

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06468

研究課題名（和文）新しい卵管観察法による精子と初期胚の卵管内輸送メカニズムの解明

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

研究代表者

日野 敏昭 (Toshiaki, Hino)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10550676

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：マウス生体の卵管を使い、配偶子や初期胚の卵管内輸送メカニズムについて検討した。卵子は、卵管内を流れる卵巣方向の液流に逆らいながら、繊毛運動の働きによって受精の場である膨大部に移動していた。初期胚は、卵管の蠕動運動によって生まれる液流や、蠕動運動そのものの働きによって、子宮に向かって少しずつ移動していることが示された。

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、不受精による受胎率低下や原因不明の不妊が報告されている。これらの異常を理解し、その原因を解明するためには、配偶子がどのように卵管内を移動して受精し、初期胚がどのようにして子宮にいたるのかについての正確な理解が求められる。本研究成果は、体内受精から妊娠に至るまでのメカニズム解明のみならず、ヒトの不妊症や家畜の受胎率低下の原因解明に繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the transport of zygotes and embryos through the oviduct in situ. We observed that oocytes moved toward the site of fertilization against the fluid flow directed towards the ovary, driven by ciliary movement. Additionally, we found that embryos were propelled towards the uterus due to the peristaltic movement of the oviduct and the resulting fluid flow.

研究分野：生殖生物学

キーワード：卵管 配偶子 受精卵 輸送

1. 研究開始当初の背景

卵管は、卵巣と子宮を繋ぐ細長い管で、精子と卵子が出会い受精と発生が始まる重要な器官である。この時、精子や卵子は卵管内をどのように移動して受精の場である膨大部に到達するのか？また、初期胚は卵管内をどのように移動して子宮に至るのか？

卵管内の精子輸送に関する従来の通説では、卵管内には卵管液が子宮に向かって緩やかに流れており、精子はその流れに逆らいながら、卵子や卵丘細胞から放出される精子誘因物質を手がかりに泳いで膨大部に到達するとされていた (Eisenbach, *Dev Genet*, 1999; Miki and Clapham, *Curr Biol*, 2013)。しかしこの通説は、卵管を体外に切り離して行われた実験結果から導き出されたものであり、生体でも同じ仕組みが機能しているのか不明であった。私達は、卵管を体外に切り離すことなく血液供給や神経支配を保ったまま卵管を観察する方法 (*in situ* 卵管観察法) を考案し、精子は従来の通説とは異なる仕組みで膨大部に到達していることを報告した (Hino and Yanagimachi, *Biol Reprod*, 2019)。すなわち、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、その一部が受精の場に向かって一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、その流れが精子を膨大部に運んでいることを明らかにした。一方、発情期には排卵と卵子の膨大部への輸送も行われるが、卵子は卵管液の流れに逆行して膨大部に移動することになる。このようなことは実際に起こりえるのだろうか。また、実際にそれが起こりえるとしたら、何が、卵管内における、卵管液の流れに逆行した卵子の輸送を可能にしているのだろうか。

卵管内の初期胚輸送に関しては、初期胚が、卵管の絨毛や蠕動のはたらきにより少しずつ子宮に向かって移動しているとされる (Suarez, *Physiology of Reproduction*, 2015)。しかし卵管内を移動する初期胚を生体で直接観察した少ない。我々が開発した *in situ* 卵管観察法を用い、卵管内で初期胚が移動する様子を捉えれば、新事実がみえてくる可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 卵管内における初期胚の輸送メカニズムの解明

マウスの卵管は、膨大部から子宮に向かって絨毛がほとんど無くなるので、初期胚輸送は蠕動運動によりなされると考えられている。ここでは、受精後間もない初期胚が卵管内を移動して子宮に至るまでの様子を *in situ* で動画撮影し、卵管の蠕動が初期胚の移動に伴ってどのように変化していくのかを明らかにする。

(2) 卵管内における卵子の輸送メカニズムの解明

精子は卵管液の流れに運ばれて膨大部に到るが、卵子はこの流れに逆らって移動していると推測される。ここでは、卵子の移動と卵管液の挙動を同時にとらえることで、卵子が実際に卵管液の流れに逆らって移動しているか否かを明らかにする。また、卵子の輸送が何によって行われるかを検証する。

3. 研究の方法

(1) *in situ* 卵管観察のセッティング

初期胚や卵子の挙動はすべて生体に卵管が繋がった状態で行った。具体的には、雌マウスを2%濃度イソフルランで吸入麻酔したら、卵管を背側から腹腔外に引き出して筋層に保持し、卵管を囲うように環流用カラーを設置した。カラー内にはPBS (37度、0.1%BSA 含) を循環させ、乾燥や温度変化の影響を最小限にした。

(2) 初期胚の卵管内における挙動

発情前期の雌マウスを一晩雄マウスと同居させ、翌朝、膣栓の有無をもって交尾の正否を判定した。交尾が成立した日を妊娠1日目とし、妊娠1日目の雌マウスの卵管にGFPマウスに由来する初期胚(2細胞期)を注入した。妊娠1~3日目に、雌マウスにおける初期胚の挙動や、それに影響を及ぼすと考えられる卵管の蠕動、ならびに卵管液の流向の変遷を観察した。卵管液は、卵管内に微量の墨汁を注入して可視化した。初期胚の挙動は、卵管壁越しに励起光をあて、GFP蛍光を高感度カメラで検出して行った。

(3) 卵子の卵管内における挙動

排卵卵子は通常、卵丘細胞に覆われた状態で卵管采を通過し膨大部に至るので、実験に用いる卵子は、卵丘細胞を残したままグルタルアルデヒド溶液で固定し、さらに卵管内からでもその動きを追跡できるようにヘマトキシリンで着色した。固定・着色した卵子は、実験直前までPBS内で冷蔵保管した。卵管内の卵子の観察には、排卵が始まる頃(hCG投与後9~10時間)の雌マウスを使用した。卵管や卵巣は透明な膜(卵巣嚢)に覆われているので、卵巣嚢に小さなスリットをいれ、次に卵子をガラスキャピラリーに吸入し、スリットにガラスキャピラリーを通して卵子を卵管采(卵巣側の卵管開口部)の上に運んだ。卵子が、卵管采から膨大部に到達するまでを

動画に記録し、膨大部に到達するまでの時間を計測した。また、以下の3つの実験も行った。1つ目の実験では、卵子の移動中に卵管内に少量の墨汁を注入して卵子と卵管液の挙動を同時撮影し、卵子が卵管液の流れに逆らいながら膨大部に移動しているか否かについての実証を試みた。2つ目の実験では、緩衝液にニカルジピン（最終濃度 $20 \mu\text{M}$ ）を加えて蠕動運動を止めてから、卵子の卵管采の通過や膨大部への移動を観察した。3つ目の実験では、 0.1M 濃度のオルトバナデート溶液を少量、膨大部から卵管内に注入して繊毛運動を阻害してから、卵子の卵管采の通過と膨大部への移動を観察した。

4. 研究成果

(1) 卵管内における初期胚の挙動

妊娠1日目の卵管において、卵管の一部（膨大部に隣接する部位）に持続的な卵巣方向の蠕動がみられ、初期胚はその蠕動にせき止められるように膨大部に滞留していた。妊娠2日目になると、妊娠1日目で観察された蠕動は消え、膨大部あたりに子宮方向の蠕動が出現した。さらに子宮に近い側の卵管に卵巣方向の蠕動が出現し、卵管液はそれらの蠕動に同調するように、卵管内を卵巣方向や子宮方向に行ったり来たり繰り返していた。初期胚はこの流れに同調するように卵管内を動いていた。妊娠3日目では、妊娠2日目で観察された蠕動は消え、子宮に近い側の卵管に子宮方向の蠕動が出現した。初期胚はちょうど、これら蠕動が見られた場所に存在しており、蠕動に押されるように、子宮に向かって少しずつ移動しているのが確認された。

(2) 卵子の卵管内における挙動

卵管采に置いた卵子は数秒から十数秒かけて卵管采を通過し卵管内へと移動した。その後、卵子は、卵管の蠕動に同調するかのように前後に行ったりきたりを繰り返しながら膨大部方向へと進み、2分ほどで膨大部に到達した。卵子の移動中に少量の墨汁を子宮に近い側の卵管から注入して卵管液の流れを可視化したところ、卵子は、卵巣方向に向かう卵管液の流れに逆らうように膨大部に向かって移動していることが確認された。蠕動運動の卵子輸送への関わりについては、ニカルジピンで蠕動運動を阻害しても、卵子の卵管采の通過と膨大部への移動は妨げられなかった（右図）。一方、オルトバナデートで繊毛運動を阻害すると、卵子の卵管采の通過は妨げられた。さらに、卵子が卵管采を通過した直後、すなわち卵子が膨大部に向かって卵管内を移動中に繊毛運動を阻害すると、卵管が蠕動しているにも関わらず卵子の移動は妨げられた。以上から、繊毛運動が、卵子の卵管内への取り込みと、卵管液流に逆らった膨大部への移動を可能にしており、蠕動運動はそれらに

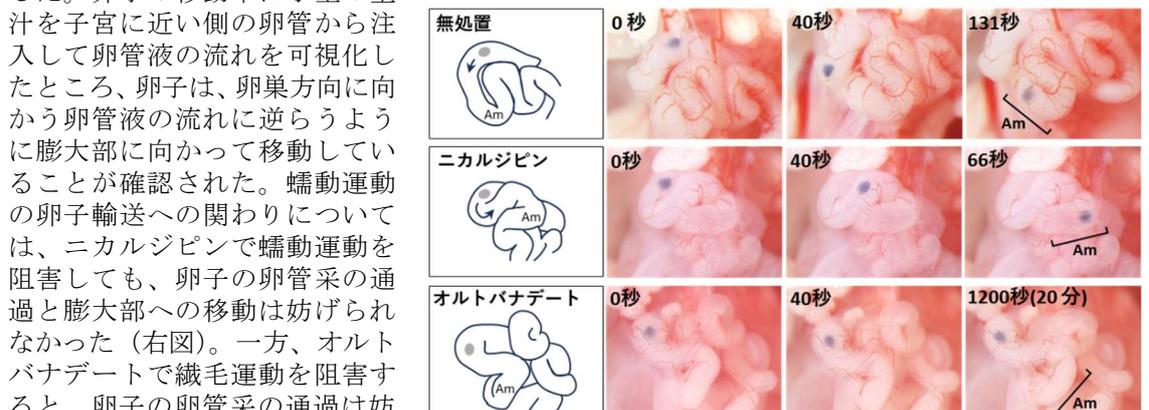


図 卵管内における卵子輸送と蠕動運動、繊毛運動との関係

ニカルジピンで卵管を処理して蠕動運動を阻害しても、卵子の膨大部(Am)への移動は妨げられず、膨大部への到達時間にも有意な差はなかった。一方、卵子が膨大部に移動している最中に繊毛運動を阻害すると、蠕動運動は残っているにも関わらず卵子の移動は止まり、その後20分観察を続けたが、卵子はそこにとどまり続けた。

関与しないことが示された。

(3) 最後に

当初の計画では、精子と初期胚の輸送メカニズムを解明する方針であったが、実験を重ねるなかで、卵子の輸送に関する重要な知見が得られたため、実験計画を一部変更して行った。そのため、精子や初期胚の輸送メカニズムの解明については未達成の部分が発生したが、一方で卵子輸送に関してきわめて重要なデータが得られた。現在、論文投稿の準備中である。

本研究は、研究協力者であるハワイ大学柳町隆造博士とともに進めてきたが、柳町博士は研究期間中の2023年9月にご逝去された。共同研究期間中に受けたご指導やご助言はあまりにも深く筆舌に尽くしがたく、本研究に関するアイデアの着想やその実行法についても多大なお力添えを頂戴した。ここに哀悼の意と、深甚なる謝意の意を表させていただきます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 日野敏昭
2. 発表標題 マウス卵管内における配偶子・初期胚の輸送機構：生体の卵管を使ってわかったこと
3. 学会等名 第8回 生殖若手の会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日野敏昭
2. 発表標題 マウス生体の卵管を使った卵管内における配偶子輸送機構の解明
3. 学会等名 第32回 母と子のすこやか基金シリーズセミナー（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 日野敏昭
2. 発表標題 マウス生体の卵管における卵子輸送の観察 ～卵管液流・繊毛拍動・蠕動運動との関係に着目して～
3. 学会等名 第65回 日本卵子学会学術集会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 柴原 浩章	4. 発行年 2021年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 412
3. 書名 実践 卵管学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

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)	ハワイ大学・医学部	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	ハワイ大学			