾の方法に基づいて抗血清を作製した。8～14週齢のC57BL/6系雄マウスより採取した脾臓を、氷冷したDULBECCOのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で細断した後、金属性のメッシュを通し脾臓

* 家畜繁殖学研究室

細胞を分散させた。細胞をPBSで2回洗浄した後、PBSに再浮遊させ、10~16週齢のC57BL/6系雌マウス1匹当たり $3 \sim 5 \times 10^7$ 個の脾臓細胞を腹腔内に投与した。この免疫注射を7日間隔で6回行い、最終免疫注射の7日後に雌マウスの頸部を切断して採血した。血液を凝固させた後、遠心分離(3,000 r.p.m., 60分間)して血清を得、これを抗C57BL/6系雄マウス脾臓細胞抗血清とした。

抗血清の雄細胞(精子)に対する特異性および胚発生に対する影響をICR系マウスを用いて検討するため、予め抗血清中の抗雄特異抗体以外の抗体をICR系雌マウス脾臓細胞によって吸収した。また、ICR系雄マウス脾臓細胞によって吸収したものを対照とした。ICR系雌マウスおよび雄マウスの脾臓細胞を前述と同様な方法で準備し、抗血清100 μ lに 1×10^8 個の雌あるいは雄の脾臓細胞を浮遊させ4℃で60分間反応させた後、脾臓細胞を遠心分離によって除去し、上清をそれぞれICR系雌マウス脾臓細胞吸収抗C57BL/6系雄マウス脾臓細胞抗血清(以下雌脾臓細胞吸収抗血清と略記)およびICR系雄マウス脾臓細胞吸収抗C57BL/6系雄マウス脾臓細胞抗血清(以下雄脾臓細胞吸収抗血清と略記)とした。これを56℃で30分間不活化した後、ミリポアフィルター(孔径0.45 μ m)で濾過し、実験まで-20℃で保存した。

2) 精子傷害性試験

GOLDBERGら⁵⁾の方法に基づいて、抗血清の特異性を精子傷害性試験によって調べた。ICR系成熟雄マウスの精巢上体より採取した精子を、表面を流動パラフィンで覆った5%ウシ胎児血清(M.A.Bioproducts)と0.5%果糖を含む400 μ lのPBSの小滴中(37℃)に浮遊させた。PBSで1/4に希釈したモルモット補体40 μ lと、PBSで1/4、1/8および1/16に希釈した雌脾臓細胞吸収抗血清または雄脾臓細胞吸収抗血清40 μ lを混合した80 μ lの小滴に精子浮遊液40 μ lを加え、37℃で45分間処理した後、PBSで希釈した0.2% (w/v) トリパンブルー80 μ lを加え、さらに37℃で20分間精子を処理した。処理後、少量の精子浮遊液をスライドガラス上に塗抹し、37℃で乾燥させた後、45分間オルト液で固定した。顕微鏡下($\times 400$)で100~200の精子を観察し、不染である精子を生存精子、青染された精子を死滅精子として傷害精子率を算出した。対照として補体1/4のみを添加した区および雌脾臓細胞吸収抗血清1/4のみを添加した区においても同様な試験を行った。なお補体としては、ICR系雄マウスの脾臓細胞で吸収した(1×10^8 cells/ml serum) Hartley系雄モルモット新鮮血清を用いた。

3) 4細胞期胚および8細胞期胚の培養

6~10週齢のICR系雌マウスに5 IUの妊馬血清性性腺刺激ホルモン(PMSG、帝国臓器)を腹腔内に投与し、その48時間後に5 IUのヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG、三共臓器)を投与して過排卵を誘起し、同系成熟雄マウスと交配させた。hCG投与60時間後および68時間後に卵管をM2液⁹⁾で灌流し、4細胞期胚および8細胞期胚をそれぞれ回収した。胚を雌脾臓細胞吸収抗血清あるいは雄脾臓細胞吸収抗血清を10 μ l添加したM16液¹⁹⁾の小滴(60 μ l)に移し、炭酸ガス培養装置内(37℃、5% CO₂-95% 空気)で培養した。hCG投与80時間後から2時間毎に胚を観察し、胞胚腔形成胚数を記録した。

結 果

1) 精子傷害性試験

抗血清およびモルモット補体を用いた精子傷害性試験の結果をFig. 1に示した。傷害を受けた精子はトリパンブルーによって青染されたが、傷害をうけなかった精子は染色されず、両者の区別は容易であった(Fig. 2)。雌脾臓細胞吸収抗血清は濃度に依存した傷害精子率を示したが、雄脾臓細胞吸収抗血清の傷害精子率は、濃度が変化してもほぼ一定であった。また、希釈率1/4および1/8における雌脾臓細胞吸収抗血清と雄脾臓細胞吸収抗血清の傷害精子率の間には有意な差が認められた($P < 0.05$)。

2) 4細胞期胚および8細胞期胚の胞胚腔形成に及ぼす抗血清の影響

雌または雄脾臓細胞吸収抗血清添加培養液中で培養したマウス4細胞期胚の胞胚腔形成率の変化をFig. 3に示した。雌または雄脾臓細胞吸収抗血清添加培養液中で培養した25個および29個の胚はすべて培養110時間後には胞胚腔を形成した。hCG投与100時間後から104時間後では、雌脾臓細胞吸収抗血清添加培養液での胞胚腔形成率は雄脾臓細胞吸収抗血清添加培養液に比べて低く、胞胚腔形成は遅れる傾向を示した。

8細胞期胚の胞胚腔形成率の変化をFig. 4に示した。雌または雄脾臓細胞吸収抗血清添加培養液中で、54個および55個の8細胞期胚を培養したところ、培養100時間後にはそれぞれ51個(94.4%)および53個(96.4%)の胚が胞胚腔を形成し、両者の胞胚腔形成率の間に差は認められなかった。しかし、hCG投与94および96時間後の胞胚腔形成率は、雌脾臓細胞吸収抗血清添加培養液では63.6%および74.5%であったのに対して、雄脾臓細胞吸

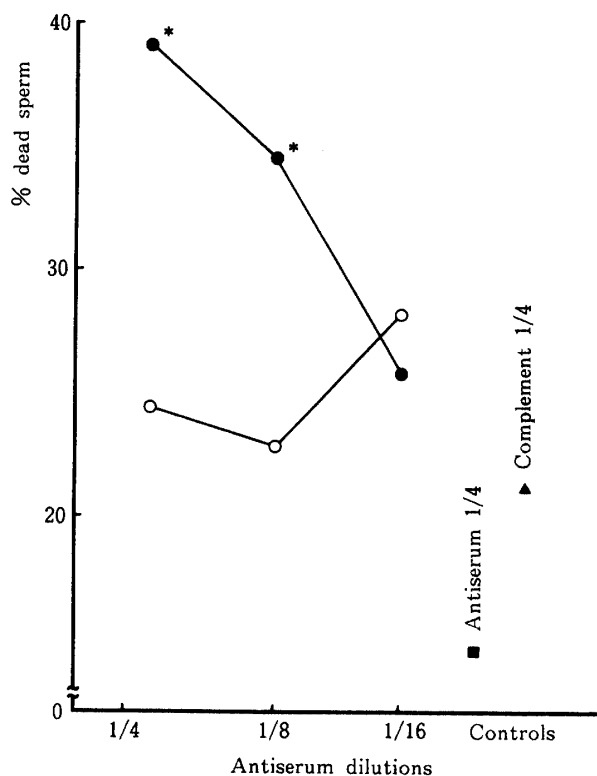


Fig. 1 Cytotoxicity test on mouse epididymal sperm with anti-male antiserum absorbed with male (○—○) or female (●—●) spleen cells. (* $P < 0.05$, χ^2 analysis)



Fig. 2 Two affected (arrows) and an unaffected sperm after culture in medium containing anti-male antiserum and complement.

収抗血清添加培養液では81.5%および92.6%であり、雌脾臓細胞吸収抗血清添加培養液中では、胞胚腔形成は遅れる傾向を示した。

考 察

雄脾臓細胞吸収抗血清の傷害精子率は、雌脾臓細胞吸収抗血清に比べ有意に低い値を示した。このことは、雄

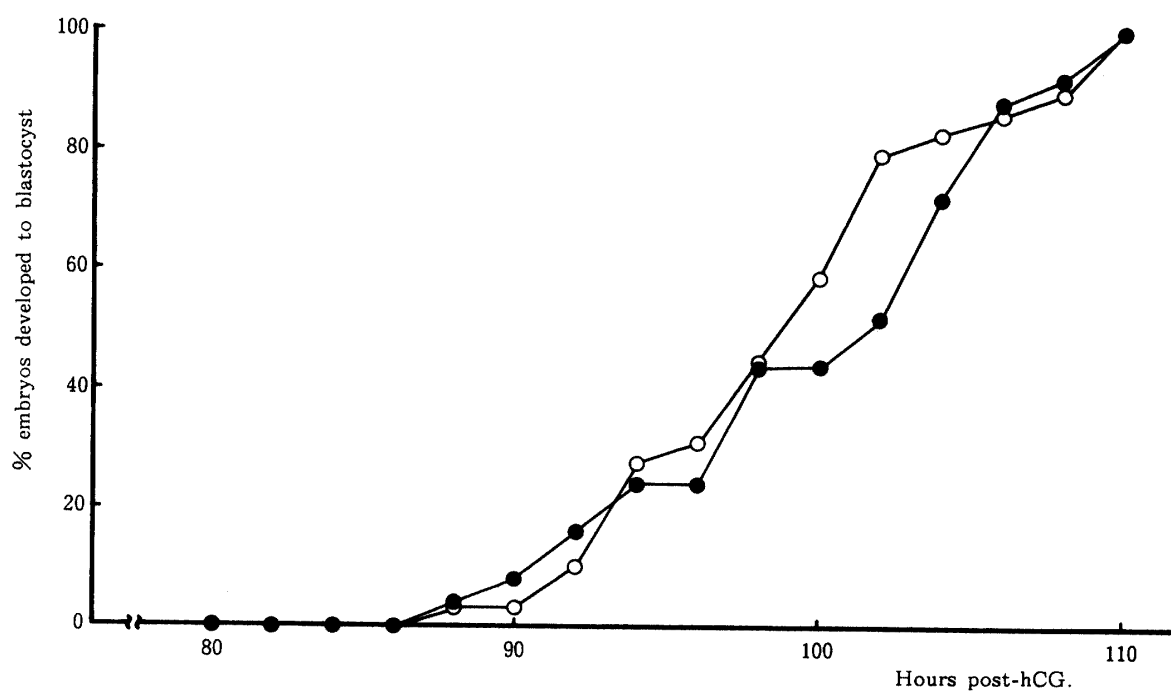


Fig. 3 Effect of anti-male antiserum absorbed with male (○—○) or female (●—●) spleen cells on blastocoel formation of 4-cell mouse embryos.

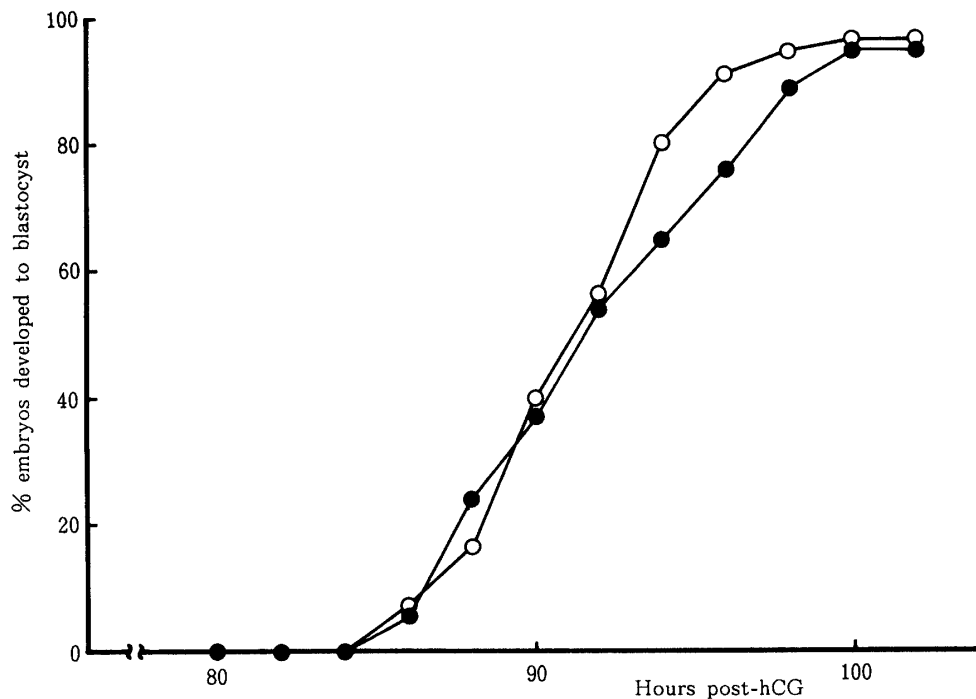


Fig. 4 Effect of anti-male antiserum absorbed with male (○—○) or female (●—●) spleen cells on blastocoel formation of 8-cell mouse embryos.

脾臓細胞で免疫した雌マウスにおいて抗雄特異抗体が産生されたことを示唆している。雄特異抗原は抗原性が低いため、抗体の作製が困難であり¹⁰⁾、また抗体が作製された場合でも、その力価が低いと報告されている⁸⁾。本研究で作製した雌脾臓細胞吸収抗血清 (1/4) の傷害精子率も39%と低いものであった。

雌脾臓細胞吸収抗血清添加培養液中で培養した4細胞期胚は、桑実期で停止することなく胚盤胞へ発生した。しかし、一部の胚は雄脾臓細胞吸収抗血清添加培養液中での発生に比べて、胞胚腔形成が遅れる傾向を示した。また、8細胞期胚を用いた場合にもほぼ同様な傾向が認められた。UTSUMIら¹²⁾は、ラット桑実胚を抗雄特異抗体を添加した培養液中で培養すると、雄の胚の胞胚腔形成は特異的に抑制され、桑実期で停止すること、また雌の胚は胞胚腔形成を抑制されることなく胚盤胞へと発生すると報告している。本研究において作製された抗血清は力価が低かったことから、胞胚腔形成に対して十分な作用を発現しなかった可能性が考えられる。また、雄

特異抗原は哺乳類に共通であるとされているが¹⁴⁾、C57BL/6系マウスで作製した抗血清の細胞傷害性は、他系統のマウスでは低いとの報告もある⁵⁾。本実験に用いたICR系マウスでは抗体の胞胚腔形成阻害作用が弱かったのかも知れない。

雌脾臓細胞吸収抗血清で培養した胚のうち、胞胚腔形成の遅れる胚は、UTSUMIら¹²⁾の報告によれば雄と推定されるが、抗雄特異抗体によって雄胚の胞胚腔形成が抑制される原因は明らかではない。マウス胚の卵割速度はH-2組織適合遺伝子複合体中の遺伝子 (Ped gene) の影響を受け、また Ped gene products 自体がH-2抗原である可能性も示唆されている^{3, 4)}。一方、マウス雌雄胚の発生速度に差があるとの報告もみられ¹¹⁾、卵割速度は性染色体上に遺伝子座を持つ遺伝子によって影響を受けることも考えられる。もし、雄特異抗原が Ped gene と同様な組織適合性抗原であるとすれば、抗雄特異抗体は雄特異抗原をマスクすることによって卵割速度を低下させ、雄胚の胞胚腔形成を特異的に抑制すると考

えられる。

要 約

マウスを用いて雄特異抗原に対する抗血清を作製し、抗血清中に抗雄特異抗体が存在することを精子傷害性試験によって確認した後、マウス4細胞期胚および8細胞期胚の胞胚腔形成に及ぼす抗雄特異抗血清の影響を調べた。

C57BL/6系雄マウスの脾臓細胞を同系雌マウスに免疫することによって作製した抗血清を用いて精子傷害性試験を行った。雌脾臓細胞吸収抗血清は、濃度依存的な精子傷害性を示したが、雄脾臓細胞吸収抗血清ではこのような作用は認められなかったことから、抗血清中には抗雄特異抗体の存在することが確認された。マウス4細胞期胚を抗血清添加培養液中で培養したところ、胚は雌脾臓細胞吸収抗血清および雄脾臓細胞吸収抗血清添加培養液中のいずれにおいても桑実期で停止することなく胚盤胞へ発生した。しかし、雌脾臓細胞吸収抗血清添加培養液中では、一部の胚の発生が雄脾臓細胞吸収抗血清添加培養液よりも遅延する傾向が認められた。また、8細胞期胚を用いた場合においても同様な傾向が認められた。

引用文献

- 1) EICHWALD, E. J. and C. R. SILMSER: *Transplant. Bul.*, 2, 148-149, 1955.
- 2) EPSTEIN, C. J., S. SMITH and B. TRAVIS: *Tissue Antigens*, 15, 63-67, 1980.
- 3) GOLDBARD, S. B., K. M. VERBANAC and C. M. WARNER: *Biol. Reprod.*, 26, 591-596, 1982.
- 4) GOLDBARD, S. B. and C. M. WARNER: *Biol. Reprod.*, 27, 419-424, 1982.
- 5) GOLDBERG, E. H., E. A. BOYSE, D. BENNETT, M. SCHEID and E. A. CARSWELL: *Nature*, 232, 478-480, 1971.
- 6) KOO, G. C. and C. L. GOLDBERG: *J. Immunol. Meth.*, 23, 197-201, 1978.
- 7) KRICO, C. J. and E. H. GOLDBERG: *Science*, 193, 1134-1135, 1976.
- 8) PIEDRAHITA, J. A. and G. B. ANDERSON: *J. Reprod. Fert.*, 74, 637-644, 1985.
- 9) QUINN, P., C. BARROS and D. G. WHITTINGHAM: *J. Reprod. Fert.*, 66, 161-168, 1982.
- 10) 角田幸生・中井裕・田中義夫・杉江佑: 哺乳卵研誌: 1, 105-106, 1984.
- 11) TSUNODA, Y., T. TOKUNAGA and T. SUGIE: *Gamete Res.*, 12, 301-304, 1985.
- 12) UTSUMI, K., E. SATOH and M. YUHARA: *Proc. 2nd Int. Cong. Reprod. Immunol., Suppl.*, 59, 1983.
- 13) WACHTEL, S. S.: *Theriogenology*, 21, 18-28, 1984.
- 14) WACHTEL, S. S., G. C. KOO and E. A. BOYSE: *Nature*, 254, 270-272, 1975.
- 15) WHITE, K. L., G. B. ANDERSON, T. J. BERGER, R. H. BONDURANT and R. L. PASHEN: *Gamete Res.*, 17, 107-113, 1987.
- 16) WHITE, K. L., G. B. ANDERSON and R. H. BONDURANT: *Biol. Reprod.*, 37, 867-873, 1987.
- 17) WHITE, K. L., G. B. ANDERSON, R. L. PASHEN and R. H. BONDURANT: *J. Reprod. Immunol.*, 10, 27-32, 1987.
- 18) WHITE, K. L., G. M. LINDNER, G. B. ANDERSON and R. H. BONDURANT: *Theriogenology*, 19, 701-705, 1983.
- 19) WHITTINGHAM, D. G.: *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 14, 7-21, 1971.
- 20) WOOD, T. C. K. L. WHITE, D. L. THOMPSON Jr. and F. GARZA Jr.: *J. Reprod. Immunol.*, 14, 1-8, 1988.