

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08132

研究課題名(和文) 卵管内の精子移行を制御する母体側メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study on the mechanism of sperm transport in oviduct

研究代表者

日野 敏昭 (Hino, Toshiaki)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：10550676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：交尾によって雌の体内に送り込まれた精子は、卵管内をどのように移動して卵子の待つ受精の場に到達するのか？我々は、生体に繋がったマウス卵管を直接観察する手法を考案し、精子は従来考えられていたように卵管液を泳いで移動するのではなく、卵管の蠕動によって生まれる卵管液の流れに運ばれて、受精の場に移動していることを明らかにした。また、卵管液の流れや蠕動は、卵巢ホルモンに制御されていることも示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトや家畜において、原因不明の不妊や、不授精による受胎率低下が報告されている。これらの異常を理解し、その原因を解明するためには、体内受精メカニズムの正確な理解が求められる。本研究成果は、ほ乳類における体内受精メカニズムの解明のみならず、ヒトの不妊症や家畜の受胎率低下の原因解明、ひいては、新たな不妊治療法の開発や家畜人工授精技術の改良に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：How do spermatozoa in the oviduct migrate from the caudal isthmus to the ampulla where the oocytes await them? In situ observations of the mouse oviduct revealed that spermatozoa migrate to the ampulla not by their own motility but by upward oviduct fluid flow, created by adovarian peristalsis and active fluid secretion. We confirmed that these processes are controlled by ovarian hormones.

研究分野：生殖生物学

キーワード：卵管 蠕動 精子輸送 卵巢ホルモン 卵巣嚢孔 卵子 受精 体内受精

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

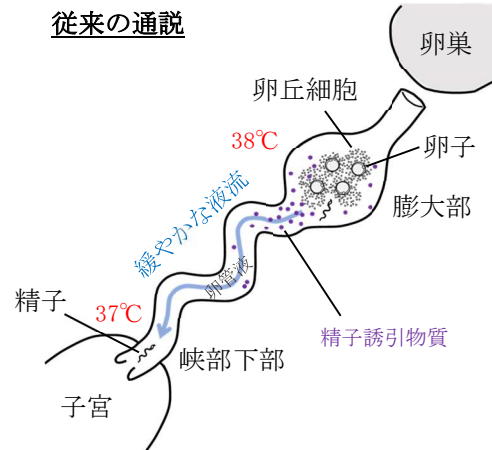
卵管は子宮と卵巣をつなぐ細長い管で、精子が卵子と出会い受精と発生がはじまる、生命の誕生にとって重要な器官である。

ほ乳類では、交尾により雌の体内に射出された精子は、すみやかに卵管の狭部下部（卵管の入り口付近）に移動してそこにしばらく留まることが知られている。数時間後、卵子が排卵された頃に、精子はそこを離れ卵子の待つ膨大部に向かって移動すると考えられている [1]。

この時、精子はどのように卵管内を移動して狭部下部から膨大部に移動するか？

これまでの通説では、卵管内には緩やかに、膨大部から狭部下部にむかって卵管液が流れており、そのなかを精子は泳いで卵子の待つ膨大部に移動すると考えられている。また、ほ乳類精子は、液体の流れに逆らって泳ぐ性質や [2]、卵子や卵丘細胞から分泌された精子誘因物質を感知する性質 [3]、卵管内の温度差を感知する性質 [4] を兼ね備えていることが体外の実験で明らかにされており、これらの性質のおかげで、精子は、卵管内を迷うことなく膨大部に移動できると考えられている (右図)。

一方で、前述した精子の性質は体外で観察されたものであり、はたしてそれらが体内でも等しく起こっており、精子の卵管内輸送をサポートしているかについて、明確な答えは得られていない。実際、生体の卵管を観察すると、卵管は卵巣と子宮をただつなぐだけの静的器官ではなく、蠕動や分節運動を活発に行う動的器官であることがわかる [5]。卵管液は卵管内を激しく行き来していて、卵管内の精子輸送には卵管の蠕動や卵管液の流れが関与していることが報告されている [6,7]。



受精が始まる頃の卵管内には、膨大部から狭部下部にむかって緩やかに卵管液が流れていて、精子はその流れに逆らって泳ぎ膨大部に向かったり、卵子や卵丘細胞から放出された精子誘因物質の濃度勾配を感知して精子は膨大部に向かって泳いだり、卵管内の温度差を感知して暖かい膨大部に向かって泳ぐと考えられている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、血液供給や神経支配を保ったまま生体の卵管を観察する手法 (in situ 卵管観察システム) を立ち上げて、生体における卵管内精子輸送の仕組みとそれを制御する機構を解明することである。

また、これまで完全閉鎖空間と思われていたマウスの卵巣嚢が、実際には卵巣嚢の小孔 (卵巣嚢孔: 注) を介して腹腔と液のやり取りをしていることがわかったので、卵巣嚢孔の機能と受精との関係についても調査した。

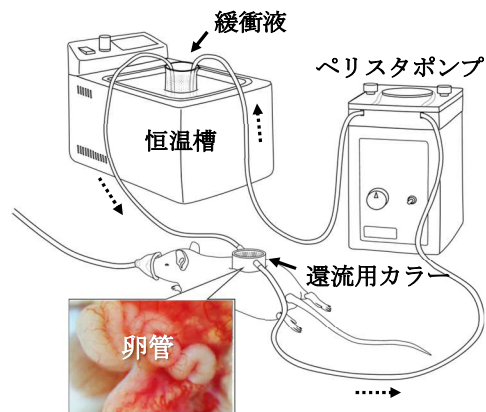
注: 卵巣嚢孔の存在は、ラットで 1942 年に Alden [8] が、マウスで 1945 年に Wimzat ら [9] が報告している。これらは 70 年以上も前に発表された古い論文であるため、見逃されて、マウスの卵巣嚢は完全閉鎖空間との考えが広まったのかもしれない。

3. 研究の方法

(1) in situ 卵管観察システムの立ち上げ

雌マウスを吸入麻酔してから背側の皮膚、筋層を順に切開し、卵管を腹腔外に取り出してそこに保定した。その周りを囲むように還流用カラーを移植し、カラー内に緩衝液 (0.1%BSA 含 PBS) を循環させた (右図)。

in situ 卵管観察システム適用下でも受精が正常に行われるか確認するために、交尾の成立した雌マウスを用いて、排卵が起こる頃に in situ 卵管観察システムを適用し、4 時間そのままにしてから卵子を回収して受精の有無を確認した。



(2) 卵管の動きと卵管液の観察

生体における卵管の動きを調べるために、受精が開始する頃の卵管を動画撮影して動態解析した。

また、卵管液の流れを調べるために、卵管に約 0.1 μ L の墨汁を注入して、その挙動を追跡した。墨汁は実験に使用する前に、一晚透析して夾雑物を除去した。

(3) 卵管の蠕動や卵管液の流れと、精子輸送ならびに受精との関わり

精子先体が GFP に、精子ミトコンドリアが DsRed でラベルされた Tg マウス[10]の精子を使用した。この Tg マウスの精子は蛍光を発するので、卵管壁越しに精子の局在を蛍光顕微鏡下で知ることができる。卵管の狭部下部に約 100 個の精子を注入し、5 分もしくは 20 分後における卵管内の精子の局在を調べた。また、精子注入 4 時間後に膨大部から卵子を採取し、第二極体の放出と雌雄前核の形成を指標にして受精の有無を判定した。

卵管の蠕動をニカルジピン（カルシウム拮抗剤）で阻害したり、卵管采側の出口を結紮して卵管液の流れを阻害したりしてから精子を注入し、精子輸送や受精がどのような影響を受けるかについても調査した。

(4) 卵巣ホルモンと卵管内精子輸送との関わり

卵巣ホルモンやその拮抗剤が、卵管液の分泌や卵管液の流れ、ならびに精子の輸送や受精に及ぼす影響を調査した。卵巣ホルモンはエストロゲン (E2) とプロゲステロン (P4)、その拮抗剤としてタモキシフェンとミフェプリストンをそれぞれ使用した。これら薬剤をゴマ油に 0.1~1mg/mL 濃度で溶かしてから、hCG 投与直後と 12 時間後の 2 回、雌マウスの皮下に 0.1mL ずつ投与してから各種調査を行った。

(5) 卵巣嚢孔の機能と受精との関わり

卵巣嚢孔を縫合糸で結紮して液の出入りを阻害することで、排卵卵子の膨大部への移動や卵管液の流れ、精子の輸送が阻害されるか否か調査した。

4. 研究成果

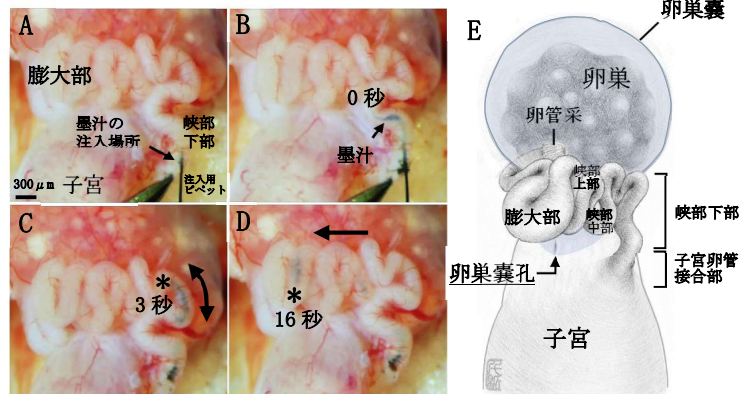
(1) in situ 卵管観察システムが受精に及ぼす影響

in situ 卵管観察システムを交尾後の雌マウスに適用し、4 時間経過後に回収した卵子はすべて受精していたことから、この観察システムの適用が受精に及ぼす影響は無いと判定した。

(2) 卵管の動きと卵管液の流向

受精が開始する頃の卵管は、波立つように激しく蠕動していた。卵管の蠕動方向は、峡部の下部から中部までは卵巣方向だったり子宮方向だったりとして一定しなかったが、膨大部が近くなるにつれて卵巣方向のみとなった。

卵管液の流れを可視化するために、膨大部に微量の墨汁を注入してその動きを追跡したところ、これまでの通説に反して、墨汁は卵管采に向かって移動し卵巣嚢に抜けた。次に墨汁を峡部下部に注入したところ (右図 A, B)、墨汁の動きは蠕動運動に同調するかのようになり、峡部の下部から中部までに行ったり来たりを繰り返して進み (右図 C)、中部を越えたと一気に膨大部に移動した (右図 D)。膨大部に到達した墨汁は卵子卵丘複合体に当たってその進みを緩め、少しずつ卵巣嚢に移動し、卵巣嚢に開口している小孔 (右図 E) を通って腹腔へと抜けた。



墨汁が峡部下から膨大部に至るまでの速度を算出したところ、400 μ m/秒以上と、精子が進む速度の数倍以上だった。精子はこの流速の流れのなかでは自由に泳ぐことが出来ないと考えられる[11]。

卵管内の卵管液は、卵巣に向かって移動し腹腔へと流れ出ていたので、卵管内には新しい卵管液が経時的に分泌されていると推測された。そこで卵管液の分泌量を測定したところ、卵管液は卵管全体から分泌されており、1 時間に約 2.7 μ l (卵管内における卵管液の総量は約 2.1 μ l) が分泌されていることが判明した。

(3) 卵管の蠕動や卵管液の流れと、精子輸送や受精との関わり

卵管の蠕動を阻害するために、還流用の緩衝液にニカルジピン（最終濃度 20 μ M）を加えたところ、約 10 分で卵管の蠕動は消失した。卵管液の流れは完全に止まることは無かったが、その速度は通常の 1/5 程度に抑えられた。このような卵管の峡部下部に精子を注入し、5 分もしくは

は 20 分後における、卵管内の精子の局在を調べた。無処理の卵管では 80%以上の精子が膨大部に達したのに対し、蠕動を阻害した卵管では膨大部に達した精子の割合が著しく減少した。運動性を無くした死滅精子を使って同様の実験を繰り返したところ、同じような結果となった。

精子の注入から 4 時間後に、卵子を回収して受精の有無を判定したところ、無処理の卵管では 90%以上が受精したのに対し、蠕動を阻害した卵管では 20%しか受精しなかった。卵管采を結紮して卵管液の流れを止めてから精子を注入したところ、卵子は 1 つも受精しなかった。

(4) 卵巣ホルモンと卵管内精子輸送との関わり

P4 や E2、ならびにそれらの拮抗剤で処理した雌マウスにおける卵管液の分泌量は、E2 の投与によって増加した。卵管液が、狭部下部から膨大部へと向かって流れるその速度は、ミフェプリストンを投与した卵管で低下した。各種ホルモンやそれら拮抗剤で処理してから人工授精(子宮に精子を注入)を雌マウスに施し、6 時間後に、膨大部に達した精子数と卵子の受精率を調べたところ、E2 の投与によって精子数と受精率が著しく減少した。一方、ミフェプリストンやタモキシフェンを投与した雌マウスでは、膨大部に達した精子数は増加し、一部の卵子において多精子が起こっていた。

このことから、卵管内における卵管液の分泌やその流れ、精子の移動や受精が卵巣ホルモンによって制御されている可能性が示唆された。

(5) 卵巣囊孔の機能と受精との関わり

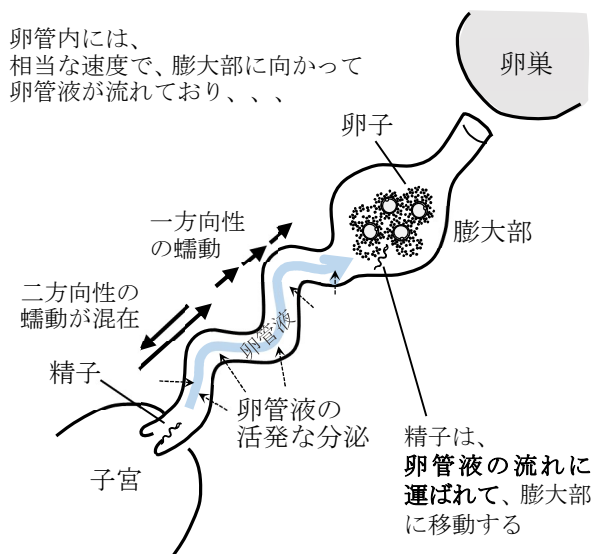
卵巣囊孔を閉じてから 1~3 日後の卵巣囊は、結紮しなかった側と比べて、直径にして約 1.2 倍、膨大していた。このような卵巣でも排卵は阻害されることなく、排卵卵子は膨大部に移行していた。また、峡部下部に墨汁を注入すると、墨汁は 1~2 分で膨大部に達し、精子を注入しても同様に膨大部に運ばれればほとんどの卵子が受精した。このことから、卵巣囊孔を介した液の移動が阻害されても、排卵や卵管液の流れ、ならびに精子輸送や受精への影響はほとんど無いと考えられた。

(6) まとめ

本研究から、発情期のマウスの卵管内には卵管液が活発に分泌されていて、更にこの時期の卵管は、その一部が膨大部に向かって一方方向性の蠕動を示すため、卵管内に分泌された卵管液は速やかに卵巣方向に汲み出され、その流れが精子を受精の場に運んでいることが示された(右図)。

精子が峡部下部から膨大部に移動するのに運動性は重要ではなく、卵管液の流れる速さは精子が自由に泳げるほど緩やかではないため、少なくともマウスでは、精子がもつ走性が、卵管内の精子輸送に重要な役割を果たしているとは考えにくい。

哺乳類の卵管で何が起きているかを理解するためにも、今後、様々な動物種で、生体の卵管を使った研究成果が積み重なっていくことが求められる。



<引用文献>

1. Suarez SS. Gamete and zygote transport. In: Neil J, editor. **Knobil and Neill' s Physiology of Reproduction**, vol. 1. 4th ed. San Diego: Academic Press; 2015. p. 197-232.
2. Miki K, Clapham DE. Rheotaxis guides mammalian sperm. **Curr Biol**. 2013; 23: 443-52.
3. Eisenbach M. Mammalian sperm chemotaxis and its association. **Dev Genet**. 1999; 94: 87-94.
4. Roy D, Levi K, Kiss V, et al. Rhodopsin and melanopsin coexist in mammalian sperm cells and activate different signaling pathways for thermotaxis. **Sci Rep**. 2020; 10: 1-11.
5. 中曾 榮吾. 家兔卵管運動に関する研究 (腹窓法及活動写真撮影による). **日本産科婦人科學會雜誌**. 1952; 4: 159-81.

6. Battalia DE, Yanagimachi R. Enhanced and co-ordinated movement of the hamster oviduct during the periovulatory period. **J Reprod Fertil.** 1979; 56: 515-20.
7. Ishikawa Y, Usui T, Yamashita M, et al. Surfing and swimming of ejaculated sperm in the oviduct. **Biol Reprod.** 2016; 94: 1-9.
8. Alden RH, The periovarial sac in the albino rat. **Anat Rec.** 1942; 83: 421-35.
9. Wimsatt WA, Waldo CM, The normal occurrence of a peritoneal opening in the bursa ovarii of the mouse. **Anat Rec.** 1945; 93: 47-57.
10. Hasuwa H, Muro Y, Ikawa M, et al. Transgenic mouse sperm that have green acrosome and red mitochondria allow visualization of sperm and their acrosome reaction in vivo. **Exp Anim.** 2010; 59: 105-7.
11. Tung C, Ardon F, Fiore AG, et al. Cooperative roles of biological flow and surface topography in guiding sperm migration revealed by a microfluidic model. **Lab Chip.** 2014; 14: 1348-56.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hino Toshiaki, Yanagimachi Ryuzo	4. 巻 101
2. 論文標題 Active peristaltic movements and fluid production of the mouse oviduct: their roles in fluid and sperm transport and fertilization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 40～49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1093/biolre/ioz061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 日野敏昭
2. 発表標題 マウス初期胚の第二極体における半数体ゲノムの安定性と発生運命
3. 学会等名 新学術領域研究「全能性プログラム：デコーディングからデザインへ」第1回公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 日野敏昭
2. 発表標題 マウス生体における卵管の蠕動と卵管液の流れ：精子の移動や受精との関係
3. 学会等名 第64回 日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiaki Hino
2. 発表標題 Amazingly active peristaltic movements and fluid production of the mouse oviduct: their roles in fluid and sperm transport and fertilization
3. 学会等名 52nd annual conference, Society for the study of the reproduction（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 日野敏昭
2. 発表標題 先体反応の再考察：先体反応はいつどこで起こり、どのような役割を果たすのか？
3. 学会等名 第63回 日本生殖医学会学術講演会・総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 柴原浩章	4. 発行年 2020年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 350
3. 書名 必読 卵管学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>【最近の論文解説】マウス卵管の活発な蠕動運動と卵管液の分泌：卵管液や精子の輸送ならびに受精との関係 https://sarb.weebly.com/document/9305674</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	柳町 隆造 (Yanagimachi Ryuzo)	University of Hawaii・Department of Anatomy, Institute for Biogenesis Research・Professor emeritus	