

精子運動性に関する運動生理学的研究

分担研究者 石島 純夫 東京工業大学生命理工学部助手

研究要旨 生殖機能のよりよい指標として、精子の形態や運動性を用いるために、精子の運動性のメカニズムを明らかにするとともに、形態や運動性を解析する方法の確立、さらに簡便な解析装置の開発を行った。

A. 研究目的

内分泌かく乱物質の生殖機能への影響を評価するための指標として精子数が用いられ、現在国際的な規模での調査が行われているが、生殖機能や受精現象により密接に関係する精子の形態や運動性を調べることは、解析方法がまだ確立していないなどの困難はあるものの、より重要な課題であると考えられる。そこで、まず精子の運動性及びその機構を明らかにし、次に、形態や運動性を正確に解析する方法を確立し、さらに、臨床や畜産などの分野でも使うことのできる簡便な解析装置の開発を行うことを目的とする。

B. 研究方法

a. 精子の形態解析

高解像度のデジタルカメラをノマルスキー微分干渉顕微鏡に装着し、記録した像をデジタルカメラからコンピュータに転送し、画像解析ソフトを用いて頭部の形態や鞭毛の長さなどを解析した。

b. 精子の運動解析

双眼の2つある接眼レンズの片方をずらすことにより機械的筒長を変え、それぞれの接眼レンズにビデオカメラを装着し、異なった焦点面の映像を1つのモニター上に表示し、ビデオテープレコーダで記録した。詳しい解析のために、1コマ毎の精子やその鞭毛運動を解析した(図1)。さらに、三次元的な精子の運動を明らかにするために、精子運動の原動力である鞭毛の運動を調べた。位相差顕微鏡に毎秒200コマ撮影で

きる高速度ビデオカメラを取り付け、精子の頭部を持つガラスの極微小ピペットを顕微操作器（マイクロマニピュレータ）を使って動かすことにより、鞭毛の屈曲運動を様々な方向から観察した。

精子の運動装置である軸糸の特性を調べるために、精子の細胞膜を界面活性剤（Triton X-100）で除去し、適当なイオン条件の下で、薬物やイオンなどを溶液中に加え、それらの精子運動に対する効果を調べた。

C. 研究結果及び考察

a. 精子の形態解析

最近のデジタル画像処理技術の進歩により、市販のデジタルカメラやコンピュータを用いて、精子の形態解析が比較的容易に行えるようになった。

b. 精子の運動解析

カバーガラスやスライドガラスなど、その運動を妨げるものがない溶液中では、精子は螺旋を描きながら螺旋軸上を比較的まっすぐに進む。この際、精子の鞭毛運動の振動面は、螺旋面、すなわち螺旋階段のステップに相当する部分に一致する。この精子の螺旋運動は、長軸の周りの回転と鞭毛の振動面での回転運動とによって説明することができる。通常の顕微鏡観察のように、比較的浅い容器を用いて精子の運動を観察すると、精子が自由に動ける間は螺旋を描いて移動するが、カバーガラスやスライドガラスに衝突し長軸方向の回転が妨げられようになると、カバーガラス直下やス

ライドガラス上で円運動をするようになる。したがって、プレパレート作成後、しばらくすると、ほとんどの精子はカバーガラスやライドガラス上に集まることになる。螺旋の向きは精子によって異なる（以下参照）。

精子の運動は、尾部鞭毛が作る屈曲の運動による。運動中のヒトやウシ精子鞭毛の形は、断面が精円のメガホンのような形の表面に巻き付く三次元螺旋である。鞭毛の三次元螺旋が左巻きか、あるいは右巻きかを調べるために、頭部の先端をカバーガラスに付けて、カバーガラスの面に垂直な軸の周りに回転している精子の回転方向を調べた。回転方向がわかれば、風車の形とその回転方向の関係のように、鞭毛の巻き方が分かる。調べたすべての動物で、精子は時計回りにも反時計回りにも回転した。ただし、種によって、時計回りと反時計回りとの比率が異なり、海産動物の精子では時計回りに回転する精子の割合が高く、哺乳類とメダカの精子では反時計回りに回転する精子の割合が高かった。精子の回転数は鞭毛の三次元性の大小に関係しており、回転数の大きなヒトやウシの精子の鞭毛運動が顕著な三次元成分を持つものに対して、ウニやヒトデやゴールドデンハムスターの精子の鞭毛運動はかなり平面的であった。

時計回りと反時計回りとの比率は異なるものの、すべての動物種で精子は両方向に回転した。さらに、海産動物のウニやヒトデの精子と、哺乳類とメダカの精子とで、回転方向について逆の傾向を示した。回転方向を決める細胞内因子を同定するために、ウニ精子の細胞膜を界面活性剤で除去した後、適当なイオン条件下で ATP を含む溶液中で鞭毛運動を起こさせ、精子の回転運動の方向に対する様々な薬物やイオンの効果を調べたところ、カルシウムイオン濃度によって回転の方向が変わった。ウニ除膜精子では、カルシウムイオン濃度の高い溶液中では時計回りに回転する傾向が強く、カルシウムイオン濃度が低くなると、反時計回りに回転するようになった。回転の方向の変化は、鞭毛の屈曲の三次元成分が逆転（対掌性の変化）することによると考えられるので、カルシウムイオン濃度の違いに

よって、鞭毛の三次元螺旋の対掌性が変わったと考えられる。

精子の鞭毛運動は本来三次元運動であるといっても、ウニやヒトデやゴールドデンハムスターの精子はかなり平面的な運動をする。この問題を明らかにするために、カブトガニの精子の運動を調べた。生きている化石と呼ばれるカブトガニは、現在北アメリカに1種類とアジアに3種類の合計4種類が生息している。アメリカ産カブトガニ精子鞭毛には真ん中に2本の中心対小管と呼ばれる微小管があるのに対して、アジア産のものにはこれがない。それぞれの運動を高速度ビデオ撮影装置を用いて調べた結果、アメリカ産のカブトガニ精子鞭毛が平面運動をしたのに対して、アジア産のものは三次元螺旋であった。平面的な運動形成に、2本の中心対小管が関係している。事実、ウナギの精子鞭毛も中心対小管を持たず、その運動は三次元螺旋であった。

精子の運動は、種によりかなり異なるため、それぞれの精子の運動に適したパラメータを決める必要がある。

すでにアメリカでは、精子の形態や運動性を生殖機能を知る指標として採用し、国家的な調査を開始し、さらにはヨーロッパへ参加を呼びかけている。現段階では、精子運動の理解不足や精子運動のどのパラメータを計測すべきかなど、まだ十分議論すべき問題が残されているものの、同一基準のもとに行われる国際的な調査によって重要な知見が得られることは、これまでの精子数についての国際共同調査からも明らかである。日本においても精子の形態と運動性についての同様な調査を開始するためには、簡便な精子運動自動解析装置の開発が必要である。これまで効果的な臨床や畜産業を目指して、幾度が試みられて来たが、まだ実用化には至っていない。そこで、上述した精子の運動性の知見を踏まえ、アメリカやイギリスなど市販されている装置の欠点を改良した装置を開発・製作し、正確な精子の形態と運動性の調査を効率よく行うための方法を確立し、全国的な調査と臨床や畜産業での応用に活用したいと考えている。

D. 結論

生殖機能のよりよい指標として、精子の形態や運動性を用いるために、精子の運動性のメカニズムを明らかにするとともに、形態や運動性を解析する方法の確立し、以下の簡便な解析装置の開発を行った。①精子形態：高解像度のデジタルカメラをノルスキー微分干渉顕微鏡に装着し、記録した像をデジタルカメラからコンピュータに転送し、画像解析ソフトを用いて頭部の形態や鞭毛の長さなどを解析した。②精子運動：双眼の2つある接眼レンズの片方をずらすことにより機械的筒長を変え、それぞれの接眼レンズにビデオカメラを装着し、異なった焦点面の映像を1つのモニター上に表示し、ビデオテープレコーダで記録した。

E. 研究発表

1. 論文発表

Ishijima, S., Ishijima, S. A., and Afzelius, B. A. Movement of *Turritella* spermatozoa: direction of propagation and chirality of flagellar bends. *Cell Motil. Cytoskeleton* In press.

Ishijima, S., Hara, M., and Okiyama, M. Comparative studies on the spermatozoan motility of Japanese fishes. *Bull. Ocean Res. Inst., Univ. Tokyo*, 33, 139-152, 1998

石島純夫：鞭毛、鞭毛運動、フラジェリン。生化学辞典 第3版、東京化学同人、1998

Ishijima, S. Mechanisms of flagellar movement of spermatozoa: conversion of sliding into bending. *J. Reprod. Develop.* 44, Suppl., 41, 1998

Ishijima, S., Hamaguchi, Y., and Iwamoto, T. Characteristics of motor apparatus of human spermatozoa that lack central pair microtubules. *Comp. Physiol. Biochem.* 15, 265, 1998

Ishijima, S. Mechanisms of flagellar movement underlying chirality and propagation direction of bending waves. Abstracts of 8th

International Symposium on Spermatology, 37, 1998

Ishijima, S., Ishijima, S. A., and Afzelius, B. A. Movement of *Turritella* Spermatozoa: direction of propagation and chirality of flagellar bends. Abstracts of 8th International Symposium on Spermatology, 81, 1998.

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Double-focal videomicroscopy

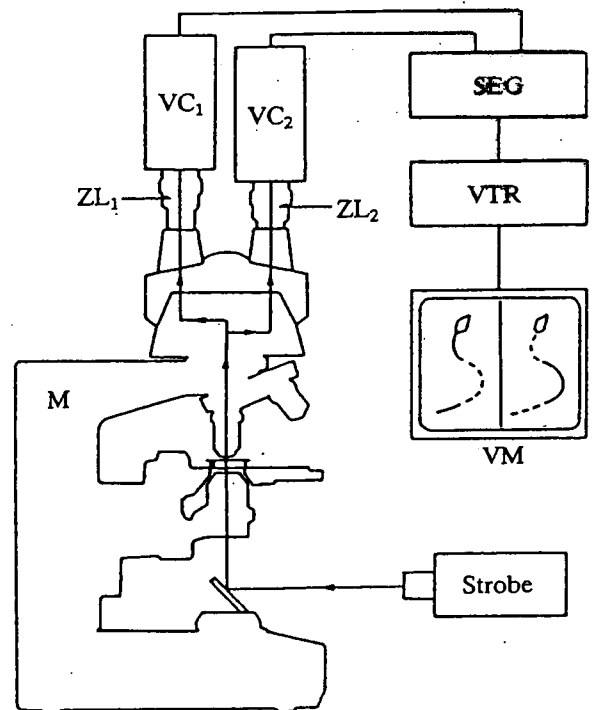


図1. 二重焦点ビデオ顕微鏡