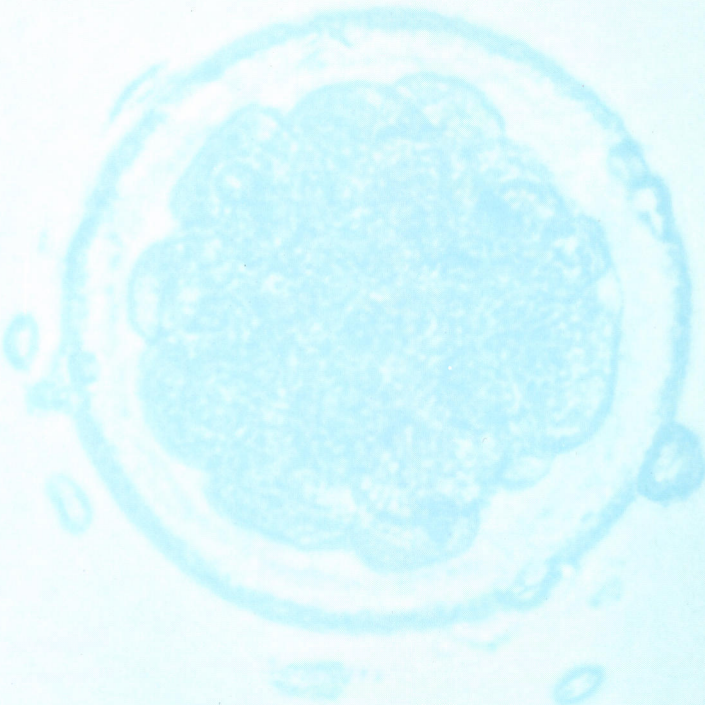


哺乳卵学誌
J. Mamm. Ova Res.

哺乳動物卵子学会誌

Journal of Mammalian Ova Research



哺乳動物卵子学会
Japanese Society of
Mammalian Ova Research

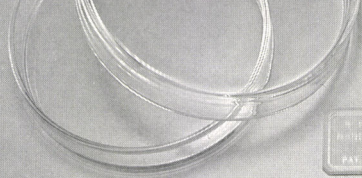
Vol. 10 No. 1

April 1993

万能型高精度温度コントロール、加温器

スライドウォーマーⅢ

電子コントロールで高精度な温度管理ができる
顕微鏡用加温器です。精子の活力検査、卵子の
捕集時などの温度管理に最適です。



FHK

富士平工業株式会社

東京都文京区本郷6丁目11番6号 千113
電話 東京(03)3812-2271 ファクシミリ(03)3812-3663

牛の繁殖障害の
分野に新しい可能性
—
!



タケダのすぐれた合成技術が生んだ
LH放出ホルモン製剤

動物用医薬品

コンセラル®注射液

牛の卵胞のう腫、排卵障害、
卵巢静止の治療、排卵促進に

(要指示)

製造発売元
武田薬品工業株式会社

提携
帝国臓器製薬株式会社



哺乳動物卵子学会誌

第10巻 第1号

平成 5年 4月

目 次

原 著

PCR法を用いて検査した牛体外作出脱出胚盤胞の性比 (英文)	
板垣佳明、木村直子、山中昌哉、須藤鎮世	1
豚卵胞卵子の体外受精と発生に及ぼす卵丘細胞の影響 (英文)	
戸津川 清、横田真良	11
ガラス化凍結保存したラット胚盤胞の形態的観察 (英文)	
大星茂樹、仲道麗子、藤原 昇、古賀 脩	17
抗 Le ^x 抗体処置マウス胚の割球接合に関する研究 (英文)	
四谷伊公子、新村末雄、石田一夫	26
牛IVF 卵子の初期発生時のMALATE DEHYDROGENASE活性と 中間代謝物質との関係	
柳 在雄、菅原七郎	34
牛IVF 卵子の初期発生時のLACTATE DEHYDROGENASE 活性と発生能の検討	
柳 在雄、稲垣 宏、菅原七郎	42
牛体外授精(IVF) 胚からの胚性幹(ES)細胞樹立について	
稲垣 宏、柳 在雄、菅原七郎	50
第34回哺乳動物卵子学会講演要旨集	
特別講演	
実験材料としての両生類の卵	
岩澤久彰	56
一般演題	
熱処理精子の顕微注入による精子の耐熱性の検討	
矢沢浩之、柳田 薫、菅野良恵、渡辺美佳、鈴木和夫、星 和彦、佐藤 章	58
SZ Iにおける挿入精子数について	
高塚亮三、辻 敏徳、豊北美穂、藤波隆一、道倉康仁、加藤 修	60
重症男性不妊に対する機械的透明帯部分開孔術(PZD) の有用性の検討	
高尾成久、吉田壮一、片桐千恵子、池成孝昭、岩部富夫、関島秋男、 戸田稔子、原田 省、見尾保幸、寺川直樹	62
卵巣灌流を用いた成長ホルモンの卵巣直接作用の検討	
南郷周児、北井啓勝、大庭三紀子、鈴木秋悦、野澤志朗	64

VS1,2,3 によるラット凍結保存卵巣の子宮腔内移植後の生存性 利部 聡、大上美穂、萬場光一、牧田登之	66
LH-RH 単用による過排卵誘起の試み 加田日出美、嶋田秀庸	68
マウスにおける反復過排卵誘起後に卵管膨大部内で分割像を示す未受精卵子の出現について 石塚久義、栗栖輝光、斎藤直道、平田義一、成相孝一、 金山喜一、遠藤 克、佐久間勇次	70
ニホンザル卵子とカニクイザル精子を用いた体外受精 山海 直、清水慶子、長 文昭、吉川泰弘	72
ニホンジカ射出精子の体外における透明帯除去ハムスター卵子への侵入能、 一とくにウシ精子との比較について 小林 仁、池田昭七、武田武雄、佐々田比呂志、菅原七郎	74
透明帯切開卵子を用いた低受精能マウス凍結精子の体外受精成績 中瀉直己、上田 進、山内一也	76
ウシ卵における表層粒の体外成熟に伴う変化 細江実佐、高橋知子、荻原 勲、河野友宏、中原達夫、新村末雄、石田一夫	78
マウス卵における表層顆粒とセカンドメッセンジャーに関する検討 小関みづは、倉沢滋明、大庭三紀子、鈴木秋悦、野澤志朗	80
共焦点レーザー顕微鏡による受精時の卵子表層顆粒の動態に関する観察 横田秀夫、加藤 勝、佐藤嘉兵	82
オカダ酸による牛およびハムスター卵子の卵核胞崩壊(GVBD) 建本秀樹、堀内俊孝、織部智宏	84
ハムスターとヒト卵子におけるelectrical stimulationによるegg activation 柳田 薫、木村康之、片寄治男、吉松宣弘、呉竹昭治、 月川 奏、阿部利明、星 和彦、佐藤 章	86
活性化卵を用いた牛の核移植における受核卵の核の不活化 坂根淳太、牛島 仁、佐賀正彦、江藤哲雄、尾川昭三	88
マウス卵子体外成熟過程へのチロシンリン酸化の関与 木村裕幸、遠藤芳広、大隅一興、大庭三紀子、鈴木秋悦、野澤志朗	90
牛卵胞内卵子の体外成熟におよぼす成長因子の影響 小林敬三、山下祥子、星 宏良	92
マウス卵子卵丘複合体におけるTNF- α の分布とその予想される一生理機能 佐藤英明、高橋裕司、東 貞宏、豊田 裕	94
Acridine orange 染色法によるsperm-egg fusionの判定法 片寄治男、中木純子、矢沢浩之、柳田 薫、星 和彦	96
限定培地におけるウシ体外受精卵の初期発生におよぼすグルタミンおよび タウリンの影響 林 正黙、丹羽皓二、金 宗興、奥田 潔	98

限定培地におけるラット 1 - 細胞期胚の体外発生におよぼすグルコースおよびリン酸濃度の影響	三好和睦、丹羽皓二、奥田 潔	100
マイトマイシン処理した細胞との共培養がウシ体外受精由来胚の発生に与える影響	富沢宗高、下平乙夫、今井 敬、後藤裕司、奥地弘明、斎藤政宏、堂地 修	102
Brinster修正培養液とDulbecco修正培養液によるキメラマウス胚の培養と移植成績	川島康成、高橋寿太郎、安田泰久	104
マクロファージと卵の共培養	野原 理、斎藤英和、小池数与、田中栄一、斎藤隆和、平山寿雄、広井正彦	106
細胞質を増加したマウス 2 細胞期胚の発生能	加藤容子、大黒 寿、角田幸雄	108
牛体外受精胚の初期発生速度がその後の発育成績に及ぼす影響	後藤裕司、下平乙夫、富沢宗高、今井 敬、奥地弘明、斎藤政宏、堂地 修	110
体外培養したウマ胚盤胞の孵化様式に及ぼす血清の影響	保地真一、ヨアヒム ブラウン、小栗紀彦	112
マウス成熟卵及び初期胚におけるcyclooxygenase活性の生理的意義	高見毅司、坂元秀樹、佐藤和雄、加藤珠美、江角真理子	114
牛IVF 卵子の初期発生時のMALATE DEHYDROGENASE活性と中間代謝物質との関係	柳 在雄、菅原七郎	116
ウシ培養胚におけるプロスタグランジンE ₂ の免疫組織化学的検出	四谷伊公子、柳 在雄、松本浩道、菅原七郎、新村末雄、石田一夫	118
ハムスター 8 細胞期胚の凍結保存について	堀内俊孝、高橋典子	120
1.5M Ethylene Glycolで凍結された牛体外受精胚からの耐凍剤除去条件の検討	下平乙夫、後藤裕司、今井 敬、富沢宗高、斎藤政宏、奥地弘明、堂地 修	122
外来 I V F - E T 4 年間の成績	小林善宗、本田育子、鈴木隆弘、井上正人	124
I V F - E T 分娩後の再 I V F - E T 成績	鈴木隆弘、小林善宗、本田育子、井上正人	126
リコンビナント透明帯蛋白質の免疫原性と妊孕性に及ぼす影響について	長谷川昭子、井上みゆき、香山浩二、磯島晋三	128
胚性幹細胞 (E S 細胞) のサブクローニング法の検討	鎌田宣夫、寺社下浩一、鈴木宏志、宮井達也、谷川 学	130
牛体外授精 (IVF) 由来胚からの胚性幹 (ES) 細胞樹立の試み	稲垣 宏、柳 在雄、稲泉絵理、銭 暁喬、菅原七郎	132
マウス初期胚発生過程におけるミトコンドリアの分布	都倉 隆、野田洋一、後藤康夫、中山貴弘、森 崇英	134

センダイウイルスを接種されたマウス卵子における細胞内Ca ²⁺ の変動 河野友宏、J.Carroll, D.Whittingham, 中原達夫	136
LIF(白血球増殖抑制因子) がマウス胚の接着ならびに移植後の生存性に及ぼす影響 小田垣論司、加藤容子、角田幸雄	138
マウス1細胞期胚における雌雄前核由来染色体の長さについて 森 英紀、石尾佐代、正田陽一	140
RT-PCR法による初期胚 mRNA の定量 森田 豊、堤 治、武谷雄二	142
PCR 法とmicromanipulation 法によるマウス着床前期胚の性別診断 矢野ともね、雀部 豊、竹下直樹、片山 進、久保春海、平川 舜	144
着床前診断を目的としたマウス体外受精胚に対するbiopsy法の検討 雀部 豊、矢野ともね、安部裕司、池永秀幸、臼井 彰、 片山 進、久保春海、平川 舜	146
マウス卵採取時のmono-poly resolving medium処理と胚への影響 末永美樹、栃木明人、橋本芳美、栃木武一、佐藤和雄	148
EIA 欠損アデノウイルスベクターによるマウス初期胚への遺伝子導入 津久井 通、東 貞宏、三宅早苗、斎藤 泉、豊田 裕	150

Journal of Mammalian Ova Research

Vol.10 No.1

April 1993

Contents

Originals

The sex ratio bovine hatched blastocysts produced and cultured in vitro as determined by the polymerase chain reaction.

ITAGAKI, Y., N. KIMURA, M. YAMANAKA & S. SUTOU 1

Effect of cumulus cells on in vitro fertilization and subsequent development of pig follicular oocytes.

TOTSUKAWA, K. & M. YOKOTA 11

Morphological features of rat blastocysts cryopreserved by vitrification

OHBOSHI, S., R. NAKAMICHI, N. FUJIHARA & O. KOGA 17

Influence of anti-Le^x antibody on in vitro development of 8-cell mouse embryos.

YOTSUTANI, I., S. NIIMURA & K. ISHIDA 26

Relationship between malate dehydrogenase activity and energy substrates of fresh bovine embryos derived from IVF.

RYOO, Z. Y. & S. SUGAWARA 34

Relationship between lactate dehydrogenase activity and subsequent developmental ability in individual bovine embryos

RYOO, Z. Y., H. INAGAKI & S. SUGAWARA 42

An establishment of embryonic stem cells from bovine embryos fertilized in vitro

INAGAKI, H., RYOO, Z. Y. & S. SUGAWARA 50

Proceeding of the 34th Annual Meeting of Japanese Society of Mammalian Ova Research

Special report

Amphibian eggs as materials for experimental studies.

IWASAWA, H. 56

General reports

Examination of developmental ability of embryos fertilized by microinjection of heat treated spermatozoa.

YAZAWA, H., K. YANAGIDA, Y. KANNO, M. WATANABE, K. SUZUKI,
K. HOSHI & A. SATO 58

The number of human sperm to be inserted in SZL.

TAKATUKA, R., T. TSUJI, M. TOYOKITA, R. FUJINAMI,
Y. MICHIKURA & O. KATO 60

The Effects of partial zona dissection in severe male infertility on the outcome of in vitro fertilization.	
TAKAO, N., S. YOSHIDA, C. KATAGIRI, T. IKENARI, T. IWABE, A. SEKIJIMA, T. TODA, T. HARADA, Y. MIO & N. TERAKAWA	62
Direct effects of growth hormone on the in vitro perfused rabbit ovary.	
NANGO, S., H. KITAI, M. OBA, S. SUZUKI & S. NOZAWA	64
Survival of frozen preserving ovaries with VS1,2 and 3 after transplant into uterine cavity.	
KAGABU, S., M. OUE, K. MAMBA & T. MAKITA	66
An attempt for the superovulation by only LH—RH.	
KADA, H. & H. SHIMADA	68
Appearance of unfertilized ova cleaving in the ampulla of the oviduct after repeated superovulation inducement in mice.	
ISHIZUKA, H., T. KURISU, T. SAITO, Y. HIRATA, K. NARIAI, K. KANAYAMA, T. ENDO & Y. SAKUMA	70
IVF using japanese monkey eggs and cynomolgus monkey spermatozoa.	
SANKAI, T., K. SHIMIZU, F. CHO & Y. YOSHIKAWA	72
Penetration of fresh spermatozoa of sika deer (Cervus Nippon) to zona - free hamster eggs in vitro, Comparison with bull spermatozoa.	
KOBAYASHI, H., S. IKEDA, T. TAKEDA, H. SASADA & S. SUGAWARA	74
Fertilization in vitro between frozen mouse spermatozoa with low fertilizing ability and oocytes with the zona partially dissected .	
NAKAGATA, N. S. UEDA & K. YAMAUCHI	76
Changes of cortical granules in bovine eggs during in vitro maturation.	
HOSOE, M., T. TAKAHASHI, K. OGIWARA, T. KONO, T. NAKAHARA, S. NIMURA & K. ISHIDA	78
Study of second messenger and cortical granules in the mouse oocytes.	
KOSEKI, M., S. KURASAWA, M. OBA, Y. ENDO, S. SUZUKI & S. NOZAWA	80
Observation of cortical granules at the time of fertilization by the laser scanning microscope.	
YOKOTA, H., M. KATO & K. SATO	82
Stimulatory effect of okadaic acid on germinal vesicle breakdown (GVBD) of bovine and hamster oocytes.	
TATEMOTO, H., T. HORIUCHI & T. ORIBE	84
Egg activation induced by electrical stimulation in hamster and human.	
YANAGIDA, K., Y. KIMURA, H. KATAYORI, N. YOSIMATSU, S. KURATAKE, S. TSUKIKAWA, T. ABE, K. HOSHI & A. SATO	86

Treatment for the nuclei inactivation prior to the nuclear transfer in parthenogenetically activated cytoplasm.	
SAKANE, J., H. USHIJIMA, S. OGAWA & T. ETO	88
Involvement of tyrosine phosphorylation in the process of in vitro maturation of mouse oocytes.	
KIMURA, H., Y. ENDO, K. OSUMI, M. OBA, S. SUZUKI & S. NOZAWA	90
Influence of growth factors on in vitro maturation of bovine follicular oocytes.	
KOBAYASHI, K., S. YAMASHITA & H. HOSHI	92
Distribution and possible physiological role of TNF- α in mouse cumulus-oocyte complexes.	
SATO, E., Y. TAKAHASHI, S. AZUMA & Y. TOYODA	94
Acridine orange staining as a mean of detecting sperm-egg fusion.	
KATAYORI, H., J. NAKAKI, H. YAZAWA, K. YANAGIDA & K. HOSHI	96
Effects of glutamine and taurine in a chemically defined medium on the development of bovine oocytes fertilized in vitro.	
LIN, J.-M., K. NIWA, J.-H. KIN & K. OKUDA	98
Effects of glucose and phosphate concentrations on in vitro development of rat 1-cell embryos in a chemically defined medium.	
MIYOSHI, K., K. NIWA & K. OKUDA	100
Effect of mitomycin treated somatic cells on development of bovine embryo co-cultured in vitro.	
TOMIZAWA, M., I. SHIMOHIRA, K. IMAI, Y. GOTO, H. OKUCHI, M. SAITO & O. DOUCHI	102
Development of chimeric mouse embryos cultured in modified Brinter's medium and modified Dulbecco's medium	
KAWASHIMA, Y., J. TAKAHASHI & Y. YASUDA	104
Coculture of mouse ovum and macrophage.	
NOHARA, M., H. SAITO, K. KOIKE, E. TANAKA, T. SAITO, T. HIRAYAMA & M. HIROI	106
Effects of the increased volume of cytoplasm on the developmental ability of mouse 2-cell embryos in vitro and in vivo.	
KATO, Y., T. OHGURO & Y. TSUNODA	108
Effect of cleavage speed at early embryonic stage on subsequent developmental potential of IVF-derived bovine embryos.	
GOTO, Y., I. SHIMOHIRA, M. TOMIZAWA, K. IMAI, H. OKUCHI, M. SAITO & O. DOUCHI	110
Influence of serum on in vitro hatching of equine blastocysts.	
HOCHI, S., J. BRAUN & N. OGURI	112

Biological significance of cyclooxygenase in mature oocyte and early embryo.	
TAKAMI, T., H. SAKAMOTO, K. SATO, T. KATOU & M. ESUMI	114
Relationship between malate dehydrogenase activity and energy substrates of fresh bovine embryos derived from IVF.	
RYOO, Z. Y. & S. SUGAWARA	116
Immunohistochemical demonstration of prostaglandin E2 in cultured bovine embryos	
YOTSUTANI, I., Z. Y. RYOO, H. MATSUMOTO, S. SUGAWARA, S. NIIMURA & K. ISHIDA	118
Frozen storage of hamster 8-cell embryos.	
HORIUCHI, T. & N. TAKAHASHI	120
Effect of various dilution procedures of IVF embryos frozen by 1.5M ethylene glycol for direct transfer method.	
SHIMOHARA, I., Y. GOTO, K. IMAI, M. TOMIZAWA, M. SAITO, H. OKUCHI & O. DOUCHI	122
Results of IVF-ET in outpatient clinic for 4 years.	
KBAYASHI, Y., I. HONDA, T. SUZUKI & M. INOUE	124
Results of IVF-ET in patients with a previous IVF success	
SUZUKI, T., Y. KOBAYASHI, I. HONDA & M. INOUE	126
Immunogenicity and antifertility effect of a recombinant zonapelluchida protein.	
HASEGAWA, A., M. INOUE, K. KOYAMA & S. ISOJIMA	128
An attempt to subcloning of embryonic stem cell.	
KAMADA, N., K. JISHAGE, H. SUZUKI, T. MIYAI & M. TANIGAWA	130
The attempt of an establishment of embryonic stem cells from bovine embryos fertilized in vitro.	
INAGAKI, H., Z. Y. RYOO, E. INAZUMI, Q. X. QIAO & S. SUGAWARA	132
Mitochondrial distribution in mouse oocytes and embryos.	
TOKURA, T., Y. NODA, Y. GOTO, T. NAKAYAMA & T. MORI	134
Calcium transients in mouse oocytes injected with sendai virus.	
KONO, T., J. CARROLL, D. WHITTINGHAM & T. NAKAHARA	136
Effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on the attachment of mouse embryos in vitro and development to young in vivo.	
ODAGAKI, S., Y. KATO & Y. TSUNODA	138
On the length of the paternal maternal chromosomes in the mouse embryos at one-cell stage.	
MORI, H., S. ISHIO & Y. SHODA	140

Quantitative analysis of mRNA in embryos by reverse transcription - polymerase chain reaction.

MORITA, Y., O. TSUTSUMI & Y. TAKETANI142

Sex identification of mouse preimplantation embryos using PCR method and micromanipulation.

YANO, T., Y. SASABE, N. TAKESHITA, S. KATAYAMA,
H. KUBO & S. HIRAKAWA144

Biopsy of mouse embryo fertilized in vitro as a preclinical model for human preimplantation diagnosis.

SASABE, Y., T. YANO, Y. ABE, H. IKENAGA, A. USUI, S. KATAYAMA,
H. KUBO & S. HIRAKAWA146

A procedure for collection of mouse ova using mono-poly resolving medium and the effect of the medium on the development of mouse embryo.

SUENAGA, M., M. TOCHIGI, Y. HASHIMOTO,
B. TOCHIGI & K. SATOH148

Gene transfer into mouse early embryos via E1A(-) adenovirus vector.

TSUKUI, T., S. AZUMA, S. MIYAKE, I. SAITO & Y. TOYODA150

The Sex Ratio of Bovine Hatched Blastocysts Produced and Cultured *In Vitro* as Determined by the Polymerase Chain Reaction

Yoshiaki Itagaki, Naoko Kimura, Masaya Yamanaka
and Shizuyo Sutou

Central Research Institute, Itoham Foods Inc., 1-2
Kubogaoka, Moriya-machi, Kitasouma, Ibaraki 302-01, Japan

Abstract. The sex ratio of bovine hatched blastocysts produced and cultured *in vitro* was examined by the polymerase chain reaction (PCR). A total of 190 hatched blastocysts was obtained between 188 and 248 h post insemination (hpi). The hatching rates expressed as a percentage of the total one-cell presumptive zygotes (0 hpi) and of cleaved embryos (72 hpi) were 31.8 and 46.7%, respectively. The sex of 189 embryos (99.5%) was successfully determined. The results of agarose gel electrophoresis clearly indicated that male embryos gave a double band with male-specific and gender-neutral primers, and females gave a single band with gender-neutral primers alone. The overall sex ratio was 51.9% (98/189), which did not significantly differ from the expected ratio of 1:1. Based on the observations at 12 h intervals, embryos were divided into three developmental groups according to the timing of hatching. The sex ratio of the fast group (188-200 hpi) was shifted to males (59.4%, 38/64), although with no significantly difference from the expected ratio of 1:1. On the other hand, the intermediate (212 hpi) and slow (224-248 hpi) groups had slightly more females than males (47.1%, 33/70) and the sex ratio close to the expected ratio of 1:1 (49.1%, 27/55), respectively.

Key words: PCR, Sex ratio, Hatched blastocysts, Bovine, *In vitro*.

(Received 25 December 1992, Accepted 25 January 1993)

Introduction

Amplification of bovine Y chromosome-specific repetitive sequences by the polymerase chain reaction (PCR) has made it possible to allow for an accurate and rapid sexing of bovine preimplantation embryos¹⁻³). Some of these methods can already be used on-farm conditions¹). Apart from economic advantages in livestock production, this method would be useful for investigating the sexual differences in the developmental process.

The sex ratio of bovine embryos produced both *in vivo* and *in vitro*, determined by cytogenetic analysis, did not significantly differ from the 1:1 ratio, although males did predominate⁴⁻⁹). However, cumulative data on the sex ratio using molecular genetic technology, are still limited^{10, 11}). Bondioli *et al.* ¹¹) reported that examination of day-6 to -7 embryos with a DNA hybridization probe revealed 379 males (60%) and 253 females.

We recently reported a reliable sexing technique of bovine embryos by taking advantage of two up-to-date methods, *i.e.*, the *in vitro* production of embryos and PCR¹²). Using these methods, we have investigated the sex ratio of bovine preimplantation embryos produced by the *in vitro* maturation and fertilization (IVM-IVF) and co-culture system. This system provides a large number of embryos and precise timing of fertilization and development¹³). A more accurate estimation of the primary sex ratio of embryos would be obtained by sexing closer to the time of fertilization. However, our present PCR conditions required more than 10 cells to discriminate males from females, as reported previously¹²) and advances in co-culture systems with various types of cells have allowed the continuous development of small portions (20-60%) of bovine zygotes to blastocysts¹³). Therefore, we determined the sex of hatched blastocysts, the most advanced stage in the preimplantation period, and examined whether the sex ratio of embryos is related to the timing of hatching *in vitro*.

Materials and methods

In vitro development of bovine embryos from zygotes produced by IVM-IVF to hatched blastocysts

Bovine hatched blastocysts were obtained by IVM-IVF and co-culture system. This system was essentially the same procedure we had used to obtain live calves with sex predicted by PCR¹²). Briefly, ovaries were obtained from non-pregnant Holsteins at a local slaughterhouse and transported to our laboratory being kept in 0.85% w/v NaCl with antibiotics at 32 °C within 1 h. Follicular oocytes with compacted cumulus cells aspirated from ovaries were cultured in 400-μl droplets of TCM-199 medium containing 25 mM HEPES (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) with 5% heat-treated calf serum, 0.5 mM

sodium pyruvate, and antibiotics under paraffin oil for 24 h. The culture conditions for IVM-IVF and co-culture were at 39 °C under a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. Each droplet contained approximately 40 oocytes-cumulus complexes. IVF was achieved using frozen-thawed semen from a single bull throughout this study. *In vitro* matured oocytes were transferred into BO medium¹⁴⁾ supplemented with heparin and caffeine, containing the capacitated spermatozoa. Following co-incubation of the spermatozoa and oocytes for 5 h post insemination (hpi), one-cell presumptive zygotes with attached cumulus cells were placed in the same medium that had been used for IVM. At 72 hpi, oocytes/embryos were manually stripped from their cumulus cells that had grown into a cell layer on the bottom of the dish by using a finely drawn pipette. On the basis of the assumption that most of the uncleaved oocytes were unfertilized, oocytes that did not develop to at least the 2-cell stage were discarded and cleaved embryos were continued to co-culture with cumulus cell monolayers for 10 days. Embryonic developmental stages were recorded at 12 h intervals between 176 hpi (day 7, 2100 h) and 248 hpi (day 10, 2100 h). Good or excellent quality hatched blastocysts determined by morphological criteria were picked up with an extremely small amount of the culture medium and directly subjected to PCR for sexing.

Primers and PCR conditions

Sequences of primers and the conditions for PCR amplification were similar to those described previously¹²⁾. Two pairs of primers for bovine male-specific (5'-TGGACATTGCCACAACCATT-3' and 5'-GCTGAATGCACTGAGAGAGA-3'), and bovine gender-neutral (5'-GCCCAAGTTGCTAAGCACTC-3' and 5'-GCAGAACTAGACTTCGGAGC-3') were synthesized with an automatic synthesizer (Applied Biosystems, model 391). These oligonucleotides amplified 226 and 102 bp, respectively.

To each of the tubes containing an embryo, 100 µl of a reaction mixture consisting of 10 mM Tris-HCl (pH 8.9), 1.5 mM MgCl₂, 80 mM KCl, 0.1% sodium cholate, 0.1% Triton X-100, 50 µM dNTPs, 0.2 µM DNA primers, and 2 units of *Tth* DNA polymerase were added and the mixture was overlaid with 50 µl of mineral oil. PCR amplification was carried out for 50 cycles each consisting of denaturation for 1 min at 94 °C, annealing for 1 min at 60 °C,

and extension for 1 min at 72 °C. Ten µl of amplified products were electrophoresed in 3% NuSieve 3:1 agarose (FMC BioProducts) gels in Tris-borate-EDTA buffer. After electrophoresis, amplified fragments were visualized directly by ethidium bromide staining and ultraviolet illumination. Positive controls including 1 ng of purified DNA of both sexes and negative control without DNA were subjected to PCR together with the embryo samples.

Statistical analysis

Comparisons of observed sex ratios with the expected ratio of 1:1 were made by the Chi-square test. The probability of less than 0.05 was considered significant.

Results

Of 598 oocytes matured and fertilized *in vitro* in four replicates, 407 (68.1%) cleaved at 72 hpi and most of them reached the 8-cell stage or beyond (Table 1). Since uncleaved oocytes were discarded at this time, embryonic development was monitored in those 407 cleaved embryos. A total of 190 hatched blastocysts was obtained between 188 and 248 hpi (Table 1, 2). The hatching rates expressed as a percentage of the total one-cell presumptive zygotes and of cleaved embryos were 31.8 and 46.7%, respectively.

When 190 hatched blastocysts were subjected to PCR for sexing, the sex of 189 embryos (99.5%) was successfully determined, excepting one case (Table 1). This single

Table 1. *In vitro* development of bovine embryos from one-cell presumptive zygotes to hatched blastocysts and efficiency of sex determination by PCR

	One-cell presumptive zygotes cultured	Embryos cleaved at 72 hpi	Blastocysts≤	Hatched blastocysts	Successful sex- determined
Number	598	407	227	190	189
% of cultured	100	68.1	38.0	31.8	—
% of cleaved	—	100	55.8	46.7	—
% of hatched	—	—	—	100	99.5

Table 2. Sex ratios of bovine embryos classified according to the timing of hatching *in vitro*

Groups	h post insemination	No. of hatched blastocysts	Male	Female	Sex ratio ^b (% of males)
Fast	188	18	11	7	61.1
	200	46	27	19	58.7
	total	64	38	26	59.4
Intermediate	212	70	33	37	47.1
Slow	224	23	10	13	43.5
	236	18 ^a	9	9	50.0
	248	14	8	6	57.1
	total	55	27	28	49.1
Total		189	98	91	51.9

^a. Failure of sexing, one case.

^b. Sex ratio did not differ ($P > 0.05$) from the expected 1:1 ratio.

failure of sexing (sampling time, 236 hpi) may have been due to a loss in handling the embryo because of the absence of both male and female signals. An example of agarose gel electrophoresis of embryo samples with PCR is shown in Fig. 1. As indicated in the picture, male embryos gave a double band with male-specific and gender-neutral primers. On the other hand, females gave a single band with gender-neutral primers alone.

The number and distribution of sexed hatched blastocysts obtained from 188 to 248 hpi are presented in Table 2. The overall sex ratio (the number of male embryos/the number of embryos sexed) was 51.9% (98/189), which did not differ significantly from the expected ratio of 1:1. For a more precise analysis, we divided embryos into three developmental groups according to the time of hatching. The interval and number of embryos in the fast, intermediate, and slow groups were 188-200 hpi ($n=64$), 212 hpi ($n=70$), and 224-248 hpi ($n=55$), respectively (Table 2). Although not significantly different from the expected 1:1 ratio, the sex ratio of the fast group was shifted to males (59.4%, 38/64). On the other hand,

the remaining of two-third (intermediate and slow) had slightly more females than males (47.1%, 33/70) or the sex ratio close to the expected ratio of 1:1 (49.1%, 27/55).

Discussion

In most of the previous studies on sexing of bovine embryos before implantation, cytogenetic analysis has been used to discriminate males from females⁴⁻⁹. This technique is very accurate when a good metaphase spread of the chromosomes is obtained. However, success in sexing processed embryos rarely exceeds 77%, due to the absence or condensation of metaphase spread⁹. The possibility of erroneous sex ratio may not be negligible, if the number of embryos available is limited or the successful sexing ratio is low, due to preferential loss of one karyotype. Furthermore, the process is labor intensive

and time-consuming. An alternative technology for embryo sexing has been developed using Y chromosome-specific DNA probes^{10, 11}. The sex of a large number of embryos could also be determined by PCR using short segments of Y chromosome-specific DNA as primers. In the present study, this technology provided a high accuracy rate (nearly 100%) and a quick answer (6h or less). These data support the previous reports of our own¹² and also of other investigators¹⁻³.

The hatched blastocysts used for this study were of good quality with morphological criteria and chronological developmental rate comparable to those seen *in vivo*¹⁵. Although

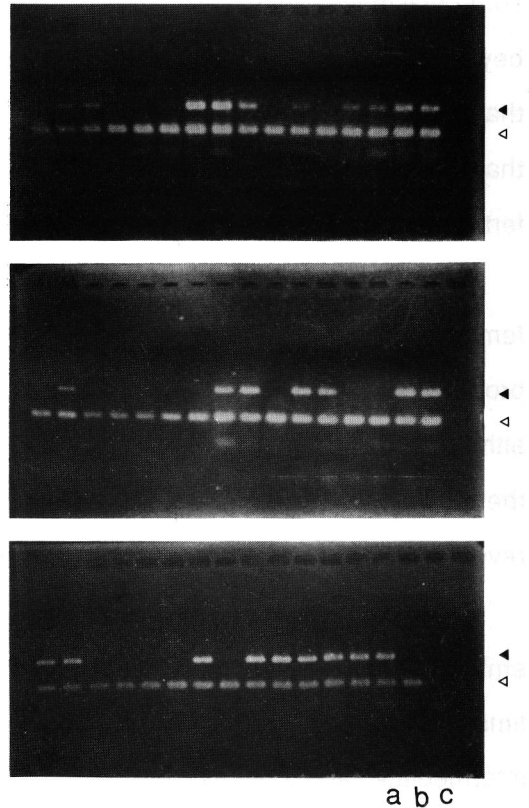


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products from whole hatched blastocysts. Forty-five hatched blastocysts were directly subjected to PCR for sexing. Twenty-five samples showing a double band with male-specific (♂) and gender-neutral (♀) primers were judged to be male embryos. Twenty samples showing only a single band with gender-neutral (♀) primers were judged to be females. a: 1 ng of purified bovine male DNA, b: 1 ng of purified bovine female DNA, c: negative control without DNA.

some blastocysts were hatched from the zona pellucida when the culture was continued to beyond 10 days, they had a morphologically poor quality and their development was slower than that of *in vivo*, so that we excluded them from the data. Therefore, we could presume that the vast majority of hatched blastocysts sexed in this study have resulted from normal fertilization and development.

The present study revealed an overall sex ratio of 1:1 with 2% more males than females. These data are in agreement with previous reports on preimplantation embryos produced both *in vivo* 4, 8) and *in vitro*⁵⁻⁹⁾, in which more males than females were obtained, although not significantly different from the expected 1:1 ratio. The sex ratio obtained during the gestation period after gonadal differentiation¹⁶⁾ and that at birth¹⁷⁾ have also generally revealed a preponderance of males.

To determine the difference in the developmental speed between male and female embryos, we divided hatched blastocysts into three developmental groups according to the timing of hatching *in vitro*. The resultant sex ratio was 59.4, 47.1, and 49.1%, in the fast, intermediate, and slow groups, respectively. These results were not significantly different from the expected ratio of 1:1. However, the concept that male cleave-stage embryos develop more rapidly than do the female embryos has been proposed in mice¹⁸⁾ and cattle^{7, 8)}. Tsunoda *et al.* 18) divided mouse embryos recovered from the uterus into three groups according to the time of blastocoel formation and transfer to the recipients. In cattle, blastocyst-stage embryos produced and cultured *in vitro* were carefully classified into four⁷⁾ or five⁸⁾ developmental stages by morphological criteria and analyzed cytogenetically. Xu *et al.*⁸⁾ suggested that sex-related gene expression affects the development of embryos during the first 8 days of development *in vitro*. We chose hatched blastocysts to examine the sex ratio under our PCR condition because, 1) the embryos contains a large number of cells, 2) there was no contamination by spermatozoa adhering to the zona pellucida or contained in the perivitelline space, 3) they were easily classified by morphological criteria, and 4) there was little data on the hatched blastocysts by cytogenetic analysis. Although a tendency of males to develop more rapidly than females was seen in this study, the timing of hatching *in vitro* itself did not appear to be a suitable parameter to determine the sexual differences in

the developmental process. In other words, the present study suggested the presence of some factor(s) affecting the difference in hatching among blastocysts, besides sex-related differences. The rate of development in the mouse was suggested to be controlled by genetic regulation such as H-2 complex and the genes located elsewhere^{19, 20}).

Hatching of blastocysts *in vitro* after IVF extended over a 188 to 248 hpi period in this study. When and how this variation is related to the stage closer to the time of fertilization is not fully understood. More precise observation such as the fate of the individual embryo in relation to 'the 8-16-cell block' is required.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Seiji Sato for guidance on the PCR amplification of bovine embryos, and Misses. Yuko Kato and Sachiko Terouchi for collecting follicular oocytes from bovine ovaries.

References

- 1) Herr, C. M. and Reed, K. C. (1991): Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. *Theriogenology*, 35,45-54.
- 2) Peura, T., Hyttinen, J.-M., Turunen, M., Aalto, J., Rainio, V. and Janne, J. (1991): Birth of calves developed from embryos of predetermined sex. *Acta. Vet. Scand.*, 32, 283-286.
- 3) Utsumi, K., Kawamoto, T., Kim, J. H., Iritani, A., Sakai, A. and Komano, T. (1992): Sex determination of bovine embryos by the polymerase chain reaction using Y-specific primers. *J. Reprod. Dev.*, 38, 35-43.
- 4) Murray, J. D., Moran, C., Boland, M. P., Doff, A. M. and Nancarrow, C. D. (1985): Cytogenetic analysis of 34 early stage bovine embryos from superovulated Hereford donors. *Can. J. Genet. Cytol.*, 27, 483-486.
- 5) Iwasaki, S., Shioya, Y., Hanada, A. and Nakahara, T. (1988); Chromosome preparation from 2-cell bovine embryos derived from follicular oocytes fertilized *in vitro*. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 34, 79-83.
- 6) Iwasaki, S., Shioya, Y., Masuda, H., Hanada, A. and Nakahara, T. (1988); Sex ratio of early embryos fertilized *in vitro* with spermatozoa separated by percoll. *Theriogenology*, 30, 1191-1198.
- 7) Avery, B., Madison, V. and Greve, T. (1991); Sex and development in bovine *in-vitro* fertilized embryos. *Theriogenology*, 35,953-963.

- 8) King, W. A., Yadav, B. R., Xu, K. P., Picard, L., Sirard, M.-A., Supplizi, A. V. and Betteridge, K. J. (1991): The sex ratios of bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology*, 36, 779-788.
- 9) Xu, K. P., Yadav, B. R., King, W. A. and Betteridge, K. J. (1992): Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 31, 249-252.
- 10) Leonard, M., Kirszenbaum, M., Cotinot, C., Chesne, P., Heyman, Y., Stinnakre, M. G., Bishop, C., Delouis, C., Vaiman, M. and Fellous, M. (1987): Sexing bovine embryos using Y chromosome specific DNA probe. *Theriogenology*, 27 248. abst.
- 11) Bondioli, K. R., Ellis, S. B., Pryor, J. H., Williams, M. W. and Harpold, M. M. (1989): The use of male-specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*, 31, 95-104.
- 12) Itagaki, Y., Sato, S., Shitanaka, Y., Kudo, T., Yamaguchi, Y. and Sutou, S. (1993): Sexing of bovine embryos with male-specific repetitive DNA by polymerase chain reaction. II. Sexing of bovine embryos and production of calves with predicted sex. *J. Reprod. Dev.* submitted.
- 13) First, N. L. (1990); New animal breeding techniques and their application. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 41, 3-14.
- 14) Brackett, B. G. and Oliphant, G. (1975): Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 12, 260-274.
- 15) Betteridge, K. J. and Frechon, J.-E. (1988): The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. *Theriogenology*, 29, 155-189.
- 16) Leibo, S. P. and Rall, W. F. (1990): Prenatal diagnosis of sex in bovine fetuses by amniocentesis. *Theriogenology*, 33, 531-552.
- 17) King, K. K., Seidel, G. E. Jr. and Elsden, R. P. (1985): Bovine embryo transfer pregnancies. I. Abortion rates and characteristics of calves. *J. Anim. Sci.*, 61, 747-757.
- 18) Tsunoda, Y., Tokunaga, T. and Sugie, T. (1985): Altered sex ratio of live young after transfer of fast- and slow-developing mouse embryos. *Gamete Res.*, 12, 301-304.
- 19) Goldbard, S. B. and Warner, C. M. (1982): Genes affect the timing of early mouse embryo development. *Biol. Reprod.*, 27, 419-424.
- 20) Brownell, M. S. and Warner, C. M. (1988): *Ped* gene expression by embryos cultured *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 39, 806-811.

P C R法を用いて検査した牛体外作出脱出胚盤胞の性比

板垣佳明 木村直子 山中昌哉 須藤鎮世

(伊藤ハム中央研究所 茨城県北相馬郡守谷町久保ヶ丘1-2)

体外受精—体外培養系およびP C R法を用いて牛脱出胚盤胞の性比を検討した。媒精後188~248時間で190個の脱出胚盤胞が得られ、供試卵子数および媒精後72時間での卵割胚数に対する割合は、それぞれ31.8および46.7%であった。P C R産物のアガロースゲル電気泳動では、雄胚では雄特異的および雌雄共通の2本のバンドが、雌胚では雌雄共通の1本のバンドのみが認められ、判定は容易であり、189/190個(99.5%)の胚で性判別が可能であった。全体での性比は51.9%(98/189)であり、性比に差はなかった。12時間間隔での観察をもとに透明帯からの脱出時期に従って、3区に分類してみると、早い区(媒精後188~200時間)で雄胚が多い傾向がみられたが(59.4%、38/64)、統計学的に有意な差ではなかった。また、中間区(212時間)および遅い区(224~248時間)では、それぞれ僅かに雌胚が多いか(47.1%、33/70)、あるいは期待値に近い値(49.1%、27/55)であった。

Effect of cumulus cells on in vitro fertilization and subsequent development of pig follicular oocytes

Kiyoshi Totsukawa and Masayoshi Yokota

Section of Bioprocess Engineering, Faculty of Agriculture,
Yamagata University, Tsuruoka 997, Japan

Abstract: Three experiments were conducted to investigate the biological role played by cumulus cells in the early pregnancy of pig.

In Exp 1, the proportions of oocytes with or without cumulus cells relating to follicular size were studied. The proportion of oocytes with cumulus cells increased by 63 % in the oocytes collected from small follicles (1~4mm) compared with those from large follicles (≥ 5 mm). In Exp 2, in vitro matured oocytes were fertilized with epididymal or ejaculated spermatozoa in vitro.

There was a significant difference in the rate of ovum development into 8-cell and 16-cell stage between epididymal and ejaculated spermatozoa. In Exp 3, the developmental ability of oocytes with or without cumulus cells was investigated. Oocytes nudged from cumulus complexes at in vitro fertilization could not develop over the 4-cell stage.

KEY WORDS : in vitro fertilization, pig follicular oocyte, cumulus cell,

(Received 8 October 1992, Accepted 27 January 1993)

Introduction

In vitro fertilization in pig have been studied to define the various conditions on the maturity of follicular oocytes and fertilization¹⁻⁵⁾. This technique have solved many problems on the fertilization and subsequent development of eggs. By now, a few piglets were born by the use of follicular and tubal oocytes⁶⁻⁷⁾.

On the other hand, the requirement of cumulus cells for the follicular to mature in vitro has been reported in few animals⁸⁻¹¹⁾. However, the biological role of cumulus cells has not been fully elucidated yet during the early development of oocyte.

The present study was conducted to investigate the role played by the cumulus cells during in vitro fertilization and subsequent development into blastocysts.

Materials and Methods

1. Collection of oocytes

Ovaries were collected from immature gilts at a local abattoir and brought to the laboratory with Dulbecco's phosphate buffered saline at 35-37°C. Only healthy follicles with a diameter of 1-4 mm and ≥ 5 mm were used for this study. The obtained oocytes were classified as follows ; Class A : oocytes surrounded by many layers of cumulus complexes ; Class B : oocytes surrounded by only 1~2 layers of cumulus cells ; Class C : nude oocytes ; Class D : abnormal oocytes.

2. Preparation of sperm

Semen was collected from Duroc boars by glove method, and washed once with Dulbecco's phosphate buffered saline.

Otherwise, epididymal spermatozoa was collected from the cauda epididymis at a local abattoir. Ejaculated and epididymal sperm samples were diluted with a basic medium consisting of TCM-199 with Earle's salts (Nissui, Japan) supplemented with 10 % FCS (HAZLETON, USA), 100mg/l dibekacine sulfate to a final dilution of 2×10^8 sperms/ml. The diluted sperm was then pre-incubated for about 4 to 5hr at 37°C. After the incubation, the sperm showed the whiplash-like movement and reduced mortality.

3. Fertilization in vitro

About 50 μ l sperm suspension (1×10^6 sperm/ml) were introduced into the 200 μ l medium contained 10~20 of matured oocytes. The oocytes and sperm were co-incubated at 38.5°C in an atmosphere of 5 % CO₂ and 95 % air, and examined every 24hrs.

Experiment 1, the proportions of oocytes with or without cumulus cells relating to follicular size were investigated.

Experiment 2, the comparison of ejaculated or epididymal sperm was examined for the development of oocytes fertilized in vitro.

Experiment 3, Using ejaculated sperm, this experiment was conducted to examine a developmental ability of oocytes with or without cumulus cells, after its removal and subsequent addition near the oocytes at fertilization and development.

4. Statistical method

The data were analyzed with the χ^2 -test. A probability (P) of 0.05 was considered significant.

Results

Proportions of oocytes with or without cumulus cells (Exp 1)

The proportion of oocytes with or without cumulus cells relating to follicular size were studied (Table 1). In the small follicle (1~4 mm in diameter), the percentage of oocytes with cumulus cells (class A and class B) was 63.4 % and nude oocytes showed 30.1 %.

Whereas, the percentages of oocytes surrounded by cumulus cells in large follicles ($\geq 5\text{mm}$) were slightly lower.

Table 2. Development of follicular oocytes matured, fertilized and cultured in vitro

Source of spermatozoa	Class of oocytes	No. of oocytes	No. and % of oocytes developed to :				
			≥ 2 -cell	≥ 4 -cell	≥ 8 -cell	≥ 16 -cell	$\geq \text{molura}$
Epididimal	A	21	14 (66.7)	8 (38.1)	4 (19.0)	3 (14.3) ^a	2 (9.5)
	B	24	15 (62.5)	6 (25.0)	4 (16.0) ^a	2 (8.3)	0 (0)
Ejaculated	A	71	44 (62.0)	23 (32.4)	11 (15.5)	2 (2.8) ^b	1 (1.4)
	B	224	105 (46.9)	50 (13.4)	11 (4.9) ^b	8 (3.6)	2 (0.9)

Significance of difference ; a vs b : $P < 0.05$.

Effect of sperm on in vitro fertilization (Exp.2)

The data are summarized in table 2. Both ejaculated and epididymal sperm could develop to the 2-cell stages at a high rate (47~67 %) between Class A and Class B oocytes. But, the developmental rate in both class declined during the 4-cell to 16-cell stage. The epididymal-class B was superior to the ejaculated-class B for development to 8-cell stage ($P < 0.05$). Furthermore, the epididymal-class A was superior to the ejaculated-A for development to 16-cell stage ($P < 0.05$). However, only a few oocytes (Class A) developed into the morula stage.

Table 3. Effect of cumulus cells on the development of pig follicular oocytes

Condition at fertilization - at development	No. of oocytes	No. and % of oocytes developed to :				
		≥ 2 -cell	≥ 4 -cell	≥ 8 -cell	≥ 16 -cell	$\geq \text{molura}$
Adherence - Adherence	37	26 (70.3) ^a	17 (46.0) ^a	10 (27.0) ^a	5 (13.5)	1 (2.7)
Adherence - Addition	56	34 (60.7) ^a	13 (35.7)	13 (23.2) ^a	13 (23.2)	2 (3.6)
Adherence - Nude	70	37 (52.9)	19 (27.1) ^b	13 (18.6)	11 (15.7)	3 (4.3)
Nude - Addition	27	6 (22.2) ^b	3 (7.8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Nude - Nude	22	6 (27.3) ^b	1 (4.5) ^b	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Significance of difference ; a vs b : $P < 0.05$.

Effects of cumulus cells on the development of pig oocytes (Exp.3)

Table 3 showed the effects of cumulus cells with, without and addition at the stage of fertilization and development. The oocytes with cumulus cells at fertilization had a significantly higher rate (53-70 %) of development than the oocytes without cumulus cells during 2-cell to 8-cell stage ($P < 0.05$).

Otherwise, both oocytes with or without cumulus cells did not develop significantly from 16-cell up to morula stage. However, 14-23 % of the oocytes with cumulus cells developed to 16-cell, and 2-4 % of the oocytes to morula stage.

Table 1. Proportions of oocytes with or without cumulus cells relating to follicular size

	Classification				total
	A	B	C	D (%)	
Follicle size (mm)					
1 ~ 4	497 (14.4)	1698 (49.0)	1041 (30.1)	226 (6.5)	3462
5 ≤	50 (12.3)	164 (40.3)	161 (39.5)	32 (7.9)	407

Discussion

A positive correlation between antral follicle diameter and oocyte maturation in vitro has been reported in pigs⁹⁾. On the contrary, antral follicular sizes have not appeared to influence oocytes maturation in vitro¹²⁾. FUKUI and SAKUMA¹³⁾ showed that the proportion of bovine oocytes without cumulus cells collected from the larger follicles was ~30 % greater than those collected from small follicles (≤ 5 mm). In addition, the rate of degeneration of the oocytes without cumulus cells during culture seemed to be higher than those of the oocytes with cumulus cells. In the present study, the proportion of oocytes (A+B) with cumulus cells collected from small follicles (≤ 4 mm) was ~63 % greater than those collected from the large follicles (≥ 5 mm) (Table 1).

There was a significant difference in the growth ratio into 8-cell and 16-cell between epididymal and ejaculated spermatozoa (Table 2). The reason for this difference is not clear. Iritani et al¹⁾ reported that the slightly higher proportion of oocytes was penetrated by epididymal than ejaculated spermatozoa. We assume that coming in contact with seminal plasma might be harmful to the spermatozoa. However, the development to the 2-cell stage was not different between the two sources of spermatozoa.

FUKUI and SAKUMA¹³⁾ concluded that the presence of cumulus cells surrounding oocytes appeared to be more important for in vitro maturation to metaphase II than either ovarian activity or follicular size.

But, it is not known whether or not cumulus cells play an important role at the time of in vitro fertilization. In pigs, the 4-cell block in culture in vitro for development have been observed for a long time¹³⁾. However, the reason of the in vitro developmental block is not clear yet. In the present study, some embryos with cumulus cells at the time of fertilization allowed development through the 4-cell block (Table 3). Otherwise, nude embryos without cumulus cells could not develop to the 8-cell stage. These results suggest that the cumulus cells may be very important for in vitro fertilization.

References

- 1) Iritani, A., Niwa, K. and Imai, H. (1978) Sperm penetration in vitro of pig follicular oocytes matured in culture. J. Reprod. Fert., 54, 379-383.
- 2) Minato, Y. and Toyoda, Y. (1982) Induction of cumulus expansion and maturation division of porcine oocyte-cumulus complexes IN VITRO. Jpn. J. Zootech. Sci., 53(7), 480-487.
- 3) Naito, K. Fukuda, Y. and Toyoda, Y. (1988) Effects of porcine follicular fluid on male Pronucleus formation in porcine oocytes matured in vitro. Gamete Res., 21, 289-295.
- 4) Yoshida, M., Banba. and Kojima, Y. (1989) Effects of gonadotropins and estradiol-17 β on the timing of nuclear maturation and cumulus mass expansion in pig oocytes cultured invitro. Jap. J. Anim. Reprod., 35, 86-91.
- 5) Mattioli, M., Bacci, M. L., Galeati, G. and Seren., E. (1989) Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro. Theriogenology 31, 1201-1207.
- 6) Cheng, W. T. K., Moor, R. M. and Polge, C. (1986) In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro(abstr). Theriogenology 25, 146.
- 7) Yoshida, M. (1987) In vitro fertilization of pig oocytes matured in vivo. Jap. J. Vet. Sci., 49, 711-718.
- 8) Tsafiri, A. and Channing, C. P. (1975) Influence of follicular maturation and culture conditions on the meiosis of pig oocytes IN VITRO. J. Reprod. Fert. 43, 149-152.
- 9) Sorenson, R. A. and Wassarman, P. M. (1976) Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. Develop. Biol. 50, 531-536.
- 10) Sato, E., Iritani, A. and Nishikawa, Y. (1977) Factors involved in maturation of pig and cattle follicular oocytes cultured in vitro. Jap. J. Anim. Reprod. 23, 12-18.
- 11) Fukui, Y. and Sakuma, Y. (1980) Maturation of bovine oocytes cultures in vitro :

Relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. Biol.Reprod. 22, 669-673.

12) McGaughey, R. W. (1977) The culture of pig oocyte in minimal media, and the influence of progesterone and estradiol-17 β on meiotic maturation. Endocrinology 100, 39-45.

13) Davis, D. L. and Day, B. N. (1978) Cleavage and blastocyst formation by pig eggs in vitro. J. Anim. Sci. 45, 350-354.

豚卵胞卵子の体外受精と発生に及ぼす卵丘細胞の影響

戸津川 清・横田真良

山形大学農学部生物機能調節学講座

豚未成熟卵子の体外受精とその後の発生に及ぼす卵丘細胞の影響について比較検討した。

1. 1～4 mmの卵胞から採取した卵子の内、卵丘細胞を有する卵子（ランクAおよびB）の割合は63.4%であり、他方5 mm以上の卵胞では52.6%であった。
2. 体外で成熟させた卵子を精巢上体精子および射出精子で体外受精した結果、8細胞期および16細胞期へ発生する割合は精巢上体精子を使用した場合が有意に高かった（ $P < 0.05$ ）。
3. 体外受精時および分割期に卵丘細胞の有無が発生に及ぼす影響を調べた結果、受精時に卵丘細胞を有していることがその後の発生に必要であることが明らかになった。さらに、卵丘細胞を有しない卵子は4細胞期以上に発生しなかった。

Morphological features of rat blastocysts cryopreserved by vitrification

Shigeki OHBOSHI, Reiko NAKAMICHI, Noboru FUJIHARA and
Osamu KOGA*

Laboratory of Animal Physiology, Faculty of Agriculture, Kyushu
University, Fukuoka 812 and *Department of Animal Science,
Kyushu Tokai University, Kumamoto 869-14 Japan.

Abstract: The aim of this study was to develop a simple and rapid method of cryopreservation of rat blastocysts by vitrification. Vitrification solution used here contained glycerol and polyethylene glycol as cryoprotective agents in a HEPES buffered saline (VS3). Two methods of vitrification, one-step and stepwise, were examined to explore a convenient and successful technique for vitrifying rat embryos. No obvious difference was found in post-thaw *in vitro* survival of vitrified embryos between the two methods of vitrification, suggesting that one-step method may be successful for the vitrification of rat blastocysts. Microscopical observations of the embryos revealed that prolonged exposure of the embryos to the VS3 induced the considerable swelling of embryonic cells, suggesting the intracellular influx of cryoprotective agents. Based on the morphological examinations, no serious damages were observed in the vitrified-thawed embryos after a short period of exposure time (5 min). The present results demonstrate that one-step method of vitrification would be successful for cryo-storage of rat blastocysts.

KEY WORDS: Rat, Embryos, Cryopreservation, Vitrification,
Morphological features

(Received 17 October 1992, Accepted 5 February 1993)

Introduction

In the previous papers, we demonstrated that, using original vitrification solution (VS1)¹, rat blastocysts were successfully cryopreserved by vitrification employing one-step method^{2, 3, 4}. These results also suggested the possibility of the improvement of the vitrification solution, which would be more suitable for better vitrification than the above-mentioned solution (VS1). This

experiment was, therefore, designed to examine the effect of newly developed vitrification solution(VS3)⁵⁾ on in vitro post-thaw survivability of vitrified rat blastocysts, in particular focusing on morphological features of the vitrified-thawed embryos.

Materials and Methods

Source of embryos:

Sprague-Dawley strain (QDJ) were housed under a constant temperature (20-24 C) and lighting regimen (12L:12D). Adult female rats (8 to 19 weeks of age) were mated with males of the same strain on the evening of proestrus. The day on which spermatozoa were found in the vaginal smear was taken as Day 1 of pregnancy. The embryos were flushed from the uterine horn with HEPES buffered saline (HB1)⁵⁾ on Day 5 of pregnancy. Morphologically normal blastocysts were washed twice in fresh HB1 before exposing to the vitrification solutions.

Vitrification solution:

The vitrification solution (100% VS3) consisted of a mixture of 47.5% (v/v) glycerol and 6.0 % (w/v) polyethylene glycol (m.w. 8000) in a modified HB1 at pH 8.0⁵⁾. Dilutions of the 100 %VS3 were prepared using HB1 to yield solutions with 25% and 50% of the cryoprotectant concentrations before experiments.

Effect of vitrification solution on *in vitro* survivability of the fresh embryos(toxicity test):

In this experiment, freshly collected embryos were directly exposed to 100% VS3 for 5, 15 or 30 min in an ice box (3-4 C), and subsequently the embryos were transferred to 3.0 ml of HB1 at room temperature (20-24 C), holding for 10 min. As controls, the freshly collected embryos were exposed directly to HB1, holding for 5 min in an ice box, and then transferred to 3.0 ml of HB1, keeping for 10 min at room temperature.

Vitrification and warming procedures:

Two methods of vitrification, one-step and stepwise, were employed according to the method reported previously^{2, 3, 4)}. In case of one-step method, the embryos were exposed directly to 100 %VS3 for 5, 15 or 30 min in an ice box, while in the stepwise method, the embryos were exposed for 10 min to 25% VS3 at room temperature and 50% VS3 in an ice box. The both embryos were transferred to 50 ml of 100% VS3 in an ice box, and then the suspensions containing embryos were carefully aspirated in 0.25 ml plastic insemination straw (IMV, France) separated by two air bubbles from the rest of the straw filled

with 100% VS3. The straws were heat-sealed and frozen rapidly by immersing quickly into LN₂ and stored for periods between 1 and 7 days. The warming procedure of straws was conducted rapidly by agitating gently in an iced-water bath. The contents of each straw were expelled into 3.0 ml of HB1 at room temperature, mixed and held for 10 min.

Assessment of in vitro embryonic development of the embryos:

All recovered embryos were washed twice in MEM supplemented with 10. 0% FCS (Gibco), and subsequently were cultured for up to 48 h in drops (400 μ l) of the same medium under mineral oil at 39 C in an atmosphere of 5% CO₂ in air. The morphological appearance was assessed by the use of inverted microscope at 24 h intervals. The embryos developed to expanded and hatched blastocysts were classified as viable.

Statistical analysis:

Data were analyzed by use of ANOVA and the statistical differences of means were evaluated by Duncan's new multiple range test after transformation to arcsine values ⁶⁾ .

Morphological examination:

The embryos were immediately pre-fixed in Karnovsky's fixative for 1.5 - 2.0 h at 4 C, rinsed in 0.1M cacodylate buffer for 2-3 h and then post-fixed 1.0 % osmium tetroxide for 1 h at 4 C, dehydrated in acetone series and embedded in Epoxy resin. Semi-thin section (0.25 μ m) were stained with 0.5% toluidine blue and observed by using light microscope.

Results

As shown in Table 1, in comparison with control embryos, prolonged exposure of the freshly collected embryos to 100%VS inhibited their subsequent *in vitro* development, depending upon the exposure time. A serious injury was observed in the embryos exposed for 15 or 30 min to the VS3, particularly the development to hatched blastocysts was severely damaged by the prolonged exposure time (Table 1).

Table 2 showed that the vitrification in VS3 was not always harmful to the rat embryos as compared with the case of toxicity test, indicating that the toxic effect of the cryoprotectants on embryonic development might be more important for vitrification than vitrification per se. The degree of inhibition of embryonic development by vitrification was not comparable to that by the

Table.1 Effect of vitrification solution(VS3) on *in vitro* development of rat blastocysts

Exposure time (minutes)	No. of embryos used	Incubation time (hr)			
		24		48	
		Expanded B. ¹	Hatched B.	Expanded B.	Hatched B.
		(%)			
Control	30	28.8±18.9 ^a	68.1±17.7 ²	3.7± 3.7 ³	89.3± 6.4 ^a
5	32	66.7±12.0 ^a	13.3± 8.8	6.7± 6.7	42.2±13.1 ^b
15	25	51.1±17.2 ^a	0.0± 0.0	3.3± 3.3	3.3± 3.3 ^b
30	28	18.9±11.6 ^a	0.0± 0.0	0.0± 0.0	6.7± 6.7 ^b

¹ B : Blastocyst

^{2 3} No statistical analysis was done in these columns.

^{a b} Means±SE in the same column with different superscripts are significantly different(P<0.01).

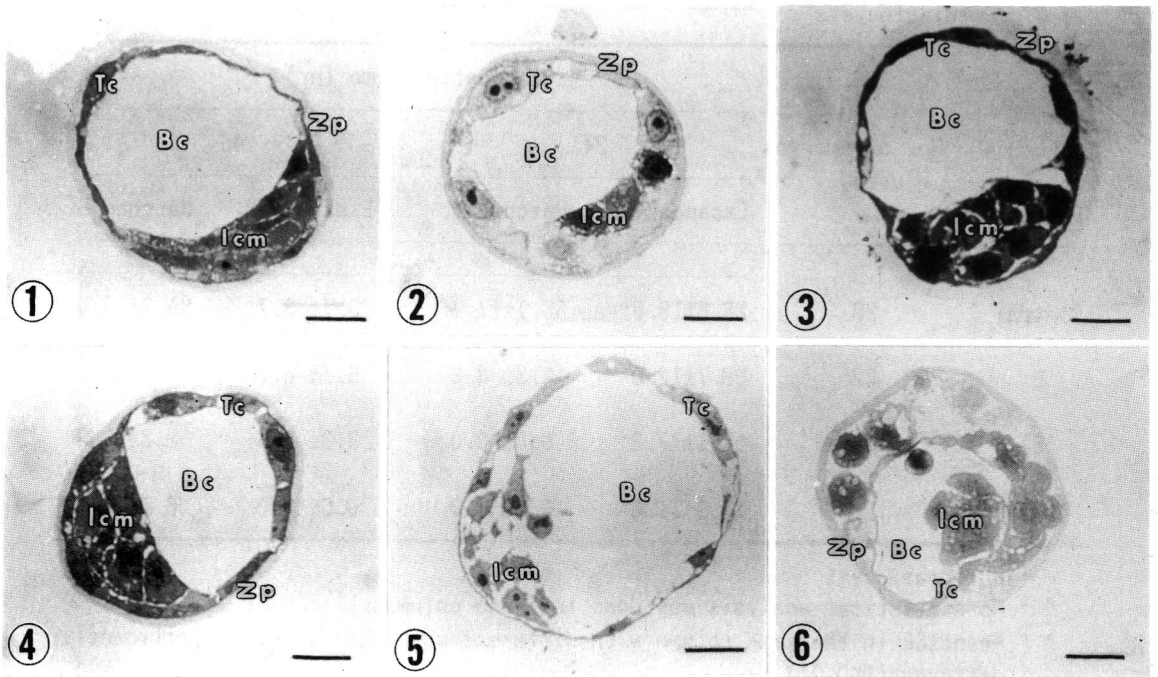
Table 2. Post-thaw development of rat blastocysts vitrified in VS3

Treatment	No. of embryos recovered	Incubation time (hr)			
		24		48	
		Expanded B. ¹	Hatched B.	Expanded B.	Hatched B.
		(%)			
Control	30	28.8±18.9 ^a	68.1±17.7 ²	3.7± 3.7 ^a	89.3± 6.4 ^a
<u>Stepwise</u>	55	59.6±10.8 ^{a b}	0.0± 0.0	1.5± 1.5 ^a	30.1±12.4 ^{b c}
<u>One-step</u>					
5min	64	83.8± 5.8 ^b	1.6± 1.6	4.3± 1.4 ^a	35.4±10.7 ^b
15min	43	54.4± 7.9 ^{a b}	2.5± 2.5	4.6± 2.7 ^a	21.0± 1.8 ^{b c}
30min	42	31.0± 7.8 ^a	2.8± 2.8	5.2± 3.3 ^a	7.2± 3.3 ^c

¹ B : Blastocyst.

² No statistical analysis was done in this column.

^{a b c} Means±SE in the same column with different superscripts are significantly different(P<0.01).



Explanation of figures

- Fig. 1. A freshly collected rat blastocyst before vitrification.
- Fig. 2. A blastocyst exposed for 5 min to VS3 in an ice box (3-4 C). The inner cell mass (Icm) and trophoblast cells (Tc) are slightly swollen.
- Fig. 3. A blastocyst just after removal of VS3. Blastocyst was exposed for 5 min to VS3 without vitrification. Morphological feature is very similar to that of the unvitrified fresh blastocyst.
- Fig. 4. A vitrified-thawed blastocyst, showing similar morphological appearance to that of the fresh blastocyst.
- Fig. 5. An expanded blastocyst, which was cultured *in vitro* for 24 h following vitrification and thawing. A disc of the trophoblast cells (Tc) and the embryonic cells were connected to each other with string-like fiber.
- Fig. 6. An injured vitrified-thawed blastocyst, which was culture *in vitro* for 24 h after vitrification and thawing. The inner cell mass (Icm) was destroyed and cell organelles were scattered.

Abbreviations in the figures: Bc, Blastocole; Icm, Inner cell mass; Tc, Trophoblast cells; Zp, Zona pellucida. Each calibration bar indicates 15 nm

exposure treatment (Table 2). Inhibitory effect of vitrification on post-thaw *in vitro* embryonic development was also dependent upon the exposure time, showing that the more exposure, the less development. As is clear in Table 2, one-step method, being 5 min exposure time, resulted in the better *in vitro* post-thaw survival of the vitrified-thawed rat embryos. This suggested that one-step method would be successful for the vitrification of the rat embryos.

Morphological examinations showed a slight swelling of the embryonic cells, which were exposed to 100%VS3 for several minutes as compared with the freshly collected embryos (Figs. 1 and 2), and the degree of swelling was also dependent upon the exposure time of the embryos, the more exposure time, the more swelling. On the other hand, some of the vitrified-thawed embryos, which were frozen just after 5 min exposure to VS3, showed normal morphological features similar to those of the fresh embryos (Figs. 3 and 4). Morphological characteristics of the expanded blastocyst were observed in the connection among the cells in trophoblast layer and inner cell mass. These intercellular connections were maintained each other with string-like fiber (Fig. 5). Some of the slightly cryoinjured embryos showed the cellular debris and cell organelles scattering inside the blastocoele (Fig. 6).

Discussion

As mentioned above, the vitrification solutions containing glycerol and polyethylene glycol, clearly inhibited *in vitro* development of the rat blastocysts, and the degree of inhibition of embryonic development was also dependent upon the exposure time, during which the embryos were exposed to the vitrification solutions. The toxic effect of the vitrification solutions has already been reported using mouse embryos⁵⁾. From the present study, prolonged exposure of the embryos to vitrification solutions seemed particularly harmful to subsequent embryonic development *in vitro*, even if the embryos were not vitrified. This means that the cryoinjury brought by vitrification and thawing arised probably mainly from toxic effect of the cryoprotective agents rather than vitrification per se. In mouse embryos, the developmental inhibition or post-thaw *in vitro* survivability following vitrification-thawing has been reported by many researchers^{5, 7, 8)}. The low survival rate of vitrified-thawed mouse embryos, however, has been said to be due to chemical toxicity of glycerol, which has the high permeability to mouse embryonic cells, rather than to osmotic injury^{8, 9)}.

On the other hand, there was no significant difference in post-thaw *in vitro* survival and embryonic development between one-step and stepwise methods of vitrification, suggesting the possibility of successful vitrification of rat blastocysts by using a simple and rapid freezing method. Similar results have already been reported in the rat embryos, employing the same method as used here ^{10, 11)}. It has also been reported the superiority of VS3 to the previous vitrification solution (VS1) ⁵⁾.

In the present study, HB1 diluent, which was used for recovering vitrified-thawed embryos, contained neither glycerol nor sucrose, resulting in *in vitro* better embryonic survival and subsequent development, as compared with the previous reports ^{2, 3, 4)}. In general, the addition of sucrose and/or glycerol to the diluents at the time of embryo recovery could enhance the post-thaw survival of the embryos ^{2, 3, 4, 12, 13)}. These results also suggest that the supplement of some chemicals to the diluents may induce some osmotic changes at cellular levels during dilutions of the embryos, leading to a better recovery of many viable embryos following vitrification and thawing.

Morphological observations revealed that the exposure of the embryos to the vitrification solutions brought about the swelling of the embryonic cells, depending upon the exposure time. The figures indicate the possibility of the intracellular permeation of cryoprotectants to the rat blastocysts. Similar findings, swelling and/or shrinkage of the embryonic cells, have already been reported in mouse eight-cell embryos when the embryos were exposed to the vitrification solutions and/or diluted after vitrification and thawing ⁵⁾. These transient morphological changes have been thought to be caused by osmotic shock due to high concentration of cryoprotectants ⁵⁾.

Well-vitrified-thawed embryos showed normal morphological features in comparison with those of freshly collected embryos, suggesting that suitable VS3 and/or better treatment for vitrifying rat embryos caused no morphological changes in the embryonic cells.

The present results showed that a simple and rapid method for cryopreserving rat blastocysts using favourable vitrification solutions could be successful. However, less toxic and more stable vitrification solutions and the procedures of dilution for removing cryoprotective agents from the embryonic cells are still required to improve the survival rate of vitrified-thawed embryos.

References

- 1) Fahy, G. M., MacFarlane, D. R., Angell, C. A. and Meryman, H. T. (1984) Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21, 407-426.
- 2) Ohboshi, S. and Fujihara, N. (1991) *In vitro* survival of rat embryos cryopreserved by vitrification. *Low Temp. Med.*, 17, 76.
- 3) Ohboshi, S. and Fujihara, N. (1992) Simple and rapid cryopreservation of rat embryos by vitrification. *Low Temp. Med.*, 18, 3-7.
- 4) Ohboshi, S., Nakamichi, R. and Fujihara, N. (1992) Cryogenic storage of rat embryos by vitrification. *Proc. 3rd Intern. Joint-Seminar Future Agric. Sci. Korea & Japan*. 82-93.
- 5) Rall, W. F. (1987) Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 24, 387-402..
- 6) Snedecor, G. W. and Cochran, W. G. (1967) *Statistical Methods*. 6th ed., Iowa State Univ. Press, Ames, pp. 285-321.
- 7) Whittingham, D. G. and Anderson, E. (1976) Ultrastructural studies of frozen-thawed 8-cell mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 48, 137-140.
- 8) Valdez, C. A., Abas, M. O., Takahashi, Y., Hishimura, M. and Kanagawa, H. (1990) Effects of equilibration time, pre-cooling and developmental stage on the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology*, 33, 627-636.
- 9) Van Der Zwahlen, P., Gaurois, B., Ectors, F. J., Touati, K., Massip, K. and Ectors, F. (1988) Some factors affecting successful vitrification of mouse blastocysts. *Theriogenology*, 30, 1177-1183.
- 10) Kono, T., Suzuki, O. and Tsunoda, Y. (1988) Cryopreservation of rat blastocysts by vitrification. *Cryobiology*, 25, 170-173.

- 11) Hirabayashi, M. and Chaya, N. (1990) Low temperature storage of rat 2-cell embryos by vitrification. J. Mamm. Ova Res., 7, 72-77.
- 12) Chupin, D. and De Reviers, M. M. (1986) Quick freezing of rat embryos. Theriogenology, 26, 157-166.
- 13) Kono, T., Kwon, O. Y., Ichinoe, K. and Nakahara, T. (1989) Effect of dilution on viability of vitrified-warmed mouse embryos. Jpn. J. Anim. Reprod., 35, 211-216.

ガラス化凍結保存したラット胚盤胞の形態的観察

大星茂樹、仲道麗子、藤原 昇、古賀 脩*

九州大学農学部、動物生理学研究室

*九州東海大学農学部、畜産学科

妊娠5日目の子宮より採取したラット胚盤胞を用いて、簡易・迅速な一段階法によるガラス化凍結を行い、融解後の胚の発育と形態的变化について検討した。まず、ガラス化溶液(VS3)が新鮮胚に及ぼす影響について検討したところ、この溶液に浸漬することによって胚はかなり膨潤し、その後の発育も若干抑制された。つぎに、ガラス化凍結を行う場合、低温(3~4℃)で短時間(5分)に平衡処理をすると、一段階法でもすぐれた生存胚を得ることができ、胚の凍結障害も極めて少ないことが確認された。

Influence of Anti - Le^x Antibody on In Vitro

Development of 8 - Cell Mouse Embryos

Ikuko YOTSUTANI*, Sueo NIIMURA and Kazuo ISHIDA

Graduate School of Science and Technology*,
and Faculty of Agriculture, Niigata University,
Niigata-shi 950-21

Abstract: Uncompacted 8-cell mouse embryos cultured in a Whittingham medium containing anti-Lewis X (Le^x) antibody underwent compaction, and developed into 16-cell embryos, though their blastomeres were all round and tended to be separated from each other. In such embryos no junctional complexes were seen of any type. These findings seem to suggest that Le^x epitope must play an important role in cell-to-cell recognition in transformed embryos and in the subsequent formation of junctional complexes.

KEY WORDS: Anti-Le^x antibody, Mouse embryo, Compaction, Junctional complex, Actin

(Received 20, December 1992 , Accepted 10, February 1993)

Introduction

Lewis X (Le^x) epitope is thought to influence cell-to-cell recognition which leads to cell differentiation^{1, 2)} and organ formation^{3, 4)}. In mouse embryos whose blastomeres have been transformed following the activation of actin filaments⁵⁾ in the cytoplasm and of E-cadherin⁶⁾ on the cell surface, it is suggested that Le^x epitope helps blastomeres to identify themselves by binding itself to receptors on the surface of blastomeres^{7, 8)}. Compaction of embryos is assumed to complete its entire course through such serial events, which also are accompanied by the construction of junctional complexes between pairs of blastomeres^{8, 9)}.

Some reports have dealt with the effect of Le^x epitope on compaction of mouse em-

bryos; in such studies, the embryos were cultured in a medium containing anti-Le^x antibody¹⁰⁻¹²⁾. Their results, however, were contradictory: (1) embryos normally underwent compaction¹⁰⁾, (2) embryos did not undergo compaction, but developed into 32-cell embryos composed of only round blastomeres^{11, 12)}. There have been no examinations, however, on the fluctuation of actin filaments, transformation of blastomeres or on the construction of junctional complexes.

In the present investigation, the authors examined the ultrastructural aspect of junctional complexes and the histochemical location of actin filaments in mouse embryos which were developed from the 8-cell stage on in a medium containing anti-Le^x antibody, and discussed the role of Le^x epitope in the construction of junctional complexes that grow between pairs of blastomeres.

Materials and Methods

Eighty mature mice of the ICR strain were kept and fed normally in a room at 24 °C, lit 14 hrs a day, from 4 a.m. till 6 p.m. Superovulated with 5 i.u. PMSG (Teikoku Hormone Manufacturing Co. Ltd., Tokyo, Japan) and with 5 i.u. hCG (Teikoku Hormone Manufacturing Co. Ltd.) 48 hrs later, they were mated with ICR strain males of proven fertility.

In order to examine the influence of anti-Le^x antibody on in vitro development of 8-cell mouse embryos, uncompacted 8-cell embryos were collected from the oviducts 63 hrs after hCG injection, and their zonae pellucidae were removed with pronase (Sigma, St. Louis, U.S.A.). The embryos thus treated were cultured at 37 °C for 8 to 24 hrs in a 1 ml Whittingham medium¹³⁾ containing 2 µg anti-Le^x antibody (Biodegign International, N. Y., U.S.A.) placed in a CO₂ incubator (5 % CO₂, 95 % air). As for the controls, a few uncompacted 8-cell embryos were cultured in a Whittingham medium devoid of antibody. Some of the embryos thus cultured were examined under a phase-contrast microscope. Approximately half of the remaining embryos were fixed in a 0.1 M cacodylate buffer solution (pH 7.4) containing 4 % glutaraldehyde and 2 % paraformaldehyde at 4 °C for 3 hrs. Rinsed 3 times in a 0.1 M cacodylate buffer solution (pH 7.4) over night, they were post-fixed in a 0.1 M cacodylate buffer solution (pH 7.4) containing 1 % osmium tetroxide. The embryos

were dehydrated through an acetone series, and then embedded in Epon 812. The embedded samples were cut using an ultramicrotome, stained with uranium acetate and then with lead nitrate, finally to be photographed under a JEM-100B electron microscope.

For the detection of actin filaments, the rest of the embryos were fixed in a phosphate buffer saline¹⁴⁾ (PBS, pH 7.4) containing 3.7 % formaldehyde at room temperature for 30 min. Rinsed in a PBS, they were immersed in a PBS containing 0.25 % Tween-20 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, U.S.A.) at room temperature for 5 min. Again rinsed in a PBS, the embryos were immersed in 100 μ l PBS containing 16.5 ng phalloidin (Molecular Probes Inc., Junction City, U.S.A.) at room temperature for 20 min. As for the controls, a few embryos were immersed in a PBS devoid of phalloidin. The embryos thus prepared for actin filament observation were placed one or a few at a time in the center of 4 vaseline spots on a slide. A coverslip was carefully placed on the vaseline spots and pressed gently to anchor the embryos in between the cover slip and the slide. Observation was carried out under a reflected-light fluorescing microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan).

Results

When uncompact 8-cell embryos were cultured in a Whittingham medium, the embryos underwent compaction, and outer round blastomeres became flat; a subsequent culture, then, led them to grow into blastocysts. When cultured in a Whittingham medium containing anti-Le^x antibody, compaction occurred just the same (Fig. 1), but the subsequent culture prevented the embryos from growing into blastocysts: the embryos, instead, had 16 round blastomeres, which were usually separated from each other.

Junctional complexes

In compacted 8-cell embryos cultured in a medium without the antibody, zonula occludens, predesmosomes and gap junctions appeared between each pairs of outer flattened blastomeres (Fig. 2), and gap junctions between each pair of inner round blastomeres, and between a flattened blastomere and a round blastomere. Cultured in a medium with the antibody, however, neither compacted 8-cell embryos nor 16-cell embryos composed only of round blastomeres had a junctional complex anywhere (Fig. 3).

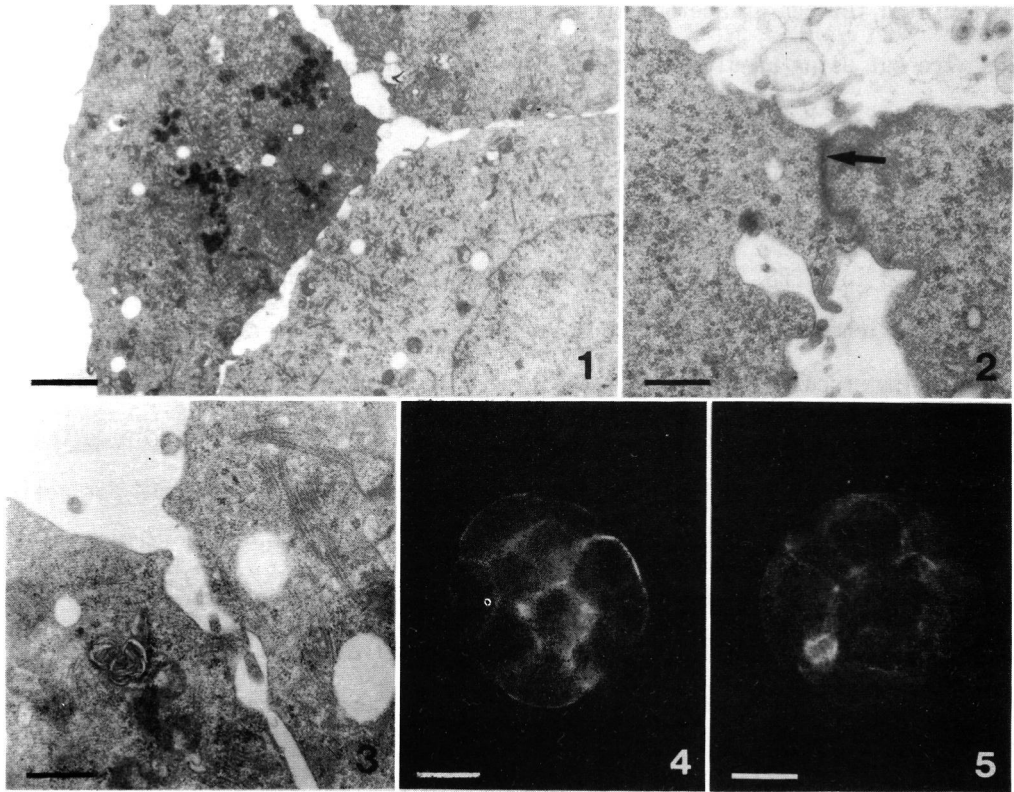


Fig. 1. A compacted 8-cell mouse embryo cultured in a medium with anti-Le^x antibody. An outer flattened blastomere and inner round blastomeres are seen. The scale indicates 2.0 μ m. Fig. 2. A compacted 8-cell mouse embryo cultured in a medium without anti-Le^x antibody. A zonula occludens (arrow) is seen between two outer flattened blastomeres. The scale indicates 0.5 μ m. Fig. 3. A compacted 8-cell mouse embryo cultured in a medium with anti-Le^x antibody. No junctional complex is seen between two outer flattened blastomeres. The scale indicates 0.5 μ m. Fig. 4. A compacted 16-cell mouse embryo cultured in a medium without anti-Le^x antibody, and treated with phalloidin. Actin fluorescence is seen in the cytoplasm of both flattened and round blastomeres, and is especially stronger in the ectoplasmic zones than in other parts of the cytoplasm. The scale indicates 25.0 μ m. Fig. 5. A compacted 8-cell mouse embryo cultured in a medium with anti-Le^x antibody, and treated with phalloidin. Actin fluorescence is seen in the cytoplasm of both flattened and round blastomeres, and is stronger throughout the ectoplasmic zones than in other parts of the cytoplasm. The scale indicates 25.0 μ m.

Actin

When normal embryos cultured in a medium with or without antibody were immersed in phalloidin solution, fluorescence appeared throughout the cytoplasm (Figs. 4 and 5), but

not when the embryos were immersed in a solution devoid of phalloidin, these findings indicating that the fluorescence shows the presence of actin.

In compacted embryos cultured in an antibody-free medium, the fluorescence was stronger in the ectoplasmic zones where two blastomeres adhered than in other parts of the cytoplasm (Fig. 4). In those cultured in a medium containing antibody, fluorescence was stronger throughout the ectoplasmic zones than in other parts of the cytoplasm (Fig. 5); but in 16-cell embryos, most of the blastomeres showed no fluorescence, though a few blastomeres showed a small amount.

Discussion

It is agreed that Le^x epitope first appears on the blastomere surface of uncompact 8-cell mouse embryos, but the largest amount of Le^x epitope occurs in compacted embryos, however, in blastocysts a small amount remains only on the surface of inner-cell-mass cells¹⁵⁻¹⁷⁾. Le^x epitope is assumed to play an important role in cell-to-cell recognition among transformed blastomeres and in subsequent formation of junctional complexes; the latter speculation, however, has not been proved experimentally. The present experimental findings confirmed this, showing that Le^x epitope does play a role in the formation of junctional complexes. Incomplete compaction of anti-Le^x antibody-treated embryos, accompanied by the lack of formation of junctional complexes and of actin activation, resulting in an inability to develop blastocysts, together seem to confirm our findings.

Johnson *et al.*¹¹⁾ and Kemler *et al.*¹²⁾ reported that no compaction occurred in anti-Le^x antibody-treated mouse embryos, disagreeing with our results. It seems that compaction did not occur because of the deployment of an antiserum made from the surface molecules of embryonic teratocarcinoma cells as antigen. That is, the antiserum may have contained an antibody against E-cadherin together with one against Le^x epitope^{18, 19)}. If embryos are treated with such an antiserum, activation of intercellular adhering molecules on the blastomere surface, the first step of compaction, is inhibited by the antibody against E-cadherin even before the inhibition of cell-to-cell recognition of blastomeres is induced by anti-Le^x antibody, thus no compaction occurs in the embryos.

References

- 1) Fox, N., Damjanov, I., Knowles, B. B. and Solter, D. (1982): Teratocarcinoma antigen is secreted by epididymal cells and coupled to maturing sperm. Exp. Cell Res., 137, 485-488.
- 2) Solter, D., Shevinsky, L., Knowles, B. B. and Strickland, S. (1979): The induction of antigenic changes in a teratocarcinoma stem cell line (F9) by retinoic acid. Dev. Biol., 70, 515-521.
- 3) Fox, N., Damjanov, I., Martinez-Hernandez, A., Knowles, B. B. and Solter, D. (1981): Immunohistochemical localization of the early embryonic antigen (SSEA-1) in post-implantation mouse embryos and fetal and adult tissues. Dev. Biol., 83, 391-398.
- 4) Fox, N., Shevinsky, L., Knowles, B. B., Solter, D. and Damjanov, I. (1982): Distribution of murine stage-specific antigens in the kidneys of three rodent species. Exp. Cell Res., 140, 331-339.
- 5) Reima, I. and Lehtonen, E. (1985): Localization of nonerythroid spectrin and actin in mouse embryos. Differentiation, 30, 68-75.
- 6) Ogou, S.-I., Yoshida-Noro, C. and Takeichi, M. (1983): Cleavage stage mouse embryos share a common cell adhesion system with teratocarcinoma cells. Dev. Biol., 92, 521-528.
- 7) Bird, J. M. and Kimber, S. J. (1984): Oligosaccharides containing fucose linked $\alpha(1-3)$ and $\alpha(1-2)$ to N-acetylglucosamine cause decompaction of mouse morulae. Dev. Biol., 104, 449-460.
- 8) Kimber, S.J. (1988): The role of fucosylated glycoconjugates in cell-cell interactions of the mammalian pre-implantation embryo. In Eukaryote Cell Recognition (Chapman, G. P., Ainsworth, C. and Chatham, C., eds.), p194-224, Cambridge University Press, Cambridge.
- 9) Ducibella, T. and Anderson, E. (1975): Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo: Pre-requisites for morphogenesis of the blastocyst. Dev. Biol., 47, 45-58.
- 10) Richa, J. and Solter, D. (1986): Role of cell surface molecules in early mammalian

development. In *Experimental Approaches to Mammalian Embryonic Development* (Rossant, J. and Pedersen, R., eds.), p293-320, Cambridge University Press, Cambridge.

- 11) Kemler, R., Babinet, C., Eisen, H. and Jacob, F. (1977): Surface antigen in early differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 74, 4449-4452.
- 12) Johnson, M. H., Chakraborty, J., Handyside, A. H., Willison, K. and Stern, P. (1979) : The effect of prolonged decompaction on the development of the preimplantation mouse embryo. *J. Embryol. exp. Morph.*, 54, 241-261.
- 13) Whittingham, D.G. (1971): Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 14, 7-21.
- 14) Dulbecco, R. and Vogt, M. (1954): Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.*, 99, 167-182.
- 15) Solter, D. and Knowles, B. B. (1978): Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 75, 5565-5569.
- 16) Solter, D. and Knowles, B. B. (1978): Developmental stage-specific antigens during mouse embryogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 13, 139-165.
- 17) Gooi, H. C., Feizi, T., Kapadia, A., Knowles, B. B., Solter, D. and Evans, M. J. (1981): Stage-specific embryonic antigen involves $\alpha 1 \rightarrow 3$ fucosylated type 2 blood group chains. *Nature*, 292, 156-158.
- 18) Takeichi, M. (1988): The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*, 102, 639-655.
- 19) Vestweber, D. and Kemler, R. (1984): Rabbit antiserum against a purified surface glycoprotein decompacts mouse preimplantation embryos and reacts with specific adult tissues. *Exp. Cell Res.*, 152, 169-178.

抗Le^x抗体処置マウス胚の割球接合に関する研究

四谷伊公子*・新村末雄・石田一夫

新潟大学大学院自然科学研究科*, 新潟大学農学部, 新潟市950-21

コンパクションを起こしていないマウス8細胞胚を抗Lewis X (Le^x) 抗体を含むWhittingham の培養液で培養すると、外側の割球は扁平に変形した。しかし、このような胚を抗Le^x 抗体を含む培養液で引き続き培養すると、胚は16細胞期まで発生したが、割球は全て球形を呈しており、離散する傾向があった。また、抗Le^x 抗体を含む培養液で発生した胚では、割球間の接合装置は全く観察されなかった。以上の結果から、Le^x 型糖鎖は割球が変形した胚における割球間の認識と、引き続いて起こる接合装置の形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

牛 IVF 卵子の初期発生時の MALATE DEHYDROGENASE 活性と中間代謝物質との関係

Relationship between malate dehydrogenase activity and energy substrates of fresh
bovine embryos derived from IVF

柳 在雄, 菅原七郎

Zae Young RYOO, Shichiro SUGAWARA

東北大学農学部家畜繁殖教室

Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Agriculture, TOHOKU University

Abstract: We have studied on the relationships between substrate activity of MDH in TCA and energy substrates of bovine embryos from the 1-cell to blastocysts stages. MDH activity was calculated in single fresh embryos, using enzyme cycling method modified by us for single fresh embryos, and then each embryo estimated MDH activity was co-cultured with cumulus cells to check subsequent development.

We found out that the level of MDH activity was significantly higher ($P<0.05$) in AMLP buffer as compared with PBS(−) buffer as enzymatic reaction buffer during early stages of development; but the bovine embryos in AMLP buffer(pH 9.8) did not continue subsequent development after estimation of enzymatic activity. MDH activity of bovine embryos at unfertilized, 2, 4, 8-cell, morula and blastocysts stages was ranged from 5.20 ± 1.06 to 12.18 ± 1.86 ($\times 10^{-6}$ mol/embryo/hr). The activity was the highest at the blastocyst stages. MDH activity in the degenerated embryos was significantly lower ($P<0.05$) as compared with that in normal embryos. MDH activity increased markedly in the presence of glutamate, malate, α -ketoglutarate and DNP, indicating that via the TCA cycle that these substrates can be used as energy sources.

KEY WORDS: Bovine embryo, Metabolic activity, Enzyme cycling, Enzymatic activity
(受付 1993 年 1 月 11 日, 受理 1993 年 2 月 25 日)

緒 言

牛初期胚はPentose Phosphate Pathway (PPP) とEmbden-MeyerHof (EMP) の両経路によってglucoseを酸化している¹⁾。他方, RiegerとGuay (1988)²⁾および Tiffinら (1991)³⁾は, 牛初期胚ではglutamateをTricarboxylic acid cycle (TCA) で代謝していることを示した。これらのことは, 牛初期胚におけるエネルギー基質の酸化経路はglucoseからのPPPとEMPだけではなく, 初期発生時でもかなりTCA系によって物質の酸化をしていることを示すものである。しかし, 牛卵子においてTCA系の中間代謝物質の代謝はマウス, ウサギおよびラットなどの実験小動物卵子のそれらと比べて殆ど報告がなく, 不明の点が多い。そこで, 牛卵子および胚において, TCA系を経て代謝される中間物質のエネルギー代謝とその後の卵子の発生成能との関係を調べることを目的として, 酵素周期法により新鮮卵子1個当りのMDH (malate dehydrogenase) 活性とそれらに関連している中間代謝物質の代謝能との関連で胚盤胞への発生率を検討したので報告する。

材料および方法

(1) 牛卵子の体外受精および体外培養による初期胚の作出

屠場で採取した牛卵巢からの卵胞卵子を用い, 体外受精法により初期胚を作出した。体外受精は既報⁴⁾に従った。すなわち, 黒毛和牛の卵巢より吸引採取法により未成熟の卵胞卵子を採集し, MDH活性とそれらに関連している中間代謝物質の影響を検討すると共に, 24時間成熟培養後, 体外受精に供した。黒毛和種の凍結射出精液を温水 (32~35℃) で融解後, BAS無添加B.O.液 (Brackett & Oliph-ant)⁵⁾に10mM カフェイン (和光純薬) を加え, 遠心分離 (200xg, 8分) を2回繰り返して精子を洗浄した。洗浄後, BSA無添加B.O.液に15 μ g/ml ヘパリン (H-3125, Sigma) および10mM カフェインを加え, 1回遠心分離 (200xg, 8分) し, 精子濃度を 10×10^6 cell/mlになるようにB.O.液で調整した。受精用シャーレ (Falcon, 35mm, No.3001) は, 0.01g/mlのBSAを含むB.O. (50 μ l) を加え, さらに成熟培養した卵子をB.O.+BSA液で2回洗浄後, 同シャーレに導入して媒精を行った。媒精時の精子濃度は 5×10^6 cell/mlとした。媒精6時間後に卵子は, 発生培地で3回洗浄して付着した精子を除いた後に, ミネラルオイルで覆った発生培地 (350 μ l) に移した。発生用培養液は, 25mM HEPES緩衝Earle型TCM199 (GIBCO, Cat.380-2340) を基礎に5% (v/v) の非燻化牛胎児血清 (FCS, Flow Lab., Lot.910) と抗生物質 (100IU/ml Penicilin; 0.05 μ g/ml Streptomycin) を添加したものをを用いた。成熟卵子は卵胞卵子を22時間成熟後に得られた。初期胚については, 媒精後24~26時間で2細胞期胚, 44~46時間で4細胞期胚, 50~52時間で8細胞期胚, 120~124時間で桑実期胚および160~170時間で胚盤胞期胚を得た。

(2) 酵素 (MDH) 活性測定

Malate dehydrogenase (MDH) 活性の測定はLowry (1972)⁶⁾が用いた酵素周期法について新鮮卵子測定用に修正した方法を用いて行った。

a. 酵素反応

MDHの反応液は以下に示した組成のものを用いた。すなわち、50mM 2-amino-2-methyl-L-propanol HCl buffer (AMLP) (pH 9.8) およびPBS (-) (pH 7.3) に0.2mM NAD, 6.5mM malate, 1.0mM EDTA, 0.05% (w/v) を溶解した。酵素反応は1.0 μ lの反応液とともに、内径5mm、厚さ1mmの特製スライドガラス上に卵子1個を入れ、ミネラルオイルで覆い、37℃で15分間反応させた。その後0.2M NaOHを加え、反応を停止させ過剰のNADを破壊した。

b. サイクリング反応

MDHの酵素反応によって生成されたNADHをサイクリングにより増幅した。サイクリング液は、pH 9.8の50mM AMLP bufferに300mM ethanol, 0.1mM ADP, 0.02% BSAを含む反応液に、50 μ g/ml alcohol dehydrogenase (ADH: EC 1.1.1.1), および5 μ g/ml malate dehydrogenase (MDH: EC 1.1.1.37) を加えて用いた。サイクリングは37℃で1時間行った。

c. 指示反応 (NADH活性) の測定

サイクリングで増幅された反応生成物のNADHを顕微測光装置 (CAM-220:Fluorometer, Nikon, UV Fluor x 20) により各サンプルの測定時間を5秒に設定し、蛍光照射 (UV励起Ex300~400nm, 干渉フィルタEm465) により蛍光度を測定した。スタンダードには 10^{-3} ~ 10^{-6} M NADH溶液を用いた。

実験は以下の4区について行い、成績を比較検討した。

(実験1) bufferの種類と酵素活性との関係を検討するために、8細胞期胚、桑実期胚および胚盤胞について、酵素反応液として、50mM AMLP buffer (pH 9.8) とPBS (-) (pH 7.3) の酵素活性を測定した。

(実験2) 実験1の結果をもとに、酵素活性は低くであるが、その後の発生率がよかった酵素反応液 (PBS(-)) を用い、卵母卵子から胚盤胞までの酵素活性と胚盤胞への発生率を調べた。

(実験3) 媒精5日目の卵子について、正常に発生した新鮮な牛体外受精卵と退行卵 (発生遅延, 発生停止あるいは発生不良卵) を選んで酵素活性と胚盤胞への発生率を調べた。

(実験4) 中間代謝物質とMDH活性の関連を調べるため、桑実期胚を用い、酵素反応液に中間代謝物質として、6.5mM malate, 5mM α -ketoglutarate, 4mM glutamate, 3mM iso-citrateおよび50 μ M 2,4-dinitrophenol (DNP; Sigma, St Louis) をそれぞれ添加し、酵素反応を測定した。

結果は、Fisher's Exact testおよびChi-square testによって有意差の検討を行った。

結 果

酵素反応液を50mM AMLP buffer (pH 9.8) および PBS (－) (pH 7.3) とし、8細胞期胚、桑実期胚および胚盤胞のMDH活性を測定した結果、Table 1に示すように、酵素反応液 AMLP buffer の酵素反応はPBS (－) より有意に高かった ($P<0.05$)。しかし、PBS(－)の条件での胚盤胞までの発生率が、8細胞期胚と桑実期胚でそれぞれ20.0 (1/5) および50.0% (3/6) に対し、AMLP buffer の条件ではすぐ形態的な変化を起こし変性し初め、その後の発生が認められなかった。

実験1の条件では、酵素反応は低くであるが、酵素活性測定後、続いての発生能を有していることが明らかになった。それ故、以降の実験ではPBS(－)を用い、卵母卵子から胚盤胞までの酵素活性を測定し、その後の発生率を検討した。その結果、卵母卵子($12.12 \pm 1.34 \times 10^{-6} \text{mol/embryo/hr}$)および胚盤胞($12.18 \pm 1.86 \times 10^{-6} \text{mol/embryo/hr}$)での酵素活性は2細胞期胚($5.20 \pm 1.06 \times 10^{-6} \text{mol/embryo/hr}$) および4細胞期胚 ($5.90 \pm 0.89 \times 10^{-6} \text{mol/embryo/hr}$) より有意に高かった ($P<0.05$)。また、2細胞期胚から胚盤胞までの酵素活性は徐々に増加する傾向にあった (Table 2)。

媒精5日目の卵子について、正常卵子および退行卵の酵素活性を比較したところ、正常卵子のMDH活性 ($11.19 \pm 0.86 \times 10^{-6} \text{mol/embryo/hr}$) が退行卵子 ($6.63 \pm 0.87 \times 10^{-6} \text{mol/embryo/hr}$) より高く ($P<0.05$)、胚盤胞への発生率も退行卵の場合全く発生しなかったが、正常卵子では16個の卵子中9個 (56.3%) の卵子が胚盤胞に発生した (Table 3)。

中間代謝物質とMDH活性の関連を調べるため、酵素反応液に中間代謝物質、6.5mM malate, 5mM α -ketoglutarate, 4mM glutamate, 3mM iso-citrate および50 μM DNPをそれぞれ添加し酵素反応を測定した結果、基質無添加区とiso-citrate添加区は、基質としてmalateを添加した区より有意に低かった ($P<0.05$)。しかし、 α -ketoglutarate, glutamate およびDNPを添加した区ではmalate添加区より酵素活性が高く、さらに α -ketoglutarate添加区およびDNP添加区ではmalate添加区との間で有意差が見られた ($P<0.05$) (Table 4)。

考 察

TCA系は卵子のエネルギー生産において解糖系より大きな役割をもっている。すなわち、glucose からpyruvateに転換する間、わずか、2分子のATPしか生産できないが、 C_3 および C_6 からの CO_2 生産と同時に24分子のATPがTCA系で生産できる。

牛胚の初期発生時における基質の酸化経路に対して、JavedとWright (1991)⁷⁾は、16細胞期胚まで CO_2 生産はpentose phosphate pathway (PPP) とEmbden-Meyerhof pathway の両方で高かったが、EMPでは発生の進行により徐々に増加する反面、PPPでは16細胞期胚から急速に減少することを報告している。また、Riegerと Guay (1988)²⁾は、空気中の CO_2 変化を補正するシステムを考案して、

Table 1. Malate dehydrogenase activity of bovine embryos using either 2-amino-2-methyl-L-propanol buffer or PBS(-) and subsequent development

Enzyme reaction medium	Cell stage	No. of embryos measured and then cultured	MDH activity* ($\times 10^6$ mol/embryo/hr)	No. and % of blastocysts
AMLPP**	morula	6	14.16 \pm 1.34a	0
	blastocyst	5	19.73 \pm 5.19b	—
PBS(—)	morula	6	5.36 \pm 1.78c	3(50.0)
	blastocyst	5	8.59 \pm 0.98d	—

a, b, vs c, d: $P < 0.05$.

*Mean \pm SE

**2-amino-2-methyl-L-propanol(pH 9.8)

Table 2. Malate dehydrogenase activity at different cell stages of bovine embryos and subsequent development

Cell stage	No. of embryos measured and then cultured	MDH activity* ($\times 10^6$ mol/embryo/hr)	No. and % of blastocysts
Unfertilized**	12	12.12 \pm 1.34a	—
2-cell	11	5.20 \pm 1.06b	2(18.2)
4-cell	10	5.90 \pm 0.89c	1(10.0)
8-cell	10	8.49 \pm 1.40d	3(30.0)
Morula	10	8.50 \pm 1.10e	5(50.0)
Blastocyst	9	12.18 \pm 1.86f	—

a, f vs b, c: $P < 0.05$.

*Mean \pm SE

**These oocytes were incubated 22 hours for maturation.

Table 3. Malate dehydrogenase activity and subsequent development of normal and degenerated morulae obtained 5 days after IVF

Type of the embryos	No. of embryos examined	MDH activity* ($\times 10^6$ mol/embryo/hr)	No. and % of blastocysts
Normal	16	$11.19 \pm 0.86a$	9(56.3)
Degenerated	19	$6.63 \pm 0.87b$	0

a vs b: $P < 0.05$.

*Mean \pm SE

Table 4. Malate dehydrogenase activity of bovine morulae with substrates

Substrates	No. of embryos measured	MDH activity* ($\times 10^6$ mol/embryo/hr)
Non-substrate	7	$7.57 \pm 0.72a$
Malate	7	$11.16 \pm 0.53b$
α -ketoglutarate	7	$16.83 \pm 1.58c$
Glutamate	7	$15.01 \pm 1.15d$
iso-citrate	7	$9.02 \pm 0.19e$
Dinitrophenol	10	$17.57 \pm 1.83f$

a vs b,c,d,f; b,c,d vs e; b vs c,f: $P < 0.05$.

*Mean \pm SE

胚盤胞のglucose代謝を調べたところ, pyruvate およびglutamateはTCA系により酸化されるが, glucoseの酸化はpyruvate kinaseの欠乏あるいは阻害により制限されることを報告した. MDHの酵素活性を指標により牛初期発生時の酵素活性と胚盤胞への発生率を調べたところ, 酵素反応液PBS (一)の条件はAML bufferと比べ, 酵素活性は低かったが, 各発生段階の胚盤胞への発生率は有意に高かった (Table 1). PBS (一) の条件での酵素活性と発生能がAML bufferと異なることは酵素反応液のpHによる影響であると考えられる.

牛初期胚のMDH活性は2細胞期胚から胚盤胞まで徐々に増加し, 胚盤胞での酵素活性が最も高かったことは (Table 2), 牛初期胚の胚盤胞ではexogeneousの基質の酸化も含め発生時のエネルギーを獲得しているものとみなされる. 従って, 着床前であっても栄養学的な面より, 母体環境から物質を取入れて代謝を行っているものと考えられる. しかし, Brinster (1966)⁸⁾はマウス初期胚でのMDH活性は卵母細胞から胚盤胞までに大きな変化が見られないが, G6PDHの活性に比べ全般的に2倍程高いことを報告した.

正常に発生した新鮮な牛体外受精卵は退化卵 (着床遅延, 発生停止あるいは発生不良卵) より酵素活性が高かった (Table 3). JavedとWright (1991)⁷⁾は牛初期胚の pentose phosphate pathwayとEmbden-MeyerHof pathwayにおいて, 品質不良卵のtotal glucose利用率が正常卵より低いことを報告した. これらのことは, エネルギー代謝の還元剤であるNADPH脱水素酵素によって卵子の生存性を判定できることが示唆された.

RiegerとGuay (1988) は, 排卵7日目の牛胚盤胞を用い, 50mM DNPを入れた発生培地にglucoseあるいはglutamateをそれぞれ添加してTCA系の基質利用率を測定した結果, glucose発生培地中にDNPを添加した場合TCAのCO₂ 生産は多かったが, glutamine発生培地中にDNPを添加した場合, 逆にCO₂生産は減少した. マウスの胚盤胞でも同じ結果であることがO' FallonとWright (1986) によって報告されている. 牛の桑実期胚においても, TCA系の中間代謝物質であるmalate, α -ketoglutarate, glutamateと同時にDNPはMDH活性が高かった. これらのことは, malate, α -ketoglutarateおよびglutamateは牛初期胚のエネルギー源として, また, DNPはTCA系にある中間代謝物質の刺激物質として利用できる可能性が示された.

研究の一部は文部省科学研究費 (一般 A No.02404018) によって行った.

文 献

- 1) Sugawara, S. and Ryoo, Z.Y. (1992): Estimation for enzymatic activity of energy metabolism and subsequent development of fresh bovine embryos from in vitro fertilization. Proc. 12th Int. Congr. Anim. Reprod. A. I., Hague, 3, 1339-1341.

- 2) Riger, D. and Guay, P.(1988): Measurement of the metabolism of energy substrates in individual bovine blastocysts. J. Reprod. Fert., 83, 589-591.
- 3) Tiffin, G.J., Rieger, D., Betteridge, K.J., Yadav, B. and King, W.A.(1991): Glucose and glutamine metabolism in pre-attachment cattle embryos in relation to sex and stage of development. J. Reprod. Fert., 93, 125-132.
- 4) 正木 全, 柳 在雄, 菅原七郎, 正木淳二 (1991): 牛体外受精卵子の幹細胞化に関する研究 . 哺乳卵研誌, 8, 27-33.
- 5) O'Fallon, J.V. and Wright, R.W. Jr.(1986): Quantitative determination of the pentose phosphate pathway in preimplantation mouse embryos. Biol. Reprod., 34, 58-64.
- 6) Lowry, O.H. and Passonneau, J.V.(1972): A flexible system of enzymatic analysis. Academic press, New York. pp130-144.
- 7) Javed, M.H. and Wright, R.W. Jr.(1991): Determination of pentose phosphate and Embden-Meyerhof pathway activities in bovine embryos. Theriogenology, 35, 1029-1037.
- 8) Brinster, R.L.(1966): Malic dehydrogenase activity in the preimplantation mouse embryos. Exp. Cell Res., 43, 131-135.

牛 IVF 卵子の初期発生時の LACTATE DEHYDROGENASE 活性と発生能の検討

Relationship between lactate dehydrogenase activity and subsequent developmental
ability in individual bovine embryos

柳 在雄, 稲垣 宏, 菅原七郎

Zae Young RYOO, Hiroshi INAGAKI, Shichiro SUGAWARA

東北大学農学部家畜繁殖教室

Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Agriculture, TOHOKU University

Abstract: In order to survey the relationships between metabolic activity and developmental ability of bovine embryo derived from in vitro fertilization, we modified an enzymatic cycling method in the present study. We measured lactate dehydrogenase (LDH) in preimplantation stages of single bovine embryo derived from IVF to examine the effect of LDH activity on a subsequent development in vitro. LDH activity of bovine embryos varied with the cleaving stages and embryos quality (Table 1, 2). LDH activity in the degenerated embryos was the highest as compared with that in normal embryos. It is suggested that the release of LDH by dying or degenerating embryos might offer an alternative for determining the viability of embryos. Thus, the LDH activity proved to be a practical method for distinguishing between nonviable and viable embryos.

KEY WORDS: Bovine embryo quality, Enzymatic cycling, LDH, Metabolic activity
(受付 1993 年 1 月 11 日, 受理 1993 年 2 月 25 日)

緒 言

解糖系で pyruvate から lactate を生じる系とその逆反応で lactate を脱水素して pyruvate を生じる系は心筋や他の組織などで重要な役割を行っている。しかし、初期胚での乳酸代謝に関しては知見は少なく、明確にされていない。

Renardら (1982)¹⁾は、体内の牛初期胚を体外の発生培地中で培養した時、発生能を失った胚あるいは退行が進んでいる胚の発生培地中には非常に高いLDH活性が検出されたと報告した。これは、退行あるいは退行が進行中の胚のLDH活性による胚の生存能が予測できる可能性を示唆した。

最近、卵子における酵素活性の測定は性判定²⁾および代謝活性による発生能³⁾を予測するために用いられている。酵素活性と胚の生存能力および発生能は明らかではないが、少なくとも通常の胚発生時における胚の代謝活性は一定のレベルを保っていることが基本と考えられる。しかし現在のところ、その指標となる酵素活性の基準が明確にされていない。

そこで本研究では、牛の初期発生時における解糖系の中間代謝物質の乳酸とエネルギー代謝について、酵素周期法により卵子1個当りのLDH活性を測定し、その後の発生能との関係を調べた。

材料および方法

(1) 牛卵胞卵子の体外受精および体外培養による初期胚の作出

屠場で採取した牛卵巣からの卵胞卵子を用い、体外受精法により初期胚を作出した。体外受精は既報⁴⁾に従った。すなわち、黒毛和牛の卵巣より吸引採取法より未成熟の卵胞卵子を採集し、LDH活性とその後の発生能との関連を検討すると共に、24時間成熟培養後、体外受精に供した。黒毛和種の凍結射出精液を温水 (32~35℃) で融解後、BSA無添加B.O.液 (Brackett & Oliphant)⁵⁾に10mM カフェインを加え、遠心分離 (200xg, 8分) を2回繰り返して精子を洗浄した。洗浄後、BSA無添加B.O.液に15 μ g/ml ヘパリン (H-3125, Sigma) および10mM カフェインを加え、1回遠心分離 (200xg, 8分) し、精子濃度を 10×10^6 cell/mlになるようにB.O.液で調整した。受精用シャーレ (Falcon, 35mm, No.3001) は、0.01g/mlのBSAを含むB.O. (50 μ l) を加え、さらに成熟培養した卵子をB.O.+BSA液で2回洗浄後、同シャーレに導入して媒精を行った。媒精時の精子濃度は 5×10^6 cell/mlとした。媒精6時間後に卵子は、発生培地で3回洗浄して付着した精子を除いた後に、ミネラルオイルで覆った発生培地 (350 μ l) に移した。発生用培養液は、25mM HEPES 緩衝 Earle型TCM199 (GIBCO, Cat., Lot.910) と抗生物質 (100IU/ml Penicilin; 0.05 μ g/ml Streptomycin) を添加したものをを用いた。初期胚については、媒精後3日目で8~16細胞期胚および媒精後5日目で桑実期胚を得た。

(2) 酵素 (LDH) 活性測定

LDH活性の測定はLowry (1972)⁶⁾が用いた酵素周期法について新鮮卵測定用に修正した方法を用いた。

a. 酵素反応

LDHの反応液は以下に示した組成のものをを用いた。すなわち、PBS (-) (pH 7.3) に1.5mM NAD, 110mM lactate, 1.0mM EDTA および0.05% (w/v) BSAをそれぞれ各濃度に溶解した。酵

素反応は1.0 μ lの酵素反応液とともに、内径5mm、厚さ1mmの特製スライドグラスに卵子1個を入れ、ミネラルオイルで覆い、37℃で5、10および20分間反応させた。その後0.2M NaOHを加え、反応を停止させ過剰のNADを破壊した。

b. サイクリング反応

LDHの酵素反応によって生成されたNADHをサイクリングにより増幅させた。サイクリング液の組成は、pH 8.0の100mM Tris-HCl bufferに300mM ethanol, 0.1mM ADP, 0.02% BSAを含む反応液に、50 μ g/ml alcohol dehydrogenase (ADH: EC 1.1.1.1), および5 μ g/ml malate dehydrogenase (MDH: EC 1.1.1.37) を加えて用いた。サイクリングは 37℃で1時間行った。

c. 指示反応 (NADH活性) の測定

サイクリングで増幅された反応生成物のNADHを顕微測光装置 (CAM-220: Fluorometer, Nikon, UVFluor x 20) により各サンプルの測定時間を5秒に設定し、蛍光照射 (UV 励起Ex300~400nm, 干渉フィルタEm465) により蛍光度を測定した。スタンダードには 10^{-3} ~ 10^{-8} M NADH溶液を用いた。

実験は以下の4区について行い、成績を比較検討した。

(実験1) 媒精5日目の培養で、正常に発生した新鮮な牛体外受精卵 (桑実期胚) と退行卵 (発生遅延、発生停止あるいは発生不良卵) を選んでNADHの反応時間を5、10分および20分として、LDH活性を調べた。そして酵素反応測定後、卵子は培養を継続して胚盤胞への発生率を検討した。

(実験2) 実験1の結果をもとに酵素反応時間を10分として、媒精3日目の培養で8~16細胞期胚に発生した正常卵子と退行卵子を用い、それぞれ酵素反応を測定後、LDHのNADH反応が検出されたもの (positive) とされなかったもの (negative) とに分け、その後の発生率を調べた。

(実験3) 媒精5日目の培養で桑実期に発生した正常卵子と退行卵子を用い、正常卵子を純粋エタノールに入れ、1分間放置した後、正常卵子および退行卵子とともに酵素反応を測定し、NADH反応の有無により卵子を分け、その後の発生率を検討した。

(実験4) 実験1から実験3までの正常卵子において、酵素活性を測定後、それぞれ卵子のNADH反応の一定値で区分して、48時間培養を続け酵素反応とその後の発生能との関係を検討した。

結果は、Fisher's Exact testおよびChi-square testによって有意差の検討を行った。

結 果

酵素反応時間を10分にした場合、45.0% (9/20) の卵子で酵素活性の測定ができ、測定に供した卵子の30% (6/20) が胚盤胞に発生した。また、不良卵子におけるLDH活性も酵素反応時間10分区間 ($45.5 \pm 9.6 \times 10^{-7}$ mol/embryo/hr) が5分 ($37.0 \pm 18.9 \times 10^{-7}$ mol/embryo/hr) および20分区

Table 1. Effect of enzymatic reaction time on LDH activity and subsequent development of normal embryos [morulae(M)] and degenerated one(D)

Enzymatic reaction time(min)	Type of the embryos	No. of embryos examined	No. of embryos positive	LDH activity in the positives (x10 ⁻⁷ mol/embryo /hr)	No. and % of blastocysts in the	
					positives	negatives
5	M	8	1	5.3*	0	5(71.4)
	D	6	3	37.0±18.9	0	0
10	M	10	1	19.3	0	6(66.7)
	D	10	8	45.5± 9.6	0	0
20	M	10	3	19.0±11.3	0	2(22.2)
	D	6	5	37.0±11.7	0	0
Control	M	42	—	—	—	33(78.6)

*Mean±SE

Table 2. LDH activity and subsequent development of 8~16 cell stage embryos obtained 3 days after IVF

Type of the embryo	No. of embryos examined	No. of embryos negative(above) or positive(below)	LDH activity (x10 ⁻⁷ mol/embryo/hr)	No. of embryos developed to	
				Morula	Blastocyst(%)
normal	24	18	0	15	13(72.2)
		6	26.7±9.1*	2	1(16.7)
degen - erated	11	1	0	0	0
		10	41.9±5.2	0	0

*Mean±SE

Table 3. LDH activity and subsequent development of normal, ethanol- treated and degenerated morulae obtained 5 days after IVF

Type of the embryo	No. of embryos examined	No. of embryos negative(above) or positive(below)	LDH activity (x10 ⁻⁷ mol/embryo/hr)	No. and % of blastocysts
normal	21	18	0	15(83.3)
		3	14.7±6.3*	0
EtOH- treated	8	8	0	0
		0	0	0
dege- nerated	6	1	0	0
		5	30.3±8.6	0

*Mean±SE

Table 4. Relationship between LDH activity and subsequent development of bovine embryos

Range of LDH activity (x10 ⁻⁷ mol/embryo/hr)	No. of embryos measured and then cultured	No. of embryos developed(%)
80.2-53.3*	2	0
49.0-31.9	3	0
27.2-10.0	8	3(37.5)
5.3- 0.6	4	1(25.0)
non -detected	78	53(67.9)
Total	95	57(60.0)

*Mean±SE

($37.0 \pm 11.7 \times 10^{-7}$ mol/embryo/hr) と比べ高かった。正常卵子の5分および10分区の胚盤胞への発生率は、それぞれ71.4% および66.7% で、酵素活性の測定操作をせず顆粒膜細胞の単層上で培養を継続した control (78.6%) 区と比べ、殆ど差がなかったが酵素反応時間20分の胚盤胞への発生率は22.0% と低かった (Table 1)。この結果から以下の全ての実験は酵素反応時間を10分とした。

8~16細胞期胚において酵素活性の検出は、正常卵子では卵子24個中6個、退行卵子では卵子11個中10個が酵素活性が測定でき、退行卵子の酵素活性の検出率が正常卵子の検出より高かった。しかし、酵素反応が検出できなかった正常卵子18個中13個 (72.2%) が胚盤胞に発生した。他方、酵素反応が検出できた卵子6個中、胚盤胞に発生したものはわずか1個であった (Table 2)。

媒精5日目の桑実期胚において、正常卵子および退行卵子での酵素反応はそれぞれ21個中3個、6個中5個で検出されたが、純粋EtOHに卵子を入れ、1分間放置した卵子での酵素反応は検出できなかった。また、正常卵子で酵素反応が検出できなかった18個の卵子中15個が胚盤胞に発生した (Table 3)。

正常卵子において酵素反応を測定後、48時間培養後の発生能を検討した結果、それぞれ一定範囲の酵素活性値によって発生率に差のあることが判った。すなわち、酵素反応が測定できなかったものは67.9% (53/78) が発生したが、酵素活性が低いもの ($27.2 \sim 0.6 \times 10^{-7}$ mol/embryo/hr) および高いもの ($80.2 \sim 53.3 \times 10^{-7}$ mol/embryo/hr) で発生率はそれぞれ0 (0/5), 33.3% (4/12) であり、酵素活性が高い程、発生率は低下した (Table 4)。

考 察

Lactate dehydrogenase (LDH) はNADを水素受容体として、または乳酸を脱水素してpyruvateを生じる酵素で、平衡な逆方向に傾き、解糖系でpyruvateからlactateを生成することに働く酵素である。Spielmannら (1978)⁷⁾によると、卵子のLDH活性は着床後、急速に増加することを報告した。また、マウスの生殖器 (卵管、子宮) では高いレベルでLDHの存在が報告されている^{8,9)}。しかし、牛の初期発生時における解糖系の中間代謝物質の乳酸とエネルギー代謝についてはまだ十分に明らかにされていない。そこで本研究では、新鮮牛卵子1個のLDH活性を測定し、その後の発生能との関係を調べたところ、酵素反応時間を10分にした場合、45.0% (9/20)の卵子で酵素活性が測定でき、30% (6/20) が胚盤胞に発生した (Table 1)。正常卵子と退行卵子のLDH活性の検出率は退行卵子の方が高く、酵素活性が測定できた正常卵子の発生率は酵素活性反応がなかった卵子より低かった。この結果について、Jordanら (1989)¹⁰⁾は、退行卵子および退行が進んでいる牛初期胚でのLDH活性が高かったと報告している。また、Johnsonら (1991)¹¹⁾は、4細胞期胚から拡張した牛胚を非外科的に採卵し、正常卵子および退行卵子に分け、LDH活性を測定した結果、退行卵子のLDH活性が正常卵子より有意に高かったと報告した。さらに、DixonとWebb (1979)¹²⁾は、未受精卵子でのLDH生産は起こらないことと、受精後胚の分割と同時にLDHの生産は徐々に増加して、最も発生した胚は非常に高いレベルのLDHを

持っているが、卵子の退行とともにLDHの生産は停止し、すべての細胞質にある酵素は発生培地に漏れることを示唆した。

酵素活性と胚の生存能力および発生能との関係は明かではないが、少なくとも、通常の胚発生時における胚の代謝活性は一定の基礎レベルを保っていると考えられるが、現在のところ、その指標となる酵素活性の基準が明確にされていない。従って、酵素活性と発生能との具体的な尺度を明確にすることと、X染色体上の酵素活性との関係も明らかにできれば、判定誤差が小さくなることは論を待たない。

卵子の基質の利用性を調べるために体外培養やアイソトープ化合物を用いての実験が行われた結果、発生時期によって異なるが、エネルギー源と合成のために使われる基質が明らかにされている。すなわち、pyruvateとlactateは主としてエネルギー源として利用される^{13,14)}。事実、ウサギの4～8細胞期以降の分割卵子は等張なリンゲル液やその他の塩類溶液に乳酸を加えただけで分割して発生すること¹⁵⁾から、そのような考えが支持されていた。

本研究の結果においても、乳酸のエネルギー代謝は胚発生能との高い相関があり、酵素活性測定後の発生能は発生の高いもの、低いものと測定できなかったものに分け、それぞれを比較したところ活性の高いもの程その後の発生能の低下率が高いことが示された (Table 4)。このことにより、LDHの酵素反応によって生産されるNADHはその後の発生能を予測するために利用し得ることが示唆された。

研究の一部は文部省科学研究費 (一般 A No.02404018) によって行った。

文 献

- 1) Renard, J.P., Menezo, Y. and Heyman, Y. (1982): Alternative tests to assess viability of bovine embryos. *Theriogenology*, 17, 106(abst.).
- 2) Monk, M. and Handyside, A.H. (1988): Sexing of preimplantation mouse embryos by measurement of X-linked gene dosage in a single blastomere. *J. Reprod. Fert.* 82, 365-368.
- 3) Koike, M., Sugawara, S. and Masaki, J. (1990): Methodology for measurement of 6-phospho gluconate dehydrogenase activity in fresh rat ovum. *Jpn J Anim Reprod* 36: 171-175.
- 4) Sugawara, S. and Ryoo, Z. Y. (1992): Estimation for enzyme activity of energy metabolism and subsequent development of fresh bovine embryos from in vitro fertilization. *Proc. 12th Int. Congr. Anim. Reprod. A. I.*, 3, 1339-1341.
- 5) O'Fallon, J.V. and Wright, R.W. Jr. (1986): Quantitative determination of the pentose

- phosphate pathway in preimplantation mouse embryos. *Biol. Reprod.*, 34, 58-64.
- 6) Lowry, O.H. and Passonneau, J.V. (1972) : A Flexible system of enzymatic analysis. Academic press, New York. pp130-144.
 - 7) Spielmann, H., Eibs, H., Jacob-Muller, U. and Bischoff, R. (1978) : Expression of lactate dehydrogenase isozyme 5(LDH-5) in cultured mouse blastocysts in the absence of implan-tation and outgrowth. *Biochem. Genetics* 16, 191-202.
 - 8) Rapola, J. and Koskimies, O.(1967): Embryonic enzyme patterns: Cnaracterrization of the single lactate dehydrogenase isoenzyme in preimplanted mouse ova. *Science* 157,1311-1312.
 - 9) Farley, K.A., Hornsby, J., Glass, K., Ballard, G. and Moore, C.L. (1990) : Lactate dehy-drogenase activity changes during pre-implantation. *Transactions of the Llinois State Academy of science*, 83, 23-31.
 - 10) Jordan, J.E., Johnson, S.K. and Page, R.D.(1989): A rapid non-subjective enzyme assay to measure bovine embryo viability. *Theriogenology*, 31, 209(abst).
 - 11) Johnson, S.K., Jordan, J.E., Dean., R.G. and Page, R.D.(1991): The quantitation of bovine embryo viability using a bioluminescent assay for lactate dehydrogenase. *Theriogenology*, 35, 425-433.
 - 12) Dixon, M. and Webb, E.C.(1979): *Enzymes*. Academic Press, New York, pp638-639.
 - 13) Barbehenn, E.K., Wales, R.G. and Lowry, O.H. (1974) : The explantation for the blockade of glycolysis in early mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1056-1060.
 - 14) Brison, D.R. and Leese, H.J. (1991) : Energy metabolism in late preimplantation rat embryos. *J. Reprod. Fert.* 93, 245-251.
 - 15) Totukawa, K., Sugawara, S. and Takeuchi, S.(1974) The micromanipulation for sexing and its after effect on the subsequent recovery of rabbit blastocysts. *Jpn J Zool Sci.* 45, 319-322.

牛体外授精(IVF)胚からの胚性幹(ES)細胞樹立について

An establishment of embryonic stem cells from bovine embryos
fertilized *in vitro*.

稲垣 宏 柳 在雄 菅原七郎

Hiroshi INAGAKI, Zae Young RYOO, Shichiro SUGAWARA

東北大学農学部動物生殖科学教室

Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Agriculture
Tohoku University, Sendai.

Abstract: We have attempted an establishment of ES cells from bovine blastocysts fertilized *in vitro* co-cultured with fibroblast feeder cells of murine or bovine embryos. In this report, we have shown bovine ES-like cells from co-culture used murine fibroblasts as feeder layer. The ES-like cells were compared morphologically with trophoblast whose features are like ES cells. Furthermore, when the ES-like cells were exposed to 10^{-5} M all-trans-retinoic acid, these cells differentiated into neuron-like cells. And, it was observed that the growth of ICMs of blastocysts used were slow, some of them hardly grew. These results may suggest that the growth of ICMs is influenced by differences of genome of each embryo, and also indicate that the property of ICMs is different between murine and bovin.

KEY WORDS: bovine embryos, ES cells, retinoic acid, differentiation

(受付1993年1月11日、受理1993年2月25日)

緒言

ES細胞は初期胚の内細胞塊(ICM)または原始内胚葉が多能性を保持したまま体外培養下で無限に増殖する性質を獲得した細胞である。最初にマウスでその樹立が報告され^{1), 2)}、現在ではES細胞の無限増殖性を利用したジーンターゲッティングにより、動物個体に人為的に遺伝子を導入する実験系へと発展している。また、様々な動物で樹立が可能になれば、哺乳動物の遺伝子工学的手法における個体発生や分化に関する特異的な遺伝子の発見とその発現の特性、および時期との関連を解析することや、種の分化とその特性を解明するための最も有力な手段となりうる。

家畜では、豚^{3), 4)}や羊^{3), 5)}での樹立の報告がされているが継代化と実用化までにはいたっていない。また牛では正木ら⁶⁾や Streichenkoら⁷⁾の報告もみられるが、細胞系樹立までにはいたっていない。しかし家畜のES細胞(ESC)を常に一定の割合で樹立し維持ができれば、ES細胞に遺伝子修飾を行ない初期胚へ注入し、それを移植して形質転換キメラ個体の作出が可能となる。さらに作出された個体が生殖系列キメラであれば、戻し交配によりES細胞由来の個体を作成できる。したがって利用価値

の高い形質の導入が可能であり、その形質は子孫に継代で利用できる。以上のような観点から、本研究では牛体外受精卵子をもちいてES細胞の樹立を試み、さらに得られたES細胞様細胞をレチノイン酸処理によってその分化能を調べた。

材料と方法

(a) フィーダーレイヤーの調整

フィーダーレイヤーとしてマウス胎仔線維芽細胞または牛胎仔線維芽細胞をもちいた。マウス胎仔線維芽細胞は、14～16日齢の胎仔を摘出後 PBS (-) で洗浄し、内蔵を除去して洗浄した。ついで0.25%トリプシン(Difco)・0.02%EDTA/PBS (-) で40～60分間処理し、ナイロンメッシュで濾過して採取し、採取した線維芽細胞は10%牛胎仔血清(FCS)添加DMEM(Gibco)に懸濁し遠心して洗浄をした。この操作を2回繰り返し細胞を集めた。血球計算板で細胞数を計測し、 1×10^6 cell/mlになるように調整して25cm²の組織培養フラスコ(Corning)に播種した。ほぼコンフルエントに達した時点でX線約4000～4500radを照射して不活性化した。次いで培地を除去し、洗浄後トリプシン処理を行って10%FCS添加DMEMに懸濁した。遠心後直径55mmの組織培養皿(Nunc)に 5×10^5 cell/mlに調整して300mlのスポットを作りミネラルオイルで覆った。

牛胎仔線維芽細胞は妊娠約1ヵ月齢の胎仔から表皮を採取して、以降はマウスと同様の手順で培養し調整した。培養はすべて10%FCS添加DMEMの培地で 37.5℃, 5%CO₂, 95%空気条件下のインキュベーターで行った。

(b) 牛胚盤胞の調整

食肉処理場より得た黒毛和種の卵巣をランチジャーで32～35℃に保ち、実験室へ持ち帰って滅菌した整理食塩水で洗浄後、吸引法により卵胞卵子を採取した。次いで顕微鏡下で観察して十分に卵丘細胞が付着しかつ細胞質が均一なものを採卵した。さらに、ミネラルオイルで覆った10%FCS添加TCM199(Gibco)のスポットで洗浄後、同様の培地で39.0℃, 5%CO₂, 95%空気条件下のインキュベーターで22時間成熟培養を行った。

黒毛和種の凍結精液は、31～32℃の温湯中で融解しカフェイン添加B.O.液に浮遊させ遠心した。上澄を除去後、豚へパリン(Sigma)、カフェイン添加B.O.液⁸⁾で遠心し血球計算盤で精子数を測定した。

卵子は洗浄後、牛血清アルブミン、カフェイン添加B.O.液で精子濃度を 5×10^6 /mlに調整したスポットへ移した。5～6時間後卵子を洗浄して10%FCS添加TCM199のスポットへ移し培養を続けた。さらに48時間後、付着している卵丘細胞から卵子をはずし4細胞期に達していないものは除去した。培地交換は48時間毎に行い桑実胚期からは24時間毎に行って初期胚盤胞、拡張胚盤胞、脱出胚盤胞を得た。

(c) 牛胚盤胞とフィーダー細胞との共培養

体外培養により得た胚盤胞は線維芽細胞のフィーダーレイヤーと共培養した。すなわち、初期胚盤胞、拡張胚盤胞は0.5%プロナーゼ(BMY)処理またはピペッティングによって透明帯を除去し、脱出胚盤胞はそのまま共培養にもちいた。培養は20%FCS、0.1mM 2-メルカプトエタノール、ヌクレオシド溶液(アデノシン、グアノシン、シチジン、ウリジンをそれぞれ0.03mM、チミジン0.01mM)、非必須アミノ酸溶液(Gibco)、および 10^3 i.u./ml MLIF(Amaral)を添加した高グルコース処方のDMEMをもちい、37.5℃, 5%CO₂, 95%空気条件下のインキュベーターで行った。培地交換は48時間毎に行い、継代はトリプシン処理またはキャピラリーチューブによる操作により行った。

(d) レチノイン酸の調整と処理

本実験では all-*trans*レチノイン酸(Sigma)をもちいた。99%エタノール中に 3.3×10^{-4} M濃度をスト

ック溶液とし、目的の濃度になるように培養液で直接希釈した。培養からレチノイン酸を除去する場合は、レチノイン酸を含まない10%FCS添加DMEMでよく洗浄し、以後同様の培地で培養した。

結果

ESC様細胞の形態的特徴

フィーダーレイヤー上へプレートした胚盤胞の接着とESC様細胞の出現に関するデータは Table 1. に示した。また、牛胚盤胞由来のESC様細胞が出現したマウス胎仔線維芽細胞のフィーダーレイヤーを用いた培養結果は発生ステージ別に Table 2. に示した。胚盤胞は接着後、ICMを中心に栄養外胚葉細胞が円状に広がっていったが、ICMは用いた胚盤胞により増殖に差がみられ中にはほとんど増殖しないものもあった。接着7日後に新しいフィーダー上へ継代した。

Table 1. Attachment of blastocyst and appearance of ES-like cells cultured with feeder layer.

Animal kind of feeder examined	No. of embryos examined	No. of embryos attached	No. of appearance of ES-like cells
mouse	23	19	2
bovine	39	24	0

The data as to attachment were evaluated on 5th days from co-culture.

Table 2. Attachment of different cell stage embryo and appearance of ES-like cells culutured with feeder layer of mouse embryo fibroblasts.

Cell stage	No. of embryos examined	No. of embryos attached	No. of appearance of ES-like cells
Ealy B.	11	7	0
Expanded B.	9	9	1
Hatched B.	3	3	1

The data as to attachment were evaluated on 5th days from co-culture.

B.=blastocyst

フィーダー上へプレートした胚盤胞のうち2つからESC様細胞の形成がみられた (Fig. 1)。1つは脱出

胚盤胞由来であり、他の1つは拡張胚盤胞由来であった。これはいずれも24時間以内に接着した胚盤胞から得られたものであった。これらESC様細胞は、約25~35 μm の小型の細胞で、マウスのES細胞のように著明な仁を含む大きな核を持っていたが多層を形成せず上皮様で豚や羊で報告されているのと同様な形態的特徴と様相を示した。しかしES細胞は栄養外胚葉細胞と形態的に類似しているため、それらの区別をするためにまず栄養外胚葉細胞のみをフィーダー上で培養し、ESC様細胞との形態的な相違(大きさ、核数、その他特徴)を観察した(Fig. 2a, b)。その結果栄養外胚葉細胞は約50~85 μm の径を持つ大型の細胞であり、ESC様細胞の約2倍以上も大きく、細胞質に多くの顆粒が存在しているのが分かった。したがってこのような形態的特徴

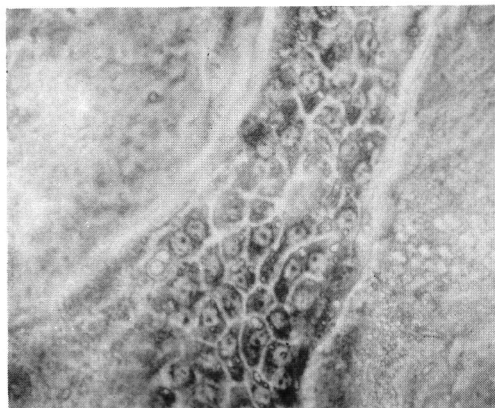


Figure 1. The phase-contrast micrograph of ES-like cells. X150

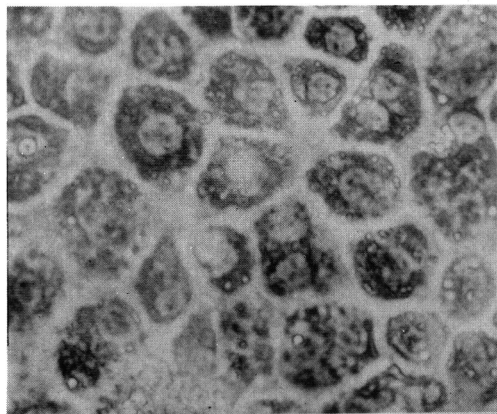
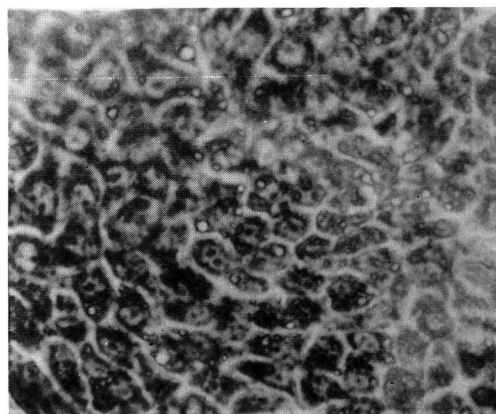


Figure 2. The phase-contrast micrograph of monolayer of ES-like cells (a), and trophoblast cells (b). X225

の違いから、得られたESC様細胞は栄養外胚葉細胞とは異なる細胞であると判断した。

得られたESC様細胞は、48日間維持されたが4回目の継代後は増殖せず消失した。

レチノイン酸による分化誘導処理

単層のESC様細胞の分化能を検討するために、培養培地にレチノイン酸を添加することにより分化の誘導を行った。本実験ではレチノイン酸濃度を 10^{-8} ~ 10^{-5} Mで行ない、 10^{-5} Mで最も効率的に誘導された。しかし胚性ガン腫(EC)細胞での報告とは異なり、処理開始48時間以内に神経細胞様細胞への分化が観察された(Fig. 3)。形態的に変化したのちは培養培地からレチノイン酸を除去してもこの形態を維持した。

考察

本研究では牛IVF胚からのES細胞の樹立を試み、得られたESC様細胞をレチノイン酸処理によって分化能を確認した。得られたESC様細胞はマウス胎仔線維芽細胞のフィーダーレイヤーを用いた培養系であり、牛胎仔線維芽細胞を用いた系からは得られなかった。このことは、胚の接着やES細胞の樹立には、必ずしも同じ動物種が適しているとはいえないというハムスター⁹⁾や豚¹⁰⁾での報告と一致している。異なった発生ステージの胚盤胞で接着率が異なったのは、胚盤胞がフィーダーレイヤー上で接する面積の差とその違いによることが考えられるが、この点についてはなお吟味する必要がある。また、データには示さなかったがフィーダーの不活性化処理にマイトマイシンCを用いると、接着率に差はみられなかったもののESC様細胞は得られなかった。このことから、線維芽細胞によって取り込まれたマイトマイシンCがこれまでの細胞培養系における同様に、ICMになんらかの悪影響を及ぼしていると考えられる。事実、EC細胞のF9細胞ではマイトマイシンを作用させると原始または遠位内胚葉の分化マーカーであるプラスミノージェン活性化因子活性が上昇する¹¹⁾ことが報告されている。



Figure 3. The phase-contrast micrograph of cells induced differentiation by 10^{-5} M retinoic acid treatment. X37.5

ESC様細胞の単層は、レチノイン酸処理によって神経細胞様細胞へと分化した。しかしこの結果は分化に必要なレチノイン酸濃度が、これまでのES細胞や胚性ガン腫細胞由来のEC細胞での実験報告とは異なる。このことは細胞密度など培養の違いや、レチノイン酸のストック溶液濃度の低さが考えられるがさらに検討を要する。また、ES細胞またはEC細胞の単層培養系ではレチノイン酸処理により線維芽細胞様細胞へ分化することが報告されている¹²⁾。これは本実験の結果とは異なるものであるが浮遊培養系で細胞凝集塊を作らせレチノイン酸を作用させた場合、F9細胞は近位内胚葉へまたP19細胞は神経細胞、グリア細胞へ分化するというように、細胞株によって反応は異なることが明らかにされており、分化能についても他の解析が必要と考えられる。

家畜のES細胞樹立にはこれまでいくつかの問題が指摘されている。一つは遺伝子的系統の問題である。マウスではES細胞を樹立するための系統としてテラトカルシノーマが多発する系統である129系がしばしば用いられている。また、現在までに生殖系列に入ることが報告されているES細胞株の多くは129系から樹立したものである。現在ではどの系統からでも樹立は可能であると考えられているが比較的樹立が容易な系統から困難な系統が存在することは確かである。ES細胞が樹立されているハムスターや羊でも樹立率は極めて低く、他の動物でもこのような胚ゲノムの差があると考えられる。本実験でも用いた胚盤胞によりICMの増殖に差がみられた。実用的樹立のためにはテラトカルシノーマの発生し易い系統であることが必要であるかもしれない。また、他の要因としてICMの性質の違いが考えられる。すなわち有蹄類の初期胚のICMはマウスとは異なり、葉裂後胚盤は分裂を休止する。したがって生体内で起こる分裂休止を反映した体外培養系での分裂停止が起こると考えられる。マウスのES細胞はICMあるいは原始外胚葉由来であるが、有蹄類では原始内胚葉と混在しあう前のICMでなく

ては樹立が困難であると考えられる。これまで牛胚盤胞の詳細な葉裂時期に関する報告はなされていないが、葉裂前にES細胞化させなければならないだろう。本実験で使用したLIFでも、原始外胚葉の形成は阻害するが、原始内胚葉の形成には影響せず¹³⁾、この点についての効果は期待できない。家畜、とくに有蹄類でES細胞の樹立を試みる場合これらの事実をふまえて培養系を組み立て、試験していく必要があると考えられる。

参考文献

- 1) Evans, M. J. & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154-156
- 2) Matin, G. R. (1981). Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 7634-7638.
- 3) Piedrahita, J. A., Anderson, G. B. & BonDurant, R. H. (1990). On the isolation of embryonic stem cells: comparative behavior of murine, porcine and ovine embryos. *Theriogenology*, 34, 879-901.
- 4) Notarianni, E., Laurie, S. Moor, R. M. & Evans, M. J. (1990). Maintenance and differentiation in culture of pluripotential embryonic cell lines from pig blastocysts. *J. Reprod. Fert.*, Suppl. 41, 51-56.
- 5) Notarianni, E., Gail, C., Moor, R. M. & Evans, M. J. (1991). Derivation of pluripotent, embryonic cell lines from the pig and sheep. *J. Reprod. Fert.*, Suppl. 43, 255-260.
- 6) 正木 全、柳 在雄、菅原七郎、正木淳二 (1991). 牛体外受精卵子の幹細胞化に関する研究, 哺乳動物卵子学会誌, 8, 27-33.
- 7) Strelchenko, N., Saito, S. & Niemann, H. (1991). Towards the establishment of bovine embryonic stem cells. *Theriogenology*, 35, 274.
- 8) Brackett, B. G. and Oliphant, G. (1975). Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* 12, 260-274.
- 9) Doetschman, T., Williams, P. & Maeda, N. (1988). Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. *Dev. Biol.*, 127, 224-227.
- 10) Piedrahita, J. A., Anderson, G. B. & BonDurant, R. H. (1990). Influence of feeder layer type on the efficiency of isolation of porcine embryo-derived cell lines. *Theriogenology*, 34, 865-877.
- 11) Nishimune, Y., Kume, A., Ogiso, Y. & Matsushiro, A. (1983). Induction of teratocarcinoma cell differentiation: Effect of the inhibitors of DNA synthesis. *Exp. Cell Res.* 186, 439-434.
- 12) Nichols, J., Evans, E. P. & Smith, A. G. (1990). Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. *Development*, 110, 1341-1348.
- 13) Shen, M. M. & Leder, P. (1992). Leukemia inhibitory factor is expressed by the preimplantation uterus and selectively blocks primitive ectoderm formation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8240-8244.

本研究の一部は文部省科学研究費 (一般研究A, 課題番号02404018) により実施した。

第 34 回

哺乳動物卵子学会

プ ロ グ ラ ム

大会長：石 田 一 夫

新潟大学農学部教授

会 期	平成 5 年 4 月 22, 23 日
会 場	ホテル新潟（新潟市）

お 知 ら せ

第34回哺乳動物卵子学会および総会を開催致しますので、多数の皆様のご参加をお待ち致しております。

大会参加の方々へ

1. 参加費 5,000 円をお支払いの上、参加章に氏名と所属をご記入下さい。
2. 会場では、必ず参加章をお付け下さい。
3. 会員の方は、哺乳動物卵子学会誌10巻1号に本大会の抄録が掲載されていますので御持参下さい。

なお当日、年会費（5,000 円）をお支払いいただければ幸いです。

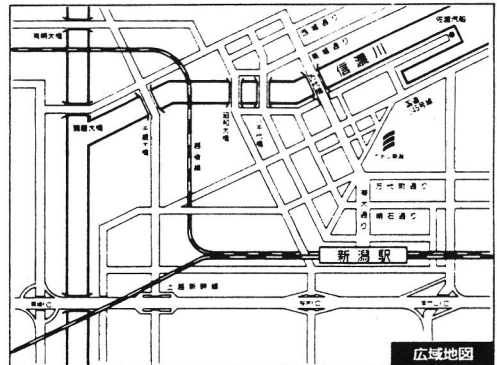
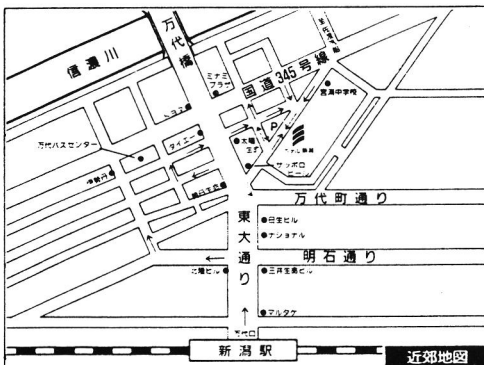
発表者の方々へ

1. 講演時間は8分、質疑は4分です。講演時間1分前に青ランプで、終了時には赤ランプとブザーでお知らせしますので、講演時間を厳守してください。
2. スライドプロジェクターは35mm用を1台用意します。スライドの枚数は制限致しませんが、10枚程度が適当かと思われます。
3. スライドは講演開始30分前までにスライド受付にお渡し下さい。発表後、スライド受付で返却致します。

懇親会のご案内

1. 懇親会を22日（木）午後5時50分から、当ホテル2階で行います。多数の皆様のご出席をお待ちしております。
2. 懇親会にご出席の方は、参加費 5,000 円を当日お支払い下さい。

会場のご案内



ホテル新潟は、JR新潟駅から徒歩8分、北陸自動車道黒埼料金所から車で20分のところにあります。なお、大会参加者のためにホテル新潟に割安料金で宿泊できるように依頼してありますので、希望者は各自で「哺乳動物卵子学会出席のため」と申し添えて、電話で早めにお申込下さい。

日 程 表

時刻	4 月 22 日
11 : 40	理 事 会
12 : 40	
13 : 00	一 般 講 演 1 ～ 19
16 : 58	
17 : 10	特 別 講 演
17 : 40	
17 : 50	懇 親 会
20 : 00	

理事会：阿賀の間（3 階）
 一般講演、特別講演：芙蓉の間（2 階）
 懇親会：芙蓉の間（2 階）

時刻	4 月 23 日
9 : 00	一 般 講 演 20 ～ 33
11 : 58	
12 : 10	評 議 員 会
13 : 00	
13 : 15	総 会
13 : 45	
13 : 55	一 般 講 演 34 ～ 47
16 : 53	

評議員会：阿賀の間（3 階）
 総 会：芙蓉の間（2 階）

第34回 哺乳動物卵子学会

プログラム

特別講演

第1日 4月22日(木) 17:10~17:40

「実験材料としての両生類の卵」

新潟大学理学部教授 岩 澤 久 彰 先生

座長 石 田 一 夫 (新潟大・農)

一般講演

	午 前	午 後
4月22日		1~10 13:00~15:00 11~19 15:10~16:58
4月23日	20~28 9:00~10:48 29~33 10:58~11:58	34~41 13:55~15:31 42~47 15:41~16:53

第1日 4月22日(木)午後 講演番号 1~19 (13:00~16:58)

13:00~13:36 座長 久保 春海 (東邦大・医)

1. 熱処理精子の顕微注入による精子の耐熱性の検討

○矢沢浩之・柳田 薫・菅野良恵・渡辺美佳・鈴木和夫・星 和彦・佐藤 章 (福島県立医大)

2. SZI における挿入精子数について

○高塚亮三・辻 敏徳・豊北美穂・藤波隆一・道倉康仁・加藤 修 (永遠幸マタニティークリニック)

3. 重症男性不妊に対する機械的透明帯部分開孔術 (PZD) の有用性の検討

○高尾成久・吉田壮一・片桐千恵子・池成孝昭・岩部富夫・関島秋男・戸田稔子・原田 省・見尾保幸・寺川直樹 (鳥取大・医)

13:36~14:24 座長 石島 芳郎 (東京農大・生物産業)

4. 卵巣灌流を用いた成長ホルモンの卵巣直接作用の検討

○南郷周児・北井啓勝*・大庭三紀子**・鈴木秋悦・野澤志朗 (慶大・医、埼玉中央病院* 森永乳業・生科研**)

5. VS 1, 2, 3 によるラット凍結保存卵巣の子宮腔内移植後の生存性
○利部 聡・大上美穂・萬場光一・牧田登之（山口大・農）
6. LH-RH 単用による過排卵誘起の試み
○加田日出美・嶋田秀庸（東京農大・短期大）
7. マウスにおける反復過排卵誘起後に卵管膨大部内で分割像を示す未受精卵子の出現について
○石塚久義・栗栖輝光・斎藤直道・平田義一・成相孝一・金山喜一・遠藤 克・佐久間勇次（日大・農獣医）

14：24～15：00 座長 佐藤 嘉兵（日大・農獣医）

8. ニホンザル卵子とカニクイザル精子を用いた体外受精
○山海 直・清水慶子*・長 文昭・吉川泰弘（予研・霊長類センター、京大・霊長研*）
9. ニホンジカ射出精子の体外における透明帯除去ハムスター卵子への侵入能一とくにウシ精子との比較について一
○小林 仁・池田昭七・武田武雄・佐々田比呂志*・菅原七郎*（宮城農業短大、東北大・農*）
10. 透明帯切開卵子を用いた低受精能マウス凍結精子の体外受精成績
○中潟直己・上田 進・山内一也（日生研）

休 憩（15：00～15：10）

15：10～15：46 座長 野田 洋一（滋賀医大）

11. ウシ卵における表層粒の体外成熟に伴う変化
○細江実佐・高橋知子*・荻原 勲*・河野友宏**・中原達夫**・新村末雄・石田一夫（新潟大・農、協同飼料・ET研*、東京農大・総研**）
12. マウス卵における表層顆粒とセカンドメッセンジャーに関する検討
○小関みづほ・倉沢滋明*・大庭三紀子**・遠藤芳広***・鈴木秋悦・野澤志朗（慶大・医、南多摩病院*、森永乳業・生科研**、遠藤クリニック***）
13. 共焦点レーザー顕微鏡による受精時の卵子表層顆粒の動態に関する観察
○横田秀夫・加藤 勝*・佐藤嘉兵（日大・農獣医、オリンパス光学*）

15：46～16：22 座長 佐藤 英明（東大・医科研）

14. オカダ酸による牛およびハムスター卵子の卵核胞崩壊（GVBD）
○建本秀樹・堀内俊孝・織部智宏（広島県立大・生物資源）
15. ハムスターとヒト卵子における electrical stimulation による egg activation
○柳田 薫・木村康之・片寄治男・吉松宣弘・呉竹昭治・月川 奏・阿部利明・星 和彦・佐藤 章（福島県立医大）
16. 活性化卵を用いた牛の核移植における受核卵の核の不活化
○坂根淳太・牛島 仁*・佐賀正彦**・江藤哲雄・尾川昭三（明治大・農、千葉県畜産センター*、聖マリアンナ医大**）

16:22~16:58 座長 安田 泰久 (岩手大・農)

17. マウス卵子体外成熟過程へのチロシンリン酸化の関与

○木村裕幸・遠藤芳広*・大隅一興**・大庭三紀子***・鈴木秋悦・野澤志朗 (慶大・医、
遠藤クリニック*、三菱油化ビーシーエル**、森永乳業・生科研***)

18. 牛卵胞内卵子の体外成熟におよぼす成長因子の影響

○小林敬三・山下祥子*・星 宏良 (機能性ペプチド研、東京理化器機バイオ研*)

19. マウス卵子卵丘複合体における TNF- α の分布とその予想される一生理機能

○佐藤英明・高橋裕司・東 貞宏・豊田 裕 (東大・医科研)

第2日 4月23日(金)午前 講演番号 20~33 (9:00~11:58)

9:00~9:36 座長 斎藤 英和 (山形大・医)

20. Acridine orange 染色法による sperm-egg fusion の判定法

○片寄治男・中木純子・矢沢浩之・柳田 薫・星 和彦・佐藤 章 (福島県立医大)

21. 限定培地におけるウシ体外受精卵の初期発生におよぼすグルタミンおよびタウリンの影響

○林 正黙・丹羽皓二・金 宗興・奥田 潔 (岡山大・農)

22. 限定培地におけるラット1-細胞期胚の体外発生におよぼすグルコースおよびリン酸濃度の影響

○三好和睦・丹羽皓二・奥田 潔 (岡山大・農)

9:36~10:12 座長 塩谷 康生 (農水省・畜試)

23. マイトマイシン処理した細胞との共培養がウシ体外受精由来胚の発生に与える影響

○富沢宗高・下平乙夫・今井 敬・後藤裕司・奥地弘明・斎藤政宏・堂地 修 (農水省・
家畜改良センター)

24. Brinster 修正培養液と Dulbecco 修正培養液によるキメラマウス胚の培養と移植成績

○川島康成・高橋寿太郎・安田泰久 (岩手大・農)

25. マクロファージと卵の共培養

○野原 理・斎藤英和・斎藤隆和・小池数与・田中栄一・平山寿雄・広井正彦 (山形大・
医)

10:12~10:48 座長 星 和彦 (福島県立医大)

26. 細胞質を増加したマウス2細胞期胚の発生成

○加藤容子・大黒 寿・角田幸雄 (近畿大・農)

27. 牛体外受精胚の初期発生速度がその後の発育成績に及ぼす影響

○後藤裕司・下平乙夫・富沢宗高・今井 敬・奥地弘明・斎藤政宏・堂地 修 (農水省・
家畜改良センター)

28. 体外培養したウマ胚盤胞の孵化様式に及ぼす血清の影響

○保地真一・ヨアヒム ブラウン・小栗紀彦 (帯広畜大)

休 憩 (10:48~10:58)

10:58~11:34 座長 堤 治 (東大・医)

29. マウス成熟卵及び初期胚における cyclooxygenase 活性の生理的意義
○高見毅司・坂元秀樹・佐藤和雄・加藤珠美*・江角真理子* (日大・医、総研*)
30. 牛 IVF 卵子の初期発生時の MALATE DEHYDROGENASE 活性と中間代謝物質との関係
○柳 在雄・菅原七郎 (東北大・農)
31. ウシ培養胚におけるプロスタグランジン E₂ の免疫組織化学的検出
○四谷伊公子・柳 在雄*・松本浩道*・菅原七郎*・新村末雄**・石田一夫** (新潟大・自然科学研究科、東北大・農*、新潟大・農**)

11:34~11:58 座長 丹羽 皓二 (岡山大・農)

32. ハムスター 8 細胞期胚の凍結保存について
○堀内俊孝・高橋典子 (広島県立大・生物資源)
33. 1.5 M Ethylene Glycol で凍結された牛体外受精胚からの耐凍剤除去条件の検討
○下平乙夫・後藤裕司・今井 敬・富沢宗高・斎藤政宏・奥地弘明・堂地 修 (農水省・家畜改良センター)

第 2 日 4 月 23 日 (金) 午後 講演番号 34~47 (13:55~16:53)

13:55~14:19 座長 香山 浩二 (兵庫医大)

34. 外来 IVF-ET 4 年間の成績
○小林善宗・本田育子・鈴木隆弘・井上正人 (東海大・医)
35. IVF-ET 分娩後の再 IVF-ET 成績
○鈴木隆弘・小林善宗・本田育子・井上正人 (東海大・医)

14:19~14:55 座長 角田 幸雄 (近畿大・農)

36. リコンビナント透明帯蛋白質の免疫原性と妊孕性に及ぼす影響について
○長谷川昭子・井上みゆき・香山浩二・磯島晋三 (兵庫医大)
37. 胚性幹細胞 (ES 細胞) のサブクローニング法の検討
○鎌田宣夫・寺社下浩一・鈴木宏志・宮井達也・谷川 学 (中外製薬・御殿場研)
38. 牛体外受精 (IVF) 由来胚からの胚性幹 (ES) 細胞樹立の試み
○稲垣 宏・柳 在雄・稲泉絵里・銭 暁喬・菅原七郎 (東北大・農)

14:55~15:31 座長 井上 正人 (東海大・医)

39. マウス初期胚発生過程におけるミトコンドリアの分布
○都倉 隆・野田洋一*・後藤康夫・中山貴弘・森 崇英 (京大・医、滋賀医大*)

40. センダイウイルスを接種されたマウス卵子における細胞内 Ca^{2+} の変動

○河野友宏・J. Carroll*・D. Whittingham*・中原達夫（東京農大・総研、MRC・UK*）

41. LIF（白血球増殖抑制因子）がマウス胚の接着ならびに移植後の生存性に及ぼす影響

○小田垣諭司・加藤容子・角田幸雄（近畿大・農）

休 憩（15：31～15：41）

15：41～16：17 座長 小林 善宗（東海大・医）

42. マウス 1 細胞期胚における雌雄前核由来染色体の長さについて

○森 英紀・石尾佐代・正田陽一（茨城大・農）

43. RT-PCR 法による初期胚 mRNA の定量

○森田 豊・堤 治・武谷雄二（東大・医）

44. PCR 法と micromanipulation 法によるマウス着床前期胚の性別診断

○矢野ともね・雀部 豊・竹下直樹・片山 進・久保春海・平川 舜（東邦大・医）

16：17～16：53 座長 河野 友宏（東京農大・総研）

45. 着床前診断を目的としたマウス体外受精胚に対する biopsy 法の検討

○雀部 豊・矢野ともね・安部裕司・池永秀幸・臼井 彰・片山 進・久保春海・平川 舜
（東邦大・医）

46. マウス卵採取時の mono-poly resolving medium 処理と胚への影響

○末永美樹・栃木明人・橋本芳美・栃木武一*・佐藤和雄（日大・医、川口市民病院*）

47. EIA 欠損アデノウイルスベクターによるマウス初期胚への遺伝子導入

○津久井 通・東 貞宏・三宅早苗・斎藤 泉・豊田 裕（東大・医科研）

第34回哺乳動物卵子学会

講演要旨集

Proceeding of the 34th Annual Meeting Japan Society for
Mammalian Ova Research.

哺乳動物卵子学会

特別講演

実験材料としての両生類の卵

Amphibian Eggs as Materials for Experimental Studies

岩澤久彰

Hisaaki IWASAWA

新潟大学理学部生物学教室

Biological Institute, Faculty of Science, Niigata University

1. 両生類卵の実験材料としてのメリット

両生類の卵を研究材料として使用する場合のメリットとしては以下のような点が考えられる。(1) 数百、数千の同腹の卵が容易に得られる。(2) 卵は無殻で卵膜・ゼリー膜は軟らかく、ほとんどが卵生である。(3) 水中で発生し、卵膜・ゼリー膜をつけたままにしておくと無菌的に扱う必要はなく、また塩類溶液は不要である。(4) 体外受精（無尾類のほとんど全部と有尾類の10%）と体内受精（無尾類のごく一部と有尾類の90%）がみられる。(5) 小型シャーレの中でフリーハンドでさまざまな操作ができる大きさである。(6) かなりの種類で周年採卵が可能である。(7) 変温動物だから保温は不要で、また温度と発生の関係をみるのに適している。(8) 卵黄を蓄積しているので、卵黄に関する研究に適しており、また胚・幼生は給餌なしでかなりのステージまで発生する。

2. 両生類卵の実態と採卵方法

一腹の卵数（産卵は大体、年1回）はアフリカのニンバヒキガエル（卵胎生）の数個からウシガエルの2万余まで幅がある。卵径はニンバヒキガエルの0.5 mmからアマゾン流域のコモリガエルの6 mmまで様々であるが、一般に2 mm前後のものが多く、産出卵の状態は1個ずつ独立しているもの（イモリ）、塊状に産出されるもの（トノサマガエル、ウシガエル）、1個ずつ産出され塊状に粘着するもの（カジカガエル）、紐状（ヒキガエル、オオサンショウウオ）、泡巣の中に産出されるもの（モリアオガエル）、卵囊に入っているもの（クロサンショウウオ、ハコネサンショウウオ）などである。

採卵するには、卵が卵管を下降し、いわゆる子宮に入っている産卵直前のカエルでは指先で腹部を後方に向けてしごく。ヒキガエルやサンショウウオでは肛門から出かかっている卵紐・卵囊の先端をピンセットでつまんで引き出す。イモリでは肛門経由の卵はすでに受精しているから、未受精卵を得るには、開腹して卵管を下降中の卵を取り出す。これらの卵に精液をかけると受精する。体腔卵に精液をかけても受精はおこらない。両生類の排卵誘発法は確立されている。卵巣に熟卵をもつ個体に生またはアセトンを通して乾燥させたウシガエルの下垂体を皮下に投与するか、市販のhCGを皮下注射する方法が一般的である。

アホロートル (メキシコサンショウウオのネオテニー型) では温度ショックが賞用される。

3. 卵形成のプロセス

熱帯・亜熱帯地方では幼若個体における卵形成は継続的に進行し、早々と成熟に達するが、温帯地方では体の発育、卵の発達に冬眠で中断し、成熟には種類によるが、満1年—3年を要するものが多い。温帯地方では産卵期はほとんどの場合、年1回で、卵形成 (肥大・卵黄蓄積) は産卵期の後に始まり、冬眠前にはほぼ完成する。従って早春—初夏が産卵期の種類では、10—11月ごろに野外で採集して低温保存 (人工冬眠) しておけば、ゴナドトロピンの投与によっていつでも採卵することができる。

4. 生息環境と産卵数・卵サイズとの関係

一般に低地や南方では冬が短くて活動期間が長く、餌も多いが天敵も多く、このような地域の両生類は小卵多産である。一方、高地や北方では冬が長くて活動期間が短く、餌も少ないが天敵も少ない。そしてこのような地域の両生類は大卵少産である。クロサンショウウオは水平分布、垂直分布の広い両生類で、この現象の研究には好適の種類である。新潟県の例では、海岸近くの産卵池と海拔2000 mの高山池では産卵数は3:1であった。この産卵数の決定は遺伝的なものと思われる。

5. 精巢卵

精巢の中にみられる卵様細胞、すなわち精巢卵の出現は生殖細胞の性的両能性を示すものであり、トンボ、ミミズなどの無脊椎動物、魚類、両生類、爬虫類、鳥類などで知られている。両生類における精巢卵の出現率には種差があり、ヌマガエル、トノサマガエルでは高く、ツチガエルがそれに次ぎ、アマガエルとカジカガエルでは低く、ヤマアカガエルとモリアオガエルではきわめて低い。精巢卵は毎年、精子形成のスタート時に細精管内に新生し、肥大成長するが、翌年の繁殖期の後に退化する。卵径は最大でも230—260程度である。両生類では性ホルモン投与などによって精巢卵の発生を人為的に誘発することはクリアカットには成功していないが、メダカでは精巢卵の形成を容易に誘導することができる。

6. ビダー器官

ヒキガエルの精巢の前端には痕跡的な卵巣、すなわちビダー器官がついている。ここでは毎年卵母細胞が発達してくるが、卵黄を蓄積するものはきわめて稀である。ビダー器官を残して精巢を摘出すると、ビダー器官は機能的な卵巣に変る。ヒキガエルは雌ヘテロ型で、この性転換雌 (ZZ) と正常雄 (ZZ) との交配で生れる子はすべて雄となる。ビダー器官の発生初期にはいわゆる髄層構造の発生がなく、これが遺伝的性にかかわらず卵巣構造に発生する原因とされる。両生類の生殖細胞はそれと接する体細胞から特別の働きかけがなければ、遺伝的性に関係なく、卵方向に分化を始めるように思われる。

7. コモリガエルの育房内孵卵

アマゾン流域に生息するコモリガエルは分類学上アフリカツメガエルに近い大型のカエルである。産卵様式は特異で、抱接が始まると雌の背皮は1日くらいで著しくふくらむ。抱接のまま宙返り泳ぎをして産卵し、卵が雌の背皮に付着するとその部分の皮膚が陥没し、2日で卵を取り込んで育房を形成する。育房内の胚の多くは流・早産するようである。変態した子ガエルの多くが育房を出ると、それまでふくらんでいた背皮は急にふくらみを減じて正常に戻る。卵が付着するとその部分の皮膚が陥没して育房を形成する機構、育房内での胚の発達、流・早産の原因などは比較内分泌学的に関心のもたれるところである。

1 熱処理精子の顕微注入による精子の熱耐性の検討

Examination of developmental ability of embryos fertilized
by microinjection of heat treated spermatozoa

○矢沢浩之 柳田薫 菅野良恵 渡辺美佳 鈴木和夫 星和彦 佐藤章

Hiroyuki YAZAWA, Kaoru YANAGIDA, Yoshie KANNO, Mika WATANABE,

Kazuo SUZUKI, Kazuhiko HOSHI, Akira SATO

福島県立医科大学産婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology of Fukushima Medical College.

【目的】不妊症治療技術の進歩により人工授精や体外受精などの配偶子操作の機会が増加してきた今日、精子が体外において様々な環境の変化にさらされることがある。精子や受精卵の凍結保存はすでに医学や畜産の分野で応用されており、これらが低温刺激に対しては非常に安定であることが確認されている。柳田ら¹⁾は、精子核を卵細胞質内に顕微注入する方法を用いて、ハムスター、ヒトなどの精子核が、90℃、30分間の熱処理後も受精能を有していることを報告している。本研究では、さらに、熱処理された精子核が、雄性前核形成能のみならず、初期胚への発生能をも有しているかをみるためにウサギを用いて検討した。

【方法】ウサギは、日本白色種を使用した。まず、雄ウサギの精巢上部尾部より精子を採取し、テフロンホモジナイザーで精子核と尾部の分離を行なった。遠心洗浄後、ペレットを生食に浮遊させ、deep freezerで保存した。

実験当日に37℃で融解し、60℃、30分間の熱処理を加え、顕微注入に供した。未受精卵は、雌ウサギにFSHを1日 12 IU.を3日間筋注した後、HCG,100iu.を静脈内に投与し、その15時間後に卵管より回収した。0.1%hyaluronidaseで顆粒膜細胞を除去したのち、顕微注入に供した。

Microinjection は、15%PVP 中に浮遊させた精子から1個の精子をpick upし、細胞質内顕微注入を行なった。Control として、熱処理を加えない精子を同様に注入し、その後の雄性前核形成能、及び、初期胚発生能を検討した。注入後の卵子は、Ham F-12中で 5%CO₂, 5%O₂, 90%N₂ の環境下で培養し、24時間毎にその形態を観察した。

【結果】熱処理精子を67個の卵に注入したときの受精率は36%、卵割率は24%であり、同様に、熱処理した精子核だけを77個の卵に注入したときの受精率は43%で、卵割率は26%であった。熱処理していない intactの精子を注入したときの受精率は43%、卵割率は29%であり、熱処理群と、非熱処理群との間に有意の差は認められなかった。また、注入後72時間で8細胞期までに発育した胚を観察し得た。

【結論および考察】以上より、ウサギ精巢上体尾部精子は、少なくとも60℃までの耐熱性があり、雄性前核形成能のみならず、8細胞期までの初期胚発生能を保持しており、精子核がかなりの範囲の温度変化に対して安定性を有していることが確認できた。この精子の耐熱性には精子核内に存在する - S-S-結合が強く関与していると考えられている。哺乳動物精子では、精巢上体内での成熟過程において、精子核内 DNA に結合している S-H 基が酸化され S-S 結合となり²⁾、隣接する DMA との間に強力な結合を形成し、核内の DNAを安定化していると考えられている³⁾。この耐熱性は、体細胞では認められず、生殖細胞の種の保存という大役に合目的であると思われる。

Microinjection of heat treated cauda epididymal sperm into rabbit oocytes

Injected sperm	No of oocytes injected	No.(%)of survival oocytes	No.(%)*of oocytes fertilized	No.(%)**of oocytes cleaved
Intact (control)	43	14 (33)	6 (43) ^a	4 (29) ^d
Whole sperm (60°C, 30min)	67	25 (37)	9 (36) ^b	6 (24) ^e
Sperm head (60°C, 30min)	77	23 (30)	10 (43) ^c	6 (26) ^f

χ^2 test; a,b,c; d,e,f; NS

* fertilize rate=(fertilized oocytes)/(survival oocytes)

** cleavage rate=(cleaved oocytes)/(survival oocytes)

【文献】

- 1) Yanagida, K. Yanagimachi, R. Perreault, S.D. : Thermostability of sperm nuclei assessed by microinjection in to hamster oocytes, Biol.Reprd. 44:440-447, 1991.
- 2) Bedford, J.M. Calvin, H.I. : The occurrence and possible functional significance of S-S crosslinks in sperm head, with particular reference to eutherian mammals, J.Exp.Zool, 188: 137, 1974.
- 3) Poccia, D. : Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization and early development, Int.Rev.Cytol. 105:1, 1986.

2 S Z I における挿入精子数について

The number of human sperm to be
inserted in SZI

○ 高塚 亮三 ・ 辻 敏徳 ・ 豊北 美穂
藤波 隆一 ・ 道倉 康仁 ・ 加藤 修

Ryozo TAKATSUKA, Toshinori TSUJI, Miho TOYOKITA
Ryuichi FUJINAMI, Yasuhito MICHIKURA, Osamu KATO

永遠幸マタニティクリニック
Towako Maternity Clinic

【目的】顕微受精は、高度乏精子症の患者にも挙児の希望を与える手技ではあるが、受精率、妊娠成功率とも低く改善すべき諸問題を含んでいる¹⁾。特に卵腔内精子注入法 (S Z I) は応用範囲も広く、これまで通常の I V F では妊娠を望めなかった夫婦の大部分を救済できると目されながら受精率が低く、周期当りの良質な受精卵を多く得ることができないのが現状である。

本研究において、S Z I における注入精子数と受精率及び多精子受精の発生率との関係を明らかにし、注入精子数の最適化を図るための方法について検討した。

【方法】対象は当施設で1992年中に SZI で得た胚を移植しえた61症例、72周期で、採取した 564個の卵子のうち、Metaphase II の卵子 428個 (75.9%) である。72周期には GnRHa と hMG で過排卵処理した51周期、クロミッド投与の18周期、自然周期3周期が含まれる。61症例中59症例で男性不妊原因が認められ、そのうち6周期で精巣上体精子が用いられた。射精精液中の全運動精子が10万未満のもの26周期、10万以上 100万未満のもの20周期、100万以上 500万未満のもの11周期、500万以上1000万未満のもの5周期、1000万以上のもの4周期であった。精子の調製はミニパーコール法で行ない、可能な場合は Test York Buffer (TYB) 処理を行なった。S Z I は透過型ノマルスキー微分干渉装置を備えたオリンパス I M-Ⅱ にナリシゲの三次元ジョイスティック油圧四方向マイクロマニピュレーターを装着したものをを用い、Cohen らの方法を踏襲した。²⁾

【結果】72周期で得られた Metaphase II の卵子 428個 (周期当たり 5.9個) のうち、S Z I 施行後得られた受精卵は 223個 (周期当たり 3.1個; 受精率52.1%) で、そのうち65個は多精子受精 (発生率15.2%) であり有効受精卵は 158個 (周期当たり 2.2個; 有効受精率36.9%) であった。移植できた胚数は 136個 (周期当たり 1.9個) で8周期で妊娠が認められた (対周期妊娠率11.1%)。Fig. 1 には各注入精子数に対する全受精率、多精子受精発生率、有効受精率がまとめてある。注入精子数が増加するに従って全受精率は向上するが、8個以上精子を注入し

た場合、急激に多精子受精発生率が増加するために、有効受精率は注入精子数7個で最大値50.9%を示した。

【考察】以上の成績より臨床的には初診の症例に対しては注入精子数7個より出発することが奨励される。本研究においても最高注入精子数30個を用いて正常な受精が得られたこともあったが10個以上の精子を注入する場合は調製した精子懸濁液が高濃度であることが要求され、症例によっては多数の精子を注入することが困難である。このような症例に対し、精子の損失を最少限度に留められるような精子の賦活化の開発が望まれ、また一部には卵細胞質内精子注入法³⁾が必要となってくるであろう。

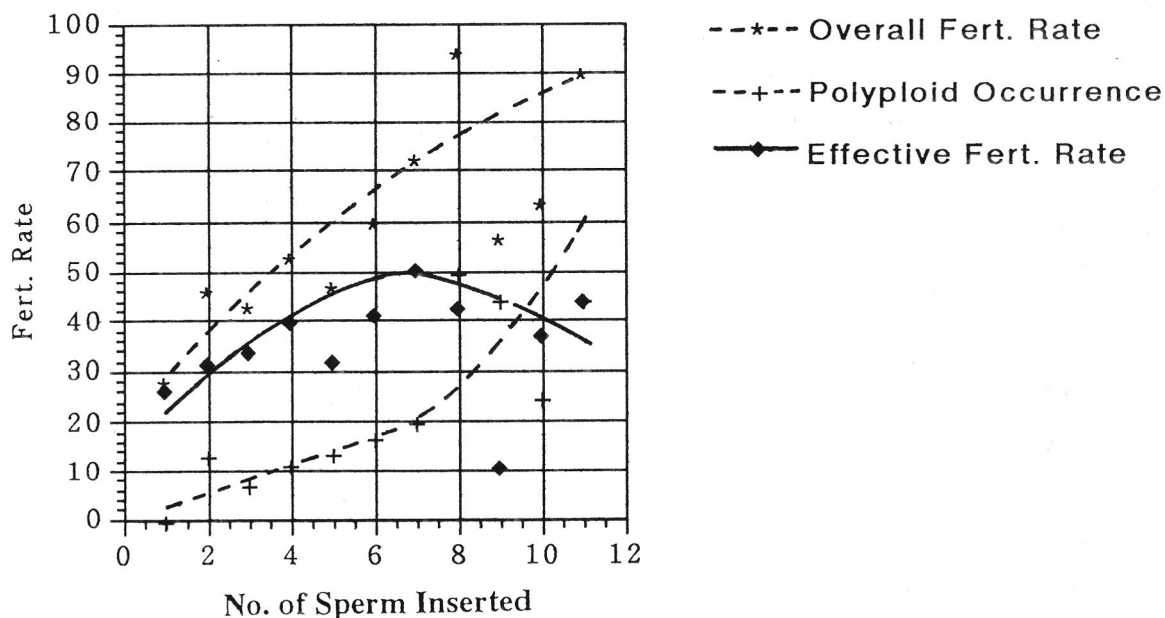


Fig. 1

Plots of No. of Sperm Inserted vs Overall Fertilization Rate, Polyploid Occurrence and Effective Fertilization Rate.

【文献】

- 1) S:C Ng, A. Bongso, S.S. Ratnam : Microinjection of human oocytes : a technique for severe oligoasthenoteratozoospermia.
Fertil Steril 1991;56 (6) :1117.
- 2) Ed. by J. Cohen : Micromanipulation of Gametes and Embryos. 1992:P.250.
- 3) G. Palermo, et al : Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte.
Lancet 1992;340:17.

3 重症男性不妊に対する機械的透明帯部分開孔術 (P Z D) の有用性の検討

The effects of partial zona dissection in severe male
infertility on the outcome of in vitro fertilization

高尾成久・吉田壮一・片桐千恵子・池成孝昭・岩部富夫
関島秋男・戸田稔子・原田省・見尾保幸・寺川直樹

Naruhisa TAKAO, Souichi YOSHIDA, Chieko KATAGIRI, Takaaki IKENARI, Tomio IWABE
Akio SEKIJIMA, Toshiko TODA, Tasuku HARADA, Yasuyuki MIO, Naoki TERAKAWA

鳥取大学医学部産科婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Tottori University

目的：近年、男性不妊に対する最終の治療法として顕微授精法が開発され臨床応用されてきた。今回我々は、機械的透明帯部分開孔術(partial zona dissection, PZD)をヒト卵子に対して行い、その有用性を検討した。

方法：通常のIVFを3回以上行い受精が起こらない重症男性不妊15症例54周期(227個)及び精液所見は正常ながらハムスターテストとIVFにて受精が起こらない受精障害3症例10周期(46個)を対象とした。患者の同意を得て、これらの卵に対してPZDを行った卵(PZD群)と通常のIVFを行った卵(IVF群)の2群に分けた。当科のIVFプロトコールに従って卵巣過剰刺激を行い¹⁾、hCG投与36時間後に採卵した。用手法にて採取した精液を30分液化後、精液所見(精液量、精子濃度、運動率)及び精子前進運動(FP)スコア(表1)²⁾を記録した。その後、直ちに単層Percoll法で運動精子を回収し、 $1 \times 10^5 / \text{ml}$ の濃度に調整し媒精に供した。5時間の前培養した卵子は0.1% hyaluronidase添加培養液で顆粒膜細胞を除去し、ついで0.3M sucrose添加培養液で囲卵腔を拡大した後、顕微操作を行った。顕微操作には、OLYMPUS社製倒立型システム顕微鏡およびNARISIGE社製Micromanipulatorを用いた。PZD群ではHolding needle(外径100 μm)で卵を吸引・保持し、Dissection needle(外径5 μm)で透明帯を1時から11時の方向に貫通後、Holding needleの管壁で卵を擦り透明帯に大きなスリットを作成した。一方、IVF群では顕微授精以外の同様の操作を施行し、両群の間で受精率、多精子受精率を比較検討した。統計学的検討は χ^2 検定で行った。

結果：対象症例の精液所見を表2に示した。重症男性不妊での受精率は、PZD群で有意に($P < 0.001$)改善されたが、多精子受精はPZD群で25.0%に認められた(表3)。一方、受精障害例においては、PZD群での受精率はIVF群に比して有意に改善され($P < 0.01$)、多精子受精率は33.3%であった(表4)。次に、FPスコアと受精率の関係では、FPスコア1以下では両群共に受精卵は得られなかったが、2以上ではPZD群で有意に改善され($P < 0.001$)、多精子受精率は25.0%であった(図1)。

表1 精子前進運動(FP)スコア

F P スコア	精子前進運動性の評価
0	前進運動精子を認めない
1	総運動精子の30%以上が1区画を5秒以上で通過する
2	総運動精子の30%以上が1区画を3秒以上5秒未満で通過する
3	総運動精子の30%以上が1区画を2秒以上3秒未満で通過する
4	総運動精子の30%以上が1区画を2秒未満で通過する

図1 精子前進運動性とPZDの成績

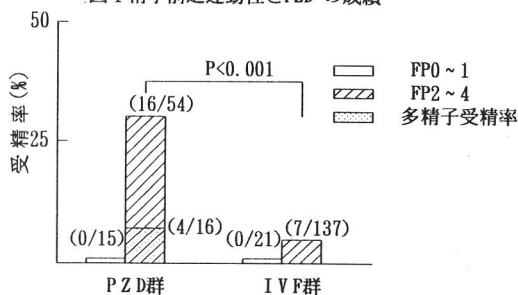


表2 重症男性不妊及び受精障害の精液所見

	精液量 (ml)	精子濃度 ($\times 10^6 / \text{ml}$)	運動率 (%)
重症男性不妊	2.5 ± 1.0	13.6 ± 21.4	51.1 ± 31.6
受精障害	2.6 ± 0.9	121.7 ± 67.3	65.0 ± 15.0

 mean \pm SD

表3 重症男性不妊に対するPZDの成績

	PZD群	IVF群
受精率	23.2(16/69) ^a	4.4(7/158) ^a
多精子受精率	25.0(4/16)	0(0/7)

^a P<0.001

表4 受精障害に対するPZDの成績

	PZD群	IVF群
受精率	25.0(3/12) ^a	0(0/34) ^a
多精子受精率	33.3(1/3)	

^a P<0.01

考察：重症男性不妊に対する最終の治療法として開発された顕微授精法には、現在3つの方法(partial zona dissection, PZD; sub-zonal insemination, SUZI; cytoplasmic sperm injection)があり、各方法ですでに妊娠、分娩例が報告されているが、今だ例数も少なくその有効性、安全性に関しては確立されていない^{3, 4, 5}。今回、我々はこの3法のうち卵に対する侵襲が最も少なく、また人為的に精子を選択することが少ないと考えられ、乏精子モデルによるマウスIVF実験系⁶⁾を用いた検討で有用性と安全性が確認されたPZDをヒト卵子に対して行い、その有用性を検討した。本研究結果よりPZDが重症男性不妊、あるいは受精障害の受精率の改善に有効であることが明らかとなった。また、精子前進運動性の良好な(FP2~4)症例では、PZDにて受精率の改善が認められたことから、精子前進運動性とPZDによる受精率との関連が示された。同時に、精子運動率不良で精子前進運動性の低い(FP0~1)症例ではPZDは限界があり、受精を期待するためにSUZI、またはcytoplasmic sperm injectionの必要性が示唆された。

文献：1) 見尾保幸, 他. (1991). 卵胞期における血中progesterone値の微小変動がIVF-ETの治療成績に及ぼす影響. 日本受精着床学会雑誌, 8, 165 ~ 168.

2) 谷川正浩, 他. (1992). 体外受精・胚移植時の精子処理における3層Percoll密度勾配法の有用性について—Swim up法との比較検討—. 日本不妊学会雑誌, 37(2), 232 ~ 236.

3) Henry EM et al. (1989). Partial zona dissection of the human oocyte: a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. Fertil Steril., 51, 139 ~ 148.

4) Simon F et al. (1991). Presentation of six pregnancies established by sub-zonal insemination (SUZI). Human Reprod., 6, 124 ~ 130.

5) Gianpiero P et al. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet., 340, 17 ~ 18.

6) 高尾成久, 他. (1993). マウス乏精子モデルにおける機械的透明帯部分開孔術の有用性の検討. 日本受精着床学会雑誌. 投稿中

4 卵巣灌流を用いた成長ホルモンの卵巣直接作用の検討

Direct effects of growth hormone on the in vitro perfused rabbit ovary

南郷周児、北井啓勝*、大庭三紀子**、鈴木秋悦、野澤志朗

Shuji NANGO, Hirokatsu KITAI*, Mikiko OBA**,

Shuetsu SUZUKI, Shiro NOZAWA

慶応義塾大学医学部産婦人科学教室、*埼玉中央病院、**森永乳業生科研

Department of Obstetrics and Gynecology School of Medicine, Keio University,

*Saitama-chuo Hospital, **Biochemical Research Laboratory, Morinaga Milk Industry Co., Ltd.

〔目的〕 最近になって多嚢胞性卵巣症候群およびHMG(human menopausal gonadotropin)による排卵誘発に抵抗性を示す無排卵症例に対して、成長ホルモン(hGH)をHMGと併用することで排卵率を高める試みがなされてきている。幾つかの施設で排卵率が上昇した成績が報告されているのに対して、効果の見られないという報告もあり、一定の成績は得られていない。またGHが卵胞発育および排卵に対してどのように関与しているかについては、未だ不明である。

我々は卵巣のステロイド産生及び直視下で排卵観察することのできるウサギを使った卵巣灌流実験を用いることによって、GHの卵巣直接作用を検討することを目的とした。

〔方法〕 3週間以上隔離飼育した体重3 kg以上の経産成熟雌ウサギを用いた。卵巣動脈に一部切開を加えガラス製カニューレを挿入した。ヘパリンと抗生剤を添加したHanks塩を含んだpH7.4のMedium199を灌流液として卵巣動脈カニューレより緩徐に注入し、卵巣内血液を流出させた後、卵巣を摘出し灌流装置に移した。灌流速度は家兎卵巣動脈正常血流速度とは同様の1.5ml/分に調節し、一側卵巣の灌流液は総量150mlとした。

同一ウサギの一側卵巣灌流液にrecombinant hGH 0.5IUを混入し、対側卵巣灌流をコントロールとして120分灌流後、両側卵巣にそれぞれフェルチノームP(almost pure FSH)5IUを注入した。その後、30分おきに180分まで卵巣静脈よりmediumを採取し、Estradiol(E2)、Progesteroneを測定した。また、180分の灌流直後の卵胞内卵子を採取し一部の卵子のmaturationと変性を観察した。残りの卵胞内卵子をminimal essential medium(MEM)/polyvinylpyrrolidone(PVP)で

12時間培養し、同様に検討した。

〔結果〕120分間の前灌流終了時点での卵巣からのE2の放出量は、5回の実験中3回でhGHを投与した側がコントロール側に比べて有意に増加し、残り2回は両側共E2の放出量が低値であった。FSH 5IU刺激後、E2の放出量は全例両側共上昇を示したが、5回中3回でhGHを投与した側がコントロール側に比べて促進傾向を示した。残り2例には有意な差は認められなかった。180分後に卵胞内卵子を観察したところ、GHを投与した群とコントロール群の間に差は認められなかった。また、MEM/PVPで12時間培養後の卵子にも、GHを投与した群とコントロール群との間に差は認められなかった。

hGHのウサギに対する作用を観察するため、ウサギにhGH0.5単位を静注し、ウサギ血液中のIGF-I(Insulin-like growth factor -I, human)が上昇するのを確認した。同様にhGHを投与した側の卵巣灌流液中のIGF-Iを測定したところ、有意な上昇は認めなかった。

〔考察〕卵巣でのFSH刺激によるE2産生放出は、上記結果からGHにより促進されているが、これがGHの直接作用によるものであるのか、IGF-Iを介したものかは不明である。GHを投与した卵巣の灌流液中のIGF-Iは測定値以下であり、この事がGHの直接作用によるものの存在を示している可能性が高い。しかし、卵胞で産生される微量のIGF-IがE2放出促進に関与している可能性も十分に残されている。これを明らかにするためには、今後抗IGF-I抗体(Sm1.2B)等を使用して、GHの直接作用を証明していく必要がある。

また今回の実験では卵子成熟過程において、GHは卵子に対して明らかな細胞障害を示さないと同時に、maturationに対しても促進も抑制もしていなかった。発育や代謝に大きな作用を有するGHを使用するにあたり、臨床上問題となってくるのは、GHを投与したときの細胞毒性であり、特に卵子の発育成熟過程に与える影響は慎重に検討して行かなくてはならない。今後はこの点に対して更なる検討が必要と思われる。

主要文献：

1. S. Nango, H. Kitai, Y. Furukawa, S. Suzuki, and S. Nozawa: Human Reprod, Abstr 7th World Congr IVF Assisted Procreation. 1991: P306.
2. S. Nango, H. Kitai, M. Ohba, Y. Matsui, S. Suzuki, S. Nozawa: The American Fertility Society, Abs 48th Annual Meeting, 1992.
3. E. Katz, E. Ricciarelli, Eli Y. Adashi: The potential relevance of growth hormone to female reproductive physiology and pathophysiology. Fertility and Sterility 1993. Vol. 59, No.1 1993: 8-34

5 V S 1、2、3 によるラット凍結保存卵巣の 子宮腔内移植後の生存性

Survival of frozen preserving ovaries with VS1,2 and 3
after transplant into uterine cavity

○利部 聡・大上 美穂・萬場光一・牧田登之

KAGABU Satosi, ÔUE Miho, MAMBA Kouichi and MAKITA Takashi

山口大学農学部 家畜解剖学教室

Department of Veterinary Anatomy, Faculty of Agriculture,

Yamaguchi University, Yamaguchi 753, Japan

【目的】

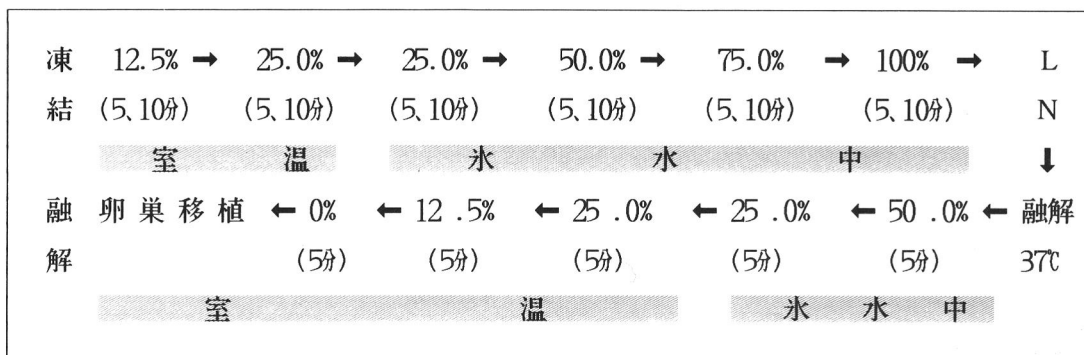
卵巣には膨大な卵細胞が存在しているが、実際に利用されるのはごくわずかである。Hirshfield & Midgley¹⁾によると 99.99% が閉鎖してしまい 0.01% が排卵するだけと考えられている。卵巣のもつ潜在能力を引き出すために過剰排卵処理などが行われているが、それでも閉鎖してしまう卵細胞の割合はまだ多い。我々は、[卵巣凍結保存 → 移植または培養 → 卵子採取 → 体外受精 → 受精卵移植] 系が確立すれば卵細胞をより有効に利用でき、いくらかでも閉鎖割合を減らすことができるのではないかと考え、[卵巣の凍結保存 → 子宮腔内移植実験]を行っている²⁻⁵⁾。Rall & Fahy⁶⁾によって開発されたガラス化法=超急速無段階凍結法を用いて、演者等は卵巣の凍結融解と移植後の生着を報告しているが、生着卵巣あたりの非閉鎖卵胞数は多くはない。

そこで今回は 各種ガラス化液 (V S 1、V S 2、V S 3⁶⁾) で卵巣を凍結し、移植後の生着状態を観察した。

【材料・方法】

卵巣凍結 : ベントバルビタール前麻酔、エーテル後麻酔下で卵巣を卵巣嚢や周囲の脂肪塊とともに取り出し直ちに B S A 4.0 mg/ml を添加した室温の H B 1 または T C M - 1 9 9 に保持した。それぞれの液中で卵巣以外の夾雑物を取り除き、新しい液に移し替えたのち、H B 1 および T C M - 1 9 9 に凍結保護剤を添加して調整したガラス化液に入れ脱水した。ガラス化液 1 0 0 % に保持後直接液化窒素に浸漬して凍結を行った。3 7℃ の温湯中で融解し脱凍結保護剤処理をしたのち、移植に用いた。

卵巣移植 : 精管結紮雄ラットと交配した偽妊娠 6 日目 (交配日 = 0) のレシピエントの子宮角中央部反間膜側に小孔をあけ凍結・融解卵巣を挿入し移植した。移植後 2 週間目に子宮とともに移植卵巣を取出し、定法によりパラフィン連続切片として生着を観察した。生着の判定は、Braw & Tsafirifi⁷⁾ の基準にしたがい非閉鎖卵胞を保有するものを生着卵巣とみなした。



【結果】

凍結卵巣は、子宮腔内で生着したがその割合は凍結保護剤の種類で異なり5分区、10分区ともVS1の生着割合が高い傾向を示した。また保持時間の違いに関しては、5分区の方が良好な成績となった。

以上の結果から本実験で用いたガラス化液のなかではVS1が、また、保持時間は5分が適していると推察された。

移植凍結・融解卵巣の生着(着/供試頭数)

	VS1	VS2	VS3
5分	4/5	1/5	0/5
10分	2/5	1/5	0/5

【文献】

- 1) Hirshfield, A. N. and Midgley, A. R., Jr.: Morphometric analysis of follicular development in the rat, Biol., Reprod., 19, 597, 1978.
- 2) 利部 聡・牧田登之・萬場光一・石田哲也: 凍結・融解したラット卵巣の卵巣嚢内への移植、哺乳卵研誌、5、89-97、1988.
- 3) 利部 聡・石田哲也・萬場光一・牧田登之: ラット子宮腔へのマウス卵巣の異種間移植—子宮腔内「生存」期間の延長、第83回日本畜産学会、1990.
- 4) 利部 聡・萬場光一・石田哲也: ラット子宮腔へのラット卵巣の同種間移植、日本不妊学会誌、36、185-188、1991.
- 5) 利部 聡・萬場光一: ニホンザル、ゴールデンハムスター、ウサギ、マウス卵巣のラット子宮腔への異種間移植、日本不妊学会誌、37、658-660、1992.
- 6) Rall, W. F.: Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification, Cryobiology, 24, 387-402, 1987.
- 7) Braw, R. E. & Tsafiriri, A.: Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary, J. Reprod. Fert., 56, 267, 1980.

6 LH-RH 単用による過排卵誘起の試み

An attempt for the superovulation by only LH-RH

加田日出美・嶋田秀庸

Hidemi KADA, Hidetsune SHIMADA

東京農業大学短期大学部農業科畜産学研究室

Laboratory of Animal Science, Junior College, Tokyo University of Agriculture

目的：近年, Gn-RHの応用が広く試みられている。演者らは昨年の本学会において, hCG の前後処理にLH-RH の5回の中間処理を組み合わせた過排卵誘起方法について, 従来のPMSGとhCG による方法と排卵数, 初期胚の形態上ならびに染色体の正常性について比較し報告した。LH-RH による過排卵誘起方法は, LH-RH が低分子量であることに着目し, 生体に抗体を作らせないことを目的としたものであった。しかし LH-RH処理の前後に排卵を確実にさせるためにhCG が使用されており, hCG についての抗体が産生されることが考えられるため, 今回はhCG の前後処理を省略もしくはLH-RH で置換できるか否かについて検討した。

方法：試験には6～12週齢のC57BL×CBA F₁未経産マウスを供試した。LH-RHについては, マウス性周期の各ステージにおいて誘起排卵試験が行われているため, 発情前期(P), 後期(M)間期(D)のそれぞれのステージを処理開始日(Day 0)として, ホルモン投与プログラムを, Fig. 1. のように設定した。各試験区ともDay 0～1にかけてLH-RH を0.025μgずつ5回投与した。Day 2に投与を終了した時点で同じF₁成熟雄と同居させ, 翌日Day 3

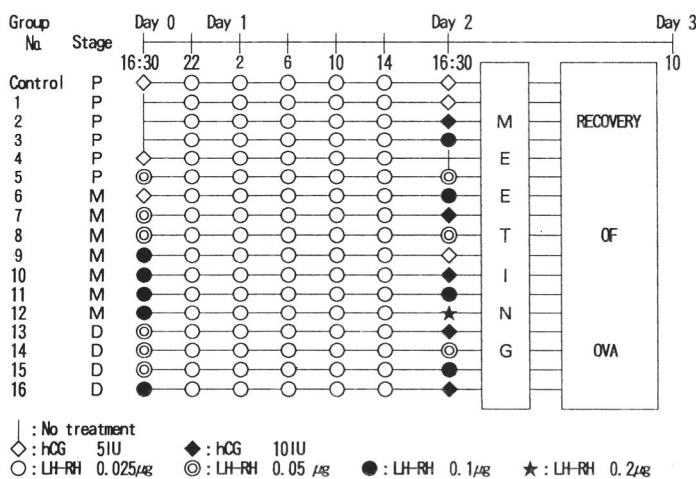


Fig. 1. Program of hormone treatments

の午前中に膣栓の有無を確認後, 有無にかかわらず安楽死の上開腹し, 卵管膨大部内の卵子を押し潰し法に

よって観察し、排卵数を算定した。また、排卵点、未排卵卵胞数、および卵巣・卵管・子宮重量の体重比もあわせて検討を行った。

結果：各試験区における成績はTable 1. に示したとおりである。LH-RH 投与の前後処理について検討したところ、交尾率はControl で 100%であったが、試験区では4区の33%、10区の60%を除き交尾を観察することはできなかった。また Day 3 における排卵数は、Control が 26.8 ± 3.8 であったのに対し試験区ではほとんどが数個観察されたのみであった。10区は他区より多く 7.6 ± 4.0 であったが、自然排卵数を上回る結果とはならなかった。排卵点は排卵数に比例する傾向を示したが、未排卵卵胞数とホルモン処理との関係は認められなかった。Control での前後処理は hCG 5 IU で十分な結果が得られたが、試験区では前処理を LH-RH 0.1 μ gにした場合のみ排卵が観察され、前処理は LH-RH 0.1 μ gで置換できることが明らかとなった。しかしその処理では後処理が hCG 5 IU では排卵を誘起することができず、hCG 10IU の投与でも全ての卵胞を排卵させることはできなかった。また、交尾率および排卵数は有意に低下した。試験区で未排卵卵胞が多観察された。

考察：以上のように今回の試験では、LH-RH の前後処理を省略することはできなかった。前処理についてのみ hCG 5 IU の代わりに LH-RH 0.1 μ gで置換できる可能性が示唆されたが、交尾率が低下し、排卵数も自然排卵数と差は認められなかった。さらに前処理を LH-RH 0.1 μ gで置換した場合、hCG 10IU を投与しても十分な排卵を起こすことはできず、これらのことから強力な排卵作用を持つホルモンの前後処理が必須であると思われる。今後さらに LH-RH単用もしくは、低分子量の他のホルモンによる処理を検討する必要があると思われる。

Table 1. Results of superovulation by various treatments

Group No.	No. of mice examine	Mating rate (%)	Mean of ova ovulated \pm S.E.	Mean of ovulation point \pm S.E.	Mean of remained follicle \pm S.E.	Genital organ/ Body weight (%)		
						Ovary	Oviduct	Uterus
Control	7	7/7(100)	26.8 ± 3.8	36.3 ± 7.1	2.4 ± 0.7	0.06	0.02	0.40
1	3	0/3(0)	0.6 ± 0.8	5.3 ± 0.4	7.0 ± 0.7	0.05	0.02	0.42
2	3	0/3(0)	0.3 ± 0.4	2.7 ± 0.4	5.3 ± 1.0	0.06	0.02	0.36
3	4	0/4(0)	0	0	3.5 ± 0.9	0.04	0.02	0.33
4	3	1/3(33)	2.0 ± 1.3	6.3 ± 2.7	4.3 ± 2.1	0.03	0.02	0.29
5	6	0/6(0)	0	0	3.2 ± 1.3	0.03	0.02	0.49
6	3	0/3(0)	3.0 ± 3.4	8.5 ± 0.8	3.3 ± 0.8	0.05	0.01	0.30
7	3	0/3(0)	8.5 ± 4.2	9.7 ± 2.3	4.0 ± 1.3	0.05	0.02	0.31
8	3	0/3(0)	0	0	2.3 ± 0.4	0.03	0.02	0.45
9	3	0/3(0)	3.3 ± 2.3	5.0 ± 4.1	3.7 ± 2.7	0.05	0.02	0.25
10	5	3/5(60)	7.6 ± 4.0	10.8 ± 3.5	7.5 ± 1.8	0.04	0.01	0.30
11	3	0/3(0)	3.3 ± 1.9	2.7 ± 0.4	4.7 ± 1.4	0.03	0.01	0.21
12	3	0/3(0)	0	0	1.3 ± 0.4	0.02	0.02	0.18
13	3	0/3(0)	5.3 ± 2.7	7.3 ± 2.2	7.4 ± 2.0	0.06	0.02	0.35
14	4	0/4(0)	4.5 ± 2.8	5.3 ± 3.7	2.3 ± 0.7	0.04	0.02	0.46
15	3	0/3(0)	4.0 ± 1.1	6.3 ± 1.0	0	0.03	0.02	0.24
16	3	0/3(0)	3.7 ± 0.4	9.0 ± 2.9	0	0.02	0.01	0.22

主要文献：

1. 金山喜一・遠藤 克・小林軍次郎・佐久間勇次 (1984) : LH-RH によるマウスの過排卵誘に関する研究
日不妊会誌, 29, 273-278.
2. Okamoto, M. T. and Nobunaga, T. : Induction of ovulation by synthetic luteinizing hormone releasing factor (LH-RF) in various stages of 4-day cyclic rats and mice. Endocrinol. Japon., 20 (6) :619-623.

7 マウスにおける反復過排卵誘起後に卵管膨大部内で分割像 を示す未受精卵子の出現について

Appearance of unfertilized ova cleaving in the ampulla of the oviduct
after repeated superovulation inducement in mice

石塚久義 栗栖輝光 齊藤直道 平田義一 成相孝一
金山喜一 遠藤克 佐久間勇次
H. ISHIZUKA, T. KURISU, T. SAITO, Y. HIRATA, K. NARIAI,
K. KANAYAMA, T. ENDO, Y. SAKUMA

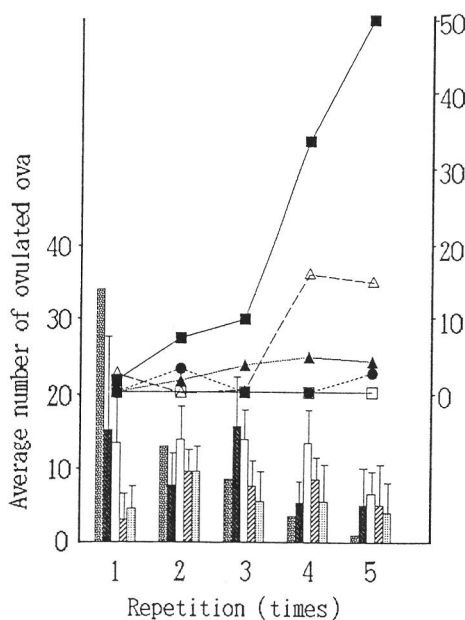
日本大学農獣医学部獣医生理学研究室
Department of Veterinary Physiology, College of Agriculture and
Veterinary Medicine, Nihon University,

【目的】 排卵後に受精しなかった未受精卵子でも、時間の経過にともなって分割像を示すことが知られている。この分割は、未受精卵子の fragmentation の過程の一経過であるとされている。一方、性腺刺激ホルモンによる過排卵誘起処理によって得られる卵子の大部分は、多くの研究によって正常な発育能を有することが明らかにされている。しかしながら、演者らは、これまでにマウスに過排卵誘起処理を反復すると、排卵卵子が、未受精にもかかわらずその多くが卵管膨大部内においてすでに分割像を呈していることを観察してきた。そこで今回、性腺刺激ホルモンの投与量と投与間隔が、異常分割卵子の出現頻度にどのような影響を及ぼすかについて検討したので報告する。

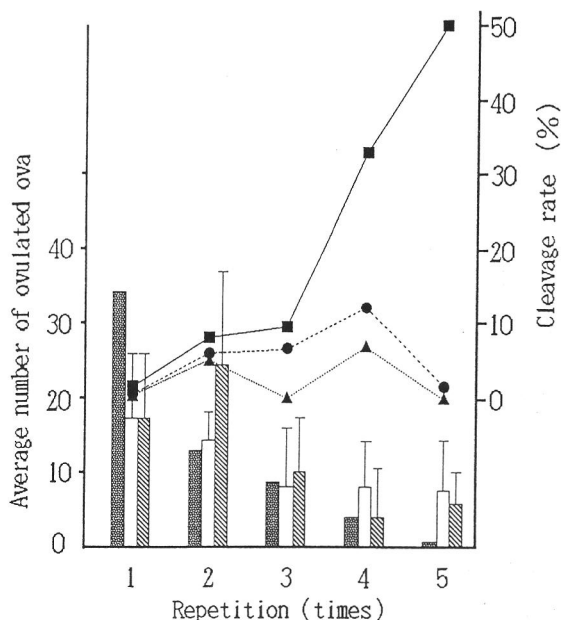
【材料および方法】 供試マウスは、ddY系 (SPF) の未経産マウスで日本 S L C より4週齢で購入し、4週間の予備飼育をしたのち実験に供した。したがって、実験開始時におけるマウスは8週齢である。マウスの飼育方法は、マウス用アルミケージに5~6匹ずつ収容し、人工照明下で午前5時から午後7時までの14時間照明とし、飼料はラット・マウス繁殖用固形飼料を用い、水と固形飼料は不断に給与した。

過排卵誘起処理は、マウスの性周期をとくに考慮しないで、午後5時にPMSG 5.0IU (セロトロピン：帝国臓器製薬) を腹腔内に投与し、ついで48時間後にhCG 5.0IU (ゴナトロピン：帝国臓器製薬) を腹腔内に投与した。反復処理の間隔は、5日間隔とし、反復回数は、1回から5回までとした。実験1 (Fig. 1) では、投与量をかえて、PMSGおよびhCGを 5.0, 3.75, 2.5, 1.0および 0.5IUの5試験区とした。さらに、実験2 (Fig. 2) では、反復処理の間隔を10日間および20日間とし、PMSGおよびhCGを 5.0IUずつ腹腔内に投与した。

排卵反応については、hCGを投与して24時間後にマウスを安楽死させ、開腹して卵巣、卵管および子宮を摘出し、卵管圧ペン法により卵管膨大部内の排卵卵子数と異常卵子数を算定した。



Relationship between the repetition times in 5 days interval and the average number of ovulated ova and cleavage rate of unfertilized ova in the ampulla of the oviduct in mice. —■—: 5.0IU PMSG and hCG. —▨—: 3.75IU PMSG and hCG. —□—: 2.5IU PMSG and hCG. —●—: 0.5IU PMSG and hCG.



Relationship between the repetition times and the average number of ovulated ova and cleavage rate of unfertilized ova in the ampulla of the oviduct in mice. —■—: 5IU of PMSG and hCG : 5days interval. —▨—: 5IU of PMSG and hCG : 10days interval. —□—: 5IU of PMSG and hCG : 20days interval. —●—: 5IU of PMSG and hCG : 5days interval.

【結果および考察】 実験1 (Fig. 1). 5日間隔のPMSGおよびhCG 5.0IU投与区では、1~5回の過排卵処理で、排卵数は33.8, 13.1, 8.5, 3.6 および 1.0 個と低下し、また、変性卵子の出現率は1.5, 6.9, 9.4, 33.3 および 50.0% であった。PMSGおよびhCG 2.5IU投与区においては、0, 1.6, 3.5, 4.7 および 3.8 となり、変性卵子の出現率の低下が認められた。また、1.0 および 0.5IUの投与区においては、平均排卵数の低下がみられるものの、変性卵子の出現率はきわめて低かった。なお、これら変性卵子はmorula様の異常分割像を呈していた。

実験2 (Fig. 2). 5日間隔のPMSGおよびhCG 5.0IU投与区を対照とすると、10日間隔では、平均排卵数は17.5, 14.4, 7.8, 8.2 および 7.6 個の低下がみられ、さらに変性卵子の出現率は0.5, 5.8, 6.4, 12.2 および 1.6% の低下が認められた。さらに、20日間隔では平均排卵数は17.5, 24.3, 9.9, 4.0 および 6.1 個の低下が認められ、さらに変性卵子の出現率は0.5, 5.2, 0, 6.8 および 0% となり、きわめて低くなることが明かとなった。

以上のように、過排卵誘起処理を反復すると、反復回数の増加にともなって排卵数は減少し変性卵子の出現率が増加するが、PMSGおよびhCGの投与量が5.0IUより少ないほど変性卵子の出現率は低下し、また、投与量が5.0IUであっても投与間隔が10日から20日であると変性卵子の出現率は低下している。従ってマウスの反復過排卵誘起には、GTHの投与量を5.0IU以下とし、反復間隔を10日以上とすることによって、より多数の正常卵子が得られることを知り、家畜における反復過排卵誘起についても同様の傾向があるものと考えられる。

【文献】

- ① Nakamura T., (1957) J. Fac. Fish and Animarl Husb., Hiroshima Univ. 1 (3) 343~351
- ② Nakamura T., (1961) J. Fac. Fish and Animarl Husb., Hiroshima Univ. 3 (2) 375~412

8 ニホンザル卵子とカニクイザル精子を用いた体外受精

IVF using Japanese monkey eggs and cynomolgus monkey spermatozoa

○山海 直、清水慶子*、長 文昭、吉川泰弘

Tadashi SANKAI, Keiko SHIMIZU*, Fumiaki CHO and Yasuhiro YOSHIKAWA

国立予防衛生研究所・筑波医学実験用霊長類センター

Tsukuba Primate Center for Medical Science,

the National Institute of Health

*京都大学・霊長類研究所

Primate Research Institute, Kyoto University

【目的】サル類における体外受精は、数種のサル類で成功しているが、ニホンザルでの報告はなされていない。我々は、最終的にニホンザルを用いて体外受精を行うことを目的として、いくつかの基礎検討を行っている。今回は、季節繁殖性をもつニホンザルに多数の卵胞を发育させることができるか否かを検討した。また、发育した卵胞から採取した卵子の受精能力を知る目的で基礎データが豊富なカニクイザル精子を用いて体外受精を試みた。

【方法】京都大学霊長類研究所で繁殖・育成された7～16才の成熟雌ニホンザル4例を用いた。卵胞发育誘起は、PMSG（帝国臓器）とhCG（帝国臓器）の組み合わせにより行った。PMSGの投与量は200IU/回で、最初の投与日をday1としてday3,5,7,9,10の計6回、あるいはday1,3,5,7,9,10,11,12の計8回筋肉内投与した。いずれの個体もPMSG最終投与から28時間目にhCG4,000IUを筋肉内投与した。その翌日に安楽殺したのち、あるいは全身麻酔下で開腹手術を行って卵巣を摘出し、直径1mm以上の卵胞から卵胞液とともに卵子を吸引採取した。採取した卵子は、10%FCSと10IU/mlPMSGを添加したTCM-199で十分に洗浄したのち、チューブに入れて密封し37℃のポット内に保存した。これらの操作は、京都大学霊長類研究所（愛知県犬山市）で行ったが、その後、卵子はポット内に保存した状態で国立予防衛生研究所・筑波医学実験用霊長類センター（茨城県つくば市）まで運搬し成熟培養、体外受精を行った。運搬した卵子は、採卵後9～13時間目に運搬時と同様の培養液内で成熟培養した。その後13時間目にノマルスキー微分干渉顕微鏡下でGV、第1極体の有無、さらに卵丘細胞の状態について観察し、成熟卵と未成熟卵を分類した。成熟卵は、1mg/mlBSAを添加したWhitten's medium内に移して媒精した。媒精には、ニホンザルと同じマカ

ク属であるカニクイザルの凍結保存精子を用いた。凍結保存されたカニクイザル精子は、既に同種卵での体外受精に成功しており、体外条件下での受精能力は実証されている。凍結精子は急速法で融解してパーコール洗浄し、1mMカフェインと1mMdBc-AMPを添加したTYH mediumで2時間の前培養を施したのち、卵子の入ったドロップ内に注入した。この時の精子は、ハイパーアクチベーションが誘起されていることを確認し、また、精子濃度は300個/ μ lとした。媒精後5時間目に検索し、雄性前核の形成が明らかなもの、あるいは第2極体の放出を認めたものを受精卵と判定した。受精卵は、10%FCSと1mg/mlBSAを添加したWhitten's mediumに移して培養をつづけ、経時的に観察した。また、実験期間を通して末梢血を採取し、エストロゲン(E2)、プロゲステロン(P)およびLHの血中濃度を測定した。

【結果および考察】ニホンザルは季節繁殖性を有しているが、実験に使用した個体は、実験開始前のE2、Pがいずれも低値を示していたこと、また、月経を認めていなかったことから考慮すると性周期は停止した状態にあったものと考えられた。PMSGおよびhCGを投与した結果、PMSG6回投与群では、2例中1例のみに卵巢サイズの増大を認め、左右合計42個の卵胞発育を誘起できた。しかし、1例には全く卵胞を認めることができず、排卵点が1個存在した。PMSG8回投与群では、2例ともに卵巢サイズの増大を認めたが、直径1mm以上の卵胞発育を誘起できたのは1例のみで、その発育卵胞数は、左右合計52個であった。他の1例は、発育卵胞は全くなかったが多数の小卵胞を認め、さらに左右卵巢に1個ずつの排卵点が存在した。これらの排卵は、血中ホルモン動態からPMSG投与中に起きたものと推察された。

卵胞発育を誘起できた2例の合計94個の卵胞から47個(50.0%)の卵子を回収した。成熟卵は1例のみから5個回収されたが、この個体はhCG投与後E2の急激な低下を認めている。他の1例から回収された卵はすべて未成熟であり、採卵時にもE2は高値を示していた。合計42個の未成熟卵は、培養により13個(31.0%)が成熟した。合計18個の成熟卵を用いて体外受精を行った結果、媒精後5時間目の検索で16個(88.9%)の卵子に雄性前核あるいは第2極体を認め、その後の培養で12個(75.0%)が分割像を示した。

以上のように、ニホンザルを用いて多数の卵胞を発育させることができた。さらに、発育した卵胞から回収した卵子の成熟培養とカニクイザルの凍結精子を用いた体外受精に成功した。今後、ニホンザル精子の体外条件下での性状について明らかにし、ニホンザルの卵子と精子による体外受精を試みたい。また、本研究の実験過程では卵子の輸送という操作が入っており、今回、輸送卵で体外受精に成功したことは、わが国においてごく限られた場所でしか飼育されていない実験用霊長類を用いた本分野の研究の発展に大きく貢献するものと思われる。

ニホンジカ射出精子の体外における透明帯除去

ハムスター卵子への侵入能

—とくにウシ精子との比較について—

Penetration of Fresh Spermatozoa in Sika Deer
(Cervus Nippon) to Zona-free Hamster eggs In Vitro
- Comparison with Bull Spermatozoa -

小林 仁・池田昭七・武田武雄・佐々田比呂志*・菅原七郎*

Jin KOBAYASHI, Shoushichi IKEDA, Takeo TAKEDA,

Hiroshi SASADA*, Shichirou SUGAWARA*

宮城県農業短期大学附属農場, *東北大学農学部2動物生殖科学

Research Farm, Miyagiken Agricultural College,

*Lab. Animal Reproduction, Faculty of Agriculture, TOHOKU University

【目的】ウシなどの家畜において卵子の体外における成熟や受精の成功が報告されているが、シカの体外受精についての報告は少なく、シカ精子の受精能獲得法について十分な検討がなされていない。精子の受精能を判定する場合、同種の卵子に対する受精によって行われるが、卵子の採取が困難な動物では異種の卵子を用いることが可能である。透明帯除去ハムスター卵子を用い、精子の受精能獲得の判定が実験動物、ヒト、ブタおよびウシにおいて報告されている。本研究では、ニホンジカ精子についてウシの体外受精法を用い、透明帯除去ハムスター卵子への侵入能をウシ精子と比較し検討したので報告する。

【方法】発情周期第1日目の午前中にPMSG 30iuを成熟雌ゴールデンハムスターの腹腔に注射し、57時間後にhCG 25iuを腹腔に注射して過剰排卵処理を行った。hCG投与後18時間後に卵管膨大部から卵子を取り出し、0.1% hyaluronidase液および0.05% trypsin液で顆粒膜細胞と透明帯を除去し媒精に供した。ニホンジカ精液は電気射精法により成熟雄2頭(3と9才)から2~14日間隔で採取した。電気射精器は環状多極電極式電気射精器(富士平工業製)を用いた。動物は2% キシラジン液(セラクター)を体重kgあたり0.05mgを筋肉内注射し鎮静させ保定した。次に電極プローブを直腸から挿入し、3Vと8Vの電圧を10~20回反復して電気刺激を行った。精液の採取は緬山羊用人工腔(富士平工業製)を用いた。採取した精液はウシ用卵黄クエン酸糖液で希釈し、4℃で0~1日間保存した。ウシ精子は、黒毛和種の凍結精液を使用直前に融解して用いた。精子の前処理はウシで行われている方法に従った。10mM Caffeineを含むB0液で遠心(500g 5min)・洗浄を2回繰り返した後、 15×10^6 cell/mlの精子濃度に調製した。Ca-ionophore A23187(以下 ionophore)処理では、この精子懸濁液にionophoreを0, 0.1, 0.5および1.0uM添加し、1分後にBSA 20mg/mlを含むB0液で等量希釈した後媒精した。Heparin処理では、洗浄後の精子をheparin 10, 20および40mg/mlとBSA 20mg/mlを含むB0液で等量希釈し15分間38℃で前培

養した後、媒精した。媒精後は38℃、空気下5% CO₂の気相条件で6時間培養した後、ラクモイドで染色し侵入を判定した。

結果：電気射精により採取したニホンジカ精子は、同一個体からでもバッチにより生存率および活力が大きく異なった。活発前進精子(++)が80%以上を示した精液を実験に用いた。Ionophore処理の場合、精子侵入率は、0.1, 0.5および1.0uMの濃度でウシ精子ではいずれも80%以上の侵入率であったのに対し、ニホンジカ精子ではそれぞれ 32.8, 41.0, 32.7%であった。平均侵入精子数は、ウシ精子では1.0以上であったのに対し、ニホンジカ精子ではすべて0.5以下であった。Heparin処理の場合、精子の侵入率は、ニホンジカ精子では0~22.6%であったのに対しウシ精子では85%以上であった。平均侵入精子数はニホンジカ精子がウシ精子よりも低かった。

【考察】本実験は、ウシの体外受精法を用いニホンジカ精子を処理して透明帯除去ハムスター卵子への侵入により受精能の検討を行った。わずかに卵子へ侵入した精子が認められたものの、ウシ精子に比較して侵入率や平均侵入精子数が有意に低かった。この違いは今回用いた方法がニホンジカの精子には適さないものか、あるいは供試した精液に依存していたことによるものかもしれない。ウシやヒツジの精子では、個体間や個体内で受精率に大きな変動があることが知られている。今後、供試個体数を増やすことや、精巢上体精子を用いることにより、また、発情期の卵管や子宮での受精能を獲得した精子について検討する必要があると考えられる。

Table 1. Effect of ionophore on sperm penetration to hamster eggs in sika deer buck and bull.

Ionophore A23187 Conc. (uM)	in the buck			in the bull		
	No. of eggs examined	No. of eggs pene- trated(%)	No. of sperm penetrated on average	No. of eggs examined	No. of eggs pene- trated(%)	No. of sperm penetrated on average
0	69	2 (2.9)	0.03	39	0 (0)	0
0.1	61	20 (32.8)	0.33	40	39 (95.5)	1.3
0.5	61	25 (41.0)	0.44	43	41 (95.3)	2.8
1.0	55	18 (32.7)	0.34	40	32 (80.0)	1.6

Table 2. Effect of heparin on sperm penetration to hamster eggs in sika deer buck and bull.

Heparin Conc. (ug/ml)	in the buck			in the bull		
	No. of eggs examined	No. of eggs pene- trated(%)	No. of sperm penetrated on average	No. of eggs examined	No. of eggs pene- trated(%)	No. of sperm penetrated on average
10	30	4 (13.3)	0.13	29	25 (86.2)	1.1
20	31	7 (22.6)	0.23	30	29 (96.7)	1.8
40	27	0 (0)	0	28	24 (85.7)	1.2

主要文献

- 1) Fukui Y. et al :Effects of Culture Duration and Time of Gonadotropin Addition on In Vitro Maturation and Fertilization of Red Deer (*Cervus elaphus*) Oocytes:Theriogenology 1991,35.499-512
- 2) Parrish J.J. et al :Capacitation of Bovine Sperm by Heparin:Biol. Reprod. 1988,38.1171-1180
- 3) 花田 章 他：体外受精された牛体外成熟卵子の胚盤胞期への発育，第77回日本畜産学会講演要旨

10 透明帯切開卵子を用いた低受精能マウス凍結精子の 体外受精成績

Fertilization in vitro between frozen mouse spermatozoa with low fertilizing ability and oocytes with the zona partially dissected.

中潟直己・上田 進・山内一也

Naomi NAKAGATA, Susumu UEDA, Kazuya YAMANOUCHI

日本生物科学研究所

Nippon Institute for Biological Science.

【目的】最近、マウス精子の凍結保存が可能となり、各種系統のマウス精子に応用されている¹⁻⁵⁾。しかしながら、融解後の精子活力が極めて低く、必ずしも良好な受精率が得られない系統があり⁶⁾、現在、これら系統の凍結精子を用いて、種々の体外受精技術系の検討を行っている。今回は、これら系統の凍結精子の受精率を高めることを目的として、Paritial zona dissection (PZD) を施した卵子と媒精を行い、その有用性について検討した。【方法】精子の採取および凍結：C57BL/6Nの成熟雄より摘出した精巢上体尾部2ヶをラスタックシャーレ内の0.4mlの保存液（18% ラフィーヌ、3% スキムミルク となるように蒸留水に溶解したもの）に入れ、眼科用ハサミで細切、精子懸濁液を作成した。続いて、約0.1 mlずつ0.25 ml のプラスチックストローに充填し、液体窒素ガス中で10分静置後、液体窒素中に浸漬した。また、融解は、サンプルを室温の水槽に入れることにより行なった。PZD：PZDにはPMSGとhCGにより過排卵処理を施したJcl:ICR系成熟雌の卵管から、hCG投与後14-15時間に採取、ヒアルロニターゼ処理により卵丘細胞を除去した裸化卵子を用いた。まず、裸化卵子を0.5 M シュクロース溶液内で十分に収縮させた後、0.75 M シュクロース溶液に移し、実体顕微鏡下でPZDを行なった。すなわち、マウスピースに接続したホールディングピペット（外径 60 μ 、内径 20 μ ）で、卵子を吸引・固定し、30 Gの注射針で透明帯の一部を切開した。体外受精・胚移植：融解後、フィルター法にて洗浄し、1.5時間前培養した凍結・融解精子を含む培養液内（4000-6000精子/ μ l）に、PZD処理した裸化卵子を導入することにより媒精を行ない、媒精後30-60分に卵子を新鮮な培養液で3回洗浄し、余分な精子を除去した。卵子は媒精後6時間に倒立顕微鏡下で、第2極体の放出と雌雄前核を指標として受精の有無を検査し、その後、更に18時間培養、2細胞期への発生について観察した。また、2細胞期へ発生した卵子は偽妊娠第1日目の受容雌の卵管へ移植し、新生仔への発生について検討した。なお、PZD処理を行なわなかった裸化卵子を凍結・融解精子で媒精したものをControlとした。

【結果】媒精後6時間における受精率はPZD 処理した裸化卵子で67% (136/203) とPZD を行わなかった裸化卵子 (Control) の受精率 (10.3%, 20/195) に比べ、極めて高い値を示した (Table 1)。さらに、多精子受精卵を除くすべての単精子受精卵を培養した結果、そのほとんどが2細胞期へ発生した (Table 2)。さらに、これら2細胞期胚の移植により、29匹の新生仔が得られた (Table 3: 23%, 29/126)。

以上の結果より、PZD 区における2細胞期胚の移植成績は、Control に比べ低値を示したものの、受精率はControl と比べ極めて高く、供試卵に対する新生仔への発生率は、14.3% (29/203) とControl (3.6%, 7/195) の約4倍もの高い値が得られたことより、低受精能マウス凍結精子において、卵子へのPZD は受精率を向上させるための有効な手段になるものと思われる。

本研究は、文部省科学研究費重点領域研究 No. 01619005 の一部として実施された。

Table 1 The fertilization rate of PZD oocytes inseminated with frozen C57BL/6N mouse sperm in vitro

Oocyte treatment	No. of oocytes examined	No. of oocytes fertilized		
		Total (%)	Monospermic	Polyspermic
PZD	203	136 (67.0)	131	5
Control	195	20 (10.3)	20	0

Table 2 Development of 2-cell embryos from PZD oocytes inseminated with frozen C57BL/6N mouse sperm in vitro

Oocyte treatment	No. of monospermic oocytes	No. of oocytes developed to 2-cell stage
PZD	131	126 (96.2)
Control	20	20 (100)

Table 3 Development to live young of 2-cell mouse embryos after transfer to the fallopian tubes of pseudopregnant recipients

Oocyte treatment	No. of recipients used	No. of embryos transferred	No. of animals which delivered live young	No. of live young (%)
PZD	6	126	6	29 (23.0)
Control	2	20	2	7 (35.0)

文献

- 1) 横山峯介、秋葉久弥、勝木元也、野村達次: 実験動物 39: 125-228, 1990
- 2) 奥山 学、磯貝滋樹、佐賀正彦、浜田 宏、尾川昭三: 日本受精着床学会雑誌 7: 116-119, 1990
- 3) Tada N, Sato N, Yamanoi Y, Mizorogi T, Kasai K, Ogawa S.: J. Reprod. Fert. 89: 511-516, 1990
- 4) 竹島 勉、中潟直己、尾川昭三: 実験動物 40: 493-497, 1991
- 5) Nakagata N & Takeshima T.: Theriogenology 37: 1283-1291, 1992
- 6) Nakagata N & Takeshima T.: Exp. Anim. in press

11 ウ シ 卵 に お け る 表 層 粒 の 体 外 成 熟 に 伴 う 変 化

Changes of Cortical Granules in Bovine Eggs
during In Vitro Maturation

細江実佐・高橋知子*・荻原 勲*・河野友宏**・中原達夫**・新村末雄・石田一夫

Misa HOSOE, Tomoko TAKAHASHI*, Isao OGIHARA*, Tomohiro KONO**,
Tatsuo NAKAHARA**, Sueto NIIMURA and Kazuo ISHIDA

新潟大学農学部農業生産科学科, * 協同飼料(株)ET課, **東京農業大学総合研究所

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Niigata University

*Kyodo Shiryō Co., LTD.

**Nodai Research Institute, Tokyo University of Agriculture

目的: これまでに、ウシ卵母細胞の成熟に伴う表層粒の密度と分布の変化については電子顕微鏡を用いて調べられている¹⁾。それによると、表層粒は、卵核胞期の卵母細胞では塊状をなして主に細胞質深部に分布しているが、LHサージ後の卵核胞が崩壊した卵母細胞では塊状をなして細胞質表層に分布するようになり、排卵直前の卵母細胞では塊はさらに大きくなるといわれている。しかし、体外で成熟過程にあるウシ卵母細胞の表層粒の変化は調べられていない。最近、ビオチンあるいは蛍光色素を標識した *Lens culinaris* agglutinin (LCA) を用いて表層粒を検出することが可能になっており²⁾、この方法を用いた観察では電子顕微鏡を用いた観察に比べ、表層粒の密度と分布を細胞質全域にわたって調べることが容易であるといわれている²⁾。そこで本実験では、ウシ卵母細胞の表層粒が体外成熟の過程でどのように変化するかを、FITCを標識したLCAを用いてレクチン組織化学的に調べるとともに、受精後の変化も併せて観察した。

材料および方法: 卵母細胞は、ホルスタイン種卵巣の小型卵胞(直径2-5 mm)から採取し、10 % FCS を含むTCM-199 を用いて39℃で20時間成熟培養した。また、成熟卵母細胞は常法に従って受精能獲得処置を施した精子を用いて媒精し、39℃で12時間培養した。観察した卵母細胞は、卵核胞期、成熟培養後10および20時間、媒精後6、12および24時間のものである。

表層粒を観察するために、これらの卵母細胞をDucibella らの方法²⁾に従って処置した。すなわち、ヒアルロニダーゼとプロナーゼで卵丘細胞と透明帯を除去した卵母細胞を、パラホルムアルデヒド

を3.7 % 含むPBS に室温で30分間固定した後、TritonX-100 を0.1 % 含むPBS に5分間浸漬し、透過処置を施した。次いで、PBS 1 ml中にLCA (E-Y Laboratories, U.S.A.) 10 μ g, TritonX-100 0.1 μ lおよびBSA 3 mgを含む液に20℃で30分間浸漬し、染色した。なお対照として、LCA を含まない液に浸漬した卵母細胞と α -メチルマンノシドで処置した卵母細胞を用いた。これらの処置を施した卵母細胞は落射蛍光顕微鏡で観察した。一方、卵核胞期、媒精後6および12時間の卵母細胞の一部については電子顕微鏡による観察のために、4% グルタルアルデヒドと2% パラホルムアルデヒドの混液および1% 四酸化オスミウムで固定し、Epon 812に包埋した。包埋後、超薄切片を作製して染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。

結果：卵母細胞をFITCを標識したLCA で処置すると、細胞質に顆粒状の蛍光が認められた。この蛍光は、LCA を含まない液に浸漬した卵母細胞と α -メチルマンノシドで処置した卵母細胞にはみられなかった。この蛍光顆粒が表層粒の存在を示していることが確認された。LCA 陽性の表層粒は、卵核胞期、成熟培養後10および20時間の卵母細胞では細胞質全域に塊状をなして多数分布しており、これらの卵母細胞で表層粒の密度と分布の状態は変化しなかった。媒精後6時間の卵母細胞の約半数において、表層粒は単独で細胞質表層に多数分布していたが、半数の卵母細胞は表層粒を全く含んでいなかった。媒精後12時間以降の卵母細胞では表層粒は完全に消失していた。また卵母細胞の電子顕微鏡による観察において、高電子密度の表層粒は、卵核胞期の卵母細胞では主に細胞質の表層から少し離れた部位に、密度の低い大型の塊をなして多数分布していた。媒精後6時間の卵母細胞では、表層粒は細胞質表層に1列に並んで多数分布していたが、表層粒を含まないものもみられた。媒精後12時間の卵母細胞では、表層粒は細胞質のいずれにもみられなかった。

考察：本実験において、ウシ卵母細胞の表層粒は卵核胞期から成熟培養後20時間まで変化なく、常に塊として細胞質全域に観察され、体内で成熟過程にある卵母細胞の表層粒を電子顕微鏡で観察した結果¹⁾とは若干異なっていた。この相違については、本実験が体外成熟させた卵母細胞を用いていることによることも考えられるが、卵母細胞の細胞質における表層粒の密度は部位によって異なっていることが知られているので、成熟過程の表層粒の動態についてはLCA を用いた本実験の方が正確のように思われた。一方、媒精後6時間の卵母細胞では約半数でLCA に陽性の表層粒が観察されなかった。これらの卵母細胞ではすでに精子が侵入したために表層粒は放出されて消失したものと思われる。また、この時期の残りの半数の卵母細胞では表層粒が細胞質表層に分布していたので、受精直前の成熟したウシ卵母細胞では、表層粒は塊を形成せずに単独で細胞質表層に分布するようになることが確かめられた。

主要文献

1. Kruip, T. A. M., Cran, D. G., Van Beneden, T. H. and Dieleman, S. J. (1983). Gamete Res., 8, 29-47.
2. Ducibella, T., Anderson, E., Albertini, D. F., Aalberg, J. and Rangarajan, S. (1988). Dev. Biol., 130, 184-197.

12

Study of Second Messenger

and

Cortical Granules in the Mouse Oocytes

小関みづほ、倉澤滋明*、大庭三紀子**、鈴木秋悦、野澤志朗

Mizuho KOSEKI, Shigeaki KURASAWA*, Mikiko OBA**, Shuetsu SUZUKI, Shiro NOZAWA

慶應大学医学部産婦人科学教室、*南多摩病院産婦人科、**森永乳業生科研

Department of Obstetrics and Gynecology School of Medicine, Keio University,

*Department of Obstetrics and Gynecology, Minamitama Hospital.

**Biochemical Research Laboratory, Morinaga Milk Industry Co. Ltd.

目的：近年、不妊治療としての体外受精が広く行なわれるようになり、顕微受精の応用も注目されているが、受精に伴って卵細胞内でおこる変化および現象に関しては、未だ不明な点が多い。受精時には、精子が卵に進入し、卵細胞膜下の表層顆粒のexocytosisが起こり卵卵腔に放出され、その結果、透明層反応が起こり多精子受精が防御されると考えられている。今回の研究では、受精におけるセカンドメッセンジャーの役割を明らかにすることを目的として、表層顆粒をLCA蛍光染色法で観察し、さらに、¹²⁵Iラベルによる1次元ゲル分析で表層反応に伴う蛋白分析を行なった。

方法：DDY4-8週齢マウスにPMSG 5IUを腹腔内投与し、48時間後にHCG 5IUを腹腔内投与して、その15時間後に卵管より過排卵卵を採取し、Hyaluronidaseで卵丘を除去し、卵丘除去卵の透明層を 0.25% Proteaseで除去した。その後、TPA10ng/mlを加えたBWW mediumで1時間培養し、BWW mediumで5回洗浄した。

1) LCA蛍光染色法：前記の卵を 3% Paraformaldehyde溶液で30分固定した。その後、0.05% Triton x-100で処理しLCA蛍光染色法にて観察した。対照の排卵卵に対しては、TPAを加えず、BWW mediumのみで、1時間、培養を行なった。固定法及び染色法は、TPA処理卵と同様に行ない、両者の比較観察を行なった。

2) マウス卵表層顆粒の一次元ゲル分析: TPA処理卵に関しては、排卵卵をTPA10ng/ml添加 BWW medium

で培養し卵を除いた液を使用し、対照に関してはBWW mediumで培養し卵を除いた液を使用した。それぞれの液の表層顆粒蛋白を ^{125}I で標識し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法による一次元電気泳動ゲル分析を行なった。

結果：1) protein kinase cを活性化するphorbol ester すなわちTPAで処理された排卵卵の表層顆粒放出に対する影響をLCA蛍光染色法で形態学的に検討した。TPA非処理卵では metaphase plate以外の部分に表層顆粒が存在しているが、TPA10ng/mlで処理した排卵卵の表層顆粒の数は、対照に比べ、有意に少ないことが認められた。

2) マウス卵表層顆粒の一次元ゲル分析の結果、排卵卵を BWW medium のみで培養した培養液中には75 kDaという蛋白分画はみられなかったが、TPA10ng/ml添加された BWW medium で培養した場合、75kDaに蛋白分画の出現が認められた。

考察：体細胞において起こる分泌現象には、カルシウムの動員とPK-Cの関与が考えられている。すなわち、G蛋白は、phospholipase c を活性化させ、カルシウム動員をもたらすイノシトール₃リン酸(IP₃)、および Protein kinase-C (PK-C)を活性化するDAGのふたつのセカンドメッセンジャーを生成する。これらの働きで、細胞内の反応が起こるが、受精時に起こる表層顆粒放出に対しても、このシグナル伝達機構が関与しているものと考えられている。本研究では、PKCを活性化するTPAで未受精卵である排卵卵を培養したが、TPAによって表層顆粒が卵外に放出されることが、LCA蛍光染色法と ^{125}I で標識された一次元ゲル分析によって示唆された。

主要文献：

- 1) Cherr, G. N., Drobnis, E. Z., and Katz, D. F. (1988). Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. J. Exp. Zool. 246, 81-93.
- 2) Pierch, K. E., Siebert, M. C., Kopf, G. S., Schultz, R. M., and Calarco, P. G. (1990). Characterization and localization of a mouse egg cortical granule antigen prior to and following fertilization or egg activation. Devel. Biol. 141:381-392.
- 3) Ducibella, T., Kurasawa, S., Rangarajan, S., Kopf, G. S., and Schultz, R. M. (1990). Precocious loss of cortical granules during mouse oocyte meiotic maturation and correlation with an egg induced modification of the zona pellucida. Devel. Biol. 137:46-55
- 4) 小関みづほ、大庭三紀子、倉澤滋明、鈴木秋悦、野澤志朗：多精子受精防御機序における表層顆粒の動態に関する研究。第44回日本産婦人科学会講演要旨。1992, 63
- 5) 小関みづほ、南郷周児、木村裕幸、大庭三紀子、倉澤滋明、鈴木秋悦、野澤志朗：卵の成熟過程における表層顆粒の動態に関する検討。哺乳卵学誌。第9巻 第1号 1992, 4月

13 共焦点レーザー顕微鏡による受精時の
卵子表層顆粒の動態に関する観察

Observation of Cortical Granules at the Time of Fertilization
by the Laser Scanning Microscope

横田秀夫・加藤誠* 佐藤嘉兵

H i d e o Y O K O T A , M a k o t o K A T O * , K a h e i S A T O

日本大学農獣医学部動物細胞学研究室、*オリンパス光学工業

Department of Cell Biology , College of Agriculture and Veterinary
Medicine, Nihon University, *Olympus Optical Co., Ltd.

目的：

受精時において、受精刺激により卵子表層顆粒の放出が引き起こされ、卵黄遮断や、透明帯反応により多精子受精が阻止される事が知られている。近年、蛍光標識したLens culinaris agglutinin(FITC-LCA)を用いて、卵子表層顆粒の放出について観察が行われているが、落射蛍光顕微鏡を用いているため細胞内の詳細な極在について報告されていない¹⁾²⁾。本実験では、共焦点レーザー顕微鏡を用いてウサギ、および、マウスの受精時における卵子細胞質内の表層顆粒の動態について調べた。

方法：

実験に用いた未受精卵は成熟雌ウサギ(PMSG 75IU/hCG 80IU)、および6週齢の雌マウス(PMSG 5IU/hCG 7IU)に過排卵処置を施し、hCG投与14時間後に卵管灌流により採卵を行った。また受精卵は、hCG投与時に同種の雄と交尾させ未受精卵と同様に採卵した。採卵した卵子は、0.1%ヒアルロニターゼ溶液により卵丘細胞を除去し、4% パラフォルムアルデヒドで30分間固定し、DPBSで3回洗浄を行った。固定した卵子をえつき針により透明帯を取り除き、膜の透過処理の為に0.02% Triton x-100 in DPBSで5分間感作した。その後、暗箱内でFITC-LCAを10 μ g/ml含むDPBSで30分間染色を行い、DPBSで洗浄した。なお、コントロールとして、無染色の卵子とD-マンノースで処理した卵子およびエタノールにより刺激を与

え、表層顆粒を放出させた卵子を用いた。これらの卵子を、共焦点レーザー顕微鏡(オリパス LSM-GB200)により観察を行った。なお、観察は、レーザー波長488nm、X-Yスキャンにより行った。

結果および考察：

未受精卵では卵子表層に表層顆粒(CG)が観察され、細胞質内には認められなかった(図1)。受精卵およびエタノールで刺激を与えた卵子においては、表層のCGは放出されていたが、中央部にCGのものと考えられる蛍光が観察された。また、無染色およびD-マンノース処理した卵子では蛍光が観察されなかった。

以上の観察結果から、受精刺激またはエタノールの刺激により、卵子表層のCGは、表層から放出されることが確認された、さらにCGのすべてが放出するのではなくその一部が卵子細胞質中央に移動している可能性が示唆された。

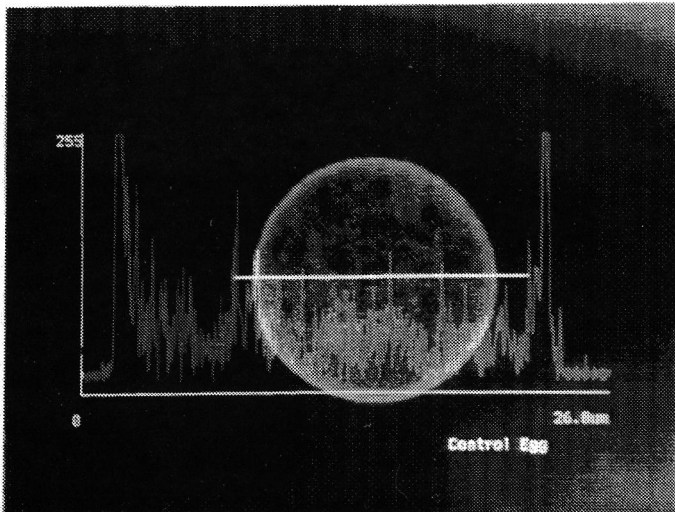


図1 FITC-LCAで染色した未受精卵
グラフは蛍光強度を示している

主要文献

1. Cherr, G. n., Drobnis, E. A., and Katz, D. F. (1988). Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. J. Exp. Zool. 246, 81-93.
2. Ducibella, T., Anderson, E., Alberini, D. F., Aalberg, J. and Rangarajan, S. (1988). Dev. Biol., 130, 184-197.

14 オカダ酸による牛およびハムスター卵子の 卵核胞崩壊 (G V B D)

Stimulatory Effect of Okadaic Acid on Germinal Vesicle Breakdown (GVBD)
of Bovine and Hamster Oocytes

○建本 秀樹・堀内 俊孝・織部 智宏

○Hideke TATEMOTO・Toshitaka HORIUCHI・Tomohiro ORIBE

広島県立大学 生物資源学部 生物資源開発学科

Department of Bioresources, Hiroshima Prefectural University

【目的】 我々は、牛卵胞卵のGVBD誘起には継続的な蛋白合成が必要であり、蛋白合成を阻害するとGVBDは完全に阻害されることを報告した¹⁾。一方、マウスとラットでは蛋白合成阻害剤に関係なくGVBDが誘起される²⁾。GVBDは卵細胞質内のMPF (Maturation Promoting Factor)の活性化によって誘起され、牛卵ではマウスやラットと異なりこのMPFの活性化に蛋白合成が必要であるものと思われる。このように、GVBDを引き起こすMPFの合成過程は種によって異なっているものと見られる。MPFの活性化にはp34^{cdc2}ならびにcyclin Bの合成によるpre-MPF合成、さらにはpre-MPF合成後のprotein phosphatase (1 or 2A) (PPase)の阻害が必要である。このPPaseはオカダ酸によって阻害され、マウス卵ではオカダ酸を添加することでGVBDを誘起する³⁾。

そこで本実験では、蛋白合成阻害剤(cycloheximide; cyclo)、リン酸化阻害剤(6-DMAP)そしてIBMXを牛ならびにハムスター卵の成熟培養時に添加することによりGVBDを阻害し、オカダ酸の添加によりGVBDを誘起することで、牛及びハムスター卵のGVBDにかかわるpre-MPF合成時期を検討した。

【方法】 牛卵胞卵は屠場で入手した卵巣の小卵胞(直径2-8mm)を吸引することで採取し、100 μ l TCM-199 (10% CS, 0.12 IU/ml FSH添加)培養液内で39°C 5%CO₂の気相下で培養した。また、ハムスター卵は、発情周期第1日目の午前中にPMSG 40IUを成熟雌ゴールデンハムスターの腹腔内に投与し、PMSG投与後72時間に卵胞から採取した。ハムスター卵の培養は100 μ l HECM (MEMアミノ酸添加)内37°C 5%CO₂の気相下で行った。卵胞卵は、顆粒層卵丘細胞に覆われているものを用い、顆粒層卵丘細胞の除去はピペッティングによる方法で行った。(1)GVBDの阻害:牛卵では、25 μ g/ml cycloを培養開始後経時的に添加することでGVBD誘起に必要な蛋白合成時期を調べた。一方、

ハムスター卵では、25 μ g/ml cyclo、0.2mM IBMX、2.0mM 6-DMAPを添加することでGVBDの阻害条件を検討した。

(2) オカダ酸によるGVBD誘起：培養開始後、経時的に2.0 μ M オカダ酸を添加することで牛及びハムスター卵の pre-MPF合成時期を検討した。

【結果】 (1) GVBDの阻害：牛卵は顆粒層卵丘細胞の有無にかかわらず、cyclo によってGVBDを阻害された。この阻害効果は前培養7時間後にcycloを添加した区で有意に減少した(図1)。一方、ハムスター卵のGVBDはIBMXと6-DMAPによって完全に阻害されたが、cycloでは69%

(37/54)の卵がGVBDを誘起した。しかし、このGVBD誘起にかかる時間はcontrolと

比較して遅延した。ハムスター卵におけるcycloによるGVBD阻害効果は、IBMX添加培地内で1時間前培養した卵子では全く認められなかった。(2) オカダ酸によるGVBD誘起：採取直後の17%(8/47)の牛卵がオカダ酸によってGVBDを誘起し、7時間以降ではそのGVBD誘起率は有意に増加した(図1)。また、卵胞から採取直後のハムスター卵をオカダ酸とcycloを添加した培地で培養したところcycloだけを添加した場合と比較してGVBD誘起率に差は認められなかった(73% vs 69%)。

【考察】 蛋白合成阻害によって牛卵のGVBDは完全に抑制された。一方、同じゲッ歯類のマウスやラットが蛋白合成に関係なくGVBDを誘起するのに対して、ハムスター卵のGVBDは牛卵ほどではないがcycloによって阻害された。このことは、種によって卵細胞質内のGVBDにかかわる蛋白の合成状態が異なっていることを示している⁴⁾。また、卵胞から採取した直後の卵子ではオカダ酸によってGVBDが誘起されなかったことや、GVBD誘起に必要な培養(蛋白合成)時間とオカダ酸によるGVBD誘起に必要な前培養時間とが、牛およびハムスター卵ともほぼ同様な時間であったことより、蛋白合成阻害剤によるGVBD阻害はpre-MPFの合成阻害によるものと示唆され、これら卵胞から採取直後の卵子の細胞質中にはGVBDを誘起するに十分なpre-MPFは備わっていないものと思われる。

以上より、牛及びハムスター卵はマウス卵とは異なり、GVBD誘起に蛋白合成を必要とし、この蛋白合成はMPFの前駆体であるpre-MPFの合成のためであるものと示唆された。しかし、哺乳動物卵におけるpre-MPFからMPFへの活性化機序には不明な点が多く、今後、pre-MPFの脱リン酸化に関わるMPF活性化因子などの詳細な検討が必要であると思われる。

【主要文献】

- 1) 建本秀樹, 堀内俊孝, 山田 學: 哺乳動物卵子学会誌, 8巻1号: 59-60, 1991.
- 2) Motlik J., Rimkevica Z.: Mol Reprod Dev, 27: 230-234, 1990.
- 3) Schwartz DA., Schultz RM.: Dev Biol, 145: 119-127, 1991.
- 4) Motlik J.: J Reprod Fert (Suppl.), 38: 17-25, 1989.

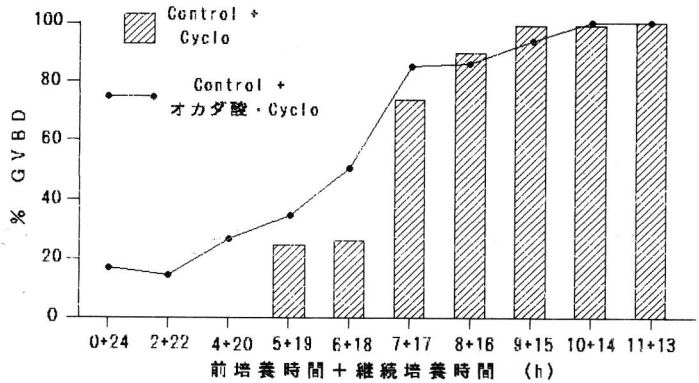


図1. 経時的に添加した25 μ g/ml cycloheximide及び2.0 μ M オカダ酸による牛卵子のGVBD誘起

15 ハムスターとヒト卵子における electrical stimulation による egg activation

Egg activation induced by electrical stimulation
in hamster and human

柳田 薫・木村康之・片寄治男・吉松宣弘・呉竹昭治
月川 奏・阿部利明・星 和彦・佐藤 章

Kaoru YANAGIDA, Yasuyuki KIMURA, Haruo KATAYOSE, Nobuhiro YOSHIMATSU
Syoji KURETAKE, Susumu TSUKIKAWA, Toshiaki ABE, Kazuhiko HOSHI, Akira SATO

福島県立医科大学産婦人科教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Fukushima Medical College

【目的】 ハムスター、ヒトなどの哺乳動物で、精子の卵細胞質内顕微注入による受精を行った場合、受精率が低いことが指摘されている。正常の受精過程では精子が卵子の原形質膜に癒合した時に卵子が activation され、以後卵子内で雌雄前核が形成されるが、この顕微授精法では精子注入後の卵子の activation が起こらない場合があり、受精率が低い原因の一つに考えられている。その対策として 顕微注入卵に対し Caイオノフォアで activation 刺激を行う事がなされている¹⁾。Activation を誘起するものとして Caイオノフォアの他にエタノールや電気刺激があるが、本研究では電気刺激の顕微授精法への応用について報告する。

【方法】 1) 電気刺激の処理液はマニトールなどの非電解質液が頻用されているが、本研究では PBS液を使用することとし²⁾、ハムスター未受精卵での刺激による activation 効果を調べた。ゴールデンハムスターに PMS30IU と HCG30IU による過排卵処理を行い、HCG 投与から15 時間後に卵子を採取し、顆粒膜細胞を0.1%ヒアルロニダーゼで除去して卵子を準備した。卵子の培養には modified Tyrode 液の W/H液³⁾を用いた。電気刺激は島津細胞融合装置SSH-2で 250-500V/cm、100 μ secのパルスを使用し、刺激後は W/H液で 3時間培養し、卵子をアセトカミン染色をして activation (雌性前核の形成と第2極体の放出) の状況を観察した。2) 次にヒトで、細胞質内精子顕微注入を行った卵子にパルスを印加し、受精率への影響を調べた。卵子は重症乏精子・精子無力症の診断で顕微授精の適応となった IVF-ET (体外受精・胚移植) 患者から同意を得て準備した。刺激法は月経周期3日目から HMG300IU を2日間、以後 HMG150IU を卵胞成熟徴候が認められるまで投与し、徴候が有ればHCG10000IUを筋注してその 35時間後に採卵した。採卵後は HTF 液で 5時間培養後 0.1%ヒアルロニダーゼで卵丘細胞を除去し、1個の精子を既に報告した方法³⁾で顕微注入した。精子は蒸留水で処理した。注入 30分後にパルス印加を行い、HTF液中で培養し受精の状況をノマルスキー倒立顕微鏡で 48時間後まで観察した。

【結果】 1) PBS液を電気刺激の処理液としたハムスターでの刺激による activation 効果は、印加電界強度が 375-500V/cm の時がもっとも卵子の activation 率が良く、かつ卵子に対する侵襲が少ない結果が得られた。印加電界強度が 750-1000V/cm ではほとんどの卵子が細胞融解を起こした。mannitol液 (0.3M mannitol+0.9mM CaCl₂) で同様の実験を行ったが、PBS液と同じ結果が得られた。また、PBS液からCa²⁺を除去した培養液ではパルスによる卵子の activation は観察できなかった。2) ヒト顕微授精法での電気刺激を追加した場合の受精率を表に示した。我々が顕微授精卵の activation を促進するために行っている A23187処理 (10 μ M A23187, 5分間処理) の結果も併せて示した。無処理の場合での受精率は 42.7%、A23187処理では 54.4%、パルス処理では57.9%であった。どの群においても、パルス処理後に死滅したものは無かった。

【考察】 卵子のパルス印加の処理液を培養環境の点から考慮すると、非電解質液よりPBS液の方が適している。PBS液でも非電解質液と同じ効果が得られることがわかり、ヒトの卵細胞質内精子顕微注入法に應用したが、従来のA23187と同等の効果をj得ることができ、今後の臨床応用が期待される。

表 ヒトの卵細胞質内精子顕微注入法での受精成績

処理	総卵数	activation卵数 (率)	前核期卵数 (率)	分割卵数 (率)	受精卵数 (率)
無処理	68	30 (44.1%)	23 (33.8%)	6 (8.8%)	29 (42.7%)
A23187処理	103	60 (58.3%)	38 (36.9%)	18 (17.5%)	56 (54.4%)
パルス処理	19	11 (57.9%)	8 (42.1%)	3 (15.8%)	11 (57.9%)

【文献】

- 1) K. Goto, A. Kinoshita, Y. Takuma and K. Ogawa : Fertilisation of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa. Veterinary Record 1990; 127: 517-520.
- 2) L.F. Rickords and K.L. White : Electroporation-induced intracellular Ca²⁺ flux and its effect on murine oocyte activation. Mol. Reprod. Dev. 1992; 31: 152-159.
- 3) K. Yanagida, R. Yanagimachi, S. D. Perreault and R. G. Kleinfeld : Thermostability of sperm nuclei assessed by microinjection into hamster oocytes. Biol. Reprod. 1991; 44: 440-447.

16 活性化卵を用いた牛の核移植における受核卵の核の不活化

Treatment for the Nuclei Inactivation Prior to the Nuclear Transfer in Pathenogenetically Activated Cytoplasm

坂根淳太・牛島仁^{*}・佐賀正彦^{**}・江藤哲雄^{*}・尾川昭三

Junta SAKANE, Hitoshi USHIJIMA^{*}, Masahiko SAGA^{**}, Tetuo ETO^{*}, Shyoso OGAWA

明治大学農学部生殖工学研究室・千葉県畜産センター・**聖マリアンナ医科大学産婦人科教室
Laboratory of Reproduction Engineering, Faculty of Agriculture, Meiji University.,

^{*}Chiba Prefectural Livestock Experiment Station.,

^{**}Department of Obstetrics and Gynecology, St. Marianna University School of Medicine.

目的：ウシにおける核移植では、発生の進んだ胚細胞核を再構築するために、受核卵として第2減数分裂中期（MⅡ期）の未受精卵や活性化卵細胞質¹⁾が用いられている。これらの受核卵の核の不活化は主として第一極体に隣接した細胞質の除去によって行われ、間接的あるいは直接的に細胞質を染色して核の除去を確認している。しかしながら、一連の除核操作（細胞質の除去、染色処置による核の確認、核が除去された卵のみの選別）は煩雑であるために一度に大量の受核卵の作出は困難である。

永井によれば、成熟培養28-32時間目のウシ卵胞卵は、活性化を目的としたエタノール処置によって、活性化処置後4-6時間で高率に第2極体及び1前核を形成する²⁾。

そこで我々は、エタノールによる活性化卵を用いた核移植において、受核卵の第2極体放出の有無が除核の指標に成り得るかについて検討した。

方法：屠畜場由来の牛卵巣から吸引採取した卵胞卵を、5%非働化仔牛血清を含むTCM-199で24時間成熟培養した。ついで卵丘細胞をヒアルロニターゼ(300 I.U./ml)にて除去した後、坂根らの方法³⁾に従ってMⅡ期未受精卵を選別した。細胞質の除去は、サイトカラシンB(5 µg/ml)及びコルセミド(0.1 µg/ml)を含む培養液中で、角田らの方法⁴⁾に準じて実施した。これらの卵に成熟培養30時間で7%エタノールにて7分間の活性化処置を施し、受核卵とした。これらの受核卵を、次の実験に供した。

実験Ⅰ；除去した細胞質にヘキスト(10 µg/ml)を含む培養液で5分間の染色処置を行い、紫外線照射によって核の有無を間接的に判定した。この判定により受核卵を二群に分けた。両者の卵に活性化処置後6時間でヘキスト染色処置を行い、蛍光顕微鏡下で前核及び第2極体放出の有無を調べた。

実験Ⅱ；受核卵を活性化処置後6時間で第2極体放出の有無により二群に分けた。両者の卵

の卵卵腔内に体外受精後3-5日目の8-32細胞期胚の割球を1個ずつ注入した。これらを電氣的に融合処置(75V, 50 μ S; 2回)した。融合が認められた卵はサイトカラシンB (7.5 μ g/ml)を含むTCM-199に1時間浸漬した。洗浄後、これらの核移植胚をTCM-199にて9日間体外培養(39°C, 5% CO₂, 95%air)して2細胞期への分割率、桑実胚及び胚盤胞への発生率を調べた。

統計処理は、 χ^2 -testにて施行した。

結果：実験Ⅰの結果をTable1に示す。活性化処置後6時間において核が存在しない受核卵は第2極体の放出が認められなかった(94個中0個)。これに対し、核が存在する受核卵は92個中78個(85%)が第2極体を放出した。これらのことから卵細胞質に核が存在する受核卵にのみ第2極体を放出することが明かとなった。

Table 1

受核卵の核の有無及び活性化後6時間における第2極体放出率

核の有無	供試 卵数	M II [*] (%)	第2極体有	第2極体無
			1前核有(%)	1前核無(%)
-	94	0(0)	0(0)	94(100)
+	92	14(15)	78(85)	0(0)

*Metaphase II

Table 2

第2極体の有無により分類した受核卵の再構築胚の発生能

第2極体 の有無	供試 卵数	融合 卵数(%)	胚の発達(%)		
			2細胞期胚	桑実胚	胚盤胞
-	228	211(93)	186(88)a	59(28)	28(13)a
+	48	47(98)	32(68)b	7(15)	0(0)b

a>b(P<0.01)

への分割率、桑実胚への発生率のいずれも低く、また、胚盤胞への発生は認められなかった。

考察：核移植において受核卵を作出する手法には、迅速かつ高精度であることが要求される。本手法は除核操作終了後に卵細胞質中の核の有無が判定できる利点がある。このため、従来の方法に比べると一度に大量の受核卵の作出が可能と思われる。また本手法により除核を確認した受核卵から作出した核移植胚における発生率は、これまでの報告と比較して、劣らない成績であった。

以上のことから、受核卵の第2極体放出を指標とした除核方法は、エタノールによる活性化処置後6-9時間を経過した受核卵を用いる核移植において、有効な除核方法であると考えられる。

主要文献：

1. Ushijima H. and Eto T. 1993; Theriogenology 39:333(abs.)
2. Nagai T. 1992; Theriogenology 37:869-875
3. 坂根淳太 1992; 第82回家畜繁殖学会講演要旨 p18
4. Tsunoda Y. et al. 1987; J. Exp. Zool. 242:147-151
5. Westhusin, M.E. et al. 1992; J. Reprod. Fert. 95:475-480
6. Powell, R., and Barnes, F.L. 1992; Molec. Reprod. Dev. 33:53-58

17 マウス卵子体外成熟過程へのチロシンリン酸化の関与

Involvement of tyrosine phosphorylation in the process
of *in vitro* maturation of mouse oocytes

木村裕幸・*遠藤芳広・**大隅一興・**大庭三紀子・鈴木秋悦・野澤志朗

Hiroyuki KIMURA, *Yoshihiro ENDO, **Kazuoki OSUMI,
***Mikiko OBA, Shuetu SUZUKI, Shiro NOZAWA

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室, *遠藤クリニック, **三菱油化ビーシーエル,
***森永乳業生科研

Department of Obstetrics and Gynecology, Keio University School
of Medicine, **Mitsubishi yuka BCL, ***Biochemical Research
Laboratory, Morinaga Milk Industry Co. Ltd.

【目的】哺乳類卵子成熟過程において、蛋白質リン酸化反応が重要な役割を演じていることは、広く認められた事実である¹⁾。一方最近、蛋白質のチロシン残基のリン酸化が、MPFなど細胞周期調節機構との関連や、EGFなど growth factor との関連で脚光をあびている。これまで我々は、チロシンリン酸化阻害剤の genistein によって、マウス卵子のGVBDおよび第1極体放出が用量依存性に抑制されることを報告してきた²⁾³⁾⁴⁾。今回は、genistein と抗ホスホチロシンモノクローナル抗体を用いて、マウス卵子体外成熟過程へのチロシンリン酸化の関与について、新たな知見を得たので報告する。

【方法】4から8週令のDDY系雌マウスに5 IU PMSGを腹腔内投与し、48時間後500 μ M dbcAMPまたは0.2 mM IBMXを含む minimal essential medium (MEM)/polyvinylpyrrolidone (PVP) 下で卵子を採取し実験に供した。

<実験1> genistein+cAMP, genistein+TPA (protein kinase Cのstimulator)のGVBD抑制効果：卵子をIBMX非存在下でgenistein+dbcAMPまたはgenistein+TPAを含むMEM/PVPで培養し、GVBDを観察した。

<実験2> 抗ホスホチロシンモノクローナル抗体のmicroinjectionがGVBDに与える影響：IBMX存在下の卵子に、抗ホスホチロシンモノクローナル抗体(PY20, ICN)を約10 pL microinjectionしたのち、IBMX-freeで培養し、GVBDを観察した。

<実験3> GVBDに伴う蛋白質リン酸化パターンの変化に対するgenisteinの影響：卵子を1 mCi/ml 32 Pを添加した500 μ M dbcAMP含有 phosphate free modified-Krebs Ringer Buffer (-P, m-KRB)/PVPで2時間 radiolabel 後、dbcAMP非存在下に30 μ g/ml genistein含有 -P, m-KRB/PVP/ 32 Pで培養し、SDSポリ

アクリルアミド電気泳動で蛋白質リン酸化パターンの変化を分析した。

【結果】

<実験1> Fig.1 (a) : 15 μ g/ml genisteinと40 μ M dbcAMPの共存

Fig.1 (b) : 15 μ g/ml genisteinと5 η g/ml TPAの共存

図の如く、genisteinとcAMP, genisteinとTPAのGVBD抑制効果は相乗的であった。

<実験2> Fig.2 : PY20をmicroinjectionされた卵子では、control群の卵子に比べ有意にGVBDが遅延した。

<実験3> Fig.3 : genisteinはcAMPと同様に、GVBDに伴う蛋白質リン酸化パターンの変化を阻害した。

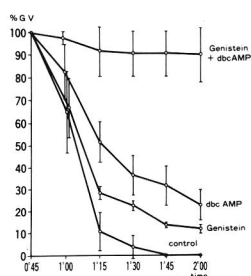


Fig.1 (a)

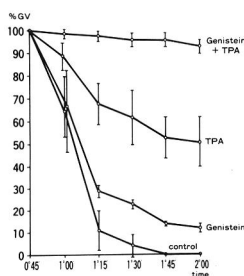


Fig.1 (b)

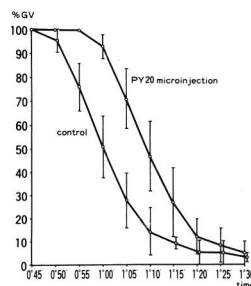


Fig.2

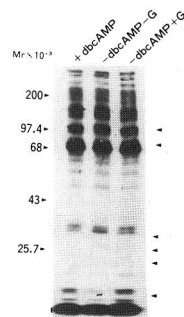


Fig.3

Fig.1 (a) (b). Effects of genistein, dbcAMP, and TPA on GVBD

Fig.2. Effect of PY20 microinjection on GVBD

Fig.3. Effect of genistein on the maturation associated changes of the protein phosphorylation patterns

【結論】マウス卵子体外成熟過程にチロシンリン酸化が関与することが示唆された。

【文献】

- 1) Endo Y, Kopf GS, Schulz RM(1986) J Exp Zool 239:401-409
- 2) 木村裕幸, 遠藤芳広, 福山隆一, 小松節子, 清水信義, 鈴木秋悦, 野澤志朗(1991) 日産婦誌 43:S-358
- 3) Kimura H, Endo Y, Fukuyama R, Oba M, Shimizu N, Suzuki S, Nozawa S(1991) Abstracts of the 7th Annual Meeting of the ESHRE and the 7th World Congress on IVF and Assisted Procreations : 121-122
- 4) 木村裕幸, 遠藤芳広, 大隅一興, 大庭三紀子, 鈴木秋悦, 野澤志朗(1992) 日不妊会誌 37:867

18 牛 卵 胞 内 卵 子 の 体 外 成 熟 に お よ ぼ す 成 長 因 子 の 影 響

Influence of growth factors on
in vitro maturation of bovine follicular oocytes

○小林 敬三・山下 祥子^{*}・星 宏良

Keizo KOBAYASHI, Shoko YAMASHITA^{*}, Hiroyoshi HOSHI

機能性ペプチド研

Research Institute for the Functional Peptides

^{*}東京理化学器械バイオ研

^{*}Biotechnology Laboratory, Tokyo Rikakikai Co., Ltd.

【目的】近年、表皮成長因子（EGF）、トランスフォーミング成長因子 α および β （TGF- α 、TGF- β ）などの成長因子が、卵核胞崩壊（GVBD）や卵丘膨潤を促進することがマウスやラットを用いた実験で示されている^{1) 2) 3)}。また、これらの成長因子が卵胞液に存在し、卵巣構成細胞により合成・分泌されることも明らかにされており、従来卵子の成熟を制御する因子として知られているLHやFSHなどのゴナドトロピンのほかに、これらの成長因子が卵子の成熟に関与している可能性が示唆されている。そこで今回、われわれは種々の成長因子を加えた無血清培地を用いて牛卵胞内卵子の体外成熟を行い、卵丘膨潤、受精および胚盤胞への発生におよぼす影響を検討した。

【方法】屠場で入手した牛卵巣から、切開法により卵丘一卵子複合体を回収し、EGF（10 ng/ml）、TGF- α （10 ng/ml）、TGF- β 1（10 ng/ml）、塩基性繊維芽細胞成長因子（bFGF、10 ng/ml）、インスリン（5 μ g/ml）、LH（5 μ g/ml）+FSH（0.5 μ g/ml）、または胎児牛血清（FBS、10%）を添加したTCM199培地および無添加のTCM199培地で39.5℃、24時間培養し、卵丘の膨潤した卵子数を実体顕微鏡下で数えた。観察終了後、凍結精液を用いてBSA（5 mg/ml）およびヘパリン（7.5 μ g/ml）を含むBO液中で体外受精を行い、6時間培養後、インスリン（5 μ g/ml）を含むTCM199培地に移した。さらに48時間培養後、分割した卵子を計数した。また、EGF、TGF- α 、LH+FSHおよびFBSについては、上記の方法で牛卵子の体外成熟、媒精した後9日間培養を行い、胚盤胞までの発生におよぼす影響を調べた。受精卵はインスリン（5 μ g/ml）を含むTCM199培地でI型コラーゲン（100 μ g/ml）であらかじめコーティングしたディッシュを用い卵丘細胞と共培養した。得られたデータはカイ2乗検定により有意差の検定を行った。

【結果】成長因子等の卵丘膨潤および分割率におよぼす効果を表1に示した。EGF、TGF- α を添加した培地で体外成熟を行った卵子は、無添加コントロールの10%に対し100%膨潤しており、LH + FSH、FBSと同様に卵丘膨潤を強く促進することが示された。またEGF、TGF- α を添加した培地で体外成熟を行った卵子は、それぞれ70%および71%分割し、無添加コントロールの49%に対し有意に高い分割率を示した。LH+FSH、FBSにもこれらと同様に分割率を高める効果が認められた。一方、TGF- β 1、bFGFおよびインスリンは、卵丘膨潤と卵子の分割のいずれにもほとんど効果を示さなかった。

卵子の胚盤胞への発生率も、EGFとTGF- α の成熟培地への添加により有意に高くなり、無添加コントロールの10%に対しEGFで18%、TGF- α で21%の分割率を示した(表2)。発生率が高くなった最も大きな要因としては、これらの成長因子の添加により分割率が51%から80%近くまで増加したことが考えられる。一方、胚盤胞への発生率を分割した卵子数あたりでみると、有為差はないもののわずかに増加しており(無添加コントロールの19%に対しEGFで23%、TGF- α で27%)、これらの成長因子の成熟培地への添加が、分割後の発生も改善している可能性が考えられた。また、LH + FSH、FBSを添加した場合にも、ほぼ同様に胚盤胞への発生率が高まる傾向がみられた。

以上の結果から、同じリセプターに結合することが知られている構造的に類似した2種類の成長因子、EGFとTGF- α が牛卵胞内卵子の卵丘膨潤、体外成熟を促進することが明らかになった。これらの成長因子が実際に *in vivo* でも卵子の成熟に関与しているのかどうか、情報伝達機構がゴナドトロピンとどう異なるのか、という点が今後の問題となるだろう。

Table 1. Effects of growth factors during in vitro maturation on cumulus expansion and cleavage of bovine oocytes

Treatment	No. of oocytes examined	No. and percent of oocytes	
		Expanded	Cleaved
None	127	13 (10%)	62 (49%)
EGF	118	118 (100%)**	83 (70%)**
TGF- α	126	126 (100%)**	89 (71%)**
TGF- β 1	126	7 (6%)	38 (30%)
bFGF	125	17 (14%)	50 (40%)
Insulin	131	30 (23%)	71 (54%)
LH+FSH	119	119 (100%)**	80 (67%)*
FBS	119	117 (98%)**	78 (66%)*

* **Percentages with asterisk(s) differ from the percentage of the control in each column * at $P < 0.01$ and ** at $P < 0.001$.

【文献】

- 1) Downs, S.M. : Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus expansion. *Biol. Reprod.* 1989; 41: 371-379.
- 2) Brucker, C., Alexander, N.J., Hodgen, G.D. and Sandow, B.A. : Transforming growth factor- α augments meiotic maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Molec. Reprod. Dev.* 1991; 28 : 94-98.
- 3) Feng, P., Catt, K.J. and Knecht, M. : Transforming growth factor- β stimulates meiotic maturation of the rat oocyte. *Endocrinology* 1988; 122: 181-186.

Table 2. Effects of EGF and TGF- α during in vitro maturation on in vitro development of bovine oocytes

Treatment	No. of oocytes examined	No. and percent of oocytes		Blastocysts / oocytes cleaved
		Cleaved	Developed to blastocyst	
None	194	98 (51%) ^a	19 (10%) ^c	19%
EGF	196	152 (78%) ^b	35 (18%) ^d	23%
TGF- α	198	156 (79%) ^b	42 (21%) ^d	27%
LH+FSH	195	136 (70%) ^b	31 (16%) ^{c,d}	23%
FBS	198	156 (79%) ^b	38 (19%) ^d	24%

a, b Percentages with different superscripts differ at $P < 0.001$.

c, d Percentages with different superscripts differ at $P < 0.05$.

Distribution and possible physiological role of TNF- α in mouse cumulus - oocyte complexes

Eimei SATO, Yuji TAKAHASHI, Sadahiro AZUMA, Yutaka TOYODA

Department of Reproductive and Developmental Biology,
The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

【方法】解析にはJc1:ICR系の雌マウスを用いたが、卵胞や卵母細胞の成熟はPMSGとhCGを投与して誘起させた。免疫組織化学的解析のために卵巣をブアン液で固定し、パラフィンに包埋の後、4 μ mの連続切片を作製した。一次抗体として抗マウスTNF- α 抗体(a polyvalent rabbit antiserum)を用い、ABC法により発色させた。なお、マクロファージの分布も知るため抗マウスマクロファージ抗体(a polyvalent rabbit antiserum)による染色も行った。一方、卵母細胞の成熟、退行に及ばずTNF- α の影響を調べるために、卵母細胞の培養系にTNF- α を添加してその作用を調べた。すなわち、PMSGとhCGを投与したマウスから卵母細胞を分離し、TNF- α を含むTYH液で培養し、その影響を調べた。

【結果と考察】TNF- α は閉鎖卵胞や膨化した卵丘に観察された。閉鎖卵胞では主として退行中の卵母細胞に強い陽性反応が認められた。hCG投与後、4時間以降に卵母細胞は卵核胞の崩壊を誘起するとともに、卵丘の膨化も誘導したが、膨化卵丘の細胞間質にTNF- α の強い陽性反応が認められた。膨化卵丘の構成細胞にpynosisなどの退行的な変化は認められず、また成熟過程にある卵母細胞には陽性反応は認められなかった。

卵胞の成熟過程において卵胞周囲にマクロファージが集積するようになったが、基底膜を超えて卵胞内部に進入することはなかった。卵丘に観察されるTNF- α はマクロファージの分泌したものを卵丘が蓄積・濃縮したものか、卵丘で強く産生されているのかどちらかであろうと推察された。

卵丘で強く発現しているTNF- α が卵母細胞になんらかの影響を与えている可能性を検討するために、卵母細胞の培養系にTNF- α を添加してその影響を調べた。TNF- α を最終濃度が1m1あたり1ないし10ngになるようにしたところ、卵核胞の崩壊率や極体の形成率に影響はみられなかったが、卵母細胞の断片化が抑制される傾向を示した。すなわち、卵胞から分離した卵母細胞の断片化は培養72時間以降に誘起されるが、培養液にTNF- α が含まれる場合、培養72時間以降の卵母細胞の断片化誘起率は有意に低下した。マクロファージにおけるTNF- α の産生を促進させるリポポリサッカライドは卵子卵丘複合体の卵核胞崩壊、極体の形成、断片化には影響を示さなかった。排卵された卵母細胞の断片化は培養24時間後から誘起されるがTNF- α は排卵卵子の断片化を抑制することにはなかった。以上のことから卵丘に分布するTNF- α は、卵母細胞の成熟の制御因子として機能しているものと推察された。

1. Adashi, E. Y. (1990) The potential relevance of cytokines to ovarian physiology: the emerging role of resident ovarian cells of the white blood cell series. *Endocr Rev* 11:454-464.
2. Zolti, M., Meirom, R., Shemesh, M., Wollach, D., Mashiach, S., Shore, L., Rafael, Z. B. (1990) Granulosa cells as a source and target organ for tumor necrosis factor- α . *FEBS Lett*, 261:253-255.
3. Robby, K. F., Terranova, P. F. (1990) Effects of tumor necrosis factor- α in vitro on steroidogenesis of healthy and atretic follicles of the rat: Theca as a target. *Endocrinology*, 126:2711-2718.
4. Adashi, E. Y., Resnick, C. E., Croft, C. S., Payne, D. W. (1989) Tumor necrosis factor α inhibits gonadotropin hormonal action in nontransformed ovarian granulosa cells. *J. Biol. Chem.*, 264:11591-11597.

Acridine orange 染色法による sperm - egg fusion の判定法

Acridine orange staining as a mean of detecting sperm - egg fusion

片寄 治男・中木 純子・矢沢 浩之・柳田 薫・星 和彦

Haruo KATAYOSE, Jyunko NAKAKI, Hiroyuki YAZAWA

Kaoru Yanagida, Kazuhiko HOSHI

福島県立医科大学産婦人科教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Fukushima Medical College

【目的】卵と精子頭部赤道領域の細胞質膜どうしの融合現象である sperm-egg fusion には、精子の acrosome reaction が不可欠である。Sperm-egg fusion を検出することは、精子の受精能、すなわち capacitation および acrosome reaction の評価に成り得ると考えられる。検出法としては、これまでに、1) 位相差顕微鏡(ハムスターテスト)、2) 電子顕微鏡、3) Sperm tail movement、4) 膜電位変化、5) Hoechst 染色法、6) Giemsa 染色法などが提唱されているが、手技および判定法の難しさ、正確さの面で一長一短があり、ハムスターテスト以外は繁用されていない。今回、我々は sperm-egg fusion の新しい検出法として、精子核クロマチンの性状によって異なる染色性を呈する核酸染色剤 Acridine orange が有効か否か検討したので報告する。

【方法】①卵の準備；卵は過排卵を誘発されたメスゴールデンハムスターの卵管および卵巣から採取し、0.1% Hyaluronidase、0.1% Trypsin の処理により透明帯除去卵(成熟卵および未成熟卵)にして用いた。②精子の準備；ハムスター精巣上体尾部より回収された精子を、m-TALP-3 培養液にて swim-up し、さらに5時間前培養することにより acrosome reaction を惹起されたものを用いた。③媒精；精子濃度 3.0×10^6 /ml に調整された培養液 300 μ l をミネラルオイルで covering し、卵を同液へ移した後10分間培養した(5%CO₂ in air, 37°C)。卵は pipetting したのちに、新鮮な培養液へ移され、さらに10分、20分、35分および50分間培養を継続した。④Acridine orange 染色；カルノイ液(メタノール:氷酢酸=3:1)へ卵を少量の培養液とともに浸漬し、2時間以上酸処理を施した。染色に際しては、卵を実体顕微鏡下に少量のカルノイ液とともにスライドガラス上に滴下、風乾後5分間染色を施し、落射型蛍光顕微鏡(450-490nm; excitation filter, 520nm; barrier filter) で観察した。Acridine orange は、pH 2.5 に調整された phosphate-citrate buffer を溶媒に、最終濃度 0.02% で用いた。

【結果】①成熟卵(metaphase II)を用いた場合；媒精後30分より膨化精子核が観察されはじめ、膨化以前には red 型を呈する intact な核を認める時期が存在した(Table 1.)。②未成熟卵(germinal vesicle stage)を用いた場合；媒精後60分では膨化精子核を認めず、ほとんどが red 型の intact な核に変化した(Table 2.)。尚、精巣上体尾部精子核自体は 100% green 型の蛍光を呈した。

【考察】eggとfusionした精子頭部は、まず卵細胞質内の酵素により精子核蛋白(プロタミン)のS-S結合が還元される。プロタミン分子は次第にヒストンに置換され、最後にmetaphaseの卵細胞質内に存在するfactorにより膨化現象を起こすという一連の過程を経て受精が完了する¹⁾²⁾。核酸染色剤であるacridine orangeは、精子核においてはプロタミン分子内のS-S結合の数により染色性が左右され、成熟精子核(S-S rich)はgreenの、S-S結合の乏しい核はredの蛍光を呈する³⁾。今回の観察により、acridine orange染色は、卵細胞質内で膨化現象を引き起こす以前のintactな精子頭部の段階で、S-S結合の還元を受けた核も同様に識別することが可能であることが証明され、本染色法がsperm-egg fusionの迅速かつ特異的な判定法になり得ることが示唆された。

主要文献

- 1) Zirkin BD, Soucek DA, Chang TSK, Perreault SD. In vitro and in vivo studies of mammalian sperm nuclear decondensation. *Gamete Res.* 1985;11:349-365.
- 2) Kopečný V, Pavlok A. Autoradiographic study of mouse spermatozoan arginine-rich nuclear protein in fertilization. *J Exp Zool.* 1974;191:85-96.
- 3) Kosower NS, Katayose H, Yanagimachi R. Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J Andrology.* 1992;13:342-348

Table.1 Alteration of acridine orange fluorescence during nuclear decondensation.
(10 min insemination)

Incubation period (total)	No. of eggs exam. (no. of exp.)	No. of sperm detected	Condensed nuclei		Decondensed nuclei	
			Green	Red	Partial	Total
10 min	17 (3)	51	30/51 [1.8]	21/51 [1.2]	-	-
20 min	30 (3)	74	16/74 [0.5]	58/74 [1.9]	-	-
30 min	25 (3)	82	7/82 [0.3]	57/82 [2.3]	18/82 [0.7]	0/82 [0.0]
45 min	15 (2)	32	3/32 [0.2]	10/32 [0.7]	17/32 [1.1]	2/32 [0.1]
60 min	12 (2)	33	0/33 [0.0]	1/33 [0.1]	0/33 [0.0]	32/33 [2.7]

[] ; number of sperm detected / one egg

Table.2 Alteration of acridine orange fluorescence of sperm nuclei during post-fusion course in the germinal vesicle stage oocytes.

Incubation period (total)	No. of eggs exam. (no. of exp.)	No. of sperm detected	Diamide treatment	Condensed nuclei		Decondensed nuclei	
				Green	Red	Partial	Total
30 min	17 (3)	65	no	18/65 [1.1]	47/65 [2.8]	-	-
60 min	36 (3)	182	no	3/182 [0.1]	179/182 [5.0]	-	-
	7 (2)	62	yes	62/62 [8.9]	0/62 [0.0]	-	-

[] ; number of sperm detected / one egg

21 限定培地におけるウシ体外受精卵の初期発生に およぼすグルタミンおよびタウリンの影響

Effects of glutamine and taurine in a chemically defined medium on
the development of bovine oocytes fertilized *in vitro*

○林 正黙・丹羽皓二・金 宗興・奥田 潔

Jeong-Mook LIM, Koji NIWA, Jong-Heung KIM and Kiyoshi OKUDA

岡山大学農学部家畜繁殖学教室

Division of Animal Science and Technology, Faculty of Agriculture, Okayama University

【目的】 最近、演者らは無蛋白合成培地におけるウシ胚の初期発生におよぼす幾つかの要因について報告したが¹⁻³⁾, 胚盤胞までの発生率はさほど高くない。一方, 卵管液に含まれるアミノ酸のうち, グルタミンとタウリンの濃度は比較的高く⁴⁾, 体外においてもハムスター⁵⁾やマウス⁶⁾の初期胚の発生を促進することが報告されている。本実験ではウシ胚の初期発生におよぼすグルタミンとタウリンの影響について検討した。

【方法】 未熟卵子を常法通り24時間成熟培養後, カフェイン-ヘパリン法⁷⁾により体外受精した。授精後8時間で卵丘細胞を除去し, 実験により異なる発生培地に卵子を移して184時間継続培養した。基礎発生培地として, 89mM-NaCl, 3.2mM-KCl, 2mM-CaCl₂, 0.5mM-MgCl₂, 25mM-NaHCO₃, 0.35mM-NaH₂PO₄, 0.5mM-ピルビン酸, 10mM-乳酸, 19種類のアミノ酸(1%のMEMとBME)および0.1% PVAを含む修正タイロード液を用いた。実験1では1mM-グルタミンと10mM-タウリンを単独, あるいは組み合わせて添加した。実験2ではタウリンのみを種々の濃度(0-12.5mM)で添加した。

【結果】 実験1 (Table 1): グルタミンとタウリンの何れか一方あるいは両者を添加しても, 授精後144時間の桑実胚までの発生(39-44%)には全く効果が見られなかった。授精後192時間の胚盤胞の割合はタウリン単独添加(33%)において最も高かったが($P<0.05$), グルタミンとタウリンの同時添加における値(26%)と比較して有意差はなかった。実験2 (Table 2): 12.5mMのタウリン添加時の桑実胚の割合(29%)は10mMにおける値(48%)と比較して有意($P<0.05$)に低かったが, それ以外の濃度における値(38-43%)と比較して有意差はなかった。胚盤胞の割合は0-10mMの範囲で濃度依存的に増加し, 10mMで最も高くなったが(35%), この値は7.5mM(29%)以外の濃度における値(17-25%)と比べて有意($P<0.05$)であった。以上の結果から, 19種類のアミノ酸以外にタウリンを添加すること

により, ウシ胚の胚盤胞形成は促進されるが, グルタミンの添加は効果のないことが示唆された。

Table 1. Effect of glutamine and/or taurine in a chemically defined medium on the development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro

Medium with		No. of oocytes cultured	No. and (%) of oocytes developed to		
Glutamine (1mM)	Taurine (10mM)		≥ 2-cell	Morula	Blastocyst
+	+	47	38(81)	19(40)	12(26) ^{a b}
+	-	46	36(78)	18(39)	10(22) ^a
-	+	45	37(82)	20(44)	15(33) ^b
-	-	45	36(80)	19(42)	10(22) ^a

^{a-b}P<0.05 or higher.

Table 2. Effect of different concentrations of taurine in a chemically defined medium on the development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro

Concentration of taurine (mM)	No. of oocytes cultured	No. and (%) of oocytes developed to		
		≥ 2-cell	Morula	Blastocyst
0.0	45	37(82)	17(38) ^{a b}	10(22) ^{a c}
2.5	46	40(87)	19(41) ^{a b}	11(22) ^{a c}
5.0	44	36(82)	19(43) ^{a b}	11(25) ^{a c}
7.5	45	37(82)	18(40) ^{a b}	13(29) ^{a b}
10.0	46	39(85)	22(48) ^b	16(35) ^b
12.5	41	33(80)	12(29) ^a	7(17) ^c

^{a-c}P<0.05 or higher within each column.

【文献】

- 1) 金宗興, 丹羽皓二, 奥田潔, 林正黙, 伊賀浩輔: 第82回家畜繁殖学会講演要旨. 1992; P.21.
- 2) Kim, J.H., Niwa, K., Lim, J.M. and Okuda, K.: Biol. Reprod. 1993; 印刷中.
- 3) 林正黙, 丹羽皓二, 金宗興, 奥田潔, 伊賀浩輔: 第87回日本畜産学会講演要旨. 1993; 印刷中.
- 4) Zaneveld, L.J.D. and Chatterton, R.T.: In Biochemistry and Mammalian Reproduction. 1982; pp.192-193.
- 5) Carney, E.W. and Bavister, B.D.: J. In Vitro Fert. Embryo Transfer. 1987; 4:162-167.
- 6) Dumoulin, J.C.M, Evers, J.L.H., Bars, M., Pieters, M.H.E.C. and Geraedts, J.P.M.: J. Reprod. Fert. 1992; 94:373-380.
- 7) Niwa, K. and Ohgoda, O.: Theriogenology. 1988; 30:733-741.

限定培地におけるラット 1 - 細胞期胚の体外発生に およぼすグルコースおよびリン酸濃度の影響

Effects of glucose and phosphate concentrations on in vitro development
of rat 1-cell embryos in a chemically defined medium

○三好和睦・丹羽皓二・奥田 潔

Kazuchika MIYOSHI, Koji NIWA and Kiyoshi OKUDA

岡山大学農学部家畜繁殖学教室

Division of Animal Science and Technology, Faculty of Agriculture, Okayama University

【目的】 ラット1-細胞期胚を体外で培養すると、2~4-細胞期で完全に発生を停止するが¹⁻²⁾、最近、ハムスター胚の発生培地として開発されたHECM-1³⁾を用いて、ラット1-細胞期胚の一部が胚盤胞にまで発生することが報告された⁴⁾。演者らは、アミノ酸を除去したHECM-1 (mHECM-1)を用いて、ラット胚における早期発生停止の原因が培地中のリン酸の存在にあること、さらにリン酸不在下では、グルコースは1-細胞期から桑実期への発生には影響をおよぼさないが桑実期から胚盤胞期への発生を促進することを明らかにした⁵⁾。本実験では、ラット1-細胞期胚の体外発生におよぼすこれら両者の成分の濃度の影響について検討した。

【方法】 自然交配させたWistar系成熟雌ラット (2-3カ月齢) の卵管を0.1%ヒアルロニダーゼを含むmHECM-1で灌流して1-細胞期胚を回収した。胚をmHECM-1で3回洗浄した後、形態的に正常な胚のみを選んで、37℃、5%CO₂/95%空気の条件下で培養した。実験1では、種々の濃度 (0-10.0 mM) のグルコースを含むmHECM-1で胚を培養した。実験2では、種々の濃度 (0-10.0 μM) のリン酸 (NaH₂PO₄) を含むmHECM-1 (7.5 mMグルコース添加) で胚を培養した。なお、胚盤胞形成率は250 mOsmの浸透圧で最も高いことが知られているので⁶⁾、本実験においてもNaCl濃度を変えることにより、最終的に培地の浸透圧が250 mOsmになるように調整した。培養開始後120時間まで、24時間ごとに位相差顕微鏡下で胚の発生状態を観察した。

【結果】 実験1: Table 1に示すように、培養96時間後の桑実期までの発生率 (68-79%) には異なるグルコース濃度間で有意差は認められなかったが、培養120時間後の胚盤胞形成率は7.5 mMまではグルコース濃度の上昇にともなって増加し、0 (26%) および2.5 (33%) mMよりも7.5 (67%) および10.0 (60%) mMの濃度で有意 (P<0.05) に高くなった。実験2: Table 2に示すように、きわめて低濃度

(0.001-0.01 μM) のリン酸存在下では、胚盤胞までの発生は全く影響されなかった。しかし、0.1および1.0 μM と濃度の上昇とともに、それぞれ桑実期および4細胞期への発生が阻害され、10.0 μM では2細胞期で発生は完全に停止した。

Table 1. Effect of concentration of glucose on development of 1-cell rat embryos in mHECM-1 without amino acids*

Conc. of Glucose (mM)	No. of embryos cultured	24 h	72 h	96 h	120 h
		2-cell (%)	≥ 4 -cell (%)	\geq Morula (%)	Blasto- cyst(%)
0	47	47(100)	44 (94)	32(68)	12(26) ^a
2.5	48	48(100)	46 (96)	33(69)	16(33) ^a
5.0	48	48(100)	44 (92)	33(69)	22(46) ^{a,b}
7.5	48	47 (98)	46 (96)	38(79)	32(67) ^b
10.0	47	47(100)	47(100)	37(79)	28(60) ^b

*Osmolarity of the medium was adjusted to 250 mOsm.

^{a-b} P<0.05 or higher.

Table 2. Effect of concentration of phosphate on development of 1-cell rat embryos in mHECM-1 without amino acids*

Conc. of Phosphate (μM)	No. of embryos cultured	24 h	72 h	96 h	120 h
		2-cell (%)	≥ 4 -cell (%)	\geq Morula (%)	Blasto- cyst(%)
0	45	45(100)	44(98) ^a	36(80) ^a	27(60) ^a
0.001	45	44 (98)	42(93) ^a	32(71) ^a	24(53) ^a
0.01	45	45(100)	43(96) ^a	37(82) ^a	28(62) ^a
0.1	45	45(100)	43(96) ^a	21(47) ^b	15(33) ^b
1.0	45	45(100)	11(24) ^b	0 (0) ^c	0 (0) ^c
10.0	45	45(100)	0 (0) ^c	0 (0) ^c	0 (0) ^c

*The medium was supplemented with 7.5 mM glucose and osmolarity was adjusted to 250 mOsm.

^{a-c} Within each column, P<0.05 or higher.

【文献】

- 1) Mayer, J.F. and Fritz, H.I.: J. Reprod. Fert. 1974; 39: 1-9.
- 2) Whittingham, D.G.: J. Reprod. Fert. 1975; 43: 575-578.
- 3) Schini, S.A. and Bavister, B.D.: Biol. Reprod. 1988; 39: 1183-1192.
- 4) Kishi, J., Noda, Y., Narimoto, K., Umaoka, Y. and Mori, T.: Human Reprod. 1991; 6: 1445-1448.
- 5) 三好和睦, 丹羽皓二, 奥田 潔, 舟橋弘晃: 第82回家畜繁殖学会講演要旨. 1992; P. 22.
- 6) 三好和睦, 丹羽皓二, 奥田 潔: 第87回日本畜産学会講演要旨. 1993; 印刷中.

23 マイトマイシン処理した細胞との共培養が
 ウシ体外受精由来胚の発生に与える影響

Effect of mitomycin treated somatic cells
on development of bovine embryo
co-cultured in vitro

○富沢宗高・下平乙夫・今井 敬・後藤裕司・奥地弘明・斎藤政宏・堂地 修

Munetaka TOMIZAWA, Itsuo SHIMOHIRA, Kei IMAI, Yuji GOTO,
Hiroaki OKUCHI, Masahiro SAITO, Osamu DOUCHI

農林水産省家畜改良センター技術部

Department of Technology National Livestock Breeding Center

【目的】ウシ胚の体外培養では、一般的に卵丘細胞との共培養法が用いられている。しかしながら、卵丘細胞の増殖とともに培養胚が卵丘細胞に付着し、物理的に圧迫を受ける現象が観察される。このため、定期的に培養胚を卵丘細胞より遊離する必要がある。特に、核移植などの透明帯を切開する処理を加えた胚では、胚盤胞までの発生培養で、卵丘細胞と付着が起こり、圧迫を受け割球が透明帯外に飛び出すなどの胚発生への悪影響がみられる。我々は、胚の付着が少ない共培養法の確立を目的とし、共培養細胞として継代が可能であり、培養条件の設定が容易であるウシ胎児繊維芽細胞、STO細胞、マウス胎児繊維芽細胞を使用し、細胞の増殖を抑制するマイトマイシンで細胞を処理し、胚の発生及び胚との付着について検討したので報告する。

【方法】試験に用いた共培養細胞は、試験区としてウシ胎児繊維芽細胞（以下BF区）、STO細胞（以下STO区）、マウス胎児繊維芽細胞（以下MF区）、対照区として卵丘細胞（以下CC区）の4種類である。試験区の細胞は、培養フラスコの底面いっぱいに広がった状態でマイトマイシン¹⁾（ $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ，SIGMA）に2～3時間感作させ、細胞を不活化し、洗浄後12時間培養を行った。その後、0.2%EDTA加0.25%トリプシン溶液で細胞を剥離し、遠心洗浄した後、TCM199+5%CS溶液中に細胞数が $5\times 10^4/\text{ml}$ になるよう再浮遊させた。この浮遊液で35mmシャーレ上に500 μl のドロップを作成し、ミネラルオイルで覆い24時間培養し使用した。CC区は、当センターの常法に従い、胚から剥離した卵丘細胞を500 μl のドロップに移し使用した。供試胚は、屠場卵巢より採取し、当センターの常法で体外成熟、体外受精

後直ちに、0.5%ヒアルロニターゼで処理し、ピペッティングにより卵丘細胞を完全に剥離した後、それぞれの試験区に移し培養を行った。発生培養は、9日間行い、48時間ごとに培養液を半量交換し、胚盤胞への発生を観察した。また、発生した胚盤胞の一部についてはヘキスト (No33342) で染色²⁾ し、細胞数を計測した。さらに、24時間ごとに胚と共培養細胞の付着を観察し、シャーレを振盪後胚が細胞に付着しているものを付着 (+)、シャーレを10回叩打後付着しているものを付着 (++) とした。

【結果】ウシ体外受精胚をマイトマイシン C で処理した各種共培養細胞で培養した結果、分割胚の胚盤胞への発生成績は表1のとおりであり、各区とも40%以上の発生率を示し、胚盤胞への発生率に差を認めなかった。さらに、出現した胚盤胞の細胞数を計測した結果についても、各区分において細胞数に差を認めなかった。また、共培養細胞と胚の付着に付いてでは、STO、BF、MF区はCC区より有意に付着 (+) の割合が低かった。一方、STO、BF、MF区間では有意差を認めなかった。付着 (++) では各区分全てで有意差を認めなかった。以上より、今回マイトマイシン C で処理した試験区の細胞間では、胚との付着と胚発生成績に付いて差を認めなかったが、CC区と胚盤胞の発生成績について差がなく、胚との付着は弱いことから、核移植胚などの透明帯に処理を加えた胚の培養に有効である可能性が示された。

表-1 マイトマイシン処理した細胞と共培養した胚の胚盤胞への発生成績

共培養細胞	供試胚数	胚盤胞数 (%)
卵丘細胞 (無処理)	162	72 (44.4)
STO細胞	226	96 (42.3)
牛胎児繊維芽細胞	232	96 (41.4)
マウス胎児繊維芽細胞	216	102 (47.2)

表-2 マイトマイシン処理した細胞と共培養した胚の胚盤胞の細胞数

共培養細胞	供試胚数	平均細胞数±SD
卵丘細胞 (無処理)	51	99.5±30.8
STO細胞	44	109.6±37.2
牛胎児繊維芽細胞	46	110.6±38.4
マウス胎児繊維芽細胞	56	110.0±35.0

表-3 マイトマイシン処理した共培養細胞と胚との付着成績

共培養細胞	延べ供試胚数	付着の状態	
		+(%)	++ (%)
卵丘細胞 (無処理)	2164	1206(55.7)a	13(0.6)
STO細胞	2521	249(9.9) b	0(0.0)
牛胎児繊維芽細胞	2591	353(13.6)b	7(0.3)
マウス胎児繊維芽細胞	2528	187(7.4) b	7(0.3)

(異符号間に有意差あり、 $P < 0.05$)

【文献】

- 1) Robertson, E.J., Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach. IRL Press. Oxford and Washington, DC. 71-112. 1987.
- 2) V.G. Pursel, R.J. Wall, C.E. Rexroad, Jr., R.E. Hammer and R.L. Brinster: A Rapid Whole-Mount Staining Procedure for Nuclei of Mammalian Embryos. Theriogenology, 24: 687-691. 1985.

24 Brinster 修正培養液と Dulbecco 修正培養液
によるキメラマウス胚の培養と移植成績

Development of chimeric mouse embryos cultured in
modified Brinster's medium and modified Dulbecco's medium

川島康成・高橋寿太郎・安田泰久

Yasunari KAWASHIMA, Jutaro TAKAHASHI and Yasuhisa YASUDA

岩手大学農学部動物機能開発学教室

Laboratory of Animal Breeding and Reproduction,
Faculty of Agriculture, Iwate University

目的: 当教室では、Dulbecco 修正培養液を用いたキメラ動物の作出において、ラットでは成功しているが、マウスでは未だ成功していない。そこで今回は先の研究で問題となった、他の一般的なマウス初期胚の培養液を用いた研究成績と比較して、その胚の発生速度が遅かった点を考慮して、一般的なマウス初期胚の培養液の一つである Brinster 修正培養液を用いて、その比較検討を行うと共に、さらに発生速度を早めるためにそれぞれの培養液を修正し、また、移植技術においても改良を試みてみた。

方法: 動物は BALB/c 系と C57BL/6 系の 2~3 カ月齢雌マウスを胚採取用に、ICR 系 3~4 カ月齢雌マウス（経産、または未経産）を胚移植用にし、胚採取用雌マウスは PMSG、hCG、45~48 時間間隔で投与して過排卵誘起をさせて、hCG 投与後それぞれ同系成熟雄マウスと同居させて、その妊娠 2.5~2.75 日目に子宮および卵管より灌流法により 8~16 細胞期胚を回収した。キメラ胚は集合法により作出し、透明帯除去には pronase 0.4% 培養液を用い、胚の集合には phytohemagglutinin P 0.2% 培養液を用いた。作出した集合キメラ胚は流動パラフィン下の微小滴培養液内で培養を行い、培養開始後 6、18、24 時間目に胚の発生過程の観察を行った。なお、各集合キメラ胚を区別するために、一つの微小滴培養液当たり胚は一つとした。また、余った胚をコントロールとして無処理、同条件で培養、観察した。胚盤胞~拡張胚盤胞に発生した胚は、予め準備させた偽妊娠 2.5~3 日目の胚移植用雌マウスの子宮内に移植した。なお、移植の際の麻酔はアバーチン腹腔内投与、あるいはキシラジン、ケタミン併用筋肉内投与とした。

結果: Dulbecco修正培養液とBrinster修正培養液を比較すると、後者の方が発生速度が早く (Fig. 1, Fig. 2-c)、これは他の研究にみられる一般的なマウス初期胚の培養液を用いた集合キメラ胚の発生速度とほぼ同じであった。また、どちらの場合もグルコース濃度が0.1%よりも0.2%が発生速度が早かった (Fig. 1, Fig. 2-a, c, d)。さらに予め2時間の卵巣浸漬を行った培養液ではDulbecco修正培養液でより発生速度が早くなり、Brinster修正培養液ではほとんど変わらなかった (Fig. 2-a, b, d, e)。しかし、卵巣浸漬を行った培養液ではどちらの培養液の場合も発生した胚の形状が非常に良好であった。

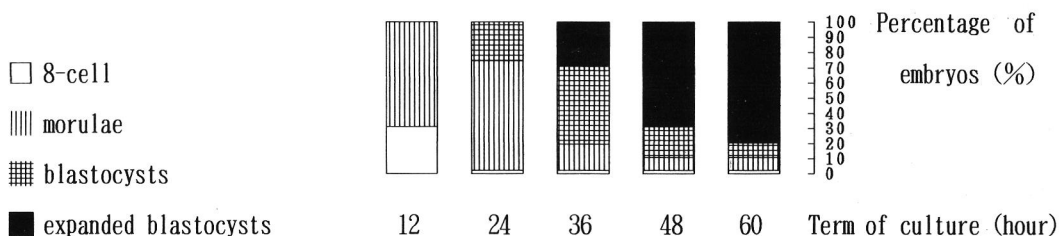


Fig.1 Development of chimeric embryos *in vitro* in DMEM. (masahiro TAKAHASHI, 1992)

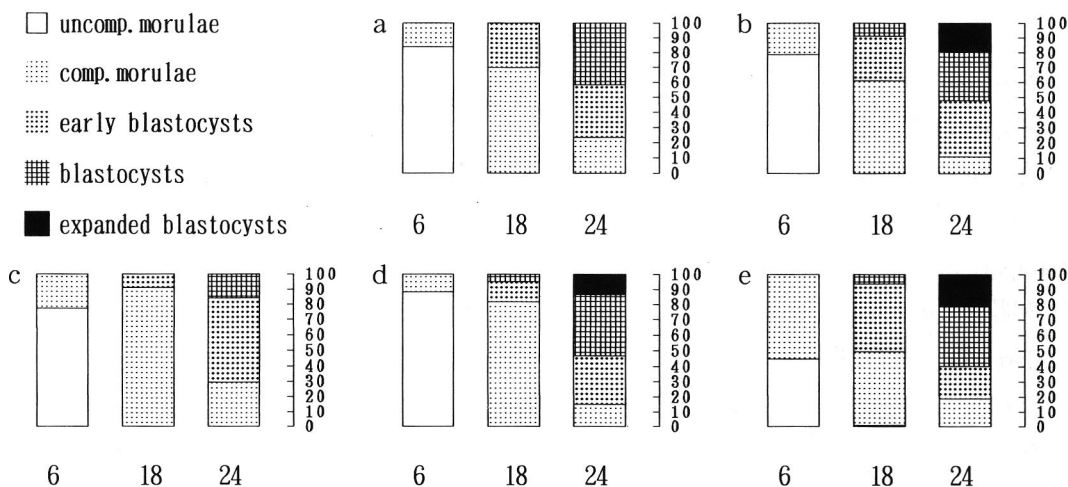


Fig.2 Development of chimeric embryos *in vitro*. a. DMEM containing the 0.2% glucose. b. a incubated with ovaries for 2 hours in advance. c. Brinster's modified medium. d. Brinster's modified medium containing the 0.2% glucose. e. d incubated with ovaries for 2 hours in advance.

なお、移植後胎子の発生がみられたのはBrinster修正培養液、およびその修正培養液のみでDulbecco修正培養液では胎子の発生はみられなかった。

文献:

1. Mullen, R. J., and Witten, W. K. (1971). Relationship of genotype and degree of chimerism in coat color to sex ratios and gametogenesis in chimeric mice. *J. Exp. Zool.* 178, 165-176.

Coculture of mouse ovum and macrophage

野原 理, 齊藤英和、小池数与、田中栄一、齊藤隆和、平山寿雄、広井正彦

M Nohara, H Saito, K Koike, E Tanaka, T Saito, T Hirayama, M Hiroi

山形大学産婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology
Yamagata University School of Medicine

(目的) 体外受精胚移植 (IVF-ET) において、媒精時の未受精卵の出現はIVF-ET成功率の低下を招いている。未受精卵の出現の原因としては、精子減少症、精子無力症等の精子側の因子、および卵透明帯の異常などが考えられている。

当院ではこのような男性不妊症、および原因不明の受精障害のある症例に対し、micro-manipulatorにより囲卵腔内に精子を注入するsubsonal insertion、あるいは26ゲージ針により透明帯にmechanical incisionを加えるpartial zona dissection(PZD)が行われている。

Cohenら¹⁾はPZDを行った胚を移植する際にステロイドの投与を行い、妊娠率の向上が認められたことを報告している。このことは免疫抑制をすることが、PZD処理胚の胚自体、あるいは着床に関する障害を少なくすることが考えられ、PZD処理胚が通常では免疫担当細胞により障害を受ける可能性があることを示唆している。そこで今回我々はPZDによってzona perucidaにmechanical incisionを加えることが、胚のマクロファージに対する防御にどのような影響を与えるのかを、マウスの卵を用いて検討を加えた。

(方法) B6C3F1雌マウスに妊馬血清性腺刺激ホルモン10単位、48時間後にhCG10単位を投与し交尾させたのち、24時間後に卵管を摘出、灌流することにより1細胞の受精卵を採取し培養に供した (各条件ともn=100)。またPZDは実体顕微鏡下で26ゲージ針を用いて施行した。一方マクロファージはマウス腹腔内にピシバニール1KEを投与し、48時間後に腹腔内洗浄液より採取したのち30万/mlの濃度で胚との培養に供した。胚にPZDを施行せずマクロファージを加えないコントロール群をC群とし、PZDを施行せず、マクロファージを加えた群をM群、PZDを施行し、マクロファージを加えた群をP群とした。また、C群、

M群、P群においてマクロファージを賦活化するために培養液中にOK432を加えた群をそれぞれC'群、M'群、P'群とした。この6群間において胚の発育、分割状況を24時間ごとに実体顕微鏡で観察し、各時間ごとの、理想的な胚発育段階に達した胚の率を調べた。

(結果) 24時間後の理想発育段階に達した胚の率は、C,M,P,C',M',P'群でそれぞれ100、100、98、100、100、100 (%)であり各群間に差を認めなかった。48時間後ではそれぞれ83、93、95、27、88、88 (%)であり、コントロールC群、C'群で発育の遅れが認められ、特に培養液中にOK432を加えたC'群では、発育率の有意な低下が認められた ($P<0.001$)。培養72時間後ではそれぞれ、69、80、81、31、85、85 (%)であり、M,P,M',P'群で有意に発育率が高かった ($P<0.001$)。また、M群とP群、およびM'群とP'群の間に差を認めなかった。また、96時間後でもそれぞれ、62、74、72、15、84、85 (%)とM,P,M',P'群で有意に発育率が高く ($P<0.001$)、M群とP群、M'群とP'群の間に差を認めなかった。

以上の結果より、マクロファージを培養系に加えても、胚の発育は障害されず、むしろ胚の発育は傷害されず、むしろ胚の発育を促進していた。また、PZDにより透明帯mechanical incisionを加えても、マクロファージによる胚への発育障害は認めなかった。

表1 マウス胚理想段階発育率

	Control (C)	PZD (P)	Macrophage +PZD (M)	Control (C')	PZD (P')	Macrophage +PZD (M')
24(h)	100	100	98	100	100	100
48	83	93	95	27	88	88
72	69	80	80	31	85	85
96	62	74	74	15	85	84
120				0	72	82

(文献)

- 1)Cohen J, Malter H, Elsner C, Kort H, Massey J, Mayer M: Immunosuppression supports implantation of zona pellucida dissected human embryos: Fertility and Sterility. 1990;53:662-665

26 細胞質を増加したマウス 2 細胞期胚の発生能

Effects of the increased volume of cytoplasm on the developmental ability of mouse 2-cell embryos in vitro and in vivo

○加藤容子・大黒寿・角田幸雄

Yoko KATO, Toshi OHGURO, Yukio TSUNODA

近畿大学農学部畜産学教室

Laboratory of Animal Reproduction, College of Agriculture, Kinki University,

目的：演者らは第85回日本畜産学会で、2細胞期胚の細胞質量を50%まで減少させると、コントロール胚と比べて、少ない細胞数で早い時期に胚盤胞を形成すること、また、それらをレシピエントマウスへ移植後、正常な子供へ発育することを報告した。本実験では、核に対する細胞質の量を2倍あるいは4倍に増加させて、体外での発生能ならびにレシピエントマウスへ移植後の発生能について検討した。

方法：細胞質2倍胚の作製には2細胞期胚を用いた。すなわち、CD-1系雌マウスに48時間間隔でPMSGとhCGを各5IUずつ腹腔内投与した後、同系雄と交配させてhCG投与後43時間目にM2液で卵管を灌流して採取した。回収した胚は、サイトカラシンBとノコダゾールで前処理したのち、マイクロマニプレータを用いて片側割球より核を除去した。ついで、0.3モルのシュークロース液に移して平衡させたのち、電極幅1mmの電気融合用チャンバーをもちいて交流(0.5MHz, 15V, 15sec)および直流(1kV/cm, 100 μ sec)をそれぞれ2回流することにより割球融合させた。コントロールは片側割球核を除去した胚とした。細胞質4倍胚の作製には、上述の2細胞期胚を約24時間培養して得られた4細胞期胚を用いた。すなわち、3つの割球より核を除去して同様の電気刺激条件により4割球全てを融合させた。また、コントロールとしては3つの割球より核を除去した胚を用いた。これらの細胞質増加胚は、体外培養を継続し2細胞への分裂ならびに胚盤胞への発生を観察した。胚盤胞へ発育したものは、培養開始後70時間目に細胞数を計測、あるいは系統の異なる妊娠マウスの子宮へ移植して個体への発育を検討した。

結果: Table 1 に細胞質増加胚の体外発生能ならびに移植成績を示した. 細胞質を2倍に増加させた胚は, 441個のうち256個(58%)が胚盤胞へ発生し, コントロール胚(33/73, 45%)の発生率よりも有意に高い値となった. そのうち82個を10匹のレシピエントマウスへ移植した結果, 36匹(44%)の産子を得られた. 培養開始後70時間目の細胞数は 60 ± 20 であり, コントロール胚の 42 ± 11 と比べて有意に増加した. 細胞質を4倍に増加させた胚では, 400個のうち86個(22%)が胚盤胞へ発生したが, コントロール胚の発生率(12/18, 67%)に比べて有意に低い値となった. そのうち78個を11匹のレシピエントへ移植した結果, 2匹(3%)の産子を得られた. また, 培養開始後70時間目の胚盤胞期での細胞数は 22 ± 6 であった. 以上の結果より, 細胞質量を2倍に増加させた胚ではコントロール胚と比較して細胞数が増加する傾向がみとめられ, 細胞周期が速くなる可能性が示唆された. 今後, 胞胚腔形成時の細胞数の計測などを詳細に検討する必要があると考えられた. また, 細胞質を4倍に増加させた胚由来の産子を得られたことから, 4細胞期胚核の全能性が示された.

Table 1. In vitro and in vivo development of mouse embryos whose cytoplasmic volume was increased two or fourfold.

Cytoplasmic volume	No. of embryos				
	used	cleaved	developed to blastocyst	transferred	developed to young
Control *	73	—	33(45)	—	—
twofold	441	333(76)	256(58)	82	36(44)
Control **	18	18(100)	12(67)	—	—
fourfold	400	—	86(22)	78	2(3)

* 2-cell embryos whose one nucleus was enucleated

** 4-cell embryos whose three nuclei were enucleated

27 牛 体 外 受 精 胚 の 初 期 発 生 速 度 が
そ の 後 の 発 育 成 績 に 及 ぼ す 影 響

Effect of cleavage speed at early embryonic
stage on subsequent developmental potential
of IVF-derived bovine embryos.

○後藤裕司・下平乙夫・富澤宗高・今井敬・奥地弘明・斎藤政宏・堂地修

Yuji GOTO, Itsuo SHIMOHIRA, Munetaka TOMIZAWA, Kei IMAI,
Hiroaki OKUCHI, Masahiro SAITO, Osamu DOUCHI

農林水産省家畜改良センター技術部

Department of Technology National Livestock Breeding Center

【目的】最近の核移植技術のドナー細胞には発生初期胚が容易に得られる体外受精胚が用いられることが多くなっている。しかし、体外受精の初期分割胚の胚盤胞への発生率は40～50%程度であり、発生途中で発育が停止するものが多く、ドナー細胞の初期胚の選定の良否が再構築胚の胚盤胞期への発生成績に影響することが考えられる。一方、牛の体外受精技術において媒精後48～72時間に行う初期発生検査時の胚の細胞数には大きなばらつきが認められ、発生初期の細胞周期がその後の胚盤胞への発生率に影響を与えているとする報告もある¹⁾。そこで、核移植のドナー細胞に供する体外受精由来の初期胚を選定する段階で、胚盤胞への発生率が高い胚を利用するため、発生初期段階の発生速度により胚を選別して、より発生率の高い胚の選別方法が確立できないか検討した。

【方法】当センターの常法に従い、成熟培養、媒精を行い卵丘細胞と共培養し、媒精後24～48時間で卵丘細胞から胚を剝離し、実体顕微鏡下で細胞数を計測した。そして、以下の実験1～3により初期胚の細胞数により区分した胚を卵丘細胞が単層発育した発生培地で継続培養し、媒精後7～9日目までの胚盤胞への発生率を調査した。

実験1．媒精後48時間目に①17細胞期以上、②8～16細胞期、③2～7細胞期、④未分割卵に区分

実験2. 媒精後24時間目に①5細胞期以上、②3～4細胞期、③2細胞期、④未分割卵に区分

実験3. 媒精後24時間目に実験2と同様4区に区分し培養を継続し、24時間後(媒精後48時間目)にさらに細胞数を計測し、各4区をそれぞれ8細胞期以上、7細胞期以下の2区に分け、計8区に区分

【結果】実験1. 48時間目で4区に分けた結果、胚盤胞の発生率は、17細胞期以上区及び8～16細胞期区が他の区に対して有意に高い結果となった($p<0.01$)。

実験2. 24時間目で4区に分けた結果、胚盤胞の発生率は2細胞期区が63%と他の区に対して有意に高い結果となった($p<0.01$)。

実験3. 実験1及び2の結果をもとに24時間目で2細胞期区、48時間目で8細胞期以上区に選別した区の胚盤胞発生率は80%と他の区に対して有意に高い成績が得られた($p<0.01$)。

【考察】今回の結果より、体外受精胚の初期発生(媒精後48時間目まで)の発生速度が早い胚(細胞周期の短い胚)は胚盤胞への発生率は低く、その後の発育性が劣ることが確認された。また、この現象を利用して初期段階で胚盤胞への発生率の高い群を作成することが可能であることが確認された。今後は、この方法により選別した胚盤胞への発生率の高い初期胚を用いて、その細胞周期の確認及び核移植への応用を検討する必要があると考えられた。

【文献】

1) L.Plante and W.A.King : Effect of time to first cleavage on hatching rate of bovine embryos in vitro. Theriogenology 1992; 37: 274.

表-1 48時間選別後の発生成績

Cleavage stage	No. of embryos	No. of blastocyst			
		Day7	Day8	Day9	Total(%)
16<	23	5	4	3	12 (52.2) ^a
8~16	97	27	24	12	63 (64.9) ^a
2~7	76	2	2	3	7 (11.7) ^b
mono	52	0	0	0	0 (0.0) ^b
Total	232	34	30	18	82 (35.3)

a vs b ($p<0.01$)

表-2 24時間選別後の発生成績

Cleavage stage	No. of embryos	No. of blastocyst			
		Day7	Day8	Day9	Total(%)
4<	51	2	6	6	14 (27.5) ^{b,d}
3~4	110	16	18	8	42 (38.2) ^{b,d}
2	132	42	26	15	83 (62.9) ^a
mono	168	3	8	7	18 (10.7) ^{b,c}
Total	232	34	30	18	82 (34.6)

a vs b, c vs d($p<0.01$)

表-3 24時間・48時間選別後の発生成績

Cleavage stage		No. of embryos	No. of blastocyst			
24hr	48hr		Day7	Day8	Day9	Total(%)
4<	8≤	33	3	2	4	7 (21.2) ^b
	<8	8	0	0	0	0 (0.0) ^b
3~4	8≤	40	3	7	3	13 (32.5) ^{b,d}
	<8	17	1	3	1	5 (29.1) ^{b,*}
2	8≤	60	28	11	9	48 (80.0) ^a
	<8	42	4	7	6	17 (40.5) ^{b,d}
mono	8≤	12	2	3	0	5 (41.7) ^{b,d}
	<8	156	1	4	9	14 (9.0) ^{b,c,f}
Total		368	42	37	32	111 (30.2)

a vs b, c vs d($p<0.01$) e vs f($p<0.05$)

Influence of Serum on In Vitro Hatching of Equine Blastocysts

保地 真一・ヨアヒム ブラウン・小栗 紀彦

Shin-ichi HOCHI, Joachim BRAUN and Norihiko OGURI

帯広畜産大学 総合馬学講座

Laboratory of Horse Production

Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

目的：胚盤胞の体外培養系の確立は、凍結融解や顕微操作などの種々の過程を経た後の胚の生存性を検定する手段として有効である。加えて、ウマ初期胚盤胞の囲卵腔に形成され孵化後も胚を被覆している“カプセル”の生理的な役割を調べるうえにも重要である。我々はこれまでに、ウマ胚盤胞の体外孵化（透明帯からの脱出）には3つの型があり、それは培養開始時の胚の発育ステージによって影響されることを報告した¹⁾。とくに初期胚盤胞では体外孵化の時間的経過及び孵化時のカプセル消失という点で生理的な孵化とは明らかに異なっていた。本研究では、ウマの初期胚盤胞を用いて体外培養におけるそれらの孵化様式に及ぼす培養液に添加した血清の影響について検討した。

方法：北海道和種及びサラブレッド牝馬を用い、排卵確認から144～168時間に子宮灌流法によって非外科的に採取した初期胚盤胞を実験に供した。培養液にはTCM199に10%の非働化試験血清を加えたものを用いた。4種類の血清、(1)市販のウシ胎児血清（以下FBSとする）、(2)市販のウマ胎児血清（FES）、(3)排卵日の牝馬から調製したドナー血清（DMS-0）、(4)妊娠8日目の牝馬から調製したドナー血清（DMS-8）を比較した。体外培養は37℃、5%CO₂ 95%空気の気相下で、200μlの小滴中にて10日間行った。それぞれの胚の孵化様式の観察は12時間毎に行い、24時間毎に撮影した写真に基づいて胚の外径を測定した。また、カプセルの所在を明らかにするために、培養の終了時に胚と脱出後の空の透明帯の両方を酢酸エタノール(1:3)で固定し、1%オルセインで染色した。それぞれの血清中のEstradiol-17β(E₂)、及びProgesterone(P₄)値はEIAにより定量した。

結果：それぞれの血清を添加した培養液におけるウマ初期胚盤胞の孵化について表1に要約した。培養開始前の胚の外径は平均で165.3～180.3μmの範囲であった。培養開始から2.0～3.8日でウマ胚は孵化を開始した。そのときの胚の外径は286.2～405.4μmであった。孵化を完了するまでに3日間以上の培養時間が必要なSQ型やTU型の孵化が最もよく観察されたが、FES群で3例中1例、DMS-0群で5例中3例が最長でも12時間以内に孵化

を完了するES型の孵化様式をとった。培養期間内での胚の最大外径は添加した血清によって異なり、平均で 489.0~1505.3 μm であった。どの血清下で孵化を完了した胚においても、カプセルは脱出後の透明帯の中に認められた。血清中の E_2 及び P_4 の濃度(ng/ml)はFBSで 0.074及び 0.800、FESで 9.150及び 8.350、DMS-0で 0.013及び 2.390、そしてDMS-8で 0.010及び 6.340であった。

Table 1. In Vitro Hatching of Equine Early Blastocysts

Serum supplement	Diameter (μm , mean \pm S.D.) of embryos at			Hatching manner *
	recovery	hatching	maximum	
FBS	168.0 \pm 8.2 (n=5, Day6.5)	405.4 \pm 36.8 ^a (n=5, Day10.0)	942.2 \pm 307.7 ^a (n=5, Day16.3)	SQ=4, TU=1 ES=0, NH=0
FES	180.3 \pm 8.1 (n=3, Day6.0)	341.7 \pm 113.5 ^{a,b} (n=3, Day 8.0)	1505.3 \pm 666.3 ^a (n=3, Day15.5)	SQ=1, TU=1 ES=1, NH=0
DMS-0	168.0 \pm 8.3 (n=5, Day6.2)	322.5 \pm 55.6 ^b (n=4, Day10.0)	677.5 \pm 224.1 ^{a,b} (n=4, Day15.0)	SQ=1, TU=0 ES=3, NH=1
DMS-8	165.3 \pm 5.7 (n=6, Day6.3)	286.2 \pm 42.3 ^b (n=5, Day 8.6)	489.0 \pm 99.1 ^b (n=5, Day14.7)	SQ=4, TU=1 ES=0, NH=1

* SQ= Squeezing through a small opening in the ZP, TU= Tearing up the ZP
ES= Escaped suddenly from the ZP. NH= Not hatching.

^{a, b} Different superscripts within columns differ significantly (PLSD-test, $P < 0.05$).

考察：ウマ胚盤胞は体内においては排卵後8日目頃、その外径が約 300 μm のとき透明帯を消失することが報告されている^{2, 3)}。一般的に血清を用いる試験では、血清のロットによって結果にかなりの変動があることを考慮しなければならない。しかし、ウマの血清を添加した群(FES, DMS-0, DMS-8)において孵化開始時の胚の外径が体内でのそれに近かった。動物種に特異的な何らかの要因が孵化開始の引き金を引く可能性が示唆された。また、ES型の孵化様式はウマの拡張胚盤胞を体外孵化させたときによく観察され、FES群とDMS-0群で見られたこの孵化様式は初期胚盤胞の拡張過程が培養系で再現された結果かもしれない。一方、いずれの培養条件下でもウマ胚盤胞は透明帯だけでなくカプセルからも脱出しており、この点で生理的な孵化とはなお異なるものであった。

文献：1) Hochi, S. et al., 1993, Equine Vet. J., Suppl. (in press).

2) Betteridge, K. J. et al., 1982, J. Anat., 135, 191.

3) Wilson, J. M. et al., 1986, Biol. Reprod., 34 (Suppl.1), 101.

29 マウス成熟卵及び初期胚における cyclooxygenase 活性の生理的意義

Biological significance of cyclooxygenase in mature oocyte and early embryo

高見毅司¹ 坂元秀樹¹ 佐藤和雄¹

加藤珠美² 江角真理子²

Takeshi Takami¹ Hideki Sakamoto¹ Kazuo Satoh¹

Tamami Katou² Mariko Esumi²

¹日本大学医学部産婦人科学教室

¹Department of obstetrics and Gynecology, Nihon University,
school of Medicine

²日本大学総合医学研究所

²Medical Research Institute, Nihon University

〔目的〕受精、着床周辺期において卵自身の機能調節が重要な生理学的意義を持つことは疑う余地がないが、その詳細については全く明らかにされていない。我々はこの時期におけるprostaglandin(以下PG)合成阻害が正常な受精-着床processを抑制することより、卵-胚におけるPG合成が重要な意味をもつと考え、PG合成律速酵素cyclooxygenase(以下PGHS)の存在とその機能的意義を成熟卵及び初期胚において検討した。

〔方法〕8週令雌マウスにPMS5単位投与後、48時間後にHCG5単位投与し、さらに18時間後に卵管膨大部より成熟卵を採取した。卵の培養は、MW液(超純水100ml中にNaCl 640mg, KCl 35.6mg, KH₂PO₄ 16.2mg,

MgSO₄ 29.4mg, NaHCO₃ 190.0mg, pyruvic acid sodium salt 2.5mg, Glucose 100.0mg, Calcium lactate 46.0mg, streptomycin 5.0mg, penicillin G 7.5mg, phenol red 100 μ l, 100mMEDTA 50 μ l, 20mM β -Mercaptoethanol 150 μ l BSA 3mg/ml)中で、ミネラルオイル法、37°C, 5%CO₂, 5%O₂, 90%N₂気相でおこなった。一方、8週令雄マウス精巢上体管よりTYH液(超純水100ml中にNaCl 697.6mg KCl 35.6mg KH₂PO₄ 16.2mg MgSO₄ 29.3mg NaHCO₃ 190.0mg, pyruvic acid sodium salt 2.5mg, Glucose 100.0mg, CaCl₂ 19.0mg, streptomycin 5.0mg, penicillin G 7.5mg, 100mMEDTA 50 μ l, 20mM β -Mercaptoethanol 150 μ l BSA 4mg/ml)を用い、精子を採取し体外受精を行なって同調受精卵を得た。

〔実験1〕ヒアルロニダーゼ処理した成熟卵80個、受精卵80個を用いて徳島大学山本尚夫教授より提供されたPGHSモノクローナル抗体(PGHS mAb)でWestern blotによるPGHS蛋白検出をおこなった。

「実験2」成熟卵100個、受精卵100個よりreverse transcription-PCR法によってPGHSmRNAの検出をおこなった。陽性コントロールは、顆粒膜細胞を用い、primerは教室早川 智博士より提供された5-GACCACTCGCCTCATCCTTA 3-GCCATCTCCTTCTCTCCTGTを使用した。

「実験3」成熟卵にPGHSmAb、OXFORD BIOMEDICAL RESEARCH INC社製PGHS純正で吸収したPGHSmAb及びマウスIg-G2aを各々8pIを細胞質内へmicroinjectionした。穿刺の影響はsham刺入をコントロールとして検討した。

〔結果〕1) 成熟卵、受精卵ともPGHS蛋白が検出された。

2) 成熟卵、受精卵ともPGHSmRNAは検出されなかったが、 β -actinは検出された。顆粒膜細胞あるいは顆粒膜細胞付着成熟卵ではPGHSのメッセージが検出された。

3) PGHSmAbをmicroinjectionした卵はすべて死滅した。(n=15)PGHS吸収PGHSmAb注入では40%が2細胞になり(n=12),マウスIG-G2aを注入した卵の50%が2細胞まで成長した(n=8)。キャピラリー刺入のみは60%が2細胞になった(n=10)。

x2分析では、PGHSmAbと比較して吸収実験 $p<0.05$ IG-G2a実験 $p<0.05$ sham実験 $p<0.001$ といずれも有意に2細胞への成長が観察された。

〔考察〕成熟卵、受精卵ともPGHSの存在が確認された。

microinjectionの実験結果よりPGHSの存在、すなわち正常な卵-胚におけるPG合成が受精卵の分化に関わっていると推測できる。受精の直前(成熟卵)、直後(初期胚)のいずれにおいてもPGHSmRNAが検出されなかったことより、受精周辺期においては卵-胚中ではPGHS遺伝子のtranscriptionはなく、それ以前より卵の中に存在するPGHS活性に依存しているものと推定された。

牛 IVF 卵子の初期発生時の MALATE DEHYDROGENASE 活性と中間代謝物質との関係

Relationship between malate dehydrogenase
activity and energy substrates of fresh
bovine embryos derived from IVF

○ 柳 在雄, 菅原七郎

Zae Young RYOO, Shichiro SUGAWARA

東北大学農学部家畜繁殖教室

Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Agriculture, TOHOKU University

【目的】われわれは、牛初期胚はPentose Phosphate Pathway (PPP) とEmbden-MeyerHof (EMP) の両経路によってglucoseを酸化していると報告¹⁾した。他方, Riegerら²⁾は、牛初期胚のglutamate代謝はTricarboxylic acid cycle (TCA) により酸化されることを示した。しかし、牛卵子についてTCA系の中間代謝物質の代謝はマウス、ウサギおよびラットなどの実験小動物卵子のそれらと比べて研究報告が少なく、不明の点が多い。そこで、牛卵子において、TCA系を経て代謝される中間物質のエネルギー代謝とその後の卵子の発生能との関係を調べることを目的として、酵素周期法により新鮮卵子1個当りのMDH (malate dehydrogenase) 活性とそれらに関連している中間代謝物質の代謝能との関連で胚盤胞への発生率を検討した。

【方法】牛胞卵子の体外受精および体外培養による初期胚の作出は屠場で採取した牛卵巣からの卵胞卵子を用い、体外受精法により初期胚を作出した。体外受精は既報³⁾に従った。MDH活性の測定は酵素周期法によって行った。すなわち、1.0 μ lの酵素反応液 [50mM 2-amino-2-methyl-L-propanol-HCl buffer (AMLP) (pH 9.8) およびPBS (-) (pH 7.3)] とともに、特製スライドガラス上に卵子1個を入れ、ミネラルオイルで覆い、37℃で15分間反応させた。その後0.2M NaOH を加え、反応を停止させ過剰のNADを破壊した。MDHの酵素反応によって生成されたNADHをサイクリングにより増幅した。サイクリングは37℃で1時間行なった。サイクリングで増幅された反応生成物のNADHを顕微測光装置により蛍光度を測定した。

【結果】酵素反応液をAMLPおよび PBS (-) bufferとし、牛初期胚のMDH活性を調べた結果、AMLP bufferの酵素反応はPBS (-) より有意に高かった ($P < 0.05$)。しかし、PBS (-) の条件での胚盤胞ま

での発生率が, 8細胞期胚と桑実期胚でそれぞれ 20.0 (1/5) および 50.0% (3/6) に対し, AMLP bufferの条件ではすぐ形態的な変化を起こし変性し初め, その後の発生が認められなかった。媒精5日目の正常卵子のMDH活性 ($11.19 \pm 0.86 \times 10^{-6} \text{ mol/embryo/hr}$) が退行卵子 ($6.63 \pm 0.87 \times 10^{-6} \text{ mol/embryo/hr}$) より高く ($P < 0.05$), 胚盤胞への発生率も退行卵子の場合全く発生しなかったが, 正常卵子では16個の卵子中9個 (56.3%) の卵子が胚盤胞に発生した。中間代謝物質とMDH活性の関連を調べるため, 酵素反応液に中間代謝物質をそれぞれ添加し酵素反応を測定した結果, malate, α -ketoglutarate, glutamateと同時にDNPの存在下でMDH活性が高かったことは, これらの中間代謝物質を牛初期胚のエネルギー源として利用できる可能性を示した (Table 1)。

Table 1. Malate dehydrogenase activity of bovine morulae with substrates

Substrates	No. of embryos measured	MDH activity* ($\times 10^{-6} \text{ mol/embryo/hr}$)
Non-substrate	7	7.57 ± 0.72^a
Malate	7	11.16 ± 0.53^b
α -ketoglutarate	7	16.83 ± 1.58^c
Glutamate	7	15.01 ± 1.15^d
iso-citrate	7	9.02 ± 0.19^e
Dinitrophenol	10	17.57 ± 1.83^f

a vs b,c,d,f; b,c,d vs e; b vs c,f: $P < 0.05$. *Mean \pm S.E.

【文献】

- 1) Sugawara, S. and Ryoo, Z.Y. (1992): Estimation for enzymatic activity of energy metabolism and subsequent development of fresh bovine embryos from in vitro fertilization. Proc. 12th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., Hague, 3, 1339-1341.
- 2) Riger, D. and Guay, P. (1988): Measurement of the metabolism of energy substrates in individual bovine blastocysts. J. Reprod. Fert., 83, 589-591.
- 3) 正木 全, 柳 在雄, 菅原七郎, 正木淳二 (1991): 牛体外受精卵子の幹細胞化に関する研究. 哺乳卵研誌, 8, 27-33.

31 ウシ培養胚におけるプロスタグランジン E₂の
免疫組織化学的検出

Immunohistochemical Demonstration of Prostaglandin E₂
in Cultured Bovine Embryos

四谷伊公子・柳 在雄*・松本浩道*・菅原七郎*・新村末雄**・石田一夫**

Ikuko YOTSUTANI, Zae Yoong RYOO*, Hiromichi MATSUMOTO*,
Shichiro SUGAWARA*, Sueo NIIMURA** and Kazuo ISHIDA**

新潟大学大学院自然科学研究科, *東北大学農学部生物生産科学科,

**新潟大学農学部農業生産科学科

Graduate School of Science and Technology, Niigata University

*Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tohoku University

**Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Niigata University

目的：ウサギの胚盤胞¹⁾がプロスタグランジン(PG) E-Aと PGFを含有していることが、1975年に初めてラジオイムノアッセイ(RIA)を用いて報告されて以来、ウサギばかりでなくヒツジ、ブタ、ウシおよびウマの胚盤胞も各種のPGを含んでいることがRIAによって確かめられている。また、これらの動物の胚盤胞とカニクイザルおよびヒトの胚盤胞はPGの合成能と分泌能を持っていることもin vitroの実験で調べられている。さらに最近、PGの合成と分泌は、ヒト4細胞胚およびウシ桑実胚でもみられるといわれている。一方、未分割卵および分割胚におけるPGの検出はNiimuraとIshida^{2, 3)}によって間接蛍光抗体法を用いて、マウス、ラット、ハムスターおよびウサギの未受精期から胚盤胞期までの卵と胚について試みられているのみで、これら以外の動物の分割胚がPGを含有しているかどうかは明らかではない。そこで今回は、体外で成熟・受精後培養して得られた未受精期から胚盤胞期までのウシの卵と胚について、PGE₂の検出を間接蛍光抗体法を用いて試みた。

材料および方法：観察した卵と胚は、未受精期、受精未分割期(媒精後6時間)、2細胞期(媒精後1日)、4細胞期(2日)、8細胞期(3日)、16細胞期(3ないし4日)、桑実胚期(4ないし5日)、初期胚盤胞期(6ないし7日)、拡張胚盤胞期(8ないし9日)および孵化胚盤胞期(10日)のもので、黒毛和種卵巣から採取した卵母細胞を体外で成熟・受精させて培養したものである。

PGE₂を検出するために、採取した卵と胚を前法²⁾を若干修正した方法に従って処置した。すなわち、卵丘細胞の付着している卵についてはこれをヒアルロニダーゼで除去し、次いですべての卵と

胚を0.2%プロナーゼ・PBS (pH7.4)で処置して透明帯を取り除いた後、10%ホルマリン・PBS(pH7.4)に室温で60分間固定した。固定後、PBSで洗浄し、0.1% TritonX-100・PBSに浸漬して透過処置を施した。次いで、ウサギ抗PGE₂血清(Polysciences, U.S.A.)に室温で60分間浸漬した。なお対照として、ウサギ抗PGE₂血清のかわりに正常ウサギ血清に浸漬した卵と胚を用いた。これらの卵と胚は、FITC標識ヤギ抗ウサギIgG (Cappel, U.S.A.)に室温で30分間浸漬した。観察は落射蛍光顕微鏡装置で行った。

結果：ウシの卵と胚をウサギ抗PGE₂血清とFITC標識ヤギ抗ウサギIgG に浸漬すると、細胞質に蛍光が出現した。この蛍光は、ウサギ抗PGE₂血清のかわりに正常ウサギ血清で処置した卵と胚には出現しなかったため、この蛍光がPGE₂の存在を示していることが確かめられた。

PGE₂の存在を示す蛍光は、1細胞期から桑実胚期までの卵と胚では弱かったが、胚盤胞ではいずれの時期のものも強かった。また1細胞卵において、PGE₂の蛍光の強さは未受精期と受精未分割期の間で相違なかった。

考察：交尾後13、15および16日のウシ胚盤胞はPGFとPGE₂を含有していることがRIA によって確かめられている⁴⁾。また、交尾後6日の桑実胚期から交尾後20日の胚盤胞期までのウシ胚はアラキドン酸から各種のPGを合成できることが調べられており、とくに交尾後12日以前の胚ではアラキドン酸は主にPGE₂に代謝されるといわれている⁵⁾。しかしこれまでに、ウシの未分割卵や分割胚がPGを含有しているかどうかは調べられていない。

本実験において、培養したウシの卵と胚についてPGE₂の検出を試みたところ、PGE₂の存在を示す蛍光は未受精期から胚盤胞期までのすべての卵と胚に認められ、とくに胚盤胞で強かった。従って、発生初期のウシ胚は常にPGE₂を含有しているとともに、PGE₂含量は胚盤胞で多くなることがうかがわれた。なお、ウシの桑実胚と胚盤胞はPGE₂を合成する能力のあることがすでに確かめられているので、本実験の桑実胚と胚盤胞で検出されたPGE₂は胚自身が合成したものであることが考えられた。またこれまでに、16細胞期までのウシ胚におけるPG合成を直接証明した報告はみられないが、本実験の培養胚でPGE₂が検出されたことから考えると、1細胞期から16細胞期までの胚に存在するPGE₂は外部から流入したものではなく、胚自身によって合成されたものであることが推察された。

主要文献

- 1) Dickmann, Z. and Spilman, C.H. (1975). Science, 190, 997-998.
- 2) Niimura, S. and Ishida, K. (1987). J. Reprod. Fert., 80, 505-508.
- 3) Niimura, S. and Ishida, K. (1989). Jpn. J. Anim. Reprod., 35, 222-227.
- 4) Shemesh, M., Milaguir, F., Ayalon, N. and Hansel, W. (1979). J. Reprod. Fert., 56, 181-185.
- 5) Hwang, D.H., Pool, S.H., Rorie, R.W., Boudreau, M. and Godke, R.A. (1988). Prostaglandins, 35, 387-402.

Frozen Storage of Hamster 8-Cell Embryos

堀内俊孝・高橋典子

Toshitaka HORIUCHI, Noriko TAKAHASHI

広島県立大学 生物資源学部 生物資源開発学科

Department of Bioresources, Hiroshima Prefectural University

【目的】1971年のマウス胚の凍結保存の成功以来、牛、羊、ウサギなど多くの哺乳動物において胚の凍結保存が可能になってきている。ゴールデンハムスターにおいては、凍結融解後の形態正常率は高く「1」、凍結融解直後に胚移植することで産子が得られる「2」ことが報告されているが、体外培養が困難であったため、その成功は限定されたものとなっている。最近、グルコースと無機リン酸塩がハムスター 8 細胞期胚の発生に阻害的に作用することが明らかにされ「3, 4」胚培養が改善された。そのため、本研究は、凍結融解ハムスター 8 細胞期胚の体外発生に及ぼす凍結培地と希釈培地の影響及び凍結融解における 2～3 の要因について検討し、凍結融解後の胚盤胞期への発生率を改善した。

【方法】発情周期第 1 日目(Ovulation Discharge放出日)の午前10時にMSG 15iuを成熟雌ゴールデンハムスターの腹腔内に注射した。3 日目の夕方、成熟雄ハムスター 1 匹と同居させた。交尾は、翌日の午前中に膣スミアの精子で確認した。交尾確認日をDay 1としてDay 3の午後1時に卵管と子宮を灌流し、8 細胞期胚を採取した。ハムスター胚は、0.2mlの培地に移したのち、等量の1.5M DMSOを除々に添加し 5 分間静置後、1.5M DMSO(4℃)に移し10分間で 0.25mlストローに配置し封入した。次に、4℃から-7℃まで-1℃/分で冷却し、植氷後 10分間保持し-35℃まで-0.3℃/分で冷却、10分間保持し液体窒素に投入した。凍結ハムスター胚は37℃温水中で融解後35mm培養皿に取り出し、0.3Mシヨ糖液(0.25ml)を加え 5 分間静置、さらに希釈液を加え 耐凍剤の除去を行った。体外培養には、PVAをBSA(0.1mg/ml)に置き換えたHECM3「5」を用い、10%CO₂, 10%O₂, 80%N₂の気相条件下 37℃で 24～36時間培養した。『実験 1』体外発生に及ぼす胚回収液(M2 vs Hepes-HECM3)の影響 『実験 2』凍結培地及び希釈培地としてPB1またはHepes-HECM3を用いたときの凍結ハムスター 8 細胞期胚の胚盤胞期への発生率 『実験 3』凍結培地におけるBSA濃度(4% vs 0.4%)の影響 『実験 4』耐凍剤の添加方法の影響(2段階 vs 1段階) 『実験 5』各種耐凍剤の影響(1.5M DMSO, PROH, Ethylene glycol, Glycerol)

【結果】『実験 1』ハムスター 8 細胞期胚を M2 液で回収し、HECM3で体外培養すると胚盤胞期への

発生率は30%(24/79)で、回収液としてHepes-HECM3を用いると胚盤胞期への発生率は100%(62/62)となった。『実験2』凍結培地としてPB1を用いた場合、希釈培地がPB1またはHepes-HECM3にかかわらず胚盤胞期への発生率は各0%(0/57)、6%(3/53)と低率であった(表1)。一方、Hepes-HECM3を凍結培地として用いた場合、希釈培地がHepes-HECM3のとき胚盤胞期への発生率は85%(80/94)と有意に高いが、PB1を用いると11%(7/66)と有意に低下した。『実験3』凍結培地のBSA濃度を4%から0.4%に低下させても融解後の胚盤胞期への発生率に影響はなかった(85% vs 80%)。『実験4』DMSOを2段階で添加しても1段階で添加しても、胚盤胞期への発生率に有意な差は認められなかった(87% vs 88%)。『実験5』耐凍剤として1.5M DMSO, PROH, Ethylene glycol, Glycerolを用いた場合、胚盤胞期への発生率は各85%(80/94), 52%(28/54), 54%(32/59), 33%(19/58)で、本実験の条件では1.5M DMSOで最も高い発生率となった。

Table 1. Effect of freezing and dilution medium on development of hamster frozen and thawed 8-cell embryos in vitro

Freezing medium	Dilution medium	No. embryos frozen and thawed	No. (%) normal embryos	No. (%) embryos developed to		
				Morulae	Blastocysts	Mor.+Blast.
PB1	PB1	57	50(88) ^a	17(30)	0(0) ^a	17(30) ^a
PB1	Hepes-HECM3	53	47(89) ^a	7(13)	3(6) ^{ab}	10(19) ^a
Hepes-HECM3	PB1	66	60(91) ^a	13(20)	7(11) ^b	20(30) ^a
Hepes-HECM3	Hepes-HECM3	94	84(89) ^a	13(14)	80(85) ^c	93(99) ^b

a, b, c Values with different superscripts within a column differ ($P < 0.05$).

【考察】ハムスター8細胞期胚の凍結保存においては、通常凍結保存に用いられているPB1ではなく、グルコースと無機リン酸塩を含まないHepes-HECM3を凍結培地及び希釈培地として用いることで、高率に胚盤胞期へ発生するが明らかとなった。このことは、ハムスター胚が凍結融解及び希釈環境において培地の組成に著しく影響を受けることを示している。一方、ハムスター胚は光を含めた外的環境に対して非常に感受性が高いことが知られているが、凍結融解に伴う物理的影響は小さく、形態的正常率は高い割合であった。本研究では、緩慢・急速凍結—急速融解法によっても、緩慢凍結—緩慢融解法[1, 2]と同様に胚が生存することを示した。各種耐凍剤のうちDMSOで高い生存率が得られたが、各耐凍剤で至適処理条件が異なるため、さらに検討が必要である。

【主要文献】

- 1) Tsunoda Y, Soma T, Sugie T: In Frozen Storage of Laboratory Animals, Zeilmaker GH(Ed) Gustav Fisher Verlag, PP 129-138, 1981.
- 2) Ridha MT, Dukelow WR: Anim Reprod Sci, 9:253-259, 1985.
- 3) Seshagiri PB, Bavister BD: Biol Reprod, 40:599-606, 1989.
- 4) Seshagiri PB, Bavister BD: Biol Reprod, 40:607-614, 1989.
- 5) Barnett DK, Bavister BD: Biol Reprod, 47:297-304, 1992.

1.5M Ethylene Glycolで 凍結された牛体外受精胚からの 耐凍剤除去条件の検討

Effect of various dilution procedures of
IVF embryos frozen by 1.5M Ethylene Glycol
for direct transfer method.

下平乙夫、後藤裕司、今井敬、富澤宗高、斎藤政宏、奥地弘明、堂地修
Ituso Shimohira, Yuji Goto, Kei Imai, Munetaka Tomizawa, Masahiro Saito
Hiroaki Okuchi, Osamu Douchi

家畜改良センター 技術部
Department of technology, National Livestock Breeding Center

【目的】最近牛の凍結胚の移植方法として融解後一切の操作を必要とせず直接移植可能なDirect Transfer 法（以下Direct法）の検討がなされている。Direct法に用いる耐凍剤にはEthylene Glycol[1,2]のほか、Propylene Glycol[3]、Sucrose+Glycerol[4]など様々な耐凍剤が用いられているがその特性については必ずしも十分検討されていないのが現状である。とくにDirect法に用いる耐凍剤を使って凍結された胚を子宮内直接移植を想定してPBSに直接投入により耐凍剤除去後した際の生存性は、必ずしも受胎成績を反映する安定的な成績が得られていない。そこで、本研究ではEthylene Glycolを用いて凍結された牛体外受精胚の体外での耐凍剤除去条件と生存性との関係を脱出胚盤胞への発生率を指標として検討した。

【方法】**実験1**：体外受精由来胚135個を1.5MのEthylene Glycol 溶液を耐凍剤としてVoelkelら[2]の方法を一部修正して凍結し、融解後は、以下の3区に分けて耐凍剤（Ethylene Glycol）を除去し、その後の生存性判定試験に供した。

（5分－室温区）：融解後5分後にストローから胚を取り出し、室温（22～23℃）下で直径35mmの小型シャーレに入った3mlのCS－PBSに胚を直接浸漬して10分間静置することにより耐凍剤を除去した。

（5分－加温区）：融解後5分後に37℃に加温した3ml CS－PBSに直接浸漬、10分間静置して耐凍剤除去を行った。CS－PBSの加温は直径35mmの小型シャーレに3mlのCS－PBSを入れ、胚を浸漬する15分前から37℃に設定した加温板（北里メディカル）上で加温して供試した。

（40分－加温区）：融解後40分間ストローを室温に静置後、ストローから胚を取り出し、（5分－加温区）と同様加温したCS－PBSに浸漬して耐凍剤を除去した。

実験2：凍結融解胚の耐凍剤除去までの経過時間が生存性に与える影響を調べた実験1の対照として、体外受精胚56個を用いて新鮮胚のEthylene Glycol 内感作が生存性に与える影響を調べた。即ち、胚を無作為に2群に分け、室温下で1.5MのEthylene Glycolに浸漬してそれぞれ25分間

及び60分間経過後に37℃に加温したCS-PBSに移し、10分間静置して耐凍剤の除去を行い、その後の胚の生存性を調べた。

生存性の判定法：凍結胚、新鮮胚とも洗浄後顆粒膜細胞が単層発育した5%子牛血清加m-199培地の小滴内で48時間培養し、脱出胚盤胞期以上に発育した胚を生存胚とした。

【結果】**実験1：**(5分ー加温区)の生存率は53.5% (23/43) であったのに対して、(5分ー室温区)は39.2% (20/51) で有意差は認められないものの、室温区に比べて加温区において耐凍剤除去後の生存性が高い傾向が見られた ($P < 0.10$)。40分経過後に加温して耐凍剤除去を行った(40分ー加温区)の生存率は24.4% (10/41) と(5分ー加温区)に対して有意に低い生存率を示した ($P < 0.05$) (表1)。

実験2：25分間Ethylene Glycol 内で感作させた新鮮胚の生存率は64.3% (18/28) であり、さらに35分間静置し、計60分間Ethylene Glycol 内で感作させた胚の生存率は60.7% (17/28) で、両区の生存率に有意な差は認められなかった (表2)。

表 1

1.5M Ethylene Glycolで凍結した牛体外受精胚の各種条件下で耐凍剤除去後の生存性

試験区	除去温度	経過時間	供試胚	生存胚*	生存率
5分ー室温区	22~23℃	5min	51	20	39.2% ^d
5分ー加温区	37℃	5min	43	23	53.5% ^{1*}
40分ー加温区	37℃	40min	41	10	24.4% ^b

a vs b $P < 0.05$ c vs d $P < 0.10$

* 生存胚：48時間培養後に脱出中の胚盤胞期以上に発育した胚を生存胚とした

表 2

新鮮牛体外受精由来胚の1.5M Ethylene Glycol中での経過時間と除去後の生存率

E G 除去温度	E G 感作時間	供試胚	生存胚*	生存率
37℃	25min	28	18	64.3%
37℃	60min	28	17	60.7%

* 生存胚：48時間培養後に脱出中の胚盤胞期以上に発育した胚を生存胚とした

【考察】今回の実験結果から、Ethylene Glycol は他の耐凍剤と比べて分子量が小さいので、細胞内における分子の動きは環境温度の影響を受け易く、PBS直接浸漬により耐凍剤を除去する場合、その環境温度に留意する必要があることが確認された。また、Ethylene Glycol は新鮮胚に毒性は示さないが、融解後は耐凍剤除去までの経過時間が長くなることにより胚の生存性が損なわれる可能性が示唆された。

- 1) 堂地修, 今井敬, 高倉宏輔. (1991) 第84回日本畜産学会大会講演要旨 p.61.
- 2) Voelkel SA, Hu YX. (1992) Theriogenology 37: 23-38.
- 3) Suzuki T, Yamamoto M, Ooe M, Sakata A, (1990) Theriogenology 34: 1051-1057.
- 4) Massip A, Van Der Zwalm P, Ectors F. (1987) Theriogenology 27: 69-79.

34 外 来 I V F — E T 4 年 間 の 成 績

Results of IVF - ET in outpatient clinic for 4 years

○小林善宗・本田育子・鈴木隆弘・井上正人

Yoshimune KOBAYASHI, Ikuko HONDA,
Takahiro SUZUKI, Masato INOUE

東海大学医学部産婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine
Tokai University

【目的】IVF - ETを外来ベースで行うようになってから、すでに4年が経過しており、今回その成績を集計し検討を加えた。

【対象・方法】1988年6月からIVF - ETをすべて外来ベースで行っているが、1992年5月までの実質4年間の成績を集計した。この期間に761名に対して1367回のIVF - ETを行った。対象の平均年齢は 33.5 ± 3.8 才、平均不妊期間は 8.0 ± 3.5 年（いずれもmean \pm S.D.）であった（表1）。

表1. 対象

	(mean \pm S.D.)
期間	1988. 6~1992. 5
患者数	761名
ET周期	1367周期
平均年齢	33.5 ± 3.8 才
平均不妊期間	8.0 ± 3.5 年

表2. IVF - ET成績

妊娠患者数	331名
妊娠数	379
対患者妊娠率	43.5%
対ET周期妊娠率	27.7%

表3. 採取卵子数、受精卵数、胚数

	(mean \pm S.D.)
採取卵子数	7.5 ± 4.3
採取成熟卵子数	6.6 ± 3.8
受精卵数	5.9 ± 3.6
正常受精卵数	4.4 ± 3.0
胚数	5.0 ± 3.2
正常胚数	2.6 ± 2.1

【結果】IVF - ET成績は、331名に379妊娠が成立し、妊娠率は対患者43.5%、対ET周期27.7%であった（表2）。採取卵子数は、成熟卵子平均6.6個採取し、正常受精卵数平均4.4個をえて、一部は前核期に移植し、正常胚平均2.6個をえて移植した（表3）。用いた過排卵法はGnRHagonist併用HMG - hCGが、1240周期と最も多く、28.4%の妊娠成立がみられた（表4）。移植時期別では1日目~3日目移植ですべて妊娠が成立したが、2日目移植（4細胞期）の妊娠率が29.8%と最も良好であった（表5）。主な不妊原因別対周期妊娠率では、原因不明や卵管性不妊の成績がやや不良の傾向にあった（表6）。年齢別対周期妊娠率では、年齢の上昇に

伴う妊娠率の下降は明らかで、最も影響する因子であった(表7)。結局全妊娠のうち59.6%が分娩まで至り、324健児がえられた(表8)。分娩率は対患者で29.7%、対ET周期で16.5%であった(表9)。

表4. 過排卵法別妊娠率(対周期)

	周期	妊娠	
natural - hCG	1	0	
CC - hCG	3	0	
CC - HMG - hCG	105	23	(21.9%)
HMG - hCG	18	4	(22.2%)
GnRHa - HMG - hCG	1240	352	(28.4%)

CC : clomiphene, GnRHa : GnRHagonist

表5. 移植時期別妊娠率(対周期)

	周期	妊娠	
1日目移植(前核期)	501	125	(25.0%)
2日目移植(4細胞期)	704	210	(29.8%)
前核期+胚	2	0	
3日目移植(8-16細胞期)	160	44	(27.5%)

表7. 年令別妊娠率(対周期)

	周期	妊娠	
~ 24才	4	2	(50.0%)
25 ~ 29才	166	63	(38.0%)
30 ~ 34才	574	182	(31.7%)
35 ~ 39才	540	126	(23.3%)
40 ~ 才	83	6	(7.2%)

表6. 主な不妊原因別妊娠率(対周期)

	周期	妊娠	
卵管性	738	189	(25.6%)
子宮内膜症	411	131	(31.9%)
卵管内精子輸送障害	96	29	(30.2%)
原因不明	122	30	(24.6%)

表8. 妊娠の予後

妊娠	379	
胎児心拍確認	266*	(70.2%)
初期流産	96	(25.3%)
子宮外妊娠	37*	(9.8%)
流産総数	123	(32.5%)
多胎(継続)	78	(20.6%)
分娩	226*	(59.6%)
出生児	326	
新生児死亡	2	〔胎児水腫 1〕 〔極小未熟児 1〕
健児	324	

*内外同時妊娠計7例を含む

表9. 分娩率

分娩患者数	226名
分娩数	226
対患者分娩率	29.7%
対ET周期分娩率	16.5%

【考察】外来ベースのIVF

- ETに切りかえることで、
手技の省略化、患者および
医師側双方の負担の軽減を
はかり、多くの件数を行え

ることで多くの患者への福音となることを願ってきたが、患者年令の上昇、いわゆる poor responderの増加など、今後とも妊娠率上昇を期待できない条件がそろっている様に思われる。これに加えて、継続妊娠に対しても産科的管理の問題、多胎管理の問題など、楽観できない条件も存在し、臨床治療としてのIVF-ETには今後とも相当の努力が必要であろう。

Results of IVF - ET in patients with a previous IVF success

○鈴木隆弘・小林善宗・本田育子・井上正人

Takahiro SUZUKI, Yoshimune KOBAYASHI,
Ikuko HONDA, Masato INOUE

東海大学医学部産婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine
Tokai University

【目的】本邦でもヒト体外受精児誕生からすでに10年が経過し、不妊治療として体外受精が確立しつつある。当科の体外受精治療でも誕生した体外受精児は400に達しようとしている。この中には、体外受精治療で1児目が誕生し、2児目を希望し、体外受精治療を再度希望する症例が少いながら出現してきた。このような場合には良好な再妊娠が期待できるとの意見もあり、今回検討を加えた。

【対象・方法】1992年までの体外受精治療のなかで、すでにIVF-ET分娩を経験しており、早産による新生児死亡に終わったかあるいはさらに2児目を希望して再度IVF-ETを行った18名を対象とした。この18名を除いた体外受精治療を対照として、妊娠率、継続妊娠率に関して、 χ^2 -test (Yates 修正) にて比較した。

表1) 対象18名のプロフィール

初回分娩に至ったIVF-ET時		主なIVF-ET適応不妊原因		再IVF-ET	
				(mean \pm S.D.)	
平均年齢	31.6 \pm 3.4才	卵管性不妊	12名	平均年齢	34.4 \pm 3.3才
平均不妊期間	6.7 \pm 2.9年	子宮内膜症	4名	平均開始時期	2.3 \pm 1.3年
		(I 期	1名)	(分娩後)	
		(IV期	3名)		
		卵管内精子輸送障害	1名		
		原因不明	1名		

【結果】対象18名は初回分娩に至るまでに26回のIVF-ETを行い、分娩まで至った妊娠を含めて22妊娠の成立をみており、18名中16名は単胎分娩にて健児を得たものの、2名は早産(1名は双胎)による極小未熟児にて新生児死亡の結果に終わっている。再IVF-ETは33回行われた。採卵～受精～胚について検討すると(表2)、再IVF-ETでの採取正常卵子数、正常受精卵数、正常胚数は初回IVF-ET時と大差がなかった。

表2) 採卵～受精～胚の検討

	(mean ± S.D.)	
	初回IVF-ET (26回)	再IVF-ET (33回)
採取卵子数	8.8 ± 4.9	8.3 ± 4.2
正常卵子数	7.5 ± 4.9	8.1 ± 4.3
受精卵数	7.2 ± 5.0	7.2 ± 3.9
正常受精卵数	5.1 ± 4.0	4.8 ± 3.4
胚数	5.8 ± 4.0 (n = 13)	6.2 ± 3.8 (n = 23)
正常胚数	3.5 ± 2.7 (n = 13)	3.3 ± 2.2 (n = 23)

表3) 再IVF-ET成績(妊娠率)

	患者数	妊娠 (%)	回数	妊娠 (%)
対象 (IVF-ET 分娩後)	18	11 (61.1 %)	33	13 (39.4 %)
対照 (上記を除く)	911	399 (43.8 %)	1805	464 (25.7 %)
		NS		NS

表4) 再IVF-ET成績(継続妊娠率)

	患者数	継続妊娠 (%)	回数	継続妊娠 (%)
対象 (IVF-ET 分娩後)	18	10 (55.6 %)	33	10 (30.3 %)
対照 (上記を除く)	911	275 (30.2 %)	1805	275 (15.2 %)
		P < 0.05		P < 0.05

表5) 再IVF-ET成績(継続多胎率)

	継続妊娠数	継続多胎妊娠数 (%)
対象 (IVF-ET 分娩後)	10	4 (40.0 %)
対照 (上記を除く)	275	92 (33.5 %)
		NS

再IVF-ET33回によって、11名に13妊娠が成立したが、継続は10妊娠であった。対照と比較してみると、妊娠率に差はなかったものの、継続妊娠率で有意に対象が高い結果となった(表3、表4)。

継続多胎妊娠率をみると、対象では継続妊娠10のうち多胎は4で、継続多胎率は40%であり、対照と差はなかった(表5)。再IVF-ETでの継続妊娠は、単胎妊娠2名が継続中で、双胎4名と単胎4名がすでに分娩まで至り、健児が得られた。

【考察】IVF-ET分娩後の再IVF-ET成績は、比較的良好なもので、その理由は、初回採卵時と同等な採卵が期待できること、妊娠成立後の継続には良い着床環境が存在していることが考えられた。

今回得られた結果は、Kochらの発表とも一致するものであった。

【文献】

Koch W.F.R.M et al: Is there a higher chance of success in IVF recidivists?. Abstracts of the 8th Annual Meeting of the ESHRE, The Hague, 1992: abstract 11 (P12).

36 リコンビナント透明帯蛋白質の免疫原性と 妊孕性に及ぼす影響について

Immunogenicity and antifertility effect of a recombinant zonapellucida protein

長谷川昭子 井上みゆき 香山浩二 磯島晋三

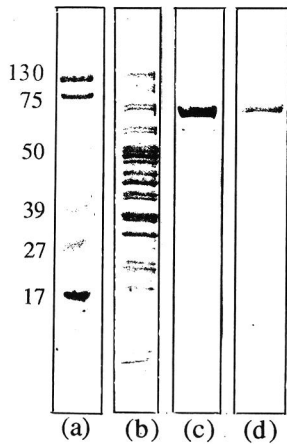
Akiko HASEGAWA, Miyuki INOUE, Koji KOYAMA, Shinzo ISOJIMA

兵庫医科大学産婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Hyogo Medical College

[目的] 哺乳動物の卵細胞をとりかこむ透明帯には、強い抗原性があることから、これを避妊ワクチンに応用する研究が広く行われている。我々は、ブタ透明帯を構成する糖蛋白質のひとつであるZP4成分をハムスターに免疫すると、自己の透明帯と反応する抗体が産生され、一時的な不妊が誘導されることを明らかにした(1)。しかし、ブタ卵巣から精製できるZP4成分には量的限界があるため、遺伝子操作法を利用してZP4の大量生産を行うことにした。すでにZP4の全アミノ酸配列の決定とZP4をコードする遺伝子の単離に成功している(2)ので、今回これを発現ベクターに組み込み、リコンビナントZP4の作成を行った。さらに、この蛋白質を家兎に免疫して、妊孕性に及ぼす影響についても検討した。

[方法] ブタ卵巣 cDNA ライブラリーからZP4をコードする遺伝子をPCRを用いてクローニングしたのち、ZP4の全配列を含むDNA (596ベース) を発現型ベクターpMAL (このベクターは、大腸菌蛋白質のマルトース結合蛋白質と目的蛋白質との融合蛋白質を産生する) のKpn I /Bam H I サイトに導入し、大腸菌(JM109)を形質転換した。抗体スクリーニングにより、陽性コロニーをピックアップし、目的のZP4蛋白質が産生されていることを、ZP4の特異的モノクローナル抗体を用いたWestern blotting法により確認した。大量培養(1リットル)の後、IPTGにてZP4蛋白の産生を誘導し、集菌後、リゾチームおよび超音波処理により、菌体を破碎した。10,000gで遠心した上清を、MBPとアミロースの親和性を応用したアミロースカラムにかけて、10mMのマルトースで溶出する結合分画を得た。この分画に含まれるリコンビナントZP4は2mgであった。免疫方法は、リコンビナントZP4(蛋白質量100 μ g/回/匹)を、まずフロイド完全アジュバントと共に日本白色家兎(体重2.5Kg)4匹に注射し、3週間後に同量の抗原を不完全アジュバントと共に注射し、さらに2週間後よりbooster injectionを3回行った。対照の家兎(4匹)には、大腸菌蛋白質であるマルトース結合蛋白質(MBP)のみを同様に免疫注射した。



(a) 分子量マーカー ($Mr \times 10^{-3}$)

(b) 大腸菌ライセート (CBB 染色)

(c) モノクローナル抗体によるリコンビナントZP4の検出
(Western blotting)

(d) 精製リコンビナントZP4 (CBB 染色)

図 リコンビナントZP4蛋白質のSDS-PAGE

血中抗体価はnativeZP4をコーティングしたELISA法により測定した。最終boosterより4週間後、PMS 50IUを48時間の間隔で2回皮下投与し、さらに48時間後に♂との交配を行った。

[結果と考察] pMAL により産生されるリコンビナント蛋白質は、Western blotting 法により、MBP との融合蛋白質としての分子量66,400を示した (図-c)。またアミロースカラムで得た結合分画も、同じく66,400の蛋白質バンドを示した (図-d)。このリコンビナントZP4を家兔に免疫すると抗体が産生され、抗体価はnative ZP4を免疫したときとほぼ同様の1:6,400であった。抗体価が、最高に達した後、血中エストロゲン値はやや低下した。対照のMBPのみを免疫した群には、このような低下は認められなかった。交配により対照の家兔 (2匹) には妊娠が成立し産仔が得られたが、実験群 (4匹) の家兔には妊娠が成立しなかった。卵巢の組織検査では、リコンビナントZP4免疫群において、成熟卵胞の数がやや減少していたが、そのほかには、対照との間に明らかな差はなかった。また実験群の家兔の卵巢組織を凍結切片とし、蛍光抗体法で染色すると、透明帯のみに抗体の沈着が認められた。以上の結果より、リコンビナントZP4蛋白質は、安全で効果の高い避妊ワクチンとして応用できると考えられる。

[文献]

- 1 Hasegawa, A., Koyama, K., Inoue, M., Takemura, T. and Isojima, S. (1990) Antifertility effect of active immunization with ZP4 glycoprotein family of porcine zona pellucida in hamsters. J. Reprod. Immunol. 22: 190-210.
- 2 長谷川昭子、井上みゆき、香山浩二、磯島晋三 (1992) ブタ透明帯糖蛋白質 (ZP4) のアミノ酸配列について 哺乳卵学誌 9(1): 47-48.

37 胚 性 幹 細 胞 (E S 細 胞) の
サ ブ ク ロ ー ニ ン グ 法 の 検 討

An attempt to subcloning of embryonic stem cell

鎌田宣夫、寺社下浩一、鈴木宏志、宮井達也、谷川学

Nobuo KAMADA, Kouichi JISHAGE, Hiroshi SUZUKI, Tatsuya MIYAI, Manabu TANIGAWA

中外製薬(株)前臨床研究所

Preclinical and Drug Engineering Research Lab.

Chugai Pharmaceutical Co., LTD.

目的：ES細胞は、遺伝子欠損マウスの作出のみならず、細胞分化に関する研究材料として注目されている。しかし、この細胞は培養により未分化状態を失ったり、あるいは染色体異常を起こすなど、その維持は比較的難しく培養条件の不確定要素も多い。また、ES細胞株の樹立の成功は、ある特定の研究機関に限られており、未分化状態で継代、維持するためには、マウス胎仔繊維芽細胞等をフィーダー細胞として用いるとともに、LIF(Leukemia Inhibitory Factor)添加培地で培養する以外、決め手となる有効な培養法は確立しておらず、研究者の細胞形態の観察に依存するところが大きい。そこで、本実験においては、ES細胞株の簡便なサブクローニング法の開発を目的として、いくつかの方法を試みたので報告する。

方法：実験には、すべて東と豊田¹⁾によって樹立されたES細胞、A3-1株を使用した。培養はLIF添加SCM培地²⁾を用い、マイトマイシン処理したマウス胎仔繊維芽細胞層上で行った。また、培地交換は毎日行った。サブクローニング法としては、以下の3つの方法を行った。Ⅰ. ピックアップ法：トリプシン-EDTA処理により単一細胞としたES細胞を、倒立顕微鏡下でマイクロマニプレーターを用いて、細胞の形態別に、球形、非球形および2時間経過後も球形を呈していたものに選別した後、それぞれ約100個のES細胞を24穴のマイクロプレートに移し換えて培養を開始した。細胞の増殖にともない6穴マイクロプレート、60mmシャーレに移し換えて培養した。Ⅱ. 沈降法：60mmシャーレで培養したES細胞を単一細胞化した後、15-45分間、インキュベーター中(37℃、5%CO₂ in air)で静置し、シャーレ上に接着したES細胞および培養液中に浮遊しているES細胞に分けて培養した。次の継代時には、それぞれのES細胞を単一細胞化、静置後、シャーレ上に接着した細胞

を培養したものはシャーレ上に接着した細胞のみを培養し、培養液中に浮遊していた細胞を培養したものは浮遊している細胞のみを培養した。この操作を継代毎に行い、数世代培養した。Ⅲ. コロニーピックアップ法: ES細胞を60mmのシャーレに 5×10^4 個播種してから72時間後に、倒立顕微鏡下で観察し、形態的に正常と思われるコロニーを選定し、96穴のマイクロプレート上で単一細胞化した後、24穴のマイクロプレートで培養を開始し、細胞の増殖にともない6穴マイクロプレート、60mmシャーレに移し換えて培養した。ES細胞の評価は、サブクロニング前後の正常染色体数を有する細胞の割合および体外における分化能の検定によって行った。

結果: ピックアップ法では、サブクロニング前の正2倍体の割合が40%であったのに対し、球形を選別した場合10-16%、非球形では0-16%、2時間経過後も球形を呈していたものを選別した場合26-51%とサブクロニングの効果は認められなかったが、2時間経過後も球形を呈していたものを選別した場合においては、40本未満の染色体を有する細胞が全く観察されず、染色体数が細胞の形態に反映ししていることを示唆する成績であった。また、沈降法においては、サブクロニング前の正2倍体の割合が30-48%であったのに対し、接着細胞では24-42%および浮遊細胞では24-46%と、ここでもサブクロニングの効果は認められなかった。コロニーピックアップ法では、正2倍体の割合が48%のラインから形態的に正常であると思われた3つのコロニーをサブクロニングした結果、68-78%の正2倍体を有する3ラインを得ることができた。なお、浮遊培養による分化能の成績は、全ての実験区において、サブクロニング前後で顕著な差を認めなかった。以上の成績より、本実験条件下ではコロニーピックアップ法が最も効果的であることが知られたが、今後とも、より簡便なサブクロニング法の開発が必要であると考えられる。

文献

- 1) 東 貞宏、豊田 裕: マウス胚性幹細胞に由来する生殖系列キメラ個体の作出
Jpn J Anim Reprod 1991;37(1):37-43
- 2) Robertson EJ: Embryo-derived stem cell lines. In: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells. A Practical Approach (Robertson EJ ed.), IRL Press, Oxford. 1987;71-112

38 牛体外授精 (I V F) 由来胚からの
胚性幹 (E S) 細胞樹立の試み

The attempt of an establishment of embryonic stem cells
from bovine embryos fertilized in vitro

○稲垣 宏・柳 在雄・稲泉絵理・銭 曉喬・菅原七郎

Hiroshi INAGAKI, Zae Young RYOO, Eri INAIZUMI
Qian Xiao QIAO, Shichiro SUGAWARA

東北大学農学部動物生殖科学教室

Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Agriculture
Tohoku University, Sendai

【目的】ES細胞(ESC)の樹立はマウス¹⁾で報告されて以来、様々な動物で試みられているが継代化と実用化までにはいたったものはない。牛においても、正木ら²⁾や Streichenkoら³⁾の報告がみられるが細胞系樹立までにはいたっていない。しかしES細胞を常に一定の割合で樹立し維持ができれば、哺乳動物の遺伝子工学的手法における個体発生や分化に関する特異的な遺伝子の発見とその発現の特性、および時期との関連を解析することや、種の分化とその特性を解明するための最も有力な手段となりうる。またES細胞に遺伝子修飾を行ない初期胚へ注入し、それを移植することによりキメラ個体の作出が可能となる。さらにその個体が生殖系列キメラであれば戻し交配によりES細胞由来の個体を作成できる。したがって利用価値の高い形質の導入が可能であり、その形質は子孫に継代されるので利用できる。また最近、始原生殖細胞からのES細胞の樹立⁴⁾が報告されたが、この細胞は生体内での分裂休止に対応した体外培養下での分裂停止がみられるという点で葉裂後の牛内細胞塊と類似した性質を持っている。したがって通常の培養方法に加え、これと同様の培養系を用い樹立を試みた。

【方法】フィーダーレイヤーとしてマウス胎仔線維芽細胞、牛胎仔線維芽細胞、STO細胞、SI/m220細胞(Dr. David Williams, Howar Hughes Medical Institute, Indiana University Medical school)を用いた。マウス胎仔線維芽細胞は妊娠14~16日齢の胎仔を用い、常法²⁾により調整した。牛胎仔線維芽細胞は妊娠約1ヵ月齢の胎仔を用いマウス胎仔線維芽細胞と同様な方法で調整した。STO細胞はヒトLIFを発現するプラスミドを導入した細胞株で、SI/m220細胞は膜結合型steel因子を発現するプラスミドを導入した細胞株であり、これらの細胞は松居靖久博士(東北大学抗酸菌病研究所)から頂いた。細胞の不活性化はX線約4000~5000radの照射またはマイトマイシン処理により行なった。培養はすべて10%FCS添加

DMEMの培地で37.5℃, 5%CO₂, 95%空気条件下のインキュベーターで行なった。

牛初期胚盤胞、拡張胚盤胞、脱出胚盤胞をフィーダー細胞との共培養に共試した。これらは正木²⁾らの方法に準じて培養を行ない、媒精後6~10日目の胚盤胞を用いた。拡張胚盤胞と脱出胚盤胞は0.5%プロナーゼ処理またはピペッティングによって透明帯を除去し、脱出胚盤胞はそのまま共培養した。培養は20%FCS, 0.1mM 2-メルカプトエタノール、ヌクレオシド溶液、非必須アミノ酸溶液 (Gibco)、および10³i. u./mL LIF (Amard) を添加した高グルコース処方DMEMをもちい、37.5℃, 5%CO₂, 95%空気条件下のインキュベーターで行なった。培地交換は48時間毎に行ない、継代はトリプシン処理またはキャピラリーチューブによる操作により行なった。

得られたESC様細胞はレチノイン酸処理により分化の誘導を行なった。本実験では all-transレチノイン酸 (Sigma) をもちいた。99%エタノール中に3.3×10⁻⁴M濃度をストック溶液とし、目的の濃度になるように培養液で直接希釈した。培養からレチノイン酸を除去する場合は、レチノイン酸を含まない10%FCS添加DMEMでよく洗浄し、以後同様の培地で培養した。

【結果】胚盤胞のフィーダーレイヤーへの接着はマウス胎仔線維芽細胞で19/23、牛胎仔線維芽細胞で24/39であった。これらのうち前者の2例でESC様細胞が得られた。1つは脱出胚盤胞由来であり、他の1つは拡張胚盤胞由来であった。これはいずれも24時間以内に接着した胚盤胞から得られたものであった。これらESC様細胞は、約25~35μmの小型の細胞でマウスのES細胞のように著明な仁を含む大きな核を持っていたが多層を形成せず、上皮様で豚や羊で報告されているのと同様な形態的特徴と様相を示した。しかしES細胞は栄養外胚葉細胞と形態的に類似しているため、それらの区別をするためにまず栄養外胚葉細胞のみをフィーダー上で培養しESC様細胞との形態的な相違 (大きさ、核数、その他特徴) を観察した。その結果栄養外胚葉細胞は約50~85μmの径を持つ大型の細胞であり、ESC様細胞の約2倍以上も大きく、細胞質に多くの顆粒が存在しているのが分かった。したがってこのような形態的特徴の違いから、得られたESC様細胞は栄養外胚葉細胞とは異なる細胞であると判断した。またこれらの細胞はレチノイン酸処理により神経細胞様細胞への分化が観察された。形態的に変化したのちは、培養培地からレチノイン酸を除去してもこの形態を維持した。

なお、STO細胞およびS1/m220細胞については実験中である。

【文献】

- 1) Evans, M. J. & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154-156
- 2) 正木 全、柳 在雄、菅原七郎、正木淳二 (1991). 牛体外受精卵子の幹細胞化に関する研究, 哺乳動物卵子学会誌, 8, 27-33.
- 3) Strelchenko, N., Saito, S. & Niemann, H. (1991). Towards the establishment of bovine embryonic stem cells. *Theriogenology*, 35, 274.
- 4) Matui, Y., Zsebo, K. M., Hogan, B. L. M. (1992). Derivation of pluripotential embryonic stem cells from primordial germ cells in culture. *Cell*, 70, 841-847

Mitochondrial distribution in mouse oocytes and embryos

○都倉 隆・野田 洋一*・後藤 康夫・中山 貴弘・森 崇英

Takashi TOKURA, Yoichi NODA, Yasuo GOTO,
Takahiro NAKAYAMA, Takahide MORI京都大学医学部婦人科学産科学教室
滋賀医科大学産科婦人科学教室*Department of Gynecology and Obstetrics, Kyoto University Faculty of Medicine
Department of Obstetrics and Gynecology, Shiga University of Medical Science*

【目的】すべての living cells において energy metabolism の中心的役割を担っている mitochondria は、代謝や増殖、分化といった細胞機能の変化に対応して、その形態や分布を変化させていることが報告されている¹⁾。卵細胞に於いても meiosis の時期に mitochondria が perinuclear region へ集中し、その後妨垂体の週囲に集まることが報告されている²⁾。しかしながらこれらの報告はいずれも、細胞周期のある時期を断片的に観察したにすぎず、mitochondria が細胞周期とともに分布形態をどのように変化させるのかを、時間経過を追って系統的に観察した報告はない。本研究では、細胞質内の mitochondria の分布が細胞周期と共にどの様に変化していくのかを明らかにするため、GV stage から 2-cell stage までのマウス卵及び胚を用いて、in vivo における mitochondria の分布の変化を fluorescence microscope を用いて系統的に検討した。更に in vitro で培養されたマウス胚における mitochondria の分布も検討した。

【方法】(1) ICR 系雌マウスを HMG 及び hCG にて過排卵処理した後、マウス卵及び胚を経時的に採卵し、mitochondria を特異的に染色する Rhodamine 123 (10 µg/ml) にて生体染色した後、mitochondria の分布形態を fluorescent microscopy にて観察した。(2) hCG 17-18h 後に採卵した胚を BWW 液で培養し、hCG 35, 40, 50 h 後に fluorescence microscope にて同様の観察を行い、vivo 胚と比較検討した。(3) hCG 17-18h 後に採卵した胚を BWW 液に Superoxide dismutase (SOD; 200 µg/ml) あるいは Thioredoxin (TRX; 500 µg/ml) を添加した培養液で培養し、(2) と同様の検討を行った。

【結果】卵、胚における mitochondria の分布形態は次の 3 型に分類できた。すなわち細胞質内に均等に分布する Homogeneous (H) pattern, 核周辺への集中が見られる Perinuclear accumulation (PA) pattern 及び細胞質内での凝集が著明な Aggregation (Agg) pattern である。vivo から回収直後の卵及び胚では、mitochondria の分布形態は hCG 投与後の時間と共に、以下のように変化した。すなわち hCG 投与前は H

pattern, hCG 投与8-9h後はPA pattern, hCG 投与10-14h後は再びH pattern, hCG 投与24及び31-32h後は再びPA patternを示した。2細胞期では, hCG 投与35h後でAgg pattern, hCG 投与40h後でH pattern, hCG 投与48h後でPA patternを示した。vitroで培養された胚では, hCG 投与35h後でAgg patternを示したまま, mitochondriaの分布形態は変化しなかった。TRXやSODを添加した培養液で培養された胚においては, vivo胚と同様の分布形態の変化が認められた。

【考察】以上の結果からmitochondriaは細胞質内に於いて, 細胞周期に依存して集合離散していることが明らかとなった。又mitochondriaが細胞質内を移動することは, 細胞分裂にとって必須であることが示唆された。更に哺乳類初期胚に見られる胚発生停止現象はmitochondriaの移動が阻害されたために生ずると考えられた。

【文献】

- 1) Johnson, L.V., Walsh, M.L. and Chen, L.B.: Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980; 77 (2): 990-994.
- 2) Van Blerkom, J. and Runner, M.N.: Mitochondrial reorganization during resumption of arrested meiosis in the mouse oocyte. Amer. J. Anat. 1984; 171: 335-355.

40 センダイウイルスを接種されたマウス卵子における 細胞内 Ca^{2+} の変動

Calcium Transients in Mouse Oocytes Injected with Sendai Virus

河野友宏¹⁾・John Carroll²⁾・David Whittingham²⁾・中原達夫¹⁾

1) 東京農業大学総合研究所、Nodai Research Institute,
Tokyo University of Agriculture

2) MRC Experimental Embryology and Teratology Unit, UK

〔目的〕 パラインフルエンザウイルスの仲間であるセンダイウイルス (H V J) は、強い細胞融合能を示すことが知られている。この性質を利用することにより、哺乳動物卵における核移植が可能となった。最近では、除核未受精卵への胚細胞核や体細胞の核移植に広く用いられている。しかし、センダイウイルス自身が細胞融合時に卵子に対してどのような影響を及ぼすかについては何ら明かにされていない。そこで、本実験ではセンダイウイルスをマウス未受精卵に接種した場合、卵細胞質内 Ca^{2+} にどのような変動が生るのかを明らかにしようとした。

〔方法〕 供試動物には F1 (C57BLx CBA) マウスを用い、未受精卵は 4 - 6 週齢の雌に過剰排卵処置し hCG 投与後 16 時間後に、また、2 細胞期胚は 6 - 8 週齢のメスに過剰排卵処置を施して雄と交配し hCG 投与後 40 - 42 時間後に、それぞれ採取した。センダイウイルスは、5000 HAU に調整して使用し、15 - 60 nl をマウス卵子に接種した。卵子の保定、ウイルスの注入、細胞質および細胞核の移植等の顕微操作は、既報¹⁾の核移植操作に準じて実施した。卵細胞質内 Ca^{2+} の測定には、 Ca^{2+} 染色剤である *indo-1* を用いた²⁾。まず、卵子を 50 μ M の *indo-1* と 0.02% の pluronic F-127 を含む M 2 液に、37°C で 60 分間浸漬した。次いで、卵子を 37°C に保ったチャンバー内の M 2 液ドロップ中に移し、蛍光装置を装着した倒立顕微鏡下にて顕微操作を行った。その後、直ちに卵子からの蛍光を 90 分間にわたり photomultiplier tube にて測定し、UMAC system を用いコンピューターにて記録および解析した³⁾。

〔結果〕後期2細胞期胚の細胞核および細胞質あるいは未受精卵細胞質をセンダイウィルスにより未受精卵に融合させた場合には、いずれも同様の卵子内 Ca^{2+} の変動が認められた。すなわち操作終了後3-10分以内に卵子内 Ca^{2+} の著しい上昇が認められ、その後の10-20分間に複数のピークを示し、一旦基礎値に戻った。細胞融合は、多くの場合その直後に観察された。次いで、測定終了時までの間に単発的な上昇が3-10回繰り返された。一方、センダイウィルス接種した場合にも同様な卵子内 Ca^{2+} 変動が認められ (Fig. 1)、この Ca^{2+} 変動は、接種したセンダイウィルスの量に依存して増大する傾向を示した。また、hCG 投与12.5時間目に採取した卵子では、 Ca^{2+} の変動が微弱になる傾向が認められた。これらの結果から、センダイウィルスが卵膜に結合して卵子細胞膜の融合を引き起こしたため、外界から卵子内へ Ca^{2+} の流入が生じたものと考えられた。

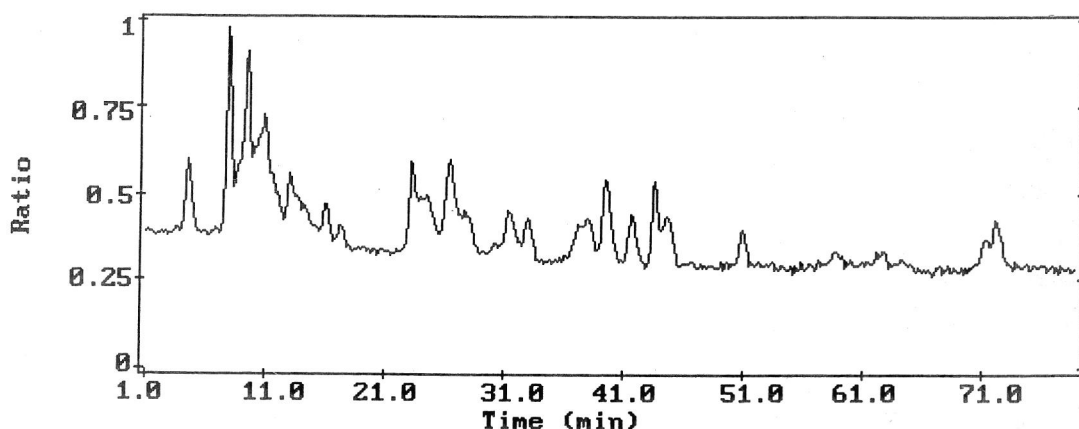


Fig. 1. Calcium transients in mouse oocytes injected with HVJ

〔文 献〕

- 1) Kono T., Kwon O.Y. and T. NAKAHARA, Development of enucleated mouse oocytes reconstituted with embryonic nuclei. J Reprod. Fertil. 93, 165-172, 1993.
- 2) McCormack J. and P. Cobbold P, Cellular calcium, The practical approach series. IRL press, 1992.
- 3) Carroll J. and K. Swann, Spontaneous cytosolic calcium oscillation driven by inositol triphosphate occur during in vitro maturation of mouse oocytes. J. Biol. Chem. 267, 11196-11201, 1992.

マウス胚の接着ならびに移植後の生存性に及ぼす影響

Effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on the attachment of mouse embryos
in vitro and development to young in vivo

○小田垣論司・加藤容子・角田幸雄

Satoshi ODAGAKI, Yoko KATO, Yukio TSUNODA

近畿大学農学部畜産学教室

Laboratory of Animal Reproduction, College of Agriculture, Kinki University,

目的：近年，哺乳動物初期胚の体外発生に及ぼす成長因子の影響が多数検討されている．leukemia inhibitory factor (LIF)は，ES細胞の分化を抑制する作用を持つサイトカインの一種で，最近，胚の着床にはこのLIF の発現が必須であることが明らかとなった¹⁾．また，胚の体外培養時にLIF を添加すると，透明帯からの脱出率やディッシュ底面への接着率を向上させる効果のあることも報告されている²⁾．そこで，本実験では①培養液に添加する牛胎児血清(FCS) とLIF の濃度が胚の脱出率ならびに接着率に及ぼす影響ならびに②LIF の子宮腔への注入が移植胚の生存性に及ぼす影響について検討した．なお，体外培養は2種のLIF を用いて検討した．

方法：供試した8細胞期胚は，CD-1系の雌マウスに48時間間隔でPMSGとhCG を各5 IUずつ腹腔内投与した後，同系雄と交配させてhCG 投与後67～69時間目にM2液で卵管ならびに子宮を灌流して採取した．①採取した胚は1あるいは10%のFCS また， 10^3 Uあるいは 10^4 U/ml のLIF を添加したM16 液を用いて体外培養した．各区とも5%CO₂，95%空気の気相で37°Cで培養し，透明帯からの脱出とディッシュ底面への接着を観察した．②8細胞期胚を 10^4 U/ml のLIF を添加したM16 液を用いて一晚培養後，桑実胚から胚盤胞へ発生した胚を 3×10^4 UのLIF 液と共に偽妊娠マウスの子宮へ移植した．なお，コントロールとしては， 10μ l のダルベッコ変法イーグル培養液(DMEM)を子宮腔に注入した．

結果：①Table 1. に，培養液に添加するLIF の濃度が胚の脱出率ならびに接着率に及ぼす影響について示した．胚の脱出率はBのLIF を 10^3 U/ml添加した場合に低い値が得られたものの他区に大差はみられなかった．また，ディッシュ底面への接着率はFCS 無添加区では0～6%と極めて低い値であったが，FCS を添加すると有意に増加し，添加濃度が高くなるにつれて上昇する傾向がみられた．また，

どちらのLIF を用いた場合も, LIF を添加することによって接着率が有意に増加した (36~49% vs 58~90%). ②培養時のLIF の添加は移植後の産子生産率に影響を及ぼさなかったが, 移植時にLIF を子宮腔に直接注入するとコントロールと比べて向上する傾向がみとめられた (7~9% vs 18~21%). 以上の結果より, 培養液にLIF を添加するとディッシュ底面への胚の接着率を向上させる効果のあることが明らかとなった. また, 移植時に直接LIF を子宮腔へ注入することにより産子への発育が上昇する傾向がみられたが, 今後注入量や濃度などを詳しく検討する必要があると考えられた.

文献:

- 1) Stewart, C. L., Kaspar, P., Brunet, L. J., Bhatt, H., Gadi, I., Kontgen, F. and Abbondanzo, S. J. (1992) : Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, 359, 76-79.
- 2) Robertson, S. A., Lavranos, T. and Seamark, R. F. (1990) : In vitro models of the maternal-fetal interface. In *Molecular and cellular immunobiology of the maternal-fetal interface* (Wegmann, T. G., Nisbet-Brown, E. and Gill, T. J. III., eds) p191-206, Oxford Univ. Press, New York.

Table 1. Effect of LIF on the development and the attachment of mouse 8-cell embryos in vitro

LIF	Concentrations of		No. of embryos used	No. of blastocysts (%)		
	LIF(U/ml)	FCS(%)		developed	hatched	attached
A	0	0	58	57(98)	36(63)	2(6)
	0	1	44	44(100)	33(75)	7(21)
	0	10	60	58(97)	45(78)	16(36)
	10 ³	10	57	57(100)	40(70)	23(58)
	10 ⁴	10	59	59(100)	42(71)	30(71)
B	0	0	57	56(98)	42(75)	0(0)
	0	1	50	33(66)	21(64)	8(38)
	0	10	58	56(97)	47(84)	23(49)
	10 ³	10	58	46(79)	20(43)	18(90)
	10 ⁴	10	58	50(86)	36(72)	32(89)

42 マウス 1 細胞期胚における雌雄前核由来
 染色体の長さについて

On the length of the paternal and maternal chromosomes
in the mouse embryos at one-cell stage

森 英紀・石尾 佐代・正田 陽一

Hidenori MORI, Sayo ISHIO, Yoichi SHODA

茨城大学 農学部

Faculty of Agriculture, Ibaraki University

(目的) ロバートソン型転座をヘテロに持つマウスでは、減数分裂の過程で正常型および均衡型配偶子のほかに、染色体不分離による不均衡型配偶子が形成されることが知られている¹⁾。当研究室では、Rb(6,15)1 Ald と命名されているロバートソン型転座染色体を導入された B10 系マウスを維持しているが、B10 系の正常核型マウスとの交配によって得られた転座ヘテロ雄マウスでは、CDF1 マウスとの交配成績において、胎子数および産子数の減少が認められたため、1 細胞期胚における転座ヘテロ雄マウスの精子染色体分析を試みている。1 細胞期胚では雌雄前核由来の核盤が区別して観察できるが、卵子由来と精子由来の核盤を判定するには、「精子由来の染色体は卵子由来に比べ細長く、凝縮が少ない。」ことでなされている^{2,3)}。そこで本実験では、このような染色体長の違いを確認するため、精子側の核盤にロバートソン型転座をホモに持つ雄マウスを利用し、雌雄配偶子染色体長を比較した。

(方法) ddy 系の成熟雌マウスに PMSG と hCG (各々 0.2IU/B.W.g) を 48 時間間隔で投与し、hCG 投与後直ちにロバートソン型転座をホモに持つ B10 系雄マウスと同居させた。採卵は hCG 投与後 17 時間目に行い、卵丘細胞除去後、ポドフィロトキシン+ビンブラスチン (0.04 μ g/ml) 添加の M16 培地で 12~14 時間培養した。低張処理は 15% FCS 加 0.9% クエン酸ナトリウムで 10 分間行った。染色体標本は、美甘ら⁴⁾の漸進固定・空気乾燥法に従い作製し、ギムザ染色後、写真撮影による染色体像より、精子由来の核盤と卵子由来の核盤の染色体長を計測した。染色体写真より得られた実測値は、各々の標本におけるロバートソン型転座染色体の長さを 100 として補正し、集計した。

(結果) 1 細胞期胚の染色体像と核型を図-1 に示した。ロバートソン型転座染色体(矢印)を持つ

精子由来の核盤に比較し、転座染色体を持たない卵子由来の核盤では、染色体の凝縮がより進んだ状態であることが認められた。染色体長を比較するため、凝縮の異なる10例の1細胞期胚の染色体像より得られた卵子由来、精子由来の染色体の平均補正値を図-2に示した。10例全てにおいて精子由来の染色体が長く、平均補正値で約6~20の差が認められた。しかし個々の染色体の凝縮の程度は、核盤により異なっていた。

以上の結果より、1細胞期胚の雌雄前核由来染色体に凝縮の差が認められた場合、凝縮の少ない核盤が精子由来の染色体であることが確認された。

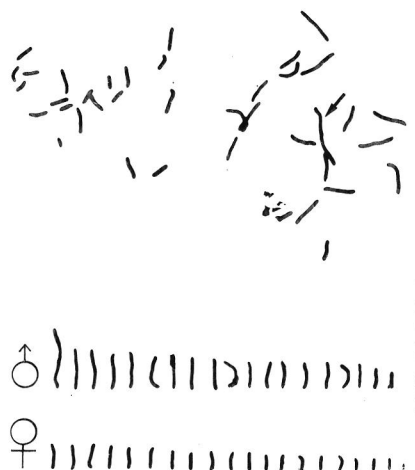


Fig.1. A chromosome preparation of a mouse embryo at 1-cell stage and its karyotype.
Arrow shows translocation chromosome.

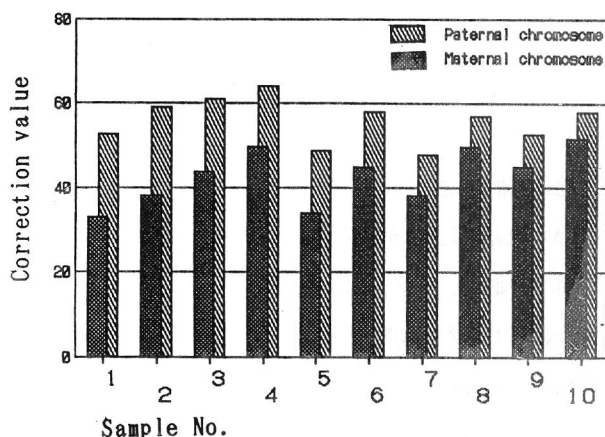


Fig.2. Comparison of the length of paternal (▨) and maternal (■) chromosome.

(文献)

- 1) Gropp, A. and Winking, H.(1981) : Robertsonian translocation: cytology, meiosis, segregation patterns and biological consequences of heterozygosity. In *Biology of the House Mouse*, Berry, R. J.(ed.), Academic Press, London, P.141-181.
- 2) Kato, M. and Tanaka, N.(1980) : Relationship between chromosome aberrations in the first-cleavage metaphases and unscheduled DNA synthesis following paternal MMS treatment. *Jpn. J. Genetics*, 55, 55-65.
- 3) Mikamo, K. and Kamiguchi, Y.(1983) : Primary incidences of spontaneous chromosomal anomalies and their origins and causal mechanisms in the chinese hamster. *Mutation Res.* 108, 265-278.
- 4) 美甘和哉、上口勇次郎(1985) : 卵子の染色体標本作製法, "リプロダクション実験マニュアル" 飯塚理八他編, 講談社, P.82-89.

43 RT-PCR 法による初期胚 mRNA の定量

Quantitative analysis of mRNA in embryos
by reverse transcription-polymerase chain reaction

森田 豊, 堤 治, 武谷雄二

Yutaka MORITA, Osamu TSUTSUMI, Yuji TAKETANI

東京大学医学部産科婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, University of Tokyo

【目的】RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 法は、逆転写酵素による mRNA からの cDNA 合成と PCR 法とを組み合わせた高感度遺伝子検出法で、微量の mRNA を解析する方法として、今日広く利用されつつある。また、本法の応用により、mRNA を定量化するという試みは近年報告が散見されるが、極めて微量な試料である初期胚を材料とした報告はこれまで知られていない。我々は、マウス初期胚発育過程における糖輸送担体 (GLUT1) mRNA の定量的解析を試みたので報告する。

【方法】6～10週齢B6C3F1雌マウスをPMS 5単位とhCG 5単位を用いて過排卵させた後に、同系雄マウスと交配させ、翌朝腹腔の認められたものを実験に用いた。hCG投与40, 88時間後にそれぞれ2細胞期胚、胞胚を、卵管ないし子宮より採取した。両群の初期胚100個より、oligo (dT) cellulose micro spin columnを用いpolyA⁺ RNAを抽出し、reverse transcriptaseにより逆転写して一本鎖 cDNAを合成した。この cDNAを鋳型として、マウス GLUT1 cDNAの361 bpを規定するprimerを用いてPCRをおこない、GLUT1 mRNAの検出を試みた。また、PCR産物の反応特異性は制限酵素を用いて検討した。

mRNAの定量はinternal standardとして、GLUT1 mRNAの構造をもたない合成 RNA (末端に poly A⁺構造を有し、micro columnに吸着される) を用い、一定量を両群の胚 100個に加えてpoly A⁺ RNA 抽出操作、遺伝子増幅を同時に行い、両群の初期胚由来の最終産物量 (361 bpの領域) を internal standard由来の産物量 (308 bpの領域) で補正して検討した (Fig. 1)。増幅反応は、産物量が指数関数的に増加している条件を用い、定量性を確認して行った。

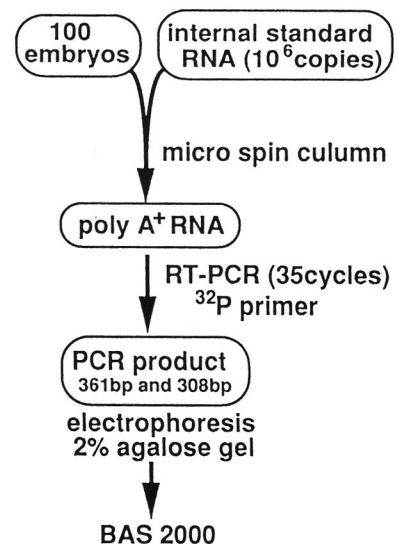


Fig. 1 マウス初期胚における
定量的 RT-PCRの原理

【結果】 2細胞期胚, 胞胚の両群において, primerで規定された361 bpの増幅遺伝子が得られ, この産物の制限酵素による消化パターンは, GLUT1に特異的であった. 胞胚100個と一定量のinternal standardより同時に抽出したpolyA⁺ RNAを段階希釈して遺伝子増幅を行ったところ, GLUT1およびinternal standardのいずれにおいても, 1/16 希釈までの範囲において, 産物量との間に直線性が認められた. 2細胞期胚および胞胚におけるGLUT1 mRNAの発現量を比較検討すると (Fig. 2), 両群に加えたinternal standard由来の産物はほぼ同等であるのに対し, 初期胚 GLUT1 mRNA由来の産物は 2細胞期胚よりも胞胚で多量に発現していることが示された. 以上の実験をくりかえし行い産物量を定量評価すると, 胞胚では 2細胞期胚の11倍の発現量を認めた (Fig. 3).

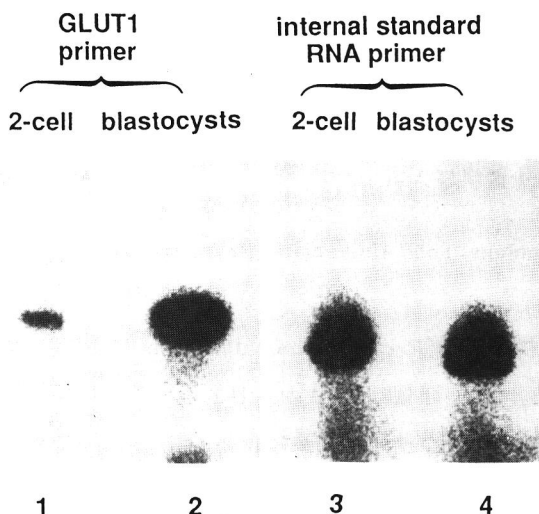


Fig. 2 初期胚および internal standard由来のPCR産物
両群に加えたinternal standard由来の産物はほぼ同等であるのに対し (lane 3, 4), 初期胚 GLUT1 mRNA由来の産物は胞胚で多量に発現している (lane 1, 2) .

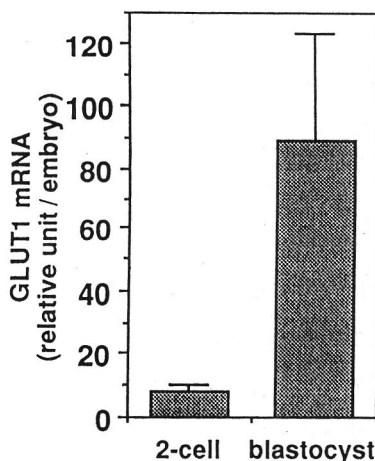


Fig. 3 2細胞期胚, 胞胚のGLUT1 mRNA
internal standard RNA由来の産物量で補正して示した. (mean + SD, n=8)

【考察】

我々はこれまで, マウス初期胚発育に伴う GLUT1の発現増加を蛋白レベルで解析してきた^{1) 2)}が, 今回の結果は, GLUT1の発現増加が転写レベルで制御を受けていることを示すものであり, 胚発育における糖取り込み能発達機構を解明する上で重要な知見と考えられる. また, このマウス初期胚を材料とする定量的RT-PCR法は, 哺乳動物初期胚以外の微量試料中の微量mRNAの検出, 定量にも極めて有用な方法であり, 今後の応用も期待できる.

【主要文献】

- 1) Morita, Y., Tsutsumi, O., Hosoya, I., Taketani, Y., Oka, Y. and Kato, T. (1992). Expression and possible function of glucose transporter protein GLUT1 during preimplantation mouse development from oocytes to blastocysts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 188, 8~15.
- 2) 森田 豊, 堤 治, 細谷岩生, 武谷雄二, 水野正彦, 加藤尚彦 (1992). ミクロウェスタンブロッティング法によるマウス初期胚の糖輸送担体の解析, 哺乳卵学誌, 9(1), 107~108.

PCR法とmicromanipulation法による マウス着床前期胚の性別診断

Sex identification of mouse preimplantation
embryos using PCR method and micromanipulation

○矢野ともね・雀部 豊・竹下 直樹・片山 進・久保 春海・平川 舜

Tomone YANO, Yutaka SASABE, Naoki TAKESHITA,
Susumu KATAYAMA, Harumi KUBO, Shun HIRAKAWA

東邦大学医学部第1産科婦人科

1st Department of Obstetrics and Gynecology, Toho University, School of Medicine

【目的】体外受精技術の進歩は着床前期胚に対する操作を可能にし、micromanipulationにより胚に障害を加えずに割球を biopsy する方法が確立されつつある。また、少量のDNAから目的とする配列を短時間で増幅することが可能な polymerase chain reaction (PCR)法¹⁾の発展に伴い、着床前期胚を用いて遺伝性疾患の診断にPCR法を応用する試みがなされている²⁾。今回、ヒトの遺伝病の非侵襲的着床前診断の確立を目的として、マウスの体外受精により得られた着床前期胚を用いて dual PCR法による性別診断の可能性を検討した。

【方法】Y染色体特異的配列としてSry遺伝子を、また internal controlとしてmyogeninを使用した。目的のDNA配列の増幅は1組の primerを用いる single PCR法と2組の primerを用いる dual PCR法を用いて行った。Sryおよびmyogenin遺伝子それぞれに対して outer および inner の2組の primerを作製した。Single PCR法では outer primerを用いて、検体に reaction buffer(10mM Tris-HCl pH 8.9, 15mM MgCl₂, 80mM KCl, 500μg/ml BSA, 0.1% sodium cholate, 0.1% Triton X-100)、それぞれ 200 μMの dNTPs、それぞれ 20 pmolの primer、および 2.5 Uの Thermus thermophilus DNA polymeraseを含む reaction mixtureを加え PCR (denaturation 94℃ 30秒、annealing 60℃ 30秒、extension 72℃ 60秒の条件で30回)を行った。Dual PCRは single PCR終了後 10 μlの増幅産物をそれぞれの inner primerを含む reaction mixtureを入れた tubeに添加しPCRを30回施行した。増幅終了後、対応する tubeから 5 μlの増幅産物を混合し、6% polyacrylamide gelにて電気泳動後、ethidium bromideで染色して増幅産物を確認した。初めに雄および雌マウス骨格筋より抽出した genomic DNAを連続希釈した検体を用いてPCRを行い、single および dual PCR法の増幅感度を比較した。8から10週齢の Crj ;CD-1 (ICR) 雌マウスに、5 IUの PMS および 5 IUの hCGを48時間間隔で腹腔内注射して過排

卵処理を行い、hCG注射後14時間に卵子を採取し、TYH mediumにて前培養した精巢上体精子で媒精した。媒精6時間後に受精卵を100 μ M EDTA加Whitten's mediumに移し、37℃、5% CO₂ in airで培養し、4-、8- および16-細胞期胚を採取した。4-および16-細胞期胚は、0.5% pronase を加えたWhitten's mediumで3~5分間培養して透明帯を除去後、全胚を検体として用いた。4-細胞期胚の一部はCa⁺⁺-, Mg⁺⁺-free Whitten's mediumで30分間培養してそれぞれ4つの割球に分離して検体とした。また8-細胞期胚より雀部らの方法³⁾により単一割球をbiopsyし、これを検体とした。全胚および割球を入れたチューブは-70℃で凍結後、直ちに94℃のheating blockに移し、20分間の加熱により内因性のdeoxy-ribonucleaseを破壊してからPCRによる増幅を行った。

【結果】Single PCR法ではgenomic DNA 100 pgまで増幅できたが、dual PCR法では10 pgまでの増幅が可能で、雄DNAではSry 147 bpおよびmyogenin 245 bpの2本の増幅産物が、また雌DNAではmyogenin 245 bpのみの増幅産物が検出された。4-および16-細胞期胚では、それぞれ24個中23個(96%)(雄12個、雌11個)および24個(100%)(雄11個、雌13個)の性別判定が可能であった。4-細胞期胚より分離した割球では84個中79個(94%)で性別判定が可能であり(雄44個、雌35個)、5個は増幅不良のため判定できなかった。胚単位では21個の4-細胞期胚のうち16個(76%)の胚で4個の割球の性別が一致した。Biopsyにより得た60個の割球のうち43個(72%)で性別判定が可能であり(雄18個、雌25個)、17個は判定不能であった。Dual PCR法により単一割球の性別判定が可能であった。また、割球のbiopsyから性別判定まで8時間以内で完了するためbiopsy後の胚を凍結保存せずに移植することができ、dual PCR法による着床前性別判定法をヒトへ応用することが可能であることが示唆された。

【文献】

- 1) R.K.Saiki, D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis and H.A. Erlich: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988; 239: 487-491
- 2) M.Morsy, L. Veeck, K. Takeuchi, G.D. Hodgen, R. Kaufmann and S.J. Beebe: Preclinical models for human pre-embryo biopsy and genetic diagnosis. II. Polymerase chain reaction amplification of deoxyribonucleic acid from single lymphoblasts and blastomeres with mutation detection. Fertil. Steril. 1992; 57: 431-438
- 3) 雀部 豊, 安部 裕司, 白井 彰, 池永 秀幸, 片山 進, 久保 春海, 百瀬 和夫: 着床前診断のための embryo biopsy 法に関する検討. 哺乳卵学誌. 1992; 9: 115-116

45 着床前診断を目的としたマウス体外受精胚に対する biopsy法の検討

Biopsy of Mouse Embryo Fertilized In Vitro as a Preclinical Model for Human Preimplantation Diagnosis

雀部 豊・矢野ともね・安部裕司・池永秀幸・白井 彰・片山 進・久保春海・平川 舜

Yutaka SASABE, Tomone YANO, Yuji ABE, Hideyuki IKENAGA,
Akira USUI, Susumu KATAYAMA, Harumi KUBO, Shun HIRAKAWA

東邦大学医学部第一産科婦人科学教室

1st Department of Obstetrics and Gynecology,
Toho University, School of Medicine

【目的】近年、体外受精法の進歩を背景とした発生工学の技術と分子生物学的手法が結びつくことにより、遺伝性疾患の着床前診断が可能となってきた。そして、その臨床応用に向けて、実験動物モデルを用いた基礎的研究が進んでいる。着床前診断を目的としたbiopsy法に必須の条件として、1) 胚発育に影響を及ぼさないこと、2) 遺伝子診断に適した検体が摘出できることの2条件があげられる。今回マウス体外受精胚を用いた臨床モデルにより着床前診断を目的としたbiopsy法について検討を行った。Biopsy法は、displacement法¹⁾およびextrusion法²⁾に修正を加えたexpulsion法を用いた。

【方法】体外受精：ICR系のマウスを用い豊田ら³⁾の方法に準じて体外受精を行った。媒精6時間後に雌雄前核を確認できた正常受精胚のみを100 μ M EDTA加Whitten's medium (WM)へ移し、5% CO₂ in air で培養を行った。

Micromanipulation：外径約80 μ m、内径約15 μ m、先端部を鈍とした胚固定用ピペットおよび先端部を約45度、内径約10 μ mとなるように研磨したbiopsy用ピペットを用いた。位相差顕微鏡下に胚固定用ピペットで胚を固定後、biopsy用ピペットにてCohenら⁴⁾の方法に準じたpartial zona dissectionを行い透明帯に摘出割球直径の約2/3の大きさのストリットを作り、対極の囲卵腔に挿入したbiopsy用ピペットより培養液を流入させ、割球を押し出すexpulsion法(図1)を行った。

I. 被摘出胚の体外培養：4, 8, 16細胞期胚に対してexpulsion法によるbiopsyを行い、4, 8細胞期胚より1個、16細胞期胚より1～2個の割球を摘出した。被摘出胚をWMへ戻し媒精96時間後まで培養を行い、胞胚形成を観察した。

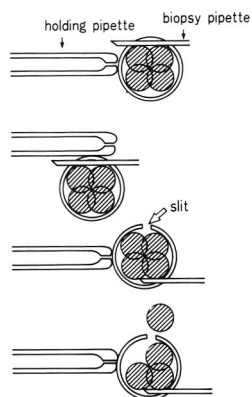


図1 Procedure of Expulsion Method

対照群は、biopsyを行わずに無処置の胚を媒精96時間後まで培養した。

Ⅱ.被摘出胚の移植：同様に、4,8,16細胞期胚各々に対してbiopsyを行い、遺伝子診断を行うことを想定して6～8時間培養後、移植へ供した。Recipientとして精管結紮雄と交配させた偽妊娠雌を用いた。対照群はbiopsyを行わずに無処置の胚をrecipientへ移植した。偽妊娠18日目に帝王切開を行い、着床痕、胎仔形成の観察および胎仔頭臀長、胎仔体重、胎盤重量の測定を行った。

Ⅲ.PCR法によるDNA増幅：摘出した単一割球は、dual PCR法によるDNA増幅に供した。

増幅目標は、Y染色体特異的配列であるSry遺伝子およびコントロール配列として常染色体上に存在するmyogenin遺伝子とした。増幅産物は、6% polyacrylamide gelで電気泳動し、ethidium bromideで染色後確認を行った。

【結果】Ⅰ.被摘出胚の体外培養：3/4細胞胚の胞胚形成率(媒精96時間後)は52.4%(22/42)であり、対照胚の胞胚形成率88.0%(44/50)より有意に低率であった($P < 0.001$, χ^2 test)。7/8, 14～15/16細胞胚の胞胚形成率は、各々対照胚と有意差を認めなかった。

Ⅱ.被摘出胚の移植：3/4細胞胚の着床率、胎仔形成率は各々58.7%(27/46)、19.6%(9/46)で、対照胚より有意に低率であった(各々 $P < 0.05$, 0.05 , χ^2 test)。7/8, 14～15/16細胞胚の着床率、胎仔形成率は、対照胚と有意差を認めなかった。また、胎仔頭臀長、胎仔体重、胎盤重量の測定により胎仔・胎盤の発育を比較したところ、3/4細胞胚は有意に対照胚より発育が良好であり、7/8, 14～15/16細胞胚は対照胚と有意差が認められなかった(Student's t-test)。すべての胎仔に外表奇形を認めなかった。

Ⅲ.PCR法によるDNA増幅：Dual PCR法によるDNA増幅に供された10個の摘出単一割球の内、2個の割球より245 bpのmyogenin遺伝子と147 bpのSry遺伝子が増幅され、6個の割球より245 bpのmyogenin遺伝子が増幅された。また、2個の割球からは両者とも増幅されなかった。

【考察】Expulsion法は8細胞期胚および16細胞期胚に対して適応することにより、被摘出胚の発育を阻害することなく、遺伝子診断に適した検体が摘出できることが示された。また、expulsion法の4細胞期胚に対する適応は、胚発育に影響を及ぼす可能性が示された。これが4細胞期胚のbiopsyに対する耐性が低いために起きた現象なのか、またはexpulsion法が4細胞期胚に適さなかったために起きた現象なのかについては今後の検討が必要である。

【文献】

- 1) Roudebush W.E. et al. : Am J Obstet Gynecol 1990; 162: 1084 - 1090
- 2) Takeuchi K. et al. : Fertil Steril 1992; 57: 425 - 430
- 3) Toyoda Y. et al. : Jpn J. Anim. Reprod. 1971; 16: 147 ~ 151
- 4) Cohen J. et al. : Fertil Steril 1991; 56: 696 - 706

マウス卵採取時の mono - poly resolving medium
処理と胚への影響

A procedure for collection of mouse ova using mono-poly
resolving medium and the effect of the medium on
the development of mouse embryo

末永美樹、栃木明人、橋本芳美、栃木武一*、佐藤和雄

Miki SUENAGA, Meijin TOCHIGI, Yoshimi HASHIMOTO,
Buichi TOCHIGI, Kazuo SATOH

日本大学医学部産婦人科学教室、川口市民病院産婦人科*

Department of Obstetrics and Gynecology,
School of Medicine, Nihon University
Department of Obstetrics and Gynecology,
Kawaguchi Shimin Hospital*

【 目的 】 卵の代謝系を検討する場合、酵素的サイクリング¹⁾による特殊な方法では、卵1個による解析が可能であるが、卵の代謝能や酵素活性の測定には通常多数の卵による検討が用いられている。卵子や胚は、その培養環境に非常に影響されやすく不安定であるために、光や空気との接触も含めてその取扱には注意が必要である。例えばマウス授精卵においては、低酸素下培養²⁾や superoxide dismutase(SOD)添加培養³⁾が2-cell blockを解除すると報告されているように酸化的ストレスは細胞障害を引き起し胚発育を障害するため、卵や胚を取り扱う場合には微小滴培養時のオイルの使用など大気との接触を避けなければならないと言われている。卵のみを採取する場合、卵管内の卵は多数の卵丘細胞に囲まれているためヒアルロニダーゼなどの酵素処理が必要である。そこで短時間で多数の卵を採取しなくてはならない場合を考慮して、今回我々は、白血球の分離に使用されている Hypaque-Ficoll法⁴⁾によるmono-poly resolving medium(M-PRM)を用いた比重遠心分離で多数の卵の同時採取を検討し、さらに採取した胚の発生に対する影響も検討を加えた。

【 方法 】 ICR系成熟雌マウスにPMSG 10IUおよびhCG 5IUずつ48時間間隔で腹腔内投与し過排卵処理を行った。hCG投与24時間後に卵管を摘出し、ヒアルロニダーゼ (500 μ g/ml) 含有のBWW液中で卵管膨大部を切開して未授精卵を採取した。採取した卵、卵丘細胞を含む液をM-PRM (ICN BIOCHEMICAL) に

重層し、遠心分離 (1000rpm、20min) した。M-PRMは3層とし、下層より原液、BWW液による2倍希釈、4倍希釈液とした。各層を採取してBWW液を添加し遠心 (1500rpm、15min) 後、各沈澱物について顕微鏡下で観察した。胚への影響は、マウスをhCG投与後雄と同居させ、48時間以降に卵管を摘出し還流して4細胞胚を採取した。胚は未受精卵と同様の分離操作処理後BWW液中で培養し胚発育を観察した。

【結果】M-PRMの性状は平均で原液：414mOsm/kg、比重：1.112、pH：6.8、2倍希釈液：353、1.049、7.6、3倍希釈：333、1.040、7.6、4倍希釈液：323、1.035、7.6、5倍希釈液：318、1.030、7.6であった。各層を顕微鏡下で観察した結果、原液層では卵丘細胞である小円形細胞が認められた。4倍希釈層では卵が認められその他の成分はほとんど認められなかった。M-PRMによる分離処理後の4細胞胚の発育は、対照では77.4%の胚が胚盤胞まで発生した。M-PRMで分離処理を行った胚の胚盤胞への発生は対照とほぼ同じで72.7%あった(表)。

【考察】卵は生体外では培養条件などで容易に影響され、受精卵では胚の発生が障害されるため生体外の操作を短時間で行なわなければならない。今回、我々が用いたM-PRMはすでに白血球分離に用いられており、細胞への影響についても検討されているが卵に対する影響については明かではない。本研究で4細胞胚の発生よりみた卵への影響は無く、しかも短時間に多数の卵を他の細胞から分離し採取可能であった。従って、本方法は多数の卵を用いる実験の際に有用と思われる。

表 4細胞胚発生におよぼすM-PRMの影響

group	4細胞胚	胚盤胞	率(%)
対照群	31	24	77.4
M-PRM群	22	16	72.7

【文献】

- 1) 馬岡 陽、野田洋一、松本 央、森 崇英：マウス前核期胚培養における酸素毒性の影響。日本不妊学会雑誌。1991;35:285-292.
- 2) 松本 央、野田洋一、馬岡 陽、森 崇英：Super Dismutase によるマウス2-Cell blockの解除。日本不妊学会雑誌。1990;35:294-299.
- 3) 堤 治、佐藤和雄、矢野 哲、木下勝之、水野正彦、坂元正一：マウス卵細胞のhexokinase活性とその受精後の変化。日本不妊学会雑誌。1983;28:399-430
- 4) Ferrante A. and Thong Y.H.:A]rapid one-step procedure for purification of mononuclear and polymorphonuclear leukocytes from human blood using a modification of the hypaque-ficoll technique. J of Immunological Methods. 1978;24:389-393

E1A 欠損 アデノウイルスベクターによる マウス初期胚への遺伝子導入

Gene transfer into mouse early embryos via E1A (-) adenovirus vector

津久井 通¹、東 貞宏¹、三宅 早苗²、斎藤 泉²、豊田 裕¹
Tohru TSUKUI¹, Sadahiro AZUMA¹, Sanae MIYAKE², Izumu SAITO², Yutaka TOYODA¹

¹ 東京大学医科学研究所獣医学研究部

¹Department of Reproductive and Developmental Biology,
Institute of Medical Science, The University of Tokyo

² 東京大学医科学研究所遺伝子解析施設

²Laboratory of Molecular Genetics,
Institute of Medical Science, The University of Tokyo

【目的】最近、非増殖型（E1A 欠損型）アデノウイルスベクターは、遺伝子治療のためのベクターとして注目されている。本研究で使用した Adex4SRLacZL¹⁾ もアデノウイルスの複製に必要な E1A 蛋白質を産生させずに外来遺伝子を発現させるように設計され、また細胞および組織での発現を確認できるように、SR α プロモーターの支配下に *E.coli* 由来の LacZ 遺伝子を挿入したベクターである。本研究では、このベクターを用いることによってマウス初期胚への外来性遺伝子の導入の可能性を検討した。

【方法】BCF₁ (C57BL/6 \times C3H) 雌マウスに、PMSG, hCG を各 7.5 i.u. 腹腔内に注射して過排卵を誘起した。精子提供雄には、同系統の雄マウスを用いた。培養およびウイルスとの反応は、すべて 5%CO₂, 95% 空気、37°C の条件下で行った。実験 1: hCG 投与後 14 時間に未受精卵を TYH²⁾ 培地中に採取し、ヒアルロニダーゼ (300 u/ml) で卵丘細胞を取り除いた。次に、酸性タイロイド液 (pH 2.5) で透明帯を溶解し、TYH で 3 回洗浄後、180 μ l の TYH に透明帯除去卵を移し、20 μ l に浮遊させた Adex4SRLacZL ウイルスを M.O.I. (ここで使用する M.O.I. は、未受精卵または受精卵を細胞 1 個と考えたときの目安である) = 10⁴, 10⁵, および 10⁶ となるように添加した。ウイルス添加の 2 時間後に、あらかじめ TYH で 2 時間前培養を行った精子を最終濃度が 5-10 精子/ μ l となるように添加し、体外受精を行った。ウイルス添加 6 時間後に受精卵を 100 μ M EDTA を含む Whitten 培地³⁾ (WM・EDTA) に移し 4 回洗浄後、桑実胚期 (72h) まで培養し、M.O.I. を変化させたときのマウス初期胚の β -ガラクトシダーゼの発現率および発生率を検討した。実験 2: hCG 投与後 16 時間に卵丘細胞に包まれた未受精卵を TYH 中に採取し、あらかじめ TYH で 2 時間前培養を行った精子を最終濃度が 150 精子/ μ l となるように

加えて体外受精を行った。媒精してから 3-6 時間後に、受精卵を WM・EDTA に移し、ヒアルロニダーゼ(300 u/ml) および酸性タイロイド液 (pH 2.5) で卵丘細胞および透明帯を除去した。次に、ウイルスを $M.O.I. = 10^6$ となるように添加した。ウイルス添加後、2, 4, 6, および 8 時間後に卵子を WM・EDTA に移し培養を継続し、発生率および発現率を調べた。さらに、 $M.O.I. = 10^6$ 、ウイルスとの反応を 6 時間に固定して、経時的 (24h, 36h, 48h, 54h, 72h, および 96h) に Adex4SR LacZL の発現時期を β -ガラクトシダーゼ 活性により調べた。Adex4SR LacZL の β -ガラクトシダーゼ活性は、卵子を 4mg/ml PVP-40 を含む 0.1Mリン酸Na緩衝液(pH 7.3) で 2 回洗浄した後に、0.25% グルタルアルデヒドで氷上において 10分間固定し、武田ら⁴⁾の方法に従い X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactoside) を基質とする酵素反応を利用した発色の有無により判定した。

【結果】実験 1: Adex4SR LacZL を透明帯除去卵子に加えてから体外受精を行った実験では、 $M.O.I. = 10^4, 10^5$, および 10^6 にした場合、媒精後 72 時間における桑実胚への発生率は、それぞれ 40.0, 33.3, および 16.7% であり、発現率 (LacZ 陽性卵数 / 検査卵数) は、それぞれ 48.0, 52.4, および 70.8%であった。透明帯で包まれた卵子では、発現はみられなかった。実験 2: 卵丘細胞存在下で体外受精を行った後に透明帯を除去し、ウイルスを加えた実験では、 $M.O.I. = 10^6$ に固定し、反応時間を 2, 4, 6, および 8 時間と変化させた場合 (処理区)、媒精後 96 時間における胚盤胞への発生率はそれぞれ、87.8, 83.2, 89.7, および 80.9% であった。透明帯除去、ウイルス無添加 (対照 A)、および透明帯あり、ウイルスとの反応 8 時間 (対照 B) の発生率は、それぞれ 82.1 および 96.3% であった。LacZ の発現率は、処理区でそれぞれ 37.5, 51.2, 85.3, および 87.7% であり、対照区 A, B では、ともに 0% であった。 $M.O.I. = 10^6$ に固定して、ウイルスとの反応時間を 6 時間に固定した場合の媒精後 24, 36, 48, 54, 72, および 96 時間における発現率はそれぞれ 1.6, 5.8, 34.8, 84.2, 91.5, および 85.3% であった。以上の結果から、外来性遺伝子の発現率は非常に高く、かつ初期胚の発生への影響も少ないため、E1A 欠損アデノウイルスベクターは、マウス初期胚への外来性遺伝子の導入に有効であると考えられる。

文献:

- 1) 斎藤 泉、辻 美保、三宅 早苗 (1992) アデノウイルスベクターによる遺伝子発現法、蛋白質核酸酵素 37:2688-2694
- 2) 豊田 裕、横山 峯介、星 冬四郎 (1971) 家畜繁殖研究会誌 16:147-151
- 3) 星 雅樹、豊田 裕 (1985) 日本畜産学会報 56:931-937
- 4) Takeda S, Toyoda Y (1991) Mol. Reprod. Dev. 30:90-94

哺乳動物卵子学会誌投稿規定

1. 投稿論文は、原則として哺乳動物卵子に関する未発表の和文または英文の原著 (Full paper)、短報 (Brief note)、総説 (Review)、その他 (論説、資料、文献紹介等) とし、著者は、原則として本会の会員に限る。
2. 投稿論文は、編集委員会で審査し、掲載が決定したものについて受付順に掲載する。
3. 論文は、次の規定に従って投稿する。
初投稿は手書かワープロしたものを投稿し、掲載が決定したものについては、本会指定の原稿用紙 (A4 版) に所定の様式に従って印刷したものと文書フロービ (3.5、5.0 インチ) を送付する。
 - (1) 和文、英文の両論文とも、和文、英文両方の表題、著者名、所属および要旨 (和文400字、英文150Words程度) を付記する。
 - (2) 原著は、緒言 (Introduction)、材料及び方法 (Materials and Methods)、結果 (Results)、考察 (Discussion)、文献 (References) の順序とする。なお、短報は原著に準ずるが項目分けはしない。
 - (3) 図、表、写真等のタイトル、説明は英文とし本文中に挿入する。
 - (4) 外国人の人名、地名などは原語、数字は算用数字、学術用語および単位の略語などは常用されているものを用いる。
 - (5) Key word phrase は一論文につき 5 個以内とする。なお、英文論文では Abstract の後に、和文論文では英文抄録の後に、短報では所属機関名の後に記入する。
 - (6) 引用文献の記載方法は下記の例に従う。
雑誌の場合：著者名 (年次)、表題、誌名、巻 (号)、頁-頁
 - 1) Bavister, B. and Yanagimachi, R. (1982): The effect of sperm extract and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.*, 16, 228~231.
 - 2) 新村末雄, 石田一夫 (1985): ハムスター顆粒層細胞における 17β -Hydroxysteroid dehydrogenase の組織化学的研究, 日不妊会誌, 30, 36-46.単行本の場合：著者名 (年次)、表題、書名、(編集者名)、頁-頁
発行所、発行地。
 - 3) Yamagimachi, R. (1981): Mechanisms of fertilization in mammals. In *Fertilization and Embryonic Development In Vitro* (Mastroianni, L. Jr. and Biggers J. D., eds) p81-90, Plenum Press, New York.
 - 4) 豊田 裕 (1984): 試験管内受精と初期胚培養-マウスを中心に, 哺乳類の発生工学 (大沢仲昭、江藤一洋、舘 鄰、御子柴 克彦編) p2~10、ソフトサイエンス社、東京。
4. 原著論文は、刷り上がり 6 頁以内、短報は同じく 2 頁以内とし、超過ページについては実費を著者負担とする。
5. 別刷を希望する時は 50 部単位で有償で受け付ける。
6. 原稿の送付および投稿に関する照会は、下記宛とする。

〒252 神奈川県藤沢市亀井野1866

日本大学農獣医学部獣医生理学研究室内

哺乳動物卵子学会編集委員会

哺乳動物卵子学会会則

第1章 総 則

(名 称)

第1条 本会は、哺乳動物卵子学会と称する。

(事務局)

第2条 本会の事務局は、東京都内または近隣県内に置く。

第2章 目的および事業

(目 的)

第3条 本会は、哺乳動物卵子の研究およびその成果の普及を図ることを目的とする。

(事 業)

第4条 本会は、前条の目的を達成するために、次の事業を行う。

- (1) 学術集会の開催
- (2) 学会誌の発行
- (3) 研究に関する情報の交換
- (4) その他本会の目的達成に必要な事業

第3章 会 員

(会 員)

第5条 本会は、次の会員をもって組織する。

- (1) 正会員は哺乳動物卵子に関する研究に従事しているか、または関心を有する者。
- (2) 賛助会員は本会の主旨に賛同する法人およびこれに準ずる者で理事会が認めたもの。
- (3) 本会には名誉会員をおくことができる。
名誉会員は、本会に多大の貢献のあった正会員で理事会で推薦し、総会で承認された者。

(入 会)

第6条 本会に入会しようとする者は、所定の入会申込書に必要事項を記入し、入会金および年度会費を添えて事務局に申し込むものとする。

(退 会)

第7条 会員で退会しようとする者は、退会届けを事務局に提出し、その年度までの会費を納入しなければならない。

第8条 会員は、次の事項に該当する時は会員の資格を失う。

(1) 会費未納の場合

(2) 会員として不適当と理事会が認め、総会でこれを承認した場合

第4章 役員

(役員)

第9条 本会に次の役員を置く。

会 長 1名

副会長 1名

理 事 25名以内

監 事 2名

評議員 若干名

幹 事 若干名

第10条 会長は、本会を代表し、会務を総括する。副会長は会長を補佐し、会長に事故があるときはその職務を代行する。

2. 理事および監事は、理事会を組織し、本会運営の重要事項について審議する。

3. 監事は、本会の業務および会計の執行について監査する。

4. 評議員は、評議員会を組織し、重要事項を審議する。

5. 幹事は、本会の会務に従事する。

第11条 役員の選出は、次によって行う。

(1) 会長および副会長は、理事の互選による。

(2) 理事および監事は、理事会で推薦し、総会で決定する。

(3) 評議員は理事会の推薦により、総会の議を経て選出される。

(4) 幹事は、会員中より会長が委嘱する。

第12条 役員の任期は2年とし、再任を妨げない。

第5章 会議

(理事会)

第13条 理事会は、年1回会長が招集する。また、会長が必要と認めた時は、臨時に理事会を招集することができる。

2. 理事会は定数の $\frac{1}{2}$ 以上をもって成立し、決議は、出席者の過半数をもって決する。

(評議員会)

第14条 評議員会は会長が招集し、評議員の $\frac{1}{2}$ 以上の者が出席しなければ、議事を開き決議することができない。但し、委任状

をもって出席とみなす。

2. 評議員会の議事は、出席評議員数の過半数をもって決する。

3. 評議員会の議長は、会長とする。

(総 会)

第15条 総会は毎年1回開催する。ただし、会長または理事の過半数が必要と認めたときは、臨時にこれを開くことができる。

2. 総会は会長が召集し、その議長となる。

3. 総会は正会員の5分の1以上の出席で成立し、出席者の過半数の賛成によって議決する。但し、委任状をもって出席とみなす。

第16条 総会は次の事項を審議し、決定する。

(1) 事業報告および決算

(2) 事業計画および予算

(3) 役員等選任および解任

(4) 名誉会員の推薦

(5) 会費の金額および徴集方法の決定、変更

(6) 会則の変更

(7) その他の必要事項

第7章 学術集会

(学会長選任)

第17条 学会長は理事会にて選出され、評議員会、総会により決定される。また、学会長の任期は1年とする。

(学術集会の運営)

第18条 学術講演会は学会長が主催する。

第7章 会 務

(会 計)

第17条 本会の会計年度は、毎年4月1日に始まり翌年3月31日に終わる。

2. 本会の経費は会費、寄付金およびその他の収入をもってこれにあてる。

附 則

この会則は、学会への移行に伴い平成3年4月1日から施行する。

秋の総会開催される

平成4年11月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議は去る10月21日から23日まで、第115回総会を開催しました。今回の日本学術会議だよりでは、同総会の議事内容及び総会中に発表した会長談話等についてお知らせします。

日本学術会議 第115回総会報告について

日本学術会議第115回総会（第15期・第4回）は、10月21日～23日の3日間開催されました。

総会の初日は、会長からの前回総会以降の経過報告に続いて、運営審議会附置委員会、部会、常置委員会、国際対応委員会、特別委員会の各委員長、部長からの報告がありました。また、本年9月27日から10月11日までの間、二国間学術交流委員会の代表団がアメリカ合衆国を訪問し、アメリカ合衆国の学術の現状を視察するとともに、大統領補佐官を始めとする連邦政府機関の関係者、国立科学財団の関係者、その他関係機関の関係者との意見交換を行い、多大なる成果が得られたとの訪米報告が行われました。午後からは各部会が開催され、国際対応委員会や研究連絡委員会の在り方等について審議が行われました。

なお、二国間学術交流の成果等に関する「平成4年度日米学術交流について」の会長談話を21日付けで発表しました。

総会2日目は、学術分野における国際貢献に関しての自由討議が行われ、国際貢献の意義、方針等について活発な討議が行われました。本件については、日本学術会議第15期活動計画の中に重点目標として掲げられており、また、昨 autumn の第113回総会において内閣官房長官から、学術研究の分野で我が国がどのような国際的貢献をなすべきかについて全学問領域から総合的に検討し、意見を出すよう求められ、以来、日本学術会議としては重要案件として審議してきたものです。

午後からは、米スペースシャトル「エンデバー」で微小重力実験に取り組んだ毛利衛さん、向井千秋さん、土井隆雄さんの三宇宙飛行士を招き、実験成果等の報告をしていただくとともに会員との意見交換が行われました。

なお、「学術分野における国際貢献について」の会長談話を22日付けで発表しました。

総会3日目は、文化としての学術特別委員会を始めとする各特別委員会、各常置委員会が開催されました。

平成4年度日米学術交流について(会長談話)

平成4年10月21日

- 1 本年度の日本学術会議の二国間学術交流事業として、9月27日から10月11日までの2週間にわたり、私を団長とし、各部所属の会員7名、その他事務局2名、計10名で構成する代表団がアメリカ合衆国を訪問した。
- 2 今回の日米学術交流は、21世紀に向けて我が国の学術の発展向上を図るためには、日米両国の緊密な連携協力が不可欠であることから、アメリカ合衆国の学術研究の現状と動向について調査するとともに、関係機関の責任者等と忌憚ない意見交換を行うためであった。なお、この機会に、いわゆるビッグ・サイエンスの象徴ともいえるべきSSC、NASA、NIH等の現地視察を行った。
- 3 連邦議会の会期末で1993年度予算案の調整等のため極めて多忙な時期であったにもかかわらず、いずれの機関においても、トップ又はそれに準ずる責任者が自ら出席するなど、代表団は温かく誠意あふれた応接を受け、関係者の日本の学術への期待が極めて大きいことが印象的であった。代表団の感想として特記すべき点をいくつか挙げれば、次のとおりである。
 - (1) アメリカ合衆国の学術政策の基盤は、確固たるものがあり、これに割り当てられる国家予算のスケールも大きい。これは、学術に対する同国の期待の大きさを表すものである。例えば、1863年にリンカーン大統領のイニシアティブで設立された科学アカデミーは、政府からの独立を前提とし、政府、議会の諮問に応えるなど、政府、議会との緊密な連携の下に、国民並びに人類の福祉の向上に寄与しているが、その後設立された工学アカデミー、医学会とともに、総額約250億円余に上る予算を毎年政府から受け取っている。これは、日本学術会議の使命と今後の発展を考える上で参考となるものである。

- (2) 学術の国際協力については、日米両国は、経済力、先端科学技術の水準から見ても、世界の中で指導的役割を果たすべき立場にあり、両国の学術交流を中心として新しい時代の知識と技術を創造し、人類の発展に寄与していく必要がある、との認識がアメリカ合衆国の関係者にあり、我が国としても、このことを考慮すべきである。
- (3) 日本政府が本年4月に決定した科学技術政策大綱における国家予算の倍增計画については、アメリカ合衆国の関係者は、大きな期待と好意とをもって注目している。
- (4) S S C、宇宙開発などのビッグ・サイエンスについては、それぞれの計画が学術における開拓者精神とでもよべき情熱をもって推進されていることをが、認められた。特に、3名の日本人宇宙飛行士達との懇談は感動的ともいふべき印象を残した。

また、S S C計画への資金面での参画問題については、我が国の学術研究の基盤自体が不十分であり、これの充実強化が優先的課題であること、欧州やアジア諸国等との協力をどう考えるか、S S C計画自体への国民の理解をどう促進するか、など今後早急に検討しなければならない課題があること、などの当方の説明に対して、これを傾聴する姿勢が見られた。

- 4 今回の日米学術交流の間に形成された代表団の一致した認識は、冷戦終焉後の新しい世界秩序形成過程における諸課題の一つとして、学術のあらゆる領域にわたっての国際協力が今後ますます重要性を持つということであった。そのことは、今回の代表団へのアメリカ合衆国側の対応からも十分窺われるところであった。
- 5 代表団としては、今回の訪米の結果について、総会、運営審議会、その他の関連の委員会等において会員に報告するとともに、政府関係者に対しても、必要に応じて報告を行う予定である。その上で、日本学術会議会員はもとより、政府並びに国民の間で、我が国の学術に関する国際協力・貢献の在り方について十分な論議が行われるよう強く期待するものである。
- 6 終わりに、今回の代表団の訪米に当たり、格別の御協力をいただいたアメリカ合衆国側関係者及び在アメリカ合衆国日本大使館の関係者に対し、ここに深い感謝の念を表するものである。

学術分野における国際貢献について(会長談話)

平成4年10月22日

現在、我が国の国際的な貢献が強く求められており、各方面でその方策が討議されているところである。日本学術会議としては、平成3年10月の第113回総会において、時の坂本三十次内閣官房長官から、学術研究の分野で我が国がどのような国際的貢献をなすべきかについて全学問領域から総合的に検討するよう求められ、以来、特別委員会を設けて検討するとともに、今回の第115回総会においても、会員全員による討議を行った。

今回の総会での討議を踏まえ、私としては、次の点を強調したい。

- 1 本来学術の国際貢献とは、日本における学術研究の成果を広く世界に伝達・発信し、学術の進歩に貢献することである。
- 2 海外から研究者が進んで来日し、優れた研究成果を挙げられるような高水準の研究施設を整備するとともに、外国人が日本の文化・学術を吸収する能力を高められるような諸条件を整備・充実する必要がある。
- 3 上記2を実現するためには、省庁の枠を超え、官民の総力を結集して、必要な資金の確保、人材の養成等についての基本方策を策定し、推進する新しいシステム(例えば学術協力機構)が必要である。

上記の趣旨を踏まえ、本会議としては、具体的な貢献策について提案すべく、全力を挙げて検討し、速やかに結論に達したいと考えている。

日本学術会議主催公開講演会

本会議では、毎年公開講演会を開催しています。この講演会は会員が講師となり、一つのテーマを学際的に展開しています。平成4年度最後の公開講演会が決まりましたので、お知らせします。多数の方々の御来場をお願いします。入場は無料です。

公開講演会「科学技術を通じての国際貢献」

日時 平成5年2月22日(月) 13:30~16:30

会場 日本学術会議講堂

演題・演者

「日本の科学技術」

西澤潤一 第5部会員
(東北大学学長)

「社会科学と自然科学との学際研究を通じての国際貢献」

松田武彦 第1部会員
(産能大学学長)

「日本の貴重な体験の伝授」

猪瀬 博 第5部会員
(学術情報センター所長)

「21世紀の科学技術」

近藤次郎

日本学術会議会長

〔申込み先〕 はがきに、住所・氏名・郵便番号を明記し、2月15日までに下記宛てお申し込みください。

〒106 東京都港区六本木7-22-34

日本学術会議事務局「公開講演会係」

☎ 03-3403-6291 内線 227,228

御意見・お問い合わせ等がありましたら、下記までお寄せください。

〒106 東京都港区六本木7-22-34

日本学術会議広報委員会 電話03(3403)6291

「アジア学術会議(仮称)」の開催決まる

平成 5 年 3 月 日本学術会議広報委員会

「アジア学術会議(仮称)」の開催経費を含む日本学術会議の平成 5 年度予算が決まりましたので、その概要についてお知らせします。

平成 5 年度日本学術会議予算

日本学術会議の第15期活動計画の大きな柱である「学術研究の国際貢献の重視」の具体的方策の一環として、「アジア学術会議(仮称)」の開催が、平成 5 年度予算によって実現することとなりました。その内容は、学術研究が環境問題等の諸課題を克服し、人類の繁栄と世界の平和に寄与するとの認識に立って、本年秋に東京で、我が国と地理的・文化的に関係の深いアジア各国を代表する学術研究者が一堂に会して、各国における学術研究の現状、アジア地域

における連携・協力のあり方などに関し意見を交換する場として開催するものです。我が国を含め10か国程度のアジア諸国から、代表者を招へいする予定です。

その他、平成 5 年度予算では、国際分担金の25団体に対する単価アップが認められ、国際会議の国内開催費については、アジア社会科学、植物科学、太平洋学術、電波科学、純粋・応用物理学、気象・水分、の6国際会議の開催を予定しています。また、世界各地で開催される学術関係国際会議への代表派遣や二国間交流に必要な経費が計上されております。

平成 5 年度予算概算決定額表は、下記のとおりであります。

(単位：千円)

事 項	前 年 度 予 算 額 A	平成 5 年度 予 算 額 B	比 較 増 △ 減 額 C = B - A	備 考
日本学術会議の運営に必要な経費	1,042,482	1,095,827	53,345	対前年度比較 105.1%
審 議 関 係 費	248,789	265,525	16,736	○地球圏－生物圏国際協同研究計画 (IGBP)シンポジウム、公開講演会等
国際学術交流関係費	198,514	221,254	22,740	
国際分担金	67,089	74,722	7,633	
国内開催	80,596	73,543	△ 7,053	
代表派遣	44,006	44,006	0	
二国間交流	6,823	6,823	0	
アジア学術会議	—	22,160	22,160	
会員推薦関係費	21,216	19,574	△ 1,642	
一般事務処理費	573,963	589,474	15,511	

日本学術会議第16期会員の推薦について

日本学術会議の会員は、従来、科学者を有権者とする直接選挙によって選出されていましたが、日本学術会議法の一部を改正する法律（昭和58年法律65号）により、第13期（昭和60年7月22日）から、学術研究団体を基盤とする推薦・任命制に改められました。来年7月で、この推薦制度も三期9年を経過することとなります。

この会員選出制度のあらましは、次のとおりです。

- ① 日本学術会議は、一定の要件を備える学術研究団体を、その申請により登録する。
- ② 登録学術研究団体は、その構成員である科学者のうちから、会員の候補者を選定し、及び会員の推薦に当たる推薦人を指名し、それぞれ、日本学術

会議に届け出る。

- ③ 推薦人は、会員推薦管理会がその資格があると認定した会員の候補者のうちから、会員として推薦すべき者及び補欠の会員として推薦すべき者を決定し、日本学術会議を経由して内閣総理大臣に推薦する。
- ④ 内閣総理大臣は、上記③の推薦に基づいて、会員を任命する。
- ⑤ 学術研究団体の登録、会員の候補者の資格の認定その他会員の推薦に関する所要の事務は、日本学術会議に置かれる会員推薦管理会が行う。

以上の概要を第16期（平成6年7月－平成9年7月）の会員選出日程によると、次表のようになり、これに従って今後の事務処理が行われる予定になっています。

日本学術会議第16期会員選出手続日程

平成5年	5月31日(月)まで	学術研究団体の登録申請の締切り
	9月上旬	登録審査結果の通知
	不登録通知を受けた日の翌日から20日以内	不登録通知を受けた団体からの異議の申出受付
	9月上旬	関連研究連絡委員会についての意見聴取*
	10月下旬	〈団体関係〉異議の申出に対する決定
	11月30日(火)まで	関連研究連絡委員会の指定*
	12月上旬	会員の候補者の選定及び推薦人の指名の依頼
平成6年	1月31日(月)まで	会員の候補者の届出の締切り
	2月21日(月)まで	推薦人（予備者を含む）の届出の締切り
	3月20日(日)まで	会員の候補者の資格の認定等の通知
	3月下旬	推薦人に会議開催等の通知発送
	不認定通知を受けた日の翌日から20日以内	会員の候補者の資格の不認定通知を受けた学術研究団体又は会員の候補者からの異議の申出受付
	4月20日(水)まで	〈会員の候補者関係〉異議の申出に対する決定
	5月中旬から6月上旬まで	推薦人会議（会員及び補欠の会員として推薦すべき者を決定）
	6月中旬	日本学術会議を経由して内閣総理大臣へ推薦
	7月22日(金)	第16期日本学術会議会員の任命

注：＊は、日本学術会議会長が意見聴取し、指定する。

日学双書の刊行について

日本学術会議主催公開講演会及び公開シンポジウムの記録をもとに編集した、次の日学双書が刊行されました。

- 日学双書第15刊 「文明の選択－都市と農業・農村の共存を目指して－」
定価1,000円（消費税込み、送料240円）
- 日学双書第16刊 「子どもの人権を考える」
定価1,000円（消費税込み、送料240円）
- 日学双書第17刊 「首都機能の一極集中問題」
定価2,000円（消費税込み、送料310円）

（問い合わせ先）

〒106 東京都港区西麻布3-24-20
交通安全教育センター内
（財）日本学術協力財団
☎03-3403-9788

御意見・お問い合わせ等がありましたら、下記までお寄せください。

〒106 東京都港区六本木7-22-34
日本学術会議広報委員会 電話03(3403)6291

編 集 後 記

会員の皆様に哺乳動物卵子学会誌の第10巻第1号をお届けいたします。

今冬季も暖冬となり、春のおとずれも例年より早いようですが、会員の皆様にはお変わりなく研究活動に邁進されていることと存じます。

早いもので談話会から研究会に移行し、会誌を発刊するようになりました。10年目を迎えることができました。この間会誌の発刊が滞ることなく発刊できたことは、会員に皆様のご協力、ご支援によるものと感謝しております。今号には、原著論文7編と第34回大会の要旨48題分を掲載いたしました。今後、本誌が益々充実するよう努力いたしますのでご支援のほど宜しくお願い申し上げます。なお、10巻第2号の掲載論文を受付ておりますので、ご投稿下さいますようお願い申し上げます。

(遠藤 克)

編 集 委 員

委員長：石 島 芳 郎

委 員：伊藤雅夫，井上正人，遠藤 克，小栗紀彦

久保春海，香山浩二，新村末雄，星 和彦

哺乳動物卵子学会誌 Jurnal of Mammalian Ova Research

第 10 巻 第 1 号

Vol.10 NO.1

平成5年3月25日 印刷

平成5年4月1日 発行

(会 員 頒 布)

発行者 哺乳動物卵子学会
代 表 豊 田 裕

発行所 哺乳動物卵子学会
〒252 藤沢市亀井野1866
日本大学農獣医学部獣医生理学教室内
TEL.0466-81-6241 (内332)
郵便振替 横浜 8-20350

印刷所 誠和印刷株式会社
住 所 藤沢市城南5丁目2番8号
電 話 0466-34-9110 (代表)

日本薬局方 注射用胎盤性性腺刺激ホルモン

動物
専用

フベローゲン[®]

1,500単位
3,000単位
5,000単位
10,000単位

日本薬局方 注射用血清性性腺刺激ホルモン

動物
専用

ピーメックス[®]

1,000単位

販売元



三共株式会社

東京都中央区銀座2-7-12

製造元



三共ゾーキ株式会社

東京都品川区広町1-4-4

下垂体性性腺刺激ホルモン パーゴナル[®]注75・150

- 強力な卵胞成熟ホルモン（FSH）作用により、卵胞の発育と成熟を促し、胎盤性性腺刺激ホルモン（HCG）との組合わせ投与により排卵を誘発します。
- 更年期婦人尿由来の下垂体性性腺刺激ホルモン（HMG）製剤であり、反復投与が可能です。
- FSH活性のほかにLH活性を有し、その活性化（FSH/LH）はほぼ一定です。



【効能・効果】

間脳性（視床下部性）無月経，下垂体性無月経の排卵誘発

【用法・用量】

1日卵胞成熟ホルモンとして75～150国際単位を連続筋肉内投与し、頸管粘液量が約300mm³以上、羊歯状形成（結晶化）が第3度の所見を指標として（4日～20日，通常5日～10日間），胎盤性性腺刺激ホルモンに切り変える。

【包装】

パーゴナル注 75：10管
パーゴナル注150：10管



帝國臓器製薬株式会社
東京都港区赤坂二丁目5番1号

【使用上の注意】

1. 一般的注意
 - 1) 本療法の対象は不妊症患者のうちの，間脳又は下垂体前葉の機能・器質的障害に由来する性腺刺激ホルモン低分泌無月経患者であるので次の点に注意すること。
 - ア．エストロゲン・プロゲステロンテストで初めて反応する第2度無月経又は抗エストロゲン療法（クエン酸クロミフェン，シクロフェニル等）が奏効しない第1度無月経の患者に投与すること。
 - イ．患者の状態（例えばエストロゲン・性腺刺激ホルモン・プレグナニジオール分泌，頸管粘液，基礎体温等）を詳細に検査し，子宮性無月経の患者には投与しないこと。
 - ウ．原発性卵巣不全による尿中性腺刺激ホルモン分泌の高い患者，副腎・甲状腺機能の異常による無月経患者，頭蓋内に病変（下垂体腫瘍等）を有する患者，及び無排卵症以外の不妊患者には投与しないこと。
 - 2) 本療法の卵巣過剰刺激による副作用を避けるため，投与前及び治療期間中は毎日内診を行い，特に次の点に留意し，異常が認められた場合には，直ちに投与を中止すること。
 - ア．患者の自覚症状（特に下腹部痛）の有無
 - イ．卵巣腫大の有無
 - ウ．基礎体温の異常上昇の有無（毎日測定させること）。
 - エ．頸管粘液量とその性状
 - 3) 卵巣過剰刺激の結果としての多胎妊娠の可能性があるため，その旨をあらかじめ患者に説明すること。
 - 4) 妊娠初期の不注意な投与を避けるため，投与前少なくとも1ヵ月間は基礎体温を記録させること。
 - 5) 産婦人科・内分泌専門医師の管理のもとに投与すること。
2. 次の場合には投与しないこと
 - 1) 卵巣腫瘍及び多のう胞性卵巣症候群を原因としないう卵巣の腫大を有する患者
 - 2) 妊婦
 3. 次の患者には投与しないことを原則とするが，やむを得ず投与する場合には，慎重に投与すること。
 - 1) 児を望まない第2度無月経患者
 - 2) 多のう胞性卵巣を有する患者
 4. 副作用
 - 1) 卵巣過剰刺激 卵巣腫大，下腹部痛，下腹部緊迫感，腹水・胸水を伴ういわゆる，Meigs様症候群等があらわれた場合には，直ちに投与を中止するなど，適切な処置を行うこと。
 - 2) その他 とときに悪心，頻尿，しびれ感，頭痛，浮腫があらわれることがある。また尿量が増加することがある。
 5. 相互作用

胎盤性性腺刺激ホルモンとの併用により，卵巣の過剰刺激による卵巣腫大，腹水・胸水を伴ういわゆるMeigs様症候群があらわれることがある。

プロゲステロン測定EIAキット!

動物用医薬品(体外診断用)

オブチェックカウサイドW

牛乳中プロゲステロン定性キット

- わずか10分間で牛乳中プロゲステロン濃度が定性的に判定できます。

包装32ウェル/キット

新 発 売

オブチェック血液用EIAキット

血液中プロゲステロン定量/定性キット

- 乳汁を採取しにくい和牛や馬及び未経産牛に適切なキットです。

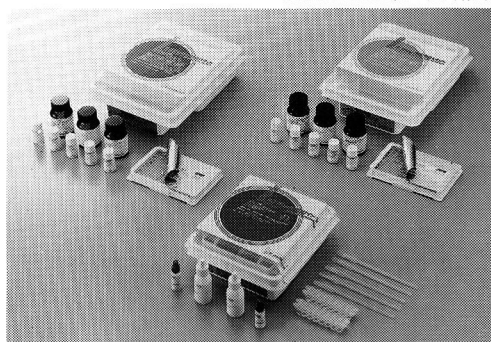
包装96ウェル/キット

オブチェック牛乳用EIAキット

牛乳中プロゲステロン定量/定性キット

- 全乳中のプロゲステロン濃度が約1.5時間で定量測定できます。

包装96ウェル/キット



お問い合わせ▶営業部 ☎044-266-0400

製造元

ケンブリッジ ペテリナリー サイエンス社

Cambridge Veterinary Sciences
a division of Cambridge Life Sciences plc

輸入発売元

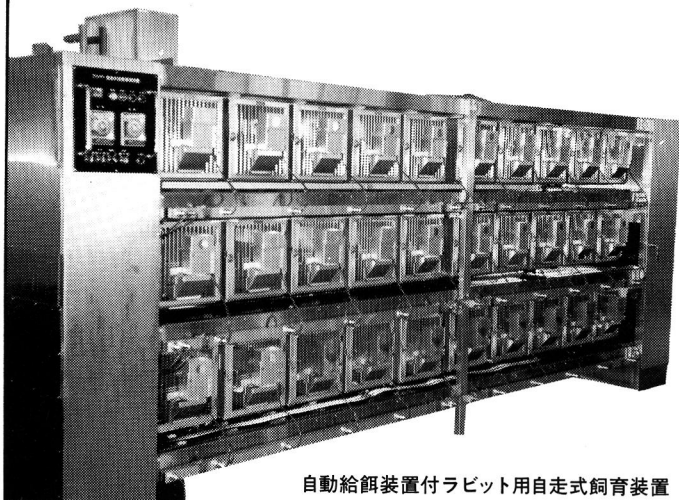


デンキ製薬株式会社

神奈川県川崎市川崎区中瀬3丁目19番11号 〒210

給餌の自動化を実現いたしました!!

自動給餌装置は各ケージに1台ずつ取付けるカートリッジタイプの本体とそれらを一括自動制御するシステムから成立っています。



自動給餌装置付ラビット用自走式飼育装置

MRF-03 ラット・マウス用・DF-01 犬用
もあります。詳細はカタログ御請求下さい。



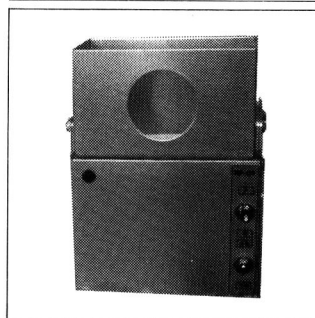
OKAZAKI

岡崎産業株式会社

本社 〒104 東京都中央区八丁堀4丁目4-3号
電話 東京 03 (3552) 4561 番

自動給餌装置

RF-01 ラビット用



特 徴

- 希望時間に一定量の給餌が出来、正確な給餌量の為エサ代及び人件費の節約。
- 連続6日間の給餌可能であり、休日の飼育管理の時間の節約。
- 従来のケージにも簡単に取付け出来ます。
- 安全性を考え完全防水型に設計されております。
- 当社の誇る自動制御システムによりコントロールし、取扱いは非常に簡単です。
- 本体はアルミ製で軽量コンパクトです。

