

特集：卵子学会の歩み

イトミミズの生殖から哺乳動物の体外受精へ

From the reproduction of the fresh water earthworm (Tubifex) to the *in vitro* fertilization of mammalian

平尾 幸久

Yuki-hisa Hirao

元和歌山県立医科大学教養部生物学教室 〒641-8509 和歌山市

Former Department of Biology, Wakayama Medical University, 811-1 Kimiidera, Wakayama 641-8509, Japan

はじめに

この度、和文誌である日本卵子学会誌の廃刊に伴って“卵子学会の歩み”という特集を企画するので何か書いて欲しいとの依頼を受けた。卵子研究に関するものなら何を書いてもよいということなので、私が研究テーマを変えることになった経緯やハワイ大学のYanagimachi研究室で行ったハムスターの体外受精の研究のことを書いた。それは私にとってとてもインパクトのある大きな出来事の一つになったからである。そして、帰国後の研究では私共の最新の論文であるマウス卵管漏斗部（卵管采）の観察を紹介したが、これらはすべてエッセイ風に書かせてもらった。

研究テーマを変更した動機

私が昭和46年（1971年）に和歌山県立医科大学医学進学課程の生物学担当の講師に採用されたとき、進学課程の校舎は専門課程（基礎医学と臨床医学）と附属病院を持つ本部と切り離され、本部とは5キロも離れた田園の地に紀伊分校として建てられていた。本学に入学した学生は先ず進学課程で人文科学、語学（英語、ドイツ語）、自然科学や保健体育の単位を2年間で取得しなければならない。医学を本格的に学ぶ前に、自然の豊かな地で教養科目をしっかり学んだ人間性豊かな医師を育てるという高邁な目標の下に校舎を分離させていた。あの頃の私の研究は、北大の大学院のとき（1963年）に与えられた、水棲イトミミズの生殖法で産卵や受精の仕組みを調べることがテーマであった。陸棲のミミズは肉眼でも観察できる大きさなので、その生殖法については詳しく報告されているが、イトミミズについてはまだ調べられていない。イトミミズは体長4–6 cm、体幅1–2 mmと小さく、しかも有機質の多いドブ川の泥のなかに頭部を

突っ込み、尾部を水中に出してゆらゆら動かしている。これをどのようにして実験室で観察するかが最初の仕事となり、また、ミミズ類は雌雄同体なのでどの体節に卵巣や精巣が配列しているのかなどの組織学的観察を行った。さらにイトミミズは5–7個の卵を包んだ半透明な卵嚢(Cocoon)を生み出す。この産卵は交尾せずに数ヶ月の間に何度も産む。卵嚢はどのようにして形成されるのか、卵はどの時点で受精するのかを明らかにすることを試み、これらをまとめることができ理学博士の学位を取得した。卵嚢内の卵はすべて受精していて卵割を始めるが、この時期に卵嚢を破って卵を水中に出すと双頭や双尾をもつ奇形が生じる。何故、奇形が起こるのかを明らかにすべく、和医大に着任して研究を始めようと勇んでみたが、進学課程のような教養部では教育に力を入れることが先で、研究費も少なくまずは研究室を整備する必要があった。次に、研究材料のイトミミズを採集しようと和歌山市のあちこちのドブ川を調べてみたが全く生息している気配がない。北大のときは大学構内の一角にあるドブ川には年中生息していて、真冬でも採集することができ研究材料には事欠かなかったのに、和歌山ではどうしても手に入らない。困り果てて熱帯魚店で餌用に売られているイトミミズを購入し、研究室に持ち帰っていざ観察をといっても生きが悪く観察に適さない。さらに、生物学の授業を本格的に担当するのは初めてで、しかも医学部教養の学生にどのくらいのレベルの話をするればいいのかなど講義ノートを作成するのに時間がかかっていた。ちょうどその頃、本学の図書館で、J. Ultrastruct. Res.にカルフォニア大学のL. Zamboni (1971)¹⁾が、ハワイ大学のR. Yanagimachi and Y. D. Noda (1970)²⁾が同雑誌に発表した、ハムスター精子の受精時にその先体に変化するプロセスを電顕で観察したものに強いクレームをつけた論文が目にとまった。これに対してR. Yanagimachi and Y. D. Noda (1972)³⁾が鋭く反論している論文に出会った。これらの論文を丁寧に訳しノートに書き取るうちに哺乳動物の受精の研究に惹きつけられた。学生の講義でウニやカエルの受精の古典的

（受付 2018年10月24日／受理 2018年11月3日）

別刷請求先：〒003-0021 札幌市白石区栄通18丁目4-6-502

e-mail: yhirao1368@m01.jogjog.ne.jp

な研究から、電顕や分子レベルでの受精のメカニズムを講じたり、ときにはイトミミズの話はできても、それらは無脊椎動物や両生類の現象でしかなく、哺乳動物の場合とは問われると、実際に生きた卵を見たこともないし、参考書程度の知識しかない。医学部の学生はヒトを対象とするのだから、それに近い哺乳動物の研究の話ができたという気持ちで強く芽生え始めた。

ちょうどその頃、幸いなことに和歌山県の援助により、本学の進学、基礎と臨床の若手教員を対象に、毎年1名を海外で1年間留学できるという制度が発足した。ハワイ大学のYanagimachi研究室で哺乳動物の受精の研究をしてみたいという思いから、早速、本学には留学の希望を出しその順番を待つことにし、一方、Yanagimachi教授には受精の研究をしたいので許可して欲しい旨の手紙を履歴書とともに送った。教授からは「君はイトミミズのような無脊椎動物をやっている、哺乳動物の研究をするというのはどういうことか。ここで研究しても帰国してから続けられるのか」との返事がきた。そこで、こちらの研究環境を説明し、研究材料が入手し難く研究に窮していること、医学部の学生に哺乳動物の受精の話をするのに自分自身で観察してみたい、そして先生のところで学んだ後必ず哺乳動物の生殖にテーマを変更したいと強くアピールした。やがて、教授から「それなら来てよい」という返事をいただいた。1年間、大学を留守にするとすれば、まず自分の担当する生物学の授業の1年と2年生の前期と後期分を済ませる必要があった。そのために、その年の4月に特別な時間割を教務に組んでもらい1年分の授業を前期中に済ませ、昭和51年(1976年)8月の初めにハワイ大学に向かった。

ハワイ大学での研究

基本操作の習得

ハワイ大学で初めてゴールデンハムスターを目の当たりにした。毎朝8時が9時頃にハムスターの膻を絞ってクリーム状の粘液がみられたら、その個体はその日の午前2-3時頃に排卵が起こった証拠だという。この個体は次の排卵に向けての発情周期の第1日目(Day 1)になるので、そのケージに日付を書いた色ラベルを貼る。ハムスターの排卵周期は4日なので、どの色になるかあらかじめ4種類のマーカーペンで色分けをしたカレンダーを作成しておく、その日のラベルの色が決まる。この作業を4日繰り返すと一集団の個体の全ての発情周期がチェックできる。マウスでは膻スメアールを作り顕微鏡で粘液細胞の状態を観察して発情周期を判定しなければならないのに比べ、ハムスターはいとも簡単に排卵日を知ることができる。また、ハムスターは排泄をケージ内の隅にするなど儀儀がいいし動物臭も少ないのに対して、マウスはまったくその逆なので、Yanagimachi教授が好んでハムスターを研究材料にしている理由が分かったような気がした。排卵チェックには、まずハムスターの首を掴んで手のひらの上に仰向けにしなければならない。ところが、首に手を近づけようとするとキーキーと甲高く鳴いて

抵抗し、ときには咬みついたりする。この作業だけで汗だくなってしまったが、何回か試みていくうちに咬みつかれないうちでできる方法を見つけた。

次に、過剰排卵をさせる方法として、Day 1に該当する個体に、朝にPMSG(妊馬血清性腺刺激ホルモン)を注射し、次いで3日後(Day 3)の夕方にhCG(ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン)を注射すると、決まって12時間後に排卵が起こるので、次の日何時に実験をするかでhCGを打つ時間を決めれば良いことなどを学んだ。また、排卵した卵の回収方法は、実体顕微鏡下で眼科用ピンセットまたはハサミで卵管膨大部の上皮の一部をカットすると卵塊が飛び出てくる。しかし、この方法だとピンセットやハサミに触れた卵が壊れたり、卵管に残ったりして全部の卵を回収できないことがある。そこで、卵管の膨大部の後方部の卵管を切り、卵管采から注射針(注射針の先を丸くしておく)を差し込んで塩溶液を注入(Flushing)すると卵塊の全てを回収することができる。卵管から回収した卵塊は、卵丘細胞に覆われているのでHyaluronidaseで卵丘細胞を除去し、次いで透明帯をTrypsinで溶解して裸の(Zona-free)卵を得る方法も目の当たりすることができた。ただし、この操作にはパストールのピペットを使うのだが、直径100 μmほどの卵を吸い取るにはピペットの口が太くて思うように吸い取れない。そこで、このピペットの先端をガスバーナーで焼いて引き伸ばし、卵の直径より少し太めにしたピペットを作製することを教わった。また、何種類かの太さのピペットを作製しておけば状況に合わせてそれを使い分けすることができるが、初期の頃は先の細いピペットに卵を吸い取っても操作中にピペットが簡単に折れて、大事な卵を見失ったり、吸い上げ過ぎて卵がガラスの内壁に付着して二度と回収できないという失敗を何度も経験してしまった。当時でもマウスピース付き吸引チューブにヘマトクリット管を繋いだピペットで卵を吸引する方法もあったが、前者の方が簡便でスピーディーに操作できることからこの方法に馴れることを勧められた。

次に、精子の培養方法では、雄の片方の精巣上体尾部を切り出しそこから精子を採取するのだが、まず、ハムスターを麻酔して下腹部の左右どちらかを2-3 cm切開してそこを広げ、精巣上体尾部を引っ張り出しそれに連なる周辺の血管などを糸で縛り、精巣上体尾部だけを切り出す。その後、素早く腹部を縫合し、毛皮の部分はクリップで止めて終了なのだが、精巣上体尾部を切り出すときや腹部の縫合のとき、ハムスターの麻酔が浅いと手術の途中で覚醒し、腹部の内臓が出たまま実験台から床に落ちて這いまわるなどのハプニングが起こり、慌てふためいたことが思い出される。取り出した精巣上体尾部の一部をキムワイプで包み有柄針で精巣上体尾部の表面を突いて、そこから出てくる精液を採り培養液の入ったペトリ皿に入れて37°Cで3-4時間培養する。その間に精子は受精能(Capacitation)を獲得し、先体反応(Acrosome reaction)を起こす。体外受精を行うには、過剰排卵の卵を回収する時間を決め、それに合わせて精子が

受精能を獲得し先体反応を起こすのに必要な時間を見越して精子の培養を始めなければならない。このような基本的な操作を駆け足で学んで、いよいよ実験テーマが与えられた。

実験スタート

当時、Yanagimachi研究室では、ハムスター精子が卵に侵入するとき、精子の先体の後方部の膜と卵の細胞膜が融合することによって、精子核が卵細胞に取り込まれることを明らかにして間もないこともあって、色々な研究者が訪れ活気に満ちていた。そこで、卵と精子の膜融合は細胞膜を構成する脂質二重層のどの要素が関わっているのかを調べよということになった。卵細胞膜の脂質二重層を構成すると思われる分子を想定して、媒精する前にZona-freeにした卵を蛋白分解酵素、脂質分解酵素や糖質分解酵素など28種類の酵素でそれぞれ処理してから、卵をよく洗った後に媒精した。媒精後1時間で卵を位相差顕微鏡下で観察し、卵細胞質中で精子核が膨化(Decondensation)していれば膜融合が成立したと判定した。この実験でPhospholipase Cの酵素で処理した卵のみに精子の侵入が見られなかった⁴⁾。このことは、脂質二重層のグリセロリン脂質のリン酸の部位が欠如すると膜融合ができないことを示唆するものとなり、ほかの分子はまったく関与していないという結果を得た。

次に、膜融合は何度まで可能なのかを明らかにするため、4、10、16、25、37°Cの環境を作り、それぞれの温度下で媒精し卵細胞質中の精子核の変化を調べた。結果は25°Cまでは正常で、16°C以下になると精子の侵入は低下し、10°C以下では精子の侵入はみられなかった⁵⁾。膜融合は温度が下がると膜の流動性が低下することで融合が起こり難くなることを意味している。これらの実験に夢中になっているうちに年が明け3月末になっていた。ハワイに来た頃真っ赤に焼けたダイヤモンドヘッドの山肌が緑一色になっているのに気付いた。常夏のハワイにも雨季があり、一時的に春を思わせる時期があることを教授のHiroko夫人から聞いた。日本では今頃桜の時期になっているのだらうとふとそんな思いが去来していたとき、教授から滞在を延ばせないかとの打診があった。実験に慣れて研究が楽しくなっていたので、もう少し実験を続けてみたいという思いもあって、和医大に出張延期を申し出た。大学側は延期を渋ったが、私が帰国してから担当の生物学の1年分の授業が可能か教務と打ち合わせせよ、ということになり、教務と交渉して、授業が可能な最大限の10月末まで、3ヶ月の延長が認められた。

次に、これらの実験ではZona-free卵に媒精しているため常に多精受精が起き、卵細胞質中に膨化した精子核や雌性前核が幾つもみられる。では、卵細胞質に取り込まれた精子核は何個まで正常な雌性前核を形成するのだろうかかと矢継ぎ早にテーマが出された。そこで、多精受精を制限するため、媒精した後、1分、2分...ごとに卵を別の新しい培養液に移し替えて精子の侵入を制限する方法を講じ、精子が卵に1個入った場合、2個の場合、3個...と調べた。結果は、卵細胞

質に取り込まれた精子核は5-6個までだと正常な雌性前核になり得ることが分かった⁶⁾。

これらの観察中、ときどき第2分裂中期の染色体が卵細胞質に散らばりそれが幾つもの小胞(Subnuclei)となり雌性前核や第2極体も形成されないという異常が意外と高い頻度でみられることに気付いた。何故そんなことが起こるのか。教授と話し合っているうちに、受精は体内で行われ光に曝されていないのに、この実験では常に蛍光灯の下で行っているので光のせいではないか、研究室の蛍光灯の光がハムスター卵にとって害となるのではないかと気付いた。そこで、蛍光灯の代わりに白熱灯(電球)の下で一連の作業をしてみると卵に異常が起こり難いことから、波長の長い光だと安全と考え、蛍光灯を赤いセロファン紙で巻いて実験をしてみた。赤い光の下では第2極体は正常に放出し雌性前核が形成された。このことを詳しく解析するために、卵の回収から卵を酵素でZona-freeにするまでを赤い光の下で行い、そのあと色々な波長の光に1時間曝した後に媒精するものと、光に曝さないように黒い箱に1時間置いてから媒精した卵とを比較した。その結果は、波長が470-480 nm以下の光に曝されると染色体に異常が起こり、正常な雌性前核が形成されないことが分かった。このことは、実験室の蛍光灯には、ハムスター卵に有害な波長の光が含まれていることを示唆するものとなった⁷⁾。

この実験でちょうどハワイ大学滞在のリミットが近づき、帰国前に教室のセミナーで私の研究結果についてスピーチをした。スピーチといえば、Yanagimachi教授の研究室には先に述べたように国内外の色々な研究者の訪問があった。なかには文系の研究者もおられたが、訪問者には必ずスピーチをしてもらうようになっていて、その都度教室員が談話室に招集された。この1年3か月の間で色々な研究者の英語が聞けて勉強になることが多かった。訪問者が来られるとき、いつもは教授自ら運転しホノルルの飛行場に迎えに行くのだが、教授が忙しいと、こんな人が来るから飛行場に迎えに行ってほしいといわれたり、またスピーチのあとワイキキのホテルまで私の車で送り迎えをしたことは、今思うと懐かしい。

帰国後の研究

昭和52年(1977)10月末、ハワイ大学から戻ったがゆっくり振り返る間もなく私に課せられた授業が待っていた。授業に追いまくられながらもハワイ大学での研究の続きをすべく準備にとりかかった。私がハワイ大学に行く前に、紀伊分校の敷地内に本学の薬理学教室の指導による産学共同の研究が始まり、プレハブの動物舎が建てられていたが、共同研究は約2年で終了し動物舎は本学に寄贈されることになって、その後の管理を我々生物学教室が引き受けることになった。ハムスターやマウスを長期にわたって飼育するには、動物舎は校舎とは隔離する必要がある。もし、同一校舎内の研究室の一角に飼育室を設けた場合、動物臭で近隣の研究室からクレームがつくのは必至で、長期の飼育は

無理である。理学部出身者が哺乳動物をテーマにしたくとも、動物を飼育する場所を確保できないという難問があるが、幸いにもその懸念事項が解消された。ようやく集中講義のかたちで私に課せられた授業が終わり、新年度に入り正常なペースの授業になった。生物学教室には私を含めて3人の教員がいたがそれぞれ別々の研究テーマを持ち、何をやるにも1人でやらなければならない。それに新年度から大学の各種委員会の役を持たされ自由な時間が持てず、帰国したらハムスターの仕事をすると誓ったのにその準備がなかなか進まない。ようやくハムスターの飼育と、そしてYanagimachi研究室で行ったと同じような体外受精が再現できるようになるまでに、帰国してから半年以上もの時間を要してしまった。体外受精の研究は卵の回収と精子の培養とをタイミングよく行い、媒精したあと卵を培養し、その後卵の観察をしてそれをフィルムに収めて完了となるのだが、これら一連の作業には継続した時間が必要である。授業はもちろん、大学の各種委員会や入試の会議、後には教授会や部局長会議の招集などで継続した時間が取れなくなって、どうしても研究方法を考えなければならない。結局、研究試料を固定しておいて時間が取れたときに顕微鏡で観察するという手法に切り替えざるを得なくなってしまった。和医大の定年退職後(2004年)、関西医療大学に移って、以前からマウスやハムスターで疑問に思っていた卵管采と卵巣の位置関係について明らかにすることを試みた。排卵した卵を卵管膨大部から回収するとき、卵管采から注射針を差し込んでFlushingすることは先に述べたが、卵を回収する者にとっては卵管采が分かればそれで用が足りるのだが、卵巣との位置関係をどうしても知りたい。卵管采をみつけようと卵巣の周りの脂肪組織を取り外すのだが、そのとき決まって卵巣囊の膜が破れ、いとも簡単に卵管采が露出してしまふ。そこで、マウスの卵巣囊を破らないように脂肪組織を付けたまま卵巣と卵管を一緒に切り出し、顕微鏡用と電顕用の固定液にそれぞれ浸漬した。固定後にまわりの脂肪組織などを注意深く取り除き、パラフィン切片にしたものはHE染色後に顕微鏡で観察し、もう一方は卵巣囊の一部を切除したあと臨界点乾燥を施し走査型電顕で観察した。いずれの観察でも卵巣囊によって形成される卵管腔の一端から卵巣の下部に接するように円筒形の卵管采が突き出している像が一致した⁸⁾。さらに、卵管采は線毛細胞と無線毛細胞(分泌細胞)とで構成されるが、排卵した卵を取り巻く卵丘細胞を線毛が捉えて⁹⁾、それを卵管采の開口部に向けて運ぶという働きのほかに、無線毛細胞から放出される分泌物(粘液)を複数の線毛が捉えて手渡しするように運ぶという新しい知見を得た⁸⁾。このことは線毛細胞の線毛には2つの働きがあることを示唆している。これらの観察結果はこれからこの方面の研究をするとき何らかの参考になれば幸いである。

おわりに

ハワイ大学での滞在も残り少なくなった頃、福田芳紹先

生(北里大学獣医学部・動物資源科学科)がアメリカ留学の帰途にYanagimachi研究室に寄られ、例によってスピーチされた後、私のいる研究室で色々な話をしているなかで、哺乳動物談話会という会があることを知らされ入会を勧めてくれた。帰国後早速会員となったが、会の名称が会員数の増加とともに、哺乳動物卵子研究会、哺乳動物卵子学会、そして日本哺乳動物卵子学会と発展的に改名された。私は平成元年(1989年)から平成16年(2004年)まで学会の理事の1人に加えさせてもらった。その間、平成14年(2002年)6月に和歌山市で第43回日本哺乳動物卵子学会の大会長を務め、大会の懇親会では和歌山の地方色を生かしたマグロの解体ショーのあと、刺身や握りを楽しんでいただいたことが懐かしく思い出される。ハワイ大学ではYanagimachi教授からハムスターの体外受精の研究を通じて、普通なら見過ごしてしまいそうなことを順序立てて観察し、それを数値や図・表にまとめて論文にすることを体験させていただいたことや、公私にわたりご指導いただいたことに、この紙面をお借りして御礼申し上げます。また、私が哺乳動物談話会の時代から日本哺乳動物卵子学会を通じて沢山の先生に出会い、そして多くの事を勉強させていただいたことに厚く御礼申し上げるとともに、本学会が今後更なるご発展を遂げられますようご期待申し上げます。

文 献

- 1) Zamboni, L. (1971): Acrosome loss in fertilizing mammalian spermatozoa: a clarification. *J. Ultrastruct. Res.*, 34, 401-405.
- 2) Yanagimachi, R. and Noda, Y.D. (1970): Ultrastructural changes in the hamster sperm head during fertilization. *J. Ultrastruct. Res.*, 31, 465-485.
- 3) Yanagimachi, R. and Noda, Y.D. (1972): Acrosome loss in fertilizing mammalian spermatozoa: A rebuttal of criticism. *J. Ultrastruct. Res.*, 39, 217-221.
- 4) Hirao, Y. and Yanagimachi, R. (1978): Effect of various enzymes on the ability of hamster egg plasma membranes to fuse with spermatozoa. *Gamete Res.*, 1, 3-12.
- 5) Hirao, Y. and Yanagimachi, R. (1978): Temperature dependence of sperm-egg fusion and post-fusion events in hamster fertilization. *J. Expt. Zool.*, 205, 433-438.
- 6) 平尾幸久・柳町隆造 (1979) : ハムスター卵子の多精における雄性前核の形成. *動物学雑誌*, 88(1): 24-33.
- 7) Hirao, Y. and Yanagimachi, R. (1978): Detrimental effect of visible light on meiosis of mammalian eggs in vitro. *J. Expt. Zool.*, 206, 365-370.
- 8) 平尾幸久・東家一雄 (2018) : マウス卵管の組織学的観察、特に卵管漏斗部(卵管采)に関する新しい知見. *関西医療大学紀要*, 12: 1-7.
- 9) Lam, X., Giesecke, C., Knoll, M. and Talbot, P. (2000): Assay and importance of adhesive interaction between hamster (*Mesocricetus auratus*) oocyte-cumulus complexes and the oviductal epithelium. *Biol. Reprod.*, 62, 579-588.