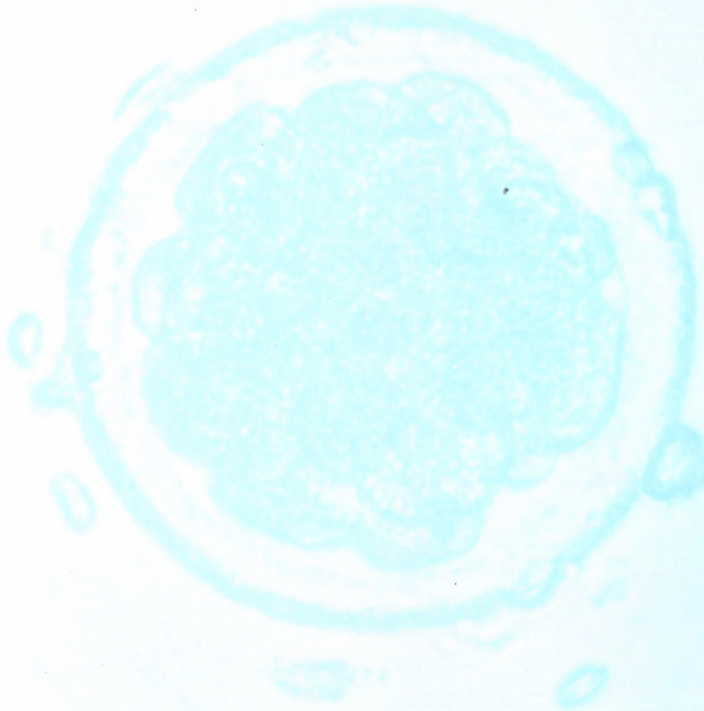


哺乳卵学誌  
J. Mamm. Ova Res.

# 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. 2**

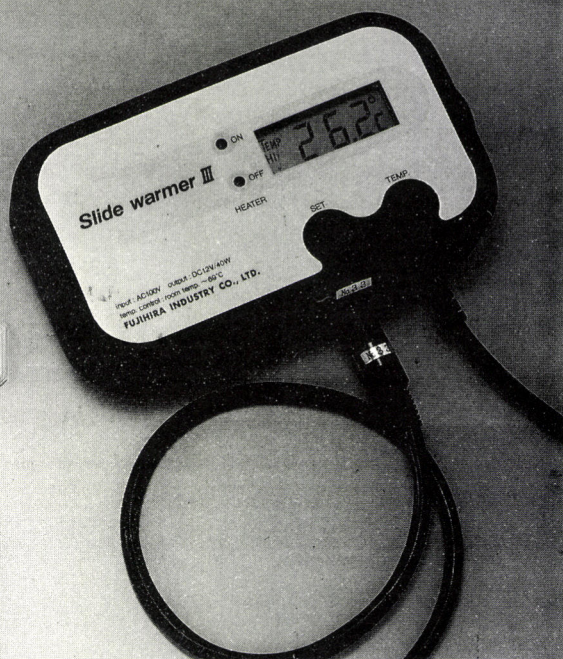
October 1993



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 〒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  
—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





## 第35回 哺乳動物卵子学会開催のご案内

下記により第35回哺乳動物卵子学会および総会を開催致します。多数の会員の参加をお願い致します。

第35回 哺乳動物卵子学会  
大会長 佐藤 和雄

### 記

期 日：1994年4月27日（水）・28日（木）  
会 場：日本大学会館 2階 大講堂  
〒102 東京都千代田区九段南4-8-24  
電話 03(3262)2271

会 長 講 演：「卵の成熟と胚発生をめぐる話題」

ワークショップ：「卵子研究における新技術」

一 般 講 演：前回の講演と同様に講演内容をオフセット印刷し、哺乳動物卵子学会誌11巻1号に講演要旨として掲載いたします。講演原稿は2ページにおまめ頂きます。

発表時間は1題7分、討論3分を予定しておりますが、演題数によっては変わることがありますのでご了承願います。

演 題 申 込：締切／1994年1月25日（火）必着

講演の申込は、葉書に演題名（和文および英文）、発表者名および共同研究者（ローマ字）を記入のうえ、下記宛お送り下さい。折り返し、発表内容を記載する原稿用紙をお送り致します。

講演原稿の締切は、1994年2月26日（土）必着とさせていただきます。

〒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教室  
哺乳動物卵子学会事務局 遠藤 克 宛  
電話： 0466(81)6241 内線2125

総 会：4月28日（木）13:00～13:30  
日本大学会館 大講堂

懇 親 会：4月27日（水）18:00～20:00  
私学会館 5階 穂高

〒102 東京都千代田区九段北4-2-25  
電話：03(3261)9921

大会事務局：〒173 東京都板橋区大谷口上町30-1  
日本大学医学部産科婦人科学教室内  
第35回哺乳動物卵子学会事務局  
大会幹事 栃木 明人  
電話：03(3972)8111 内線2522  
FAX：03(3972)9612

当大会では日本産科婦人科学会の認定医シールが発行される予定です。







目次

原著

胚盤胞形成過程におけるウシ培養胚の割球接合に関する研究 (英文)

四谷伊公子、柳 在雄、松本浩道、菅原七郎、新村末雄、石田一夫…………… 152

室内繁殖コロニーで死亡したカニクイザルの卵巢から回収した卵子の成熟培養と体外受精

山海 直、榊原一兵、長 文昭、吉川泰弘 …………… 161

器官培養マウス卵巢において発育初期から体外発育した卵母細胞の成熟能力 (英文)

平尾雄二、池田佳久、宮野 隆、加藤征史郎 …………… 167

ブタ卵子の体外受精および発生に及ぼす卵子成熟培養時間および媒精後の精子との共培養時間の影響 (英文)

加野浩一郎、廣岡亮介、宮野 隆、加藤征史郎 …………… 175

Ethyleneglycol, Polyethyleneglycol及びSucroseを用いたラット胚盤胞のガラス化凍結保存 (英文)

大星茂樹、仲道麗子、藤原 昇 …………… 185

白血病細胞増殖抑制因子 (L I F) 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

加藤容子、小田垣諭司、角田幸雄 …………… 194

Brinster培養液とDulbecco修正Eagle培養液によるキメラマウス胚の培養と移植の試み

川島康成、高橋寿太郎、安田泰久 …………… 200

透明帯除去マウス卵子の体外受精における侵入精子数の分布

山田秀一、福田芳詔、豊田 裕 …………… 206

共培養法によるES細胞キメラマウスの作出 (英文)

杉野友啓、東 貞宏、佐藤英明、豊田 裕 …… 216



# Journal of Mammalian Ova Research

Vol.10 No.2

October 1993

## Contents

### Originals

Construction of junctional complexes in bovine embryos in the process of blastocyst formation in vitro

YOTSUTANI, I., Z. Y. RYOO, H. MATSUMOTO, S. SUGAWARA,  
S. NIMURA & K. ISHIDA ..... 152

In vitro maturation and in vitro fertilization of eggs recovered from ovaries of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) at necropsy in a indoor breeding colony.

SANKAI, T., I. SAKAKIBARA, F. CHO & Y. YOSHIKAWA ..... 161

Meiotic maturation of mouse oocytes grown from primary stage in ovaries cultured in vitro

HIRAO, Y., Y. IKEDA, T. MIYANO & S. KATO ..... 167

Effects of the time of maturation culture and subsequent co-culture with spermatozoa on fertilization and early cleavage of pig oocytes in vitro

KANO, K., R. HIRO-OKA, T. MIYANO. & S. KATO ..... 175

Cryopreservation of rat blastocysts by vitrification using ethyleneglycol, polyethylene glycol and sucrose

OHBOSHI, S., R. NAKAMICHI & N. FUJIHARA ..... 185

Effects of leukemia inhibitory factor (LIF) on the developmental ability of mouse 8-cell embryos in vitro and in vivo

KATO, Y., S. ODAGAKI & Y. TSUNODA ..... 194

An attempt to culture chimeric mouse embryos in a Brinster's medium and Dulbecco's modified Eagle medium.

KAWASHIMA, Y., J. TAKAHASHI & Y. YASUDA ..... 200

Distribution of the number of penetrating sperm in zona-free mouse eggs fertilized in vitro.

YAMADA, S., Y. FUKUDA & Y. TOYODA ..... 206

Production of chimeric mice by coculture of embryonic stem cell and zona-free embryos.

SUGINO, T., S. AZUMA, E. SATO & Y. TOYODA ..... 216



## Construction of Junctional Complexes in Bovine Embryos in the Process of Blastocyst Formation In Vitro

Ikuko YOTSUTANI<sup>1)</sup>, Zae Young RYOO<sup>2)</sup>, Hiromichi MATSUMOTO<sup>2)</sup>,  
Sichiro SUGAWARA<sup>2)</sup>, Sueo NIIMURA<sup>3)</sup> and Kazuo ISHIDA<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Graduate School of Science and Technology, Niigata University, Niigata-shi 950-21,

<sup>2)</sup>Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai-shi 980,

and <sup>3)</sup>Faculty of Agriculture, Niigata University, Niigata-shi 950-21

**Abstract:** The formation of junctional complexes and the location of actin and cyto-keratin were examined in bovine embryos which were being transformed in vitro into blastocysts. In 16-cell embryos and morulae, gap junctions were observed between some pairs of blastomeres, though not very often. In early blastocysts, however, three kinds of junctions, i.e., zonula occludens, predesmosomes and gap junctions were found between each pair of trophoblast cells. Gap junctions were seen between a pair of inner-cell-mass cells, and between a trophoblast cell and an inner-cell-mass cell, also. In expanded blastocysts, zonula occludens, zonula adherens, desmosomes and gap junctions were found between each pair of trophoblast cells, while predesmosomes and gap junctions were found between each pair of inner-cell-mass cells, and between a trophoblast cell and an inner-cell-mass cell. Meanwhile, actin and cytokeratin fluorescences were observed throughout the cytoplasm of embryos at the 16-cell through blastocyst stages, and they were more prevalent in the ectoplasmic zone of trophoblast cells in blastocysts. **Key words:** Bovine embryo, In vitro, Junctional complex, Cytoskeletal protein

(Received 14 May 1993, Accepted 2 September 1993)

### Introduction

The blastomeres of in vivo hamster<sup>1,2)</sup>, rat<sup>2-4)</sup>, mouse<sup>2,5-7)</sup> and rabbit<sup>2,8,9)</sup> embryos are known to undergo transformation to be differentiated into trophoblast cells and inner-cell-mass cells, when junctional complexes are constructed between all pairs of blastomeres. Such changes have been observed in the blastomeres of in vitro mouse<sup>5)</sup> and rabbit<sup>8)</sup> embryos. As for in vivo bovine blastocysts, junctional complexes have been observed between all pairs of trophoblast cells, all pairs of inner-cell-mass cells and between each pair of a trophoblast cell and an inner-cell-mass cell<sup>10,11)</sup>. As for in vivo construction of junctional complexes, this has been examined neither in 16-cell embryos<sup>12)</sup> nor in 32-cell embryos<sup>13)</sup>, though transformation of blastomeres has. In vitro construction of such complexes in bovine

embryos has not been studied, either.

Actin and cytokeratin are constituents of zonula adherens and desmosomes respectively<sup>14)</sup>, and it has been reported that the location of these cytoskeletal proteins in mouse embryos changes during blastomere transformation in blastocysts<sup>15-20)</sup>. As for other species, however, there has been no report of the detection of actin and cytokeratin. In the present study, the formation of junctional complexes and the location of actin and cytokeratin were examined in the process of blastocyst formation of in vitro bovine embryos.

## Materials and Methods

### Collection and in vitro maturation of oocytes

Bovine ovaries (Japanese Black) were obtained at a slaughter house. Immature oocytes covered with cumulus were collected by sucking out of visible follicles measuring 2 - 5mm in diameter. The cumulus-oocyte complexes were cultured for maturation at 39°C for 22 hrs in 350  $\mu$ l droplets of TCM-199 (Gibco Lab., Grand Island, U.S.A.) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Nissui Co., Tokyo, Japan) and covered with mineral oil (Squibb and Sons, Inc., Princeton, U.S.A.) in a CO<sub>2</sub> incubator (5% CO<sub>2</sub>, 95% air).

### Sperm capacitation

After having thawed frozen semen obtained from males of the same species, the semen was washed three times in BO medium<sup>21)</sup> containing 10mM caffeine (Sigma, St. Louis, U.S.A.) and 10  $\mu$ g/ml heparin (Sigma). The sperm suspension was diluted with BO medium containing 10mM caffeine and 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma), so that the final concentration of live spermatozoa was adjusted to  $5 \times 10^6$ /ml.

### In vitro fertilization and culture

Cumulus-oocyte complexes after maturation culture were introduced into droplets of the sperm suspension and cultured at 39°C for 6 hrs under mineral oil in a CO<sub>2</sub> incubator. After insemination, cumulus-oocyte complexes were washed three times in TCM-199 containing 5% FBS (culture medium) and cultured at 39°C for 48 hrs in culture medium, and then the cumulus cells surrounding embryos were removed. The denuded embryos were cocultured with a monolayer of cumulus cells laid below, at 39°C for 7 days in fresh culture medium with mineral oil on top in a CO<sub>2</sub> incubator. The culture medium was replaced with fresh medium every 48 hrs.

Embryos observed were at the 16-cell stage (3-4 days after insemination), the morula stage (5-6 days), the early blastocyst stage (7-8 days) and the expanded blastocyst stage (8-9 days).



#### Procedure for electron microscopy

Some of the embryos were fixed in a 0.1M cacodylate buffer solution (pH 7.4) containing 4% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde at 4°C for 3 hrs. Rinsed three times in a 0.1M cacodylate buffer solution (pH 7.4) over night, they were postfixed in a 0.1M cacodylate buffer solution (pH 7.4) containing 1% osmium tetroxide. The embryos thus fixed 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 lead nitrate, and then were photographed under a JEM-100B electron microscope.

#### Procedure for the detection of actin

Approximately half of the remaining embryos were fixed in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)<sup>22)</sup> 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 Lab., Richmond, U.S.A.) at room temperature for 5 min. Again rinsed in a PBS, the embryos were immersed in 100  $\mu$ l PBS containing 16.5ng phalloidin (Molecular Probes Inc., Junction City, U.S.A.) at room temperature for 20 min. As for the controls, a few embryos treated as above were immersed in a PBS devoid of phalloidin.

#### Procedure for the detection of cytokeratin

The rest of the embryos whose zonae pellucidae had been removed with pronase (Sigma) were fixed in a PBS containing 2% paraformaldehyde at room temperature for 30 min. Rinsed in a PBS containing 100mM glycine (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) and 0.3% BSA (BSA-PBS), they were immersed in a BSA-PBS containing 0.25% Tween-20 at room temperature for 5 min. Rinsed again in a BSA-PBS, the embryos were immersed in rabbit anti-keratin serum (Transformation Research Inc., Framingham, U.S.A.), the primary antibody, that reacts with cytokeratin polypeptides (molecular weights, 50,000, 54,000 and 57,000)<sup>23,24)</sup>, the antiserum having been diluted 30 times with a PBS. The embryos treated were rinsed in a PBS, most of which to be immersed in FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (Cappel, Durham, U.S.A.), the secondary antibody, at room temperature for 60 min. As for the controls, the remaining few were treated with normal rabbit serum (1:30) or treated simply with FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG.

The embryos thus prepared for actin and cytokeratin observations were placed one or a few at a time in the center of 4 vaseline spots on a slide. A cover slip was then carefully placed on the vaseline spots and pressed gently to anchor the embryos between the cover slip and the slide. Observation was carried out under a reflected-light fluorescing microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan).

## Results

### Junctional complexes

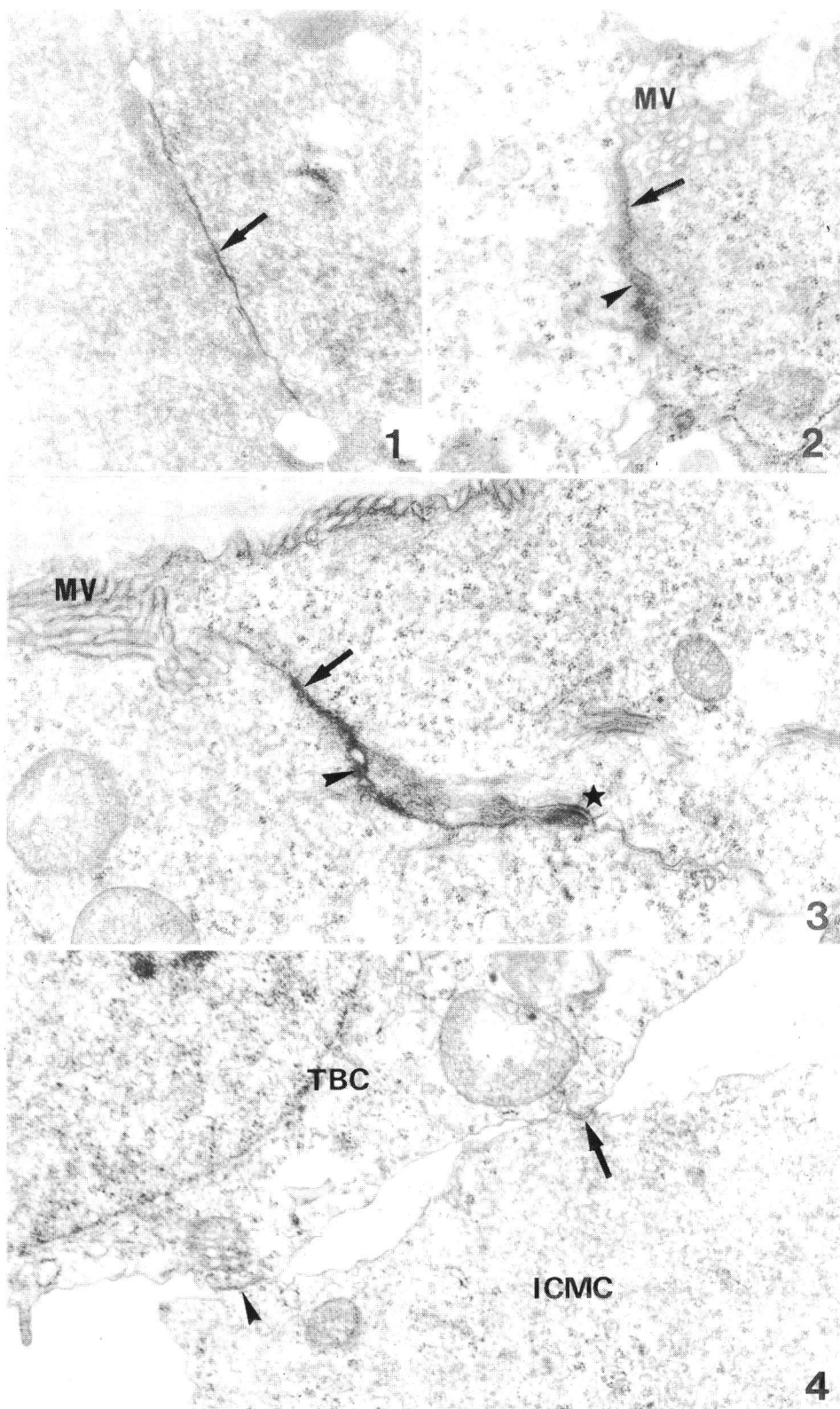
All the blastomeres of 16-cell embryos were spherical, but in the morulae, outer blastomeres were cuboidal. In these embryos, only gap junctions were rarely found between pairs of blastomeres (Fig. 1). Early blastocysts were composed of outer cuboidal trophoblast cells and spherical inner-cell-mass cells. (Fig. 1 to 4) There were zonula occludens, predesmosomes and gap junctions between each pair of trophoblast cells (Fig. 2), while only gap junctions were rarely found between a pair of inner-cell-mass cells, and between a trophoblast cell and an inner-cell-mass cell. Interdigitation of microvilli was frequently seen between pairs of trophoblast cells at their outer ends (Fig. 2). Expanded blastocysts were composed of flattened trophoblast cells and spherical inner-cell-mass cells, and zonula occludens, zonula adherens, desmosomes and gap junctions were found between each pair of trophoblast cells (Fig. 3), while predesmosomes and gap junctions were found between each pair of inner-cell-mass cells and between a trophoblast cell and an inner-cell-mass cell (Fig. 4). In these expanded blastocysts, predesmosomes found in early blastocysts had grown into desmosomes (Fig. 3). Interdigitation of microvilli between a pair of trophoblast cells had been widened (Fig. 3).

### Actin and cytokeratin

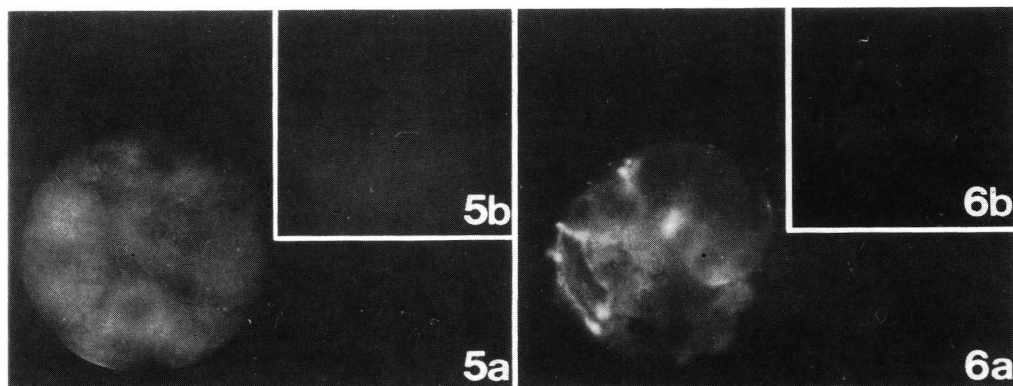
Immersed in phalloidin solution, or treated with the primary antibody and then with the secondary antibody, fluorescence appeared throughout the cytoplasm of all the embryos at 16-cell, morula, early blastocyst and expanded blastocyst stages (Figs. 5a, 6a), but not when the embryos were immersed in a solution devoid of phalloidin (Fig. 5b), or when treated with the secondary antibody only (Fig. 6b). These findings indicate that the fluorescence shows the presence of actin or cytokeratin, though the fluorescence in either case was weak in the blastomeres of 16-cell embryos (Fig. 5a) and morulae. In early and expanded blastocysts, however, the fluorescence was brighter in trophoblast cells than in inner-cell-mass cells in early blastocysts; in early blastocysts, it was brighter in the ectoplasmic zone of trophoblast cells, and in expanded ones, in the ectoplasmic zone of trophoblast cells adhering to each other (Fig. 6a).

## Discussion

It is generally accepted that cell-to-cell binding is strengthened through the construction of different junctional complexes over the morula-blastocyst transformation period<sup>1-9,25)</sup>, and the binding of gap junctions is reported to be weaker compared to that of their







Explanation of figures

- Fig. 1. A gap junction (arrow) between two outer cuboidal blastomeres in a bovine morula.  $\times 15,000$ .
- Fig. 2. A zonula occludens (arrow) and a predesmosome (arrowhead) between two cuboidal trophoblast cells in an early bovine blastocyst. Interdigitation of microvilli (MV) is seen between a pair of trophoblast cells at their outer ends.  $\times 20,000$ .
- Fig. 3. A zonula occludens (arrow), a zonula adherens (arrowhead) and a desmosome (star) between two flattened trophoblast cells in an expanded bovine blastocyst. Widened interdigitation of microvilli (MV) is seen between a pair of trophoblast cells at their outer ends.  $\times 24,000$ .
- Fig. 4. A predesmosome (arrow) and a gap junction (arrowhead) between a trophoblast cell (TBC) and a inner-cell-mass cell (ICMC) in an expanded bovine blastocyst.  $\times 24,000$ .
- Fig. 5. Fluorescence showing the presence of actin in each blastomere of a 16-cell bovine embryo (a) and its absence in a control 16-cell embryo treated with a PBS devoid of phalloidin (b).  $\times 200$ .
- Fig. 6. Fluorescence showing the presence of cytokeratin in both the trophoblast cell and inner-cell-mass cell of an expanded bovine blastocyst (a) and its absence in a control expanded blastocyst treated only with FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (b).  $\times 150$ .

junctional complexes<sup>10</sup>. Our present investigation has revealed that only gap junctions are seen between a few pairs of blastomeres in bovine embryos at the 16-cell and morula stages.

It has been reported that early bovine blastocysts in vivo have zonula occludens, zonula adherens, desmosomes and gap junctions between each pair of trophoblast cells, while they have predesmosomes and gap junctions between each pair of inner-cell-mass cells, and between a trophoblast cell and an inner-cell-mass cell<sup>10,11</sup>. In the present in vitro investigation, however, early blastocysts had predesmosomes as well as zonula occludens and gap junctions, but had no desmosomes between pairs of trophoblast cells. These predesmosomes seem to grow into desmosomes as the blastocysts expand. This result may further suggest that the junctional complex formation of in vitro bovine blastocysts is somewhat delayed compared to that of in vivo blastocysts.

It is accepted that actin is one of the constituents of zonula adherens, while cytokeratin of desmosomes. The present histochemical investigation has shown that actin and cytokeratin fluorescence are stronger in trophoblast cells than in inner-cell-mass cells, and are especially so in the ectoplasmic zone with trophoblast cells adhering to each other, where there were zonula adherens and desmosomes. Accordingly, it can be said that in the process of blastocyst formation, actin participates in the construction of zonula adherens between trophoblast cells, while cytokeratin in the development of predesmosomes into desmosomes between trophoblast cells.

### References

- 1) Hamilton, W. J. and Samuel, D. M. (1956): The early development of the golden hamster (*Cricetus auratus*). *J. Anat.*, 90, 395-416.
- 2) Yotsutani, I., Niimura, S. and Ishida, K. (1992): The incidence and morphology of transformed embryos in the course of blastocyst formation in four mammalian species. *Jpn. J. Fertil. Steril.*, 37, 74-82.
- 3) Schlafke, S. and Enders, A. C. (1967): Cytological changes during cleavage and blastocyst formation in the rat. *J. Anat.*, 102, 12-32.
- 4) Dvok, M. (1978): The differentiation of rat ova during cleavage. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, 55, 1-131.
- 5) Lewis, W. A. and Wright, E. S. (1935): On the early development of the mouse egg. *Contr. Embryol.*, 25, 115-143.
- 6) Caralco, P. G. and Brown, E. H. (1968): Cytological and ultrastructural comparisons of t12/t12 and normal mouse morulae. *J. Exp. Zool.*, 168, 169-186.
- 7) 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.
- 8) Van Blerden, J. U., Manes, C. and Daniel, J. C. (1973): Development of preimplantation rabbit embryos in vitro and in vivo. I. An ultrastructural comparison. *Dev. Biol.*, 35, 262-282.
- 9) Hastings, R. A. and Enders, A. C. (1975): Junctional complexes in the preimplantation rabbit embryos. *Anat. Rec.*, 181, 17-34.
- 10) Linares, T. and Plen, L. (1981): On the ultrastructure of seven day old normal (blastocysts) and abnormal bovine embryos. *Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe C*, 10, 212-226.
- 11) Mulnard, A. M. J., Huygens, R., Hanzen, C., Van Der Zwalm, P. and Ectors, F. (1981): Ultrastructure of the cow blastocyst. *J. Submicrosc. Cytol.*, 13, 31-40.
- 12) Brackett, B. G., Oh, K. Y., Evans, J. F. and Donawick, W. J. (1980): Fertilization



- and early development of cow ova. *Biol. Reprod.*, 23, 189-205.
- 13) Lindner, G. M. and Wright, R. W. Jr. (1983): Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20, 406-416.
  - 14) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D. (1989): Cell adhesion, cell junctions, and the extracellular matrix. In *Molecular Biology of the Cell* (Robertson, M., ed.), 2nd ed., p792-802, Garland Publishing, Inc., New York.
  - 15) Jackson, B. W., Grund, C., Schmid, E., Burki, K., Franke, W. W. and Illmensee, K. (1980): Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. *Differentiation*, 17, 161-179.
  - 16) Reima, I. and Lehtonen, E. (1985): Localization of nonerythroid spectrin and actin in mouse embryos. *Differentiation*, 30, 68-75.
  - 17) Lehtonen, E. and Reima, I. (1986): Changes in the distribution of vinculin during preimplantation mouse development. *Differentiation*, 32, 125-134.
  - 18) Chisholm, J. C. and Houliston, E. (1987): Cytokeratin filament assembly in the preimplantation mouse embryo. *Development*, 101, 565-582.
  - 19) Emerson, J. A. (1988): Disruption of the cytokeratin filament network in the preimplantation mouse embryo. *Development*, 104, 219-234.
  - 20) Lehtonen, E., Ordonez, G. and Reima, I. (1988): Cytoskeleton in preimplantation mouse development. *Cell Differ.*, 24, 165-178.
  - 21) Brackett, B. G. and Oliphant, G. (1975): Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.*, 12, 260-274.
  - 22) Dulbecco, R. and Vogt, M. (1954): Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.*, 99, 167-182.
  - 23) Sun, T.-T. and Green, H. (1978): Keratin filaments of cultured human epidermal cells. *J. Biol. Chem.*, 253, 2053-2060.
  - 24) Lehtonen, E., Lehto, V.-P., Vartio, T., Badley, R. A. and Virtanen, I. (1983): Expression of cytokeratin polypeptides in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Dev. Biol.*, 100, 158-165.
  - 25) Duciballa, T., Albertini, D. F., Anderson, E. and Bigger, J. D. (1975): The preimplantation mammalian embryo: characterization of intercellular junctions and their appearance during development. *Dev. Biol.*, 45, 231-250.

胚盤胞形成過程におけるウシ培養胚の割球接合に関する研究

四谷伊公子<sup>1)</sup>・柳 在雄<sup>2)</sup>・松本浩道<sup>2)</sup>・

菅原七郎<sup>2)</sup>・新村末雄<sup>3)</sup>・石田一夫<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>新潟大学大学院自然科学研究科, 新潟市950-21

<sup>2)</sup>東北大学農学部, 仙台市980

<sup>3)</sup>新潟大学農学部, 新潟市950-21

ウシ培養胚(16細胞期から胚盤胞期)について、接合装置の状態を電顕的に、また、アクチンとサイトケラチンの局在を組織化学的にそれぞれ観察した。16細胞胚と桑実胚では、割球間にギャップ結合が稀にみられた。初期胚盤胞では、栄養膜細胞同士の間には閉鎖帯、デスモソーム前駆体およびギャップ結合が観察されたが、栄養膜細胞と内細胞塊細胞の間および内細胞塊細胞同士の間にはギャップ結合がみられる程度であった。拡張胚盤胞では、栄養膜細胞同士の間には閉鎖帯、接着帯およびデスモソームが、栄養膜細胞と内細胞塊細胞の間および内細胞塊細胞同士の間にはデスモソーム前駆体がそれぞれ認められた。また拡張胚盤胞では、すべての細胞間にギャップ結合がみられた。一方、アクチンとサイトケラチンの存在を示す蛍光は、観察したすべての時期の胚の細胞質にみられ、胚盤胞の栄養膜細胞では強くなって細胞膜直下に局在していた。



室内繁殖コロニーで死亡したカニクイザルの卵巣  
から回収した卵子の成熟培養と体外受精

In vitro maturation and in vitro fertilization of eggs recovered from ovaries of  
cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) at necropsy in a indoor breeding colony

山海 直、榊原一兵、長 文昭、吉川泰弘

Tadashi SANKAI, Ippei SAKAKIBARA, Fumiaki CHO and Yasuhiro YOSHIKAWA

国立予衛生研究所・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,  
1 Hachimandai, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

**Abstract:** Cynomolgus monkey oocytes were collected from the ovarian follicles of females that died from accidents, diseases of respiratory and digestive organs, or sacrificed for the other experiment. Immature oocytes were collected from 10 females aged 1 to 18 years except 1 female aged 19 days and they were cultured for 24 h in TCM 199 medium supplemented with 10 % FCS and 10 IU/ml PMSG. The 11.9 % oocytes extruded the first polar body and some of them were further used for in vitro fertilization. In two cases, we could observe the presence of male and female pronuclei and the second polar body. The ovaries were histologically different with regard to the number of primordial follicles and the vesicular follicles between sexually immature and mature females. This study suggests that the ovarian oocytes collected from dead animals are useful for the embryological studies in nonhuman primates, and this procedure is applicable to gene banking for individuals died accidentally. **Key words:** Cynomolgus monkey, Oocyte, In vitro maturation, IVF, Ovarian follicle (受付1993年8月23日, 受理1993年9月2日)

## 緒 言

サル類を対象とした発生工学的研究において、少しでも多くの卵子を採取する方法を確立することは、極めて重要な課題である。サル類における卵子の採取は、性周期にあわせてホルモン製剤を投与して卵胞発育を誘起し、発育卵胞から卵胞卵を吸引する方法が多く用いられてきた<sup>1)</sup>。またウシ、ブタなどの家畜では屠殺された個体の卵巣から卵子を回収し、その卵子を用いた成熟培養、体外受精などの研究が広く行われるようになってきた<sup>2,3)</sup>。一方、サルでは健康な状態で安楽殺されることは極めて少ない。

国立予防衛生研究所・筑波医学実験用霊長類センター（以下TPC）では、約1,600頭のカニクイザルが飼育されており、年間数十頭が事故、疾病などの原因で死亡している。本研究では、様々な原因で死亡したサルの卵巣から採取した卵子が、発生工学的研究に利用できるか否かを明らかにすることを目的として、死亡カニクイザルの卵巣から卵子の採取を試み、得られた卵子を用いて成熟培養、体外受精を行った。

## 材料および方法

実験対象となったカニクイザルは、交配時の咬傷、呼吸器や消化器系の疾患などが原因で死亡した個体、あるいは他の実験のために安楽殺した個体であり、性成熟していない0-2歳齢のもの4例、性成熟した9-11歳齢のもの6例、および野生由来で推定年齢が18歳齢のもの1例であった。死後採材までの時間は、死亡直後のものから3日間を経過したものまでであった（Table 1）。TPCのシステムにより、安楽殺個体を除く死亡個体は、病理解剖までの間5℃の冷蔵庫内に一時保存されていた。

卵子の採材は安楽殺した1例を除き各個体の片側卵巣のみから行った。摘出した卵巣は、TCM-199で洗浄したのち、同medium内で細切し（1mm大）、medium中に浮遊した卵子を回収した。卵胞のままで浮遊していたものは実体顕微鏡下で、27Gの注射針を用いて卵胞を破り卵子を取り出した（Fig. 1）。回収した卵子は、十分に洗浄したのちにノマルスキー微分干渉顕微鏡下（Nikon、東京）で検索し、10% FCSと10 IU/ml PMSG（セロトロピン：帝国臓器、東京）を添加したTCM

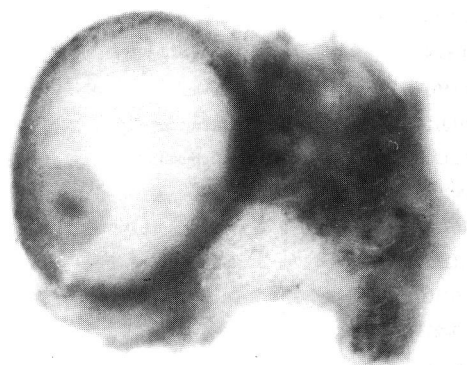


Fig. 1 A follicle from a hashed ovary floating in the medium



—199 (Flow laboratories, Virginia, U.S.A.) で成熟培養した。培養後、24時間目にGerminal vesicle (GV)あるいは第1極体の有無について鏡検した。第1極体の放出を認めた卵子の一部を用いて体外受精を試みた。体外受精の方法は、我々が従来行ってきた方法<sup>4)</sup>に準じた。精子は、1 mM カフェイン (和光、大阪) と 1 mM dbc-AMP (ヤマサ醤油、千葉) を添加したTYH medium<sup>5)</sup> で 2 時間の前培養を施した凍結融解精子を用いた。媒精は、Whitten's medium<sup>6)</sup> 中で行い、精子濃度は 300 sperm/ml とした。媒精後 15 時間目に雌雄両前核と第2極体の放出を認めたものを受精卵と判定した。卵子採取を行わなかった他方の卵巣は、ホルマリン固定したのち組織切片を作成しヘマトキシレン・エオジン染色して鏡検した。

## 結 果

各個体ごとの卵子回収、成熟培養、体外受精の成績は、Table 1に示すとおりである。0歳齢の1例を除く10例の個体から合計270個の卵子が採取できた。変性卵のほとんどは、卵実質に空胞を形成していた。卵実質が整っていた234個のGV期未成熟卵を成熟培養したところ、27個(11.5%)に第1極体の放出を認めた(Fig. 2)。安楽殺ののち直ちに採材した個体の卵巣からは119個と、他の個体に比べてとくに多くの卵子が回収でき、培養により21個に第1極体の放出を認めた。また、第1極体を放出したもののうち4個の卵子で体外受精したところ、2個に受精を認めた(Fig. 3)。

Table 1. Results of oocyte collection, oocyte maturation and in vitro fertilization

Anim. No.	Age in years	Days from the last mense	Causes of death	Days from death to eggs collection	Eggs collected		Oocytes maturation		In vitro fertilization	
					State	No.	No. of eggs matured	No. of eggs cultured	No. of eggs fertilized	No. of eggs examined
1219208168	19 (days)	—	prolapse of the anus	within 1 day	—	0 <sup>1)</sup>	—	—	—	—
1219106096	1	—	sepsis with bite	within 1 day	immatured	15 <sup>1)</sup>	0 / 15	—	—	—
1319011008	2	—	starvation	1	degenerated only zona	20 <sup>1)</sup>	—	—	—	—
1219010120	2	—	pneumonia	2	degenerated	8 <sup>1)</sup>	—	—	—	—
1118311277	9	29	pneumonia	1	immatured	12 <sup>1)</sup>	0 / 12	—	—	—
1118203081	10	120	bite	1	immatured	32 <sup>1)</sup>	0 / 32	—	—	—
1118107198	11	2	torsion of the bowel	within 1 day	immatured degenerated	15 <sup>1)</sup> 12	1 / 15	—	0 / 1	—
1118111328	11	27	bite	within 1 day	immatured	23 <sup>1)</sup>	3 / 23	—	2 / 3	—
1118103100	11	37	ketosis	2	degenerated	5 <sup>1)</sup>	—	—	—	—
1118108223	11	24	sacrifice for the other experiment	Immediately	immatured	119 <sup>2)</sup>	21 / 119	—	—	—
1017902131	18 (estimated)	229	sepsis with bite	1	immatured	10 <sup>3)</sup>	2 / 10	—	—	—

1) from one ovary

2) from both ovaries

3) from a half of a ovary

卵巣の組織像の典型例を

Fig. 4に示した。卵子を全く回収できなかった19日齢の個体では多数の原始卵胞を認めたが発育卵胞は存在しなかった。1歳2ヶ月齢の個体では多数の原始卵胞とともに発育卵胞が認められた。また、11歳齢の個体では発育卵胞を認めたが、原始卵胞の数が1、2歳齢のものと比較すると極めて少なかった。

#### 考 察

サル類は、ヒトに最も近縁の動物種であり、サル類の発生工学的研究は新しい実験用サル類の開発、疾患モデルの開発、貴重なサル遺伝子の保存などにとって必須の研究領域である。しかし、本分野の研究はマウス、家兎などの実験動物やウシ、ブタなどの家畜と比較すると遅れていると言わざるをえない。その理由として、サル類では卵子、

精子などの研究材料を確保することが困難であることがあげられる。著者らは、少しでも多くの良質な卵子を採取することを目的として本研究を計画した。また、死亡したサル卵巣からの卵子採取は、研究用卵子の確保という意味だけではなく、急死した疾患モデルサルなどの貴重な遺伝子の保存という観点からもきわめて重要な手法と考えられる。

今回、性成熟していない1および2歳齢の個体からも多数の未成熟卵を回収している。これらの卵子を成熟させることはできなかったが、サル卵子に適した成熟培養技術を検討することで十分に成熟し得る卵子であると考えている。

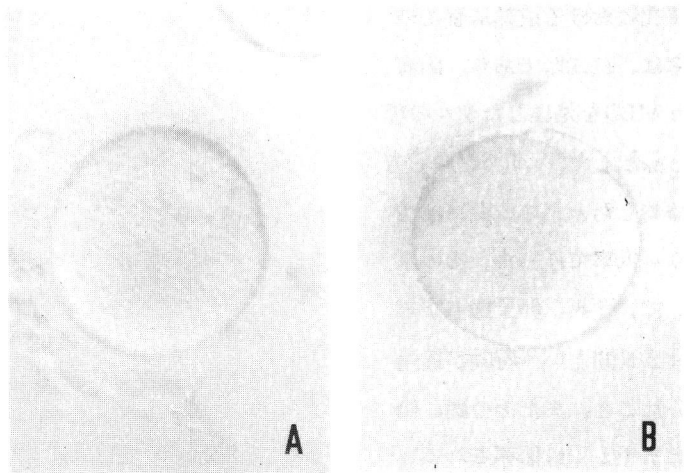


Fig.2 (A) Pre-incubated GV stage oocyte  
(B) Matured oocyte after 24 h cultivation

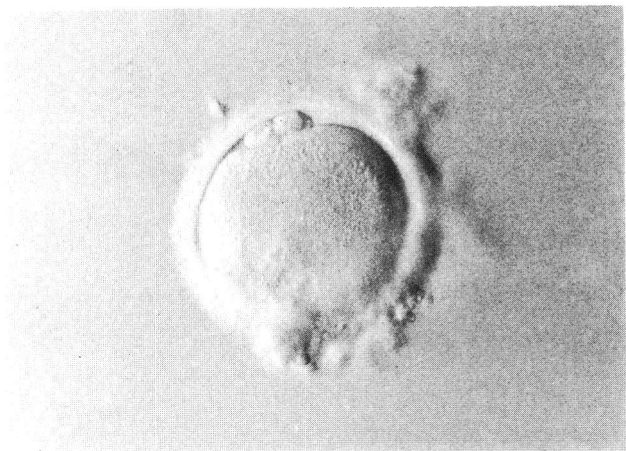


Fig.3 The fertilized egg 15 h after insemination.  
Male and female pronuclei and the second polar body are observed.

本研究における成熟培養での成熟率は、11.9%であり、山海ら<sup>7)</sup>がPMSGを処理したサルの卵胞から採取したGV期卵を同じ方法で培養したときの成熟率28.2%よりも低率であった。その原因として、死後、卵子採取までに最大2日間という時間が経過していたこと、またその間、個体のままで5℃に保存されていたことなどが考えられる。他の実験のために安楽殺された1頭(死後直後に卵子採取を試みた。5℃には保存されていない。)からは、非常に多くの卵子が採取でき、その成熟率は17.6%であった。このことは、死後、卵子採取までの時間経過と5℃保存がその後の卵子成熟に影響していることを示唆するものである。

今回、体外受精に用いた卵子数が少ないため数値的考察はできないが、本研究は死亡ザル卵胞卵を用いて体外受精に成功したのは初めての報告である。

未性成熟個体と性成熟個体卵巢の組織像は、原始卵胞および发育卵胞の数という点で明らかに異なっていた。未性成熟個体の中でも1歳2ヶ月齢のものでは比較的大きな发育卵胞が確認され、その個体から卵子が回収されたのに対し、19日齢では发育卵胞が認められず卵子の回収もできなかった。未性成熟ザルにおける卵巢内の卵胞发育過程についてたいへん興味もたれる。本研究では例数が少なく、また3-8歳齢の個体がいなかった。今後も検討を続け、生後のみならず胎児期から性成熟および老齢に至る過程の卵巢の性状、卵子採取の可能性について明らかにして行きたい。

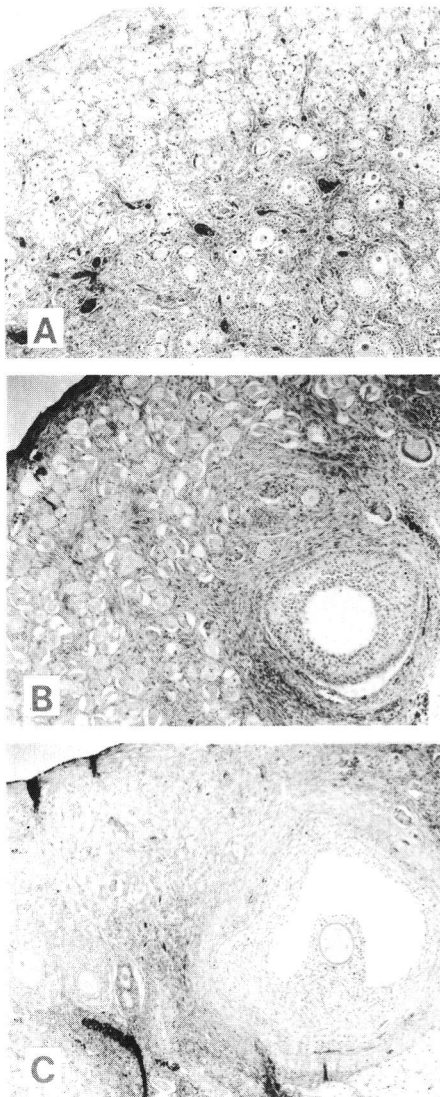


Fig.4 Histological view on ovaries.

(A) Anim. No. 1219208168 (19 days of age)

(B) Anim. No. 1219106096 (1 year 2 months of age)

(C) Anim. No. 1118107198 (11 years of age)



以上のように、本研究はサル遺伝子資源の新しい利用法を示したものであり、今後のサル類の発生工学的研究に貢献する成果であると思われる。

#### 謝 辞

本研究は財団法人ヒューマンサイエンス振興財団からの科学研究費によって行った。また、研究を遂行するにあたり終始ご協力くださいました(社)予防衛生協会の小林理恵子氏、エーザイ(株)の、若林庸夫、井田 聡両氏に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Wolf, D. P., Thomson, J. A., Zelinski-Wooten, M. B. and Stouffer, R. L. (1990):  
In vitro fertilization-embryo transfer in nonhuman primates: the technique and its applications. *Mol. Reprod. Dev.*, 27, 261-280.
- 2) 徳丸元幸, 後藤和文 (1993): 卵子の培養法-ウシ, 生殖機能細胞の培養法 (菅原七郎, 尾川昭三編) p78-98, 学会出版センター, 東京.
- 3) 永井 卓 (1993): 卵子の培養法-ブタ, 生殖機能細胞の培養法 (菅原七郎, 尾川昭三編) p99-110, 学会出版センター, 東京.
- 4) 山海 直 (1993): 卵子の培養法-霊長類, 生殖機能細胞の培養法 (菅原七郎, 尾川昭三編) p129-139, 学会出版センター, 東京.
- 5) Toyoda, Y., Yokoyama, M. and Hoshi, F. (1971): Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. I. In vitro fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. *Jap. J. Anim. Reprod.* 16, 147-151.
- 6) Whitten, W. K. (1971): Nutritional requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro. *Adv. Biosci.*, 6, 129-139.
- 7) 山海 直, 井田 聡, 若林庸夫, 長 文昭 (1991): カニクイザル卵子の成熟培養と体外受精, 第36回日本不妊学会講演要旨

## Meiotic maturation of mouse oocytes grown from primary stage in ovaries cultured in vitro

Yuji HIRAO<sup>1)</sup>, Yoshi-hisa IKEDA, Takashi MIYANO and Seishiro KATO

<sup>1)</sup>The Graduate School of Science and Technology and  
Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Agriculture,  
Kobe University, Nada-ku, Kobe-shi 657, Japan

**Abstract:** Ovaries excised from 4-day-old mice were cultured for 20 days in the absence of gonadotrophins. In the ovaries, there were a great number of non-growing oocytes (10-19  $\mu\text{m}$  in diameter) and a group of growing oocytes (20-39  $\mu\text{m}$ ). After organ culture, although most oocytes remained in the non-growing pool, a very low percentage of oocytes increased their diameter to 60-75  $\mu\text{m}$ . Those oocytes grown in culture were enclosed with 1-3 layers of granulosa cells. When the oocytes were further cultured for 24 h after isolation from granulosa cells, 1, 9 and 47% of oocytes of 60-64, 65-69 and over 70  $\mu\text{m}$  in diameter underwent germinal vesicle breakdown, respectively. Oocytes smaller than 60  $\mu\text{m}$  failed to resume meiosis. Extrusion of a first polar body was observed in 11% of oocytes larger than 70  $\mu\text{m}$ . Oocyte degeneration, however, was observed frequently during both organ culture and maturation culture.

**Key words:** Mouse ovary, Organ culture, Oocyte growth, Maturation

(Received 28 August 1993, Accepted 22 September 1993)

### Introduction

In the newborn mouse ovary, a group of oocytes begin to grow and increase their diameter from about 12 to 80  $\mu\text{m}$  (oocyte growth) during the first 3 weeks<sup>1)</sup>. As the oocytes increase in size, granulosa cells surrounding oocytes increase in number dramatically (follicular growth)<sup>2,3)</sup>. Although these events occur coordinately in vivo, in the ovaries cultured in the absence of gonadotrophins only oocyte growth occurs while follicular growth is severely retarded<sup>4,6)</sup>. Oocytes grown under such conditions are reported to be morphologically normal<sup>5,6)</sup>. However, functional property of the oocytes remains to be understood.

An important functional differentiation performed in growing oocytes is the acquisition of meiotic competence<sup>1)</sup>. In the mouse, capacity of the oocytes to resume meiosis appears when they become 60  $\mu$ m or larger in diameter<sup>7-9)</sup>, and ability to complete the first meiotic division is acquired in the later stage of growth<sup>7,9)</sup>.

In the present study, ovaries removed from 4-day-old mice were cultured for 20 days, and growth and acquisition of meiotic competence of the oocytes in cultured ovaries were examined.

## Materials and Methods

### Ovaries

Ovaries were removed from 4-day-old female mice (ICR strain). Some were fixed in 4% formaldehyde, dehydrated and embedded in JB-4 (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA). They were serially sectioned at 3  $\mu$ m and stained with periodic acid-Schiff and haematoxylin. Numbers of layers of the granulosa cells around oocytes were examined under a microscope.

### Organ culture of ovaries

Ovaries were washed three times with Hepes-buffered Eagle's minimum essential medium (MEM; Nissui Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan). Five ovaries were placed on each filter support (pore size 3  $\mu$ m; Nihon Millipore Kogyo K.K., Yonezawa, Japan) in an organ culture dish (#3037, Falcon; Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ, USA). Culture medium used was Waymouth MB752/1 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) supplemented with sodium pyruvate (50  $\mu$ g/ml; Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan), fetal calf serum (FCS, 5%; Filtron Ltd., Victoria, Australia), penicillin (100  $\mu$ g/ml; Meiji Conf. Co., Tokyo, Japan) and streptomycin (50  $\mu$ g/ml; Meiji Conf. Co.). The ovaries were cultured for 20 days at 37 °C under a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. The medium was replaced every 4 days.

### Oocyte growth in organ culture

Ovaries before and after organ culture were incubated for 30 min in the culture medium containing pronase (2 mg/ml, Actinase E; Kaken, Tokyo, Japan). They were transferred into a fresh culture medium and pipetted to denude the oocytes. Diameters of 400 oocytes (excluding zona pellucida) were measured with an ocular micrometer attached to an inverted microscope (x200). Oocytes showing any signs of degeneration such as deformation and disintegration of the ooplasm were discarded.



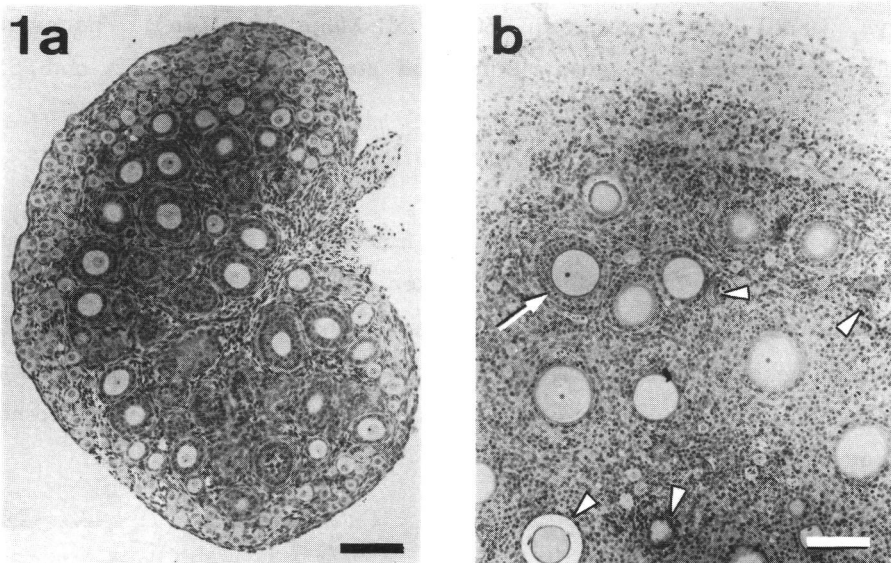
### Maturation culture of oocytes

After organ culture, the ovaries were incubated in MEM containing collagenase (2 mg/ml; Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) for 30 min at 37 °C. After incubation, they were washed twice in the fresh culture medium. The oocytes were isolated by pipetting and only oocytes larger than 55  $\mu$ m were used for maturation culture. Each oocyte was transferred to a microdrop of the culture medium (10  $\mu$ l) under paraffin oil. After measurement of oocyte diameters, oocytes were cultured for 24 h. At the end of the culture period, germinal vesicle breakdown (GVBD) and emission of a first polar body were examined under the inverted microscope (x200). The oocytes with deformation and disintegration of the ooplasm were considered as degenerated. All data were compared on the basis of chi-square analysis.

## Results

### Histology

Figure 1 shows histological sections of the ovaries before and after 20 days of organ culture (Fig. 1.a and b). The 4-day-old mouse ovaries contained a large number of non-growing oocytes with similar size. Some oocytes were in early growth phase, which had a continuous zona pellucida and were enclosed with 1-2 layers of cuboidal granulosa cells (Fig. 1.c). After organ culture, besides many non-growing oocytes, some large oocytes were observed, which were surrounded by 1-3 layers of granulosa cells (Fig. 1.d). A lot of crumpled zonae pellucidae were also observed, suggesting a proportion of growing oocytes degenerated during organ culture (Fig. 1.b).



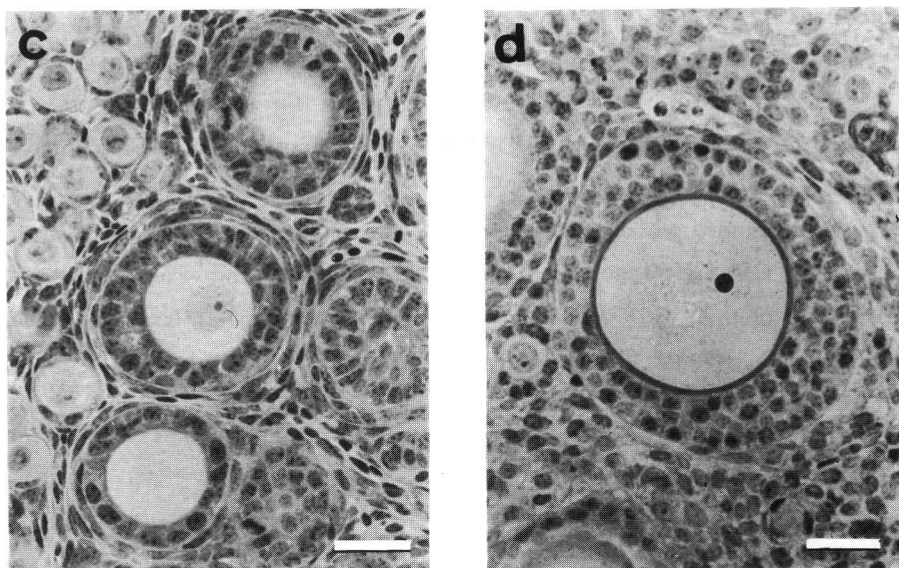


Fig. 1. Histological sections of ovaries excised from a 4-day-old mouse and after 20 days of organ culture. The sections were stained with periodic acid-Schiff and haematoxylin.

- (a) An ovary obtained from a 4-day-old mouse.  
 (b) An ovary cultured for 20 days in vitro. A fully grown oocyte (arrow) and degenerated oocytes are seen (arrow heads).  
 (c) Growing oocytes in the ovary before culture.  
 (d) A fully grown oocyte in the cultured ovary. Note the oocyte is surrounded by 2-3 layers of granulosa cells.

Bar indicates 100  $\mu$ m for (a) and (b), or 30  $\mu$ m for (c) and (d).

### Oocyte growth in organ culture

Table 1 shows the size distribution of oocytes before and after 20 days of organ culture. Before organ culture, almost all of the oocytes were smaller than 30  $\mu$ m in diameter, and a small portion of oocytes were in early growth phase. After the culture, although most of the oocytes still remained in the non-growing pool, a very low percentage of oocytes reached the final size.

Table 1. Size distribution of oocytes in ovaries of 4-day-old mice and after 20 days of organ culture

Oocyte diameter ( $\mu$ m)	Distribution of oocytes in ovaries	
	Before culture	After culture
10-19	338	294
20-29	58	97
30-39	4	6
40-49	0	0
50-59	0	1
60-69	0	1
70-79	0	1
Total	400	400

Table 2. Meiotic maturation of mouse oocytes grown in ovaries cultured in vitro

Oocyte diameter ( $\mu$ m)	No. of oocytes (%)			
	Examined	Undergoing GVBD		
		Total	Extruding 1 PB	Degenerating <sup>a</sup>
55-59	98	0 (0)	0 (0)	39 (40)
60-64	147	2 (1) <sup>b</sup>	0 (0)	43 (29)
65-69	103	9 (9) <sup>c</sup>	0 (0)	36 (35)
70-75	45	21 (47) <sup>d</sup>	5 (11)	13 (29)

GVBD, germinal vesicle breakdown; 1 PB, first polar body.

<sup>a</sup>Oocytes with deformation and disintegration of the ooplasm were considered as degenerated.

<sup>b-d</sup>Values with different superscripts in the same column differ significantly ( $P < 0.05$ ).

### Meiotic maturation

After organ culture of 42 ovaries, in total 393 oocytes of 55-75  $\mu\text{m}$  in diameter were recovered (Fig. 2.a), and further cultured for 24 h. At the time of isolation from ovaries, 5 oocytes had already undergone GVBD, which were counted as GVBD competent oocytes. Table 2 shows the results of maturation culture. GVBD was not observed in oocytes smaller than 60  $\mu\text{m}$  in diameter, while 1, 9 and 47% of the oocytes of 60-64, 65-69 and larger than 70  $\mu\text{m}$  underwent GVBD, respectively. One third of oocytes, however, showed degenerative signs irrespective of the size (Fig. 2.b). Emission of a first polar body was observed in 11% of oocytes larger than 70  $\mu\text{m}$  in diameter (Fig. 2.c).

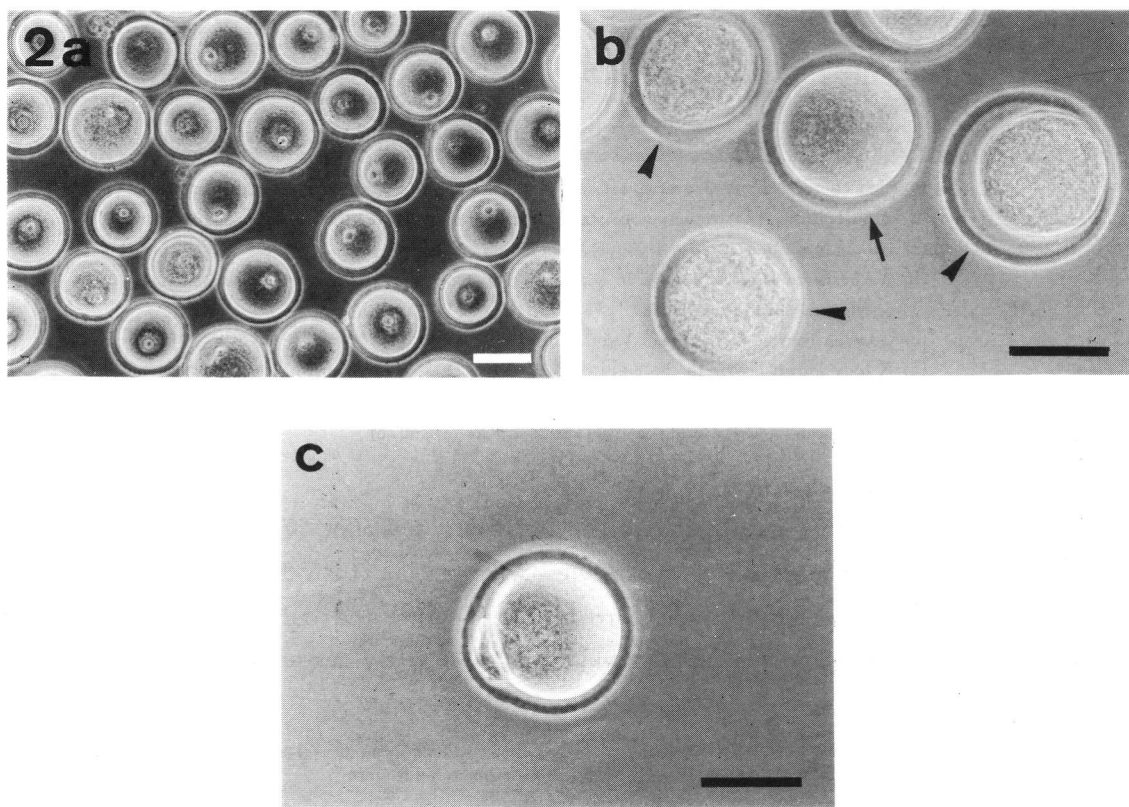


Fig. 2. Photomicrographs of mouse oocytes isolated from ovaries after 20 days of organ culture.

- (a) Oocytes of various sizes in GV stage at the time of isolation from the ovaries cultured for 20 days.
- (b) Oocytes after 24 h of maturation culture. An oocyte that underwent GVBD (arrow), and oocytes that degenerated (arrow heads).
- (c) An oocyte that extruded a first polar body during 24 h of maturation culture.

Bar indicates 50  $\mu\text{m}$ .

## Discussion

Several lines of evidence suggest that FSH is essential for proliferation of granulosa cells in growing follicles, but is not required for oocyte growth<sup>4,5,10</sup>. In studies using organ culture of ovaries of neonatal mice<sup>5,6</sup> and rats<sup>4</sup> in gonadotrophin-free medium, oocytes increased their size, although they remained enclosed in a single layer of granulosa cells. The oocytes, however, grew to the size that would have been surrounded by several layers of granulosa cells in vivo. In the present study, a small proportion of oocytes in 4-day-old mouse ovaries became larger than  $70\mu\text{m}$  in diameter during 20 days of organ culture. Number of layers of granulosa cells remained one to three, irrespective of oocyte size after culture. These results suggest that oocyte growth can be completed in the absence of follicular growth. However, roles of the single layer of granulosa cells around the grown oocytes should not be disregarded. Using an in vitro follicle culture system, Eppig<sup>5</sup> has shown that oocytes can not grow without surrounding granulosa cells. Intercellular gap-junctions between growing oocytes and processes of granulosa cells<sup>11</sup>, via which both cells are metabolically coupled are well known<sup>12</sup>. Therefore, it seems reasonable to speculate under our culture conditions that the granulosa cells do not proliferate actively, but are functional at least in terms of their roles in regulation of oocyte growth.

A proportion of grown oocytes had acquired the capacity to resume meiosis in cultured ovaries. In the mouse, the ability is acquired at about the time when oocytes become  $60\mu\text{m}$  in diameter and the GVBD rate increases with the increase of oocyte size<sup>7-9</sup>. In the present study, 1, 9 and 47% of the oocytes larger than 60, 65 and  $70\mu\text{m}$  underwent GVBD, respectively. Although these percentages are low when comparison is made with their counterparts in vivo, the size of oocytes firstly showing meiotic competence is similar to that in vivo. There is a cytoplasmic factor called maturation promoting factor (MPF) which controls meiotic resumption<sup>13</sup>. MPF is assumed to be synthesized and stored in immature oocytes as pre MPF and be activated as a result of tyrosine-dephosphorylation of one subunit<sup>14</sup>. Thus, it seems probable that the oocytes grown under our culture conditions have synthesized such factor(s) at a similar stage of growth in vivo and activated them during maturation culture in vitro.

In the present study, oocytes underwent GVBD after isolation from enclosing granulosa cells. This suggests that the somatic cells produce substance(s) which maintains the oocytes in meiotic arrest under the conditions used for organ culture. Whether it is the substance described previously, such as purines<sup>15</sup>, peptides<sup>16,17</sup>, or other than those is not known.

Extrusion of a first polar body was observed only in oocytes larger than  $70\mu\text{m}$  in diameter. This result is consistent with previous finding that the ability to complete the first meiotic division is acquired at the final stage of oocyte growth<sup>7,9</sup>. After resuming meiosis,



newly protein synthesis is required for completion of the first meiotic division<sup>18)</sup>. It is indicated, therefore, that oocytes grown under our culture conditions are equipped for the requirements to synthesize the protein(s) concerned in the first meiotic division.

### Acknowledgments

This study was supported in part by a grant given to Y.H. from the Ministry of Education, Science and Culture, Japan. Y.H. was a grantee of the Fellowships of the Japan Society for the Promotion of Science for Japanese Junior Scientists.

### References

- 1) Wassarman, P.M. (1988): The mammalian ovum. In *The Physiology of Reproduction* (Knobil, E. and Neill, J.D. eds) p69-102, Raven Press, New York.
- 2) Peters, H. (1969): The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Acta Endocr.*, 62, 98-116.
- 3) Miyano, T., Hirao, Y., Kato, S. and Kanda, S. (1988): Formation of the zona pellucida in relation to the oocyte growth in the mouse ovary. *Jpn.J.Anim.Reprod.*, 34, 61-66.
- 4) Fainstat, T. (1968): Organ culture of postnatal rat ovaries in chemically defined medium. *Fert.Steril.*, 19, 317-338.
- 5) Eppig, J.J. (1977): Mouse oocyte development in vitro with various culture systems. *Dev.Biol.*, 60, 371-388.
- 6) Miyano, T., Hirao, Y., Kato, S. and Kanda, S. (1988): Growth of mouse oocytes in ovaries cultured in vitro. *Jpn.J.Zootech.Sci.*, 59, 848-853.
- 7) Sorensen, R.A. and Wassarman, P.M. (1976): Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev.Biol.*, 50, 531-536.
- 8) Sato, E. and Miyamoto, Y. (1988): Cultivation of mouse oocytes in vitro: the ability to resume meiosis. *Exp.Anim.*, 37, 231-238.
- 9) Hirao, Y., Miyano, T. and Kato, S. (1993): Acquisition of maturational competence in in vitro grown mouse oocytes. *J.Exp.Zool.*, in press.
- 10) Lunenfeld, B., Kraiem, Z. and Eshkol, A. (1975): The function of the growing follicle. *J.Reprod.Fert.*, 45, 567-574.
- 11) Anderson, E. and Albertini, D.F. (1976): Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J.Cell Biol.*, 71, 680-686.
- 12) Brower, P.T. and Schultz, R.M. (1982): Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: existence and possible nutritional role during oocyte growth. *Dev.Biol.*, 90, 144-153.
- 13) Hashimoto, N. and Kishimoto, T. (1988): Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation promoting factor during mouse oocyte maturation. *Dev.Biol.*, 126, 242-252.

- 14) Choi, T., Aoki, F., Mori, M., Yamashita, M., Nagahama, Y. and Kohmoto, K. (1991): Activation of p34cdc2 protein kinase activity in meiotic and mitotic cell cycles in mouse oocytes and embryos. *Development*, 113, 789-795.
- 15) Downs, S.M., Coleman, D.L., Ward-Bailey, P.F. and Eppig, J.J. (1985): Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 454-458.
- 16) Tsafiriri, A., Dekel, N. and Bar-Ami, S. (1982): The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. *J. Reprod. Fert.*, 64, 541-551.
- 17) Sato, E. and Koide, S.S. (1984): A factor from bovine granulosa cells preventing oocyte maturation. *Differentiation*, 26, 59-62.
- 18) Wassarman, P.M., Josefowicz, W.J. and Letourneau, G.E. (1976): Meiotic maturation of mouse oocytes in vitro: inhibition of maturation at specific stages of nuclear progression. *J. Cell Sci.*, 22, 531-545.

器官培養マウス卵巣において発育初期から体外発育した卵母細胞の成熟能力

平尾雄二・池田佳久<sup>1)</sup>・宮野 隆<sup>1)</sup>・加藤征史郎<sup>1)</sup>

神戸大学大学院自然科学研究科, <sup>1)</sup>神戸大学農学部家畜繁殖学研究室  
神戸市灘区 657

器官培養マウス卵巣内で発育した卵母細胞の成熟能力について検討した。培養に用いた4日齢のマウス卵巣内には、多くの発育開始前と考えられる直径10~19  $\mu$ mの卵母細胞とともに、少数の発育初期の卵母細胞(直径20~39  $\mu$ m)が存在していた。培養20日後、大部分の卵母細胞は未発育のままであったが、一部は直径60~75  $\mu$ mへと発育していた。卵巣の組織染色標本を作製し、培養後の卵胞の形態を観察した。その結果、発育卵母細胞を包む顆粒膜細胞は1~3層であり、生体内で認められるような顆粒膜細胞の著しい重層化は認められなかった。器官培養卵巣内で発育した卵母細胞を裸化し、さらに24時間培養して成熟を誘起した。その結果、直径60  $\mu$ m以上の卵母細胞において卵核胞の崩壊が認められ、その割合は卵母細胞の直径の増大とともに増加した。さらに直径70  $\mu$ m以上の卵母細胞では、11%において第1極体の放出が認められた。一方、培養卵巣内および成熟培養中に退行する卵母細胞も多数認められた。

## Effects of the time of maturation culture and subsequent co-culture with spermatozoa on fertilization and early cleavage of pig oocytes in vitro

Koichiro KANO<sup>1)</sup>, Ryosuke HIRO-OKA<sup>2)</sup>, Takashi MIYANO<sup>2)</sup> and Seishiro KATO<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>The Graduate School of Science and Technology and <sup>2)</sup>Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Agriculture, Kobe University,  
Nada-ku, Kobe-shi 657, Japan.

**Abstract** Two experiments using pig oocyte-cumulus-granulosa cell complexes dissected from healthy follicles of 4-6 mm in diameter were conducted in this study. In the first experiment, nuclear change of oocytes during maturation culture was examined and the appropriate timing of insemination was determined. In the second experiment, the effects of the time of co-culture with spermatozoa after insemination on fertilization and subsequent early cleavage were examined. Oocytes reached the metaphase II between 30 and 33 h. When oocytes cultured for 30, 36, 42, 48 and 54 h were inseminated by ejaculated spermatozoa, no differences were detected in the proportions of penetrated oocytes in these groups. In contrast, oocytes cultured for 36 and 42 h formed male pronucleus(ei) at significantly higher percentages than the other groups. In oocytes cultured for 36 h and inseminated, sperm penetration and male pronuclear formation were first observed at 9 h after insemination. Oocytes co-cultured with spermatozoa for 9 and 12 h showed higher rates of normal cleavage than oocytes co-cultured for 3 and 6 h. However, the rate of embryos reaching the 4-cell stage or beyond was higher for oocytes co-cultured for 9 h than 12 h. It is concluded from these results that the proportion of normal fertilization of pig follicular oocytes is highest when oocytes are matured for 36 h in vitro and subsequently co-cultured with spermatozoa for 9 h under the culture condition of the present study. **Key words:** Pig oocytes, In vitro maturation, In vitro fertilization, Early cleavage

(Received 30 August, Accepted 27 September 1993)

### Introduction

Pig follicular oocytes can mature, fertilize and develop in vitro<sup>1)</sup>. However, embryos from pig follicular oocytes hardly develop into living young<sup>1,3-5)</sup>, or even to the blastocyst stage<sup>1,2)</sup>,

since polygyny, polyspermy<sup>2)</sup> and delay of male pronuclear formation<sup>4,6,7)</sup> occur more frequently in oocytes matured in vitro than in vivo. The maturation culture of pig oocytes in the presence of follicular cells<sup>8)</sup>, follicular fluid<sup>9)</sup> and their fractions<sup>10)</sup> improve the ability of oocytes to form a male pronucleus following sperm penetration in vitro. Nagai and Moor<sup>11)</sup> reported the co-culture of spermatozoa and oocytes with oviductal epithelial cells selectively reduced polyspermic fertilization.

Pig oocytes surrounded by the cumulus with some membrana granulosa cells directly adjacent to the cumulus (oocyte-cumulus-granulosa cell complex) do not mature in gonadotropin-free medium<sup>12)</sup>. Pig oocyte-cumulus-granulosa cell complexes have previously been shown to mature to the metaphase II stage at a high percentage by gonadotropic stimulation and form a male pronucleus(ei) at a high percentage following insemination<sup>13)</sup>. Two experiments using pig oocyte-cumulus-granulosa cell complexes were conducted in this study. In the first experiment, nuclear change of oocytes during maturation culture was examined and the appropriate timing of insemination was determined. In the second experiment, the effects of the time of co-culture with spermatozoa after insemination on in vitro fertilization and subsequent early cleavage were examined.

## Materials and Methods

### Collection and culture of follicular oocytes

Ovaries from prepubertal pigs were obtained at a local abattoir and were brought to the laboratory at 20 °C within 1 h. They were rinsed four times in phosphate-buffered saline containing 0.1% polyvinylalcohol (PBS-PVA). Healthy follicles at 4-6 mm in diameter were dissected and opened in 25 mM HEPES-buffered TCM199 (Earl's salt, Nissui pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan). Oocyte-cumulus-granulosa cell complexes were released into 25 mM HEPES-buffered TCM199 by scraping the inner surface of follicles by a forceps. They were washed twice in the maturation medium, TCM199 supplemented with 10% (v/v) heat inactivated fetal calf serum (FCS, Biocell Co., Ltd., California, USA), 0.1 mg/ml sodium pyruvate, 0.08 mg/ml kanamycin sulphate (Sigma, St. Louis, USA), and 0.1 IU/ml human menopausal gonadotropin (hMG, Teikoku Zoki, Tokyo, Japan), and transferred to a plastic dish (35 X 10 mm; No.1008, Falcon, Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ, USA) containing 2 ml of the maturation medium. Oocyte-cumulus-granulosa cell complexes were cultured with a thecal shell from a healthy follicle at 6 mm in diameter that had been removed follicular fluid and membrana granulosa cells<sup>13)</sup>. Culture was carried out with gentle agitation under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air at 38.5 °C up to 54 h.



### Sperm preparation and in vitro fertilization

Sperm-rich fraction of ejaculates was collected from one mature Meishan boar by the glove-hand method. ETCG-catalase solution<sup>14)</sup> containing 10% (v/v) egg yolk, 12.1 mg/ml tris (hydroxymethyl) aminomethane, 6 mg/ml citric acid, 30 mg/ml glucose, 150 Sigma unit/ml catalase (Sigma, St. Louis, USA) and 1000 I.U./ml penicillin G potassium (Meiji, Tokyo, Japan) was used as a diluent. Semen was centrifuged at 400g for 5 min to remove seminal plasma, the resulting sperm pellets were resuspended in the ETCG-catalase diluent to give a concentration of  $2 \times 10^8$  cells/ml. Then sperm suspension was cooled to 4°C over 4 h and stored at 4°C for 6-32 h until use. Progressive motility of spermatozoa was evaluated under a microscope just before each insemination. Acrosomal integrity of spermatozoa was assessed after staining in buffered Giemsa solution (pH 7.4).

After maturation culture, oocyte-cumulus-granulosa cell complexes were washed in the fertilization medium that was composed of TCM199 supplemented with 10% FCS, 0.1 mg/ml sodium pyruvate, 0.55 mg/ml glucose, 0.9 mg/ml calcium lactate, 0.08 mg/ml kanamycin sulphate and 2 mM caffeine. A group of 15-30 oocytes were placed in 2 ml of the fertilization medium in a 35 X 10 mm culture dish. Spermatozoa were washed twice in PBS-PVA by centrifugation at 400g for 5 min each, subsequently they were introduced to the medium containing the oocytes to give a concentration of  $1.0-1.5 \times 10^4$  cells/ml and cultured at 38.5°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air.

### Experiment I

Maturation stage of oocytes and the appropriate timing of insemination were determined in our experimental condition. Every six hours during maturation culture, oocyte-cumulus-granulosa cell complexes were collected, and oocytes were denuded of surrounding cells and mounted on a slide glass. They were fixed in ethanol and acetic acid (3:1, v/v), stained with 1% aceto-orcein, and examined the maturational stage under a Nomarski differential interference microscope (Olympus, Tokyo, Japan). Spermatozoa were collected 6-8 h before insemination, washed and stored as described above. Oocytes cultured for 30, 36, 42, 48 and 54 h were inseminated. Twelve hours after insemination, they were fixed, stained and examined as described above. Oocytes having a sperm head(s) and/or a male pronucleus(ei) with corresponding detached sperm tail(s) in the cytoplasm were classified as being penetrated.

### Experiment II

Effects of the time of co-culture with spermatozoa on fertilization and subsequent early cleavage of oocytes in vitro were examined using oocytes cultured for 36 h. At 3, 6, 9 and 12 h after insemination, some oocytes were recovered, fixed and examined for the stage of

fertilization. Oocytes at the anaphase II or telophase II stage, and oocytes having a female pronucleus were defined as activated oocytes. Sperm penetration and male pronuclear development were also examined as described above. Other oocytes were washed twice in the embryo culture medium, TCM199 supplemented with 10% FCS and 0.08 mg/ml kanamycin sulphate, and further cultured to examine the ability to develop. Groups of 10-15 oocytes were cultured for 3 days in 25  $\mu$ l drops of the embryo culture medium overlaid with paraffin oil at 38.5°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. Cleaved embryos (2-8 cells) having blastomeres of regular size were counted under an inverted microscope every 24 h.

#### Statistical analysis

The chi-square test with Yates correction for continuity and Fisher's exact test were used to test the significance of individual comparisons for the rates of penetrated, activated and developing oocytes. The number of penetrating spermatozoa per oocytes was analyzed by one-way analysis of variance according to Student's *t*-test. Probability of less than 0.05 was considered significant.

### **Results**

#### Experiment I

Table 1 shows the nuclear maturation of pig follicular oocytes. Maturation change of oocytes proceeded synchronously under the conditions used. Oocytes remained in the germinal vesicle stage until 12 h after maturation culture. Half of the oocytes underwent germinal vesicle breakdown after 18 h of culture, and all oocytes reached the metaphase I after 24 h. Twenty-eight percent of oocytes matured to the metaphase II after 30 h. Thereafter, over 90% of oocytes reached metaphase II at 33 h. This rate was persisted from 36 to 54 h of culture.

Table 2 shows the details of fertilization of oocytes inseminated at different times after maturation culture. The percentages of spermatozoa with progressive motility and a normal acrosome just before insemination were 80-85% and 55-65%, respectively, and no significant differences in these values at each insemination could be detected. Twelve hours after insemination, 94-98% of oocytes that had matured to metaphase II were found to have been penetrated. Oocytes cultured for 36 and 42 h formed a male pronucleus(ei) at significantly higher percentages than oocytes cultured for 30, 48 and 54 h. They showed lower mean numbers of spermatozoa per penetrated oocyte than the other groups.

Table 1. Nuclear change of pig follicular oocytes during maturation culture in vitro

Duration of maturation culture (h)	No. of oocytes examined <sup>1)</sup>	No. (%) of oocytes at stage of				
		GV <sup>2)</sup>	D <sup>3)</sup>	MI <sup>4)</sup>	AI-TI <sup>5)</sup>	MII <sup>6)</sup>
0	42	42(100)	0( 0)	0( 0)	0( 0)	0( 0)
6	35	35(100)	0( 0)	0( 0)	0( 0)	0( 0)
12	37	37(100)	0( 0)	0( 0)	0( 0)	0( 0)
18	33	18( 55)	12(36)	3( 9)	0( 0)	0( 0)
24	34	0( 0)	0( 0)	34(100)	0( 0)	0( 0)
30	32	0( 0)	0( 0)	10( 31)	13(41)	9( 28)
33	33	0( 0)	0( 0)	0( 0)	3( 9)	30( 91)
36	30	0( 0)	0( 0)	0( 0)	0( 0)	30(100)
42	34	0( 0)	0( 0)	0( 0)	0( 0)	34(100)
48	35	1( 3)	0( 0)	2( 6)	0( 0)	32( 91)
54	36	0( 0)	0( 0)	3( 8)	0( 0)	33( 92)

<sup>1)</sup> Oocytes surrounded by the cumulus with a piece of parietal granulosa cells were cultured in 2 ml TCM199 supplemented with 10% fetal calf serum, 0.1 IU/ml hMG, 0.1 mg/ml sodium pyruvate and 0.08 mg/ml kanamycin sulphate in a rocking system.

<sup>2-6)</sup> GV; germinal vesicle, D; diakinesis, MI; metaphase I, AI-TI; anaphase I and telophase I, MII; metaphase II.

Table 2. In vitro fertilization of pig follicular oocytes inseminated at different times after maturation culture

Duration of maturation culture (h)	No. of oocytes examined <sup>1)</sup>	No. (%) of oocytes penetrated				Mean no. of spermatozoa in penetrated oocytes
		Total	USH <sup>2)</sup>	SSH <sup>3)</sup>	MPN <sup>4)</sup>	
30	82	79(96)	5( 6)	34(43) <sup>ac</sup>	40(51) <sup>a</sup>	4.7 ± 3.1 <sup>ab</sup>
36	87	84(97)	2( 3)	23(27) <sup>b</sup>	59(70) <sup>b</sup>	4.2 ± 2.3 <sup>a</sup>
42	97	95(98)	4( 4)	29(31) <sup>ab</sup>	62(65) <sup>b</sup>	4.1 ± 2.9 <sup>a</sup>
48	88	83(94)	5( 6)	42(51) <sup>c</sup>	36(43) <sup>a</sup>	5.3 ± 3.7 <sup>b</sup>
54	88	85(97)	6( 7)	42(49) <sup>c</sup>	37(44) <sup>a</sup>	4.9 ± 2.9 <sup>ab</sup>

<sup>1)</sup> Oocytes that had not matured to metaphase II, when examined 12 h after insemination were omitted from the data.

<sup>2-4)</sup> USH; unswollen sperm head(s), SSH; swollen sperm head(s), MPN; male pronucleus(ei).

<sup>a-c)</sup> Values with different superscripts in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

## Experiment II

Table 3 shows the effects of the time of co-culture with spermatozoa on fertilization of oocytes cultured for 36 h prior to insemination. Activated oocytes at anaphase II and telophase II stages were first observed 3 h after insemination. Subsequently the rate of activated oocytes continued to increase rapidly up to 9 h after insemination. Sperm penetration and male pronuclear formation were first observed at 9 h after insemination. The number of oocytes that formed a male pronucleus(ei) increased to 53%, and the mean number of spermatozoa per penetrated oocyte increased significantly at 12 h after insemination.

Table 3. Effect of the time of co-culture with spermatozoa after insemination on in vitro fertilization of pig follicular oocytes culture for 36 h

Duration co-culture with spermatozoa(h)	No. of oocytes examined <sup>1)</sup>	No.(%) of oocytes activated			No.(%) of oocytes penetrated				Mean no. of spermatozoa in penetrated oocytes
		Total	AII-TII <sup>2)</sup>	FPN <sup>3)</sup>	Total	USH <sup>4)</sup>	SSH <sup>5)</sup>	MPN <sup>6)</sup>	
3	34	2( 6) <sup>a</sup>	2( 6)	0( 0) <sup>a</sup>	0( 0) <sup>a</sup>	0( 0) <sup>a</sup>	0( 0) <sup>a</sup>	0( 0) <sup>a</sup>	-
6	47	5(10) <sup>a</sup>	5(11)	0( 0) <sup>a</sup>	0( 0) <sup>a</sup>	0( 0) <sup>a</sup>	0( 0) <sup>a</sup>	0( 0) <sup>a</sup>	-
9	35	29(83) <sup>b</sup>	4(11)	22(63) <sup>b</sup>	24(69) <sup>b</sup>	13(54) <sup>c</sup>	8(33) <sup>b</sup>	3(13) <sup>b</sup>	1.8 ± 1.3 <sup>a</sup>
12	35	32(91) <sup>b</sup>	0( 0)	32(91) <sup>c</sup>	32(91) <sup>c</sup>	7(22) <sup>b</sup>	8(25) <sup>b</sup>	17(53) <sup>c</sup>	2.8 ± 1.8 <sup>b</sup>

1) Oocytes that had not matured to metaphase II, when examined 12 h after insemination were omitted from the data.

2) AII-TII; anaphase II and telophase II, FPN; female pronucleus, USH; unswollen sperm head(s), SSH; swollen sperm head(s), MPN; male pronucleus(ei).

a-c) Values with different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05).

Table 4 shows the early development of oocytes co-cultured with spermatozoa for different periods of time after insemination. When oocytes and spermatozoa were co-cultured for 3 and 6 h, the rates of cleaved embryos were 11 and 22%, respectively. In contrast, oocytes co-cultured for 9 and 12 h showed higher rates of cleaved embryos at 57 and 51%, respectively. However, the rate of embryos reaching the 4-cell stage or beyond was higher for oocytes cultured for 9 h than 12 h.

Table 4. Effect of the time of co-culture with spermatozoa after insemination on early cleavage of pig follicular oocytes in vitro

Duration of co-culture with spermatozoa	No. of oocytes examined <sup>1)</sup>	No. (%) of oocytes developing to			No. (%) of oocytes degenerated or fragmented
		1 cell	2-3 cell	4 cell-	
3	37	10(27) <sup>ab</sup>	3( 8) <sup>a</sup>	1( 3) <sup>a</sup>	23(62) <sup>a</sup>
6	41	14(34) <sup>a</sup>	2( 5) <sup>a</sup>	7(17) <sup>b</sup>	18(44) <sup>ab</sup>
9	45	10(20) <sup>ab</sup>	10(20) <sup>b</sup>	18(37) <sup>c</sup>	11(23) <sup>bc</sup>
12	45	5(11) <sup>b</sup>	10(22) <sup>b</sup>	13(29) <sup>bc</sup>	17(38) <sup>ab</sup>

1) Oocytes matured 36 h in vitro and subsequently co-cultured with spermatozoa for 9 h were transferred to the embryo culture medium and examined after 3 days.

a-c) Values with different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05).

### Discussion

The time required for nuclear maturation of pig follicular oocytes varies among oocytes when oocyte-cumulus complexes are cultured in vitro<sup>15,16)</sup>. In contrast, nuclear maturation of oocytes proceeded synchronously in the present experiment, when oocytes surrounded by the cumulus with a part of membrana granulosa cells directly adjacent to the cumulus were cultured. Oocyte-cumulus-granulosa cell complexes do not resume meiosis in gonadotropin-free medium<sup>12)</sup> and thus oocytes in such a condition were stimulated by gonadotropic



stimulation to resume meiosis<sup>13</sup>). All oocytes reached the metaphase II stage after 33 h of culture. The time required for oocyte maturation to the metaphase II was essentially the same as that reported by Yoshida et al.<sup>16</sup>).

Oocytes cultured for 36 and 42 h and inseminated formed a male pronucleus(ei) at significantly higher percentages than oocytes cultured for 48 or 54 h. Oocytes matured in modified TCM199 for 32-36 h and fertilized in vitro show a significantly higher cleavage rate than those of oocytes cultured for 24-28 and 40-44 h<sup>17</sup>). In the oviducts, ovulated oocytes encounter capacitated spermatozoa by which they are penetrated immediately. When ovulated oocytes remain unfertilized for a certain time, they undergo degeneration<sup>18</sup>). The incidence of polyspermic fertilization and abnormal development increase by postovulatory aging of pig oocytes<sup>19</sup>). The fertilizing ability of oocytes is thus limited after ovulation, and aging results in increased abnormal fertilization of oocytes<sup>20</sup>). The rate of male pronuclear formation of oocytes matured for 30 h was significantly lower than that of the oocytes cultured for 36 and 42 h. The proportion of oocytes reaching metaphase II was only 28% after 30 h of maturation culture. Remaining oocytes that did not reach metaphase II continued to undergo maturational change in the fertilization medium. It follows from these results that there should be a suitable culture period for pig oocyte maturation, which in this study was found to be 36-42 h.

Sperm penetration of oocytes was first observed 9 h after insemination. Although no oocytes had penetrated by spermatozoa 3 and 6 h after insemination, a few oocytes showed normal cleavage after transfer to the embryo culture medium. The rate of development of oocytes co-cultured with spermatozoa for 9 h was higher than that of 12 h, although the proportions of oocytes penetrated and which formed a male pronucleus(ei) were significantly lower in oocytes co-cultured with spermatozoa for 9 h. Some spermatozoa that had penetrated the zona pellucida or perivitelline space of the oocytes might have continued to penetrate oocytes after transfer to the development medium.

There is a close relationship between the rate of polyspermy and subsequent abnormal cleavage in ovulated pig eggs<sup>19</sup>). Multiple sperm entry into oocytes has been reported in pig oocytes following in vitro fertilization<sup>2,4,8,11</sup>). In the present study, the occurrence of abnormal cleavage was higher in oocytes co-cultured for 12 h than 9 h. The mean number of spermatozoa per penetrated oocyte was significantly higher at 12 h after insemination, and thus the higher incidence of abnormal cleavage may have been due to polyspermic fertilization of the oocytes. The rate of abnormal cleavage was higher in oocytes co-cultured for 3 and 6 h than 9 h. Abnormality may be caused by fragmentation of unfertilized oocytes.

It is concluded from these results that proportion of normal fertilization of pig follicular oocytes is highest when oocytes are matured for 36 h in vitro and subsequently co-cultured with spermatozoa for 9 h under the culture conditions of the present study.

### Acknowledgment

We thank Yoichiro Fujinami for his technical assistance, and the staff of Meat Inspection Office, Kobe, for supplying the pig ovaries. We are grateful to Dr. Robert Moor for his advice on maturation culture of pig oocytes using a rocking system.

### References

- 1) 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.
- 2) Yoshida, M., Ishizaki, Y. and Kawagishi, H. (1990): Blastocyst formation by pig embryos resulting from in-vitro fertilization of oocytes matured in-vitro. *J. Reprod. Fert.*, 88, 1-8.
- 3) Yoshida, M. (1987): In vitro fertilization of pig oocytes matured in vivo. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 49, 711-718.
- 4) Nagai, T., Takahashi, T., Masuda, H., Shioya, Y., Kuwayama, M., Fukushima, M., Iwasaki, S. and Hanada, A. (1988): In-vitro fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 84, 585-591.
- 5) Nagai, T., Takahashi, T., Shioya, Y. and Oguri, N. (1990): Maturation and fertilization of pig follicular oocytes cultured in pig amniotic fluid. *Theriogenology*, 34, 195-204.
- 6) Toyoda, Y., Itagaki, Y., Minato, Y. and Fukuda, Y. (1984): Fertilization in vitro of pig egg matured in vivo and vitro. *Proc. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem.*, 3, 395.
- 7) Miyano, T., Yoshikawa, K., Kato, S., Harayama, H., Nanjo, I. and Kanda, S. (1990): In vitro fertilization of in vitro and in vivo matured oocytes from prepubertal Meishan gilts. *Jpn. J. Zootech Sci.*, 61, 1011-1016.
- 8) Mattioli, M., Galeati, G. and Seren, E. (1988): Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation. *Gamete Res.*, 20, 177-183.
- 9) 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.
- 10) Yoshida, M., Ishizaki, Y., Kawagishi, H., Bamba, K. and Kojima Y. (1992): Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes in vitro and on their subsequent fertilizing and developmental capacity in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 95, 481-488.

- 11) Nagai, T. and Moor, R. M. (1990): Effect of oviductal cells on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized in vitro. *Mol. Reprod. Dev.*, 26, 377-382.
- 12) Motlik, J., Nagai, T. and Kikuchi, K. (1991): Resumption of meiosis in pig oocytes cultured with cumulus and parietal granulosa cells: The effect of protein synthesis inhibition. *J. Exp. Zool.*, 259, 386-391.
- 13) Kano, K., Miyano, T. and Kato, S. (1993): Effect of human menopausal gonadotropin on maturation and fertilization of pig oocytes cultured in vitro. *Jpn. J. Anim. Reprod. Technol.*, 15, 29-34.
- 14) Kato, S., Saida, J. and Terayama, K. (1979): Successful pregnancy using boar spermatozoa stored at 4°C for 12 days. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 25, 48-49.
- 15) Sato, E., Iritani, A. and Nishikawa, Y. (1978): Rate of maturation division of pig follicular oocytes cultured in vitro. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 49, 400-405.
- 16) Yoshida, M., Bamba, K. and Kojima, Y. (1989): Effects of gonadotropins and estradiol-17 $\beta$  on the timing of nuclear maturation and cumulus mass expansion in pig oocytes cultured in vitro. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 35, 86-91.
- 17) Wang, Z. K., Wei, P.H., Wang, J. Z., Lei, C. and Kou, M. Q. (1992): Maturation and fertilization of porcine oocytes in vitro. *Theriogenology*, 37, 733-739.
- 18) McLaren, A. and Ward-Orsini, M. (1968): The fate of unfertilized eggs in mice. *J. Reprod. Fert.*, 15, 181-183.
- 19) Hunter, R.H.F. (1967): The effects of delayed insemination on fertilization and early cleavage in the pig. *J. Reprod. Fert.*, 13, 133-147.
- 20) Hunter, R.H.F. (1980): Physiology and technology of reproduction in female domestic animal. p145-185, Academic Press Inc. London.

ブタ卵子の体外受精および発生に及ぼす卵子成熟培養時間および  
媒精後の精子との共培養時間の影響

加野浩一郎<sup>1)</sup>・廣岡亮介・宮野 隆・加藤征史郎

<sup>1)</sup>神戸大学大学院自然科学研究科

神戸大学農学部, 家畜繁殖学研究室

神戸市灘区657

直径4～6 mmのブタ卵胞から壁顆粒膜細胞の一部が付着した状態で卵子-卵丘細胞複合体を採取し、卵胞膜とともに振盪培養して、体外成熟過程を調べた。さらに成熟培養時間および媒精後の精子との共培養時間が卵子の受精および発生に及ぼす影響について検討した。培養24時間後、すべての卵子が第Ⅰ減数分裂中期へ、培養33時間後には91%の卵子が第Ⅱ減数分裂中期に達した。成熟培養30, 36, 42, 48および54時間に媒精し、その12時間後における受精状況を調べた。各区間で精子侵入卵子率に差は認められなかったが、雄性前核形成率は成熟培養36および42時間後に媒精した卵子で有意に高い値を示した。36時間成熟培養した卵子に媒精し、3, 6, 9および12時間後に回収して受精状況を調べるとともに、その後の発生状況を観察した。精子侵入卵子率および雄性前核形成率は媒精9から12時間後にかけて増加した。また、2細胞期以降への発生率は、媒精9時間後に発生培地へ移したときに57%と最も高かった。以上の結果から、本培養条件下では成熟培養時間を36時間とし、媒精後の精子との共培養時間を9時間とした場合に、最高の正常受精卵子率が得られることが知られた。



## Cryopreservation of Rat Blastocysts by Vitrification Using Ethylene Glycol, Polyethylene Glycol and Sucrose

Shigeki OHBOSHI, Reiko NAKAMICHI and  
Noboru FUJIHARA<sup>1)</sup>

Laboratory of Animal Reproduction and

<sup>1)</sup>Laboratory of Animal Physiology

Department of Animal Sciences

College of Agriculture

Kyushu University 46-06

Hakozaki, Fukuoka 812

**Abstract :** Rat blastocysts were cryopreserved by vitrification with a simple and rapid method using ethylene glycol (EG)-based solution which was mixed with different concentrations of polyethylene glycol (PEG) (5-15%) and sucrose (0.25-1.0M). Effect of time (2-10min) and temperature (on ice or at room temperature) for equilibration on the in vitro development of vitrified-warmed embryos were investigated. Successful vitrification was obtained by the equilibration for 5 min on ice (3-4°C). More than eighty percent of the vitrified-warmed embryos developed to the stages of expanded or hatched blastocyst when the embryos were equilibrated on ice for 5 min in the solution containing 40% EG, 5% PEG and 0.5 M sucrose. The solution containing sucrose (0.5M) was not effective for recovering the vitrified-warmed embryos. About 30% of the vitrified-warmed embryos developed to live fetus after transfer to recipient female rats. The present results indicate that even a simple and rapid method could be successful for the vitrification of rat blastocysts using the solution containing EG, PEG and sucrose. **Key words :** Vitrification, Rat, Blastocyst, Ethylene glycol, Polyethylene glycol, Sucrose.

(Received 30 August 1993, Accepted 30 September 1993)

### Introduction

The previous reports have demonstrated that ethylene glycol (EG) was an effective cryoprotectant for murine<sup>1)</sup>, sheep<sup>2)</sup> and cattle<sup>3)</sup> embryos which were cryopreserved by conventional freezing procedure. Recent paper has also shown that mouse embryos have been successfully cryopreserved by vitrification using EG as a cryoprotectant<sup>4)</sup>. We have already reported a favourable vitrification of rat blastocysts by a simple and rapid method<sup>5,6)</sup>. This experiment was, therefore, undertaken to examine the effects of EG, polyethylene glycol (PEG) and sucrose on vitrification of rat blastocysts,

determining in vivo and in vitro development of the vitrified-warmed embryos.

## Materials and Methods

### Embryos

According to the previous reports<sup>5,6)</sup>, female rats (8 to 14 weeks of age) of the Sprague-Dawley strain were mated with the same strain males. Day 1 was designated by the presence of sperm in vaginal smear. Blastocyst stage embryos were flushed from the uterus on day 5 of pregnancy. Morphologically normal blastocysts were washed twice with fresh Hepes-buffered saline (HBI) for the experiment.

### Vitrification and warming procedures

Vitrification solutions were prepared by mixing 40% (v/v) EG (Sigma Chemical Co.) with 5, 7.5, 10 or 15% (w/v) PEG (Sigma Chemical Co., m. w. 8000) and 0.25, 0.5 or 1.0 M sucrose, based on HBI solution. The embryos were directly exposed to each of the vitrification solutions for stated minutes in an ice box (3–4 C) or at room temperature (20–24C). The embryos were then loaded into plastic straw (0.25ml) and stored in liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>) for 1 to 31 days according to the method described previously<sup>5,6)</sup>. Warming of straws was performed by gently shaking in an ice-water or 20 C-water bath for 5 to 10 seconds. The contents of each straw were expelled into different diluents (see below) at room temperature.

### Experiment 1

In this experiment, different levels of PEG and sucrose were tested as the cryoprotectants for vitrification. Embryos were directly exposed to a vitrification solution in an ice box for 5min, vitrified and cryopreserved in LM<sub>2</sub>. Warming of straws was done in an ice-water bath, and the warmed embryos were recovered in 3 ml of HBI at room temperature, holding for 10min in order to remove cryoprotectants. Viability of the vitrified - warmed embryos was assessed by in vitro culture. The culture was conducted by the same method as the previous reports<sup>5,6)</sup>. The embryos that developed to expanded or hatched blastocyst stages were judged to be viable.

### Experiment 2

In this experiment, effect of time and temperature for equilibration were examined by using the solution composed of 40% EG, 50% PEG and 0.5 M sucrose (designated EPS). Embryos were exposed to EPS for 2, 5 or 10 min either in an ice box or at room temperature. The embryos were vitrified, preserved and warmed according to the method described in the section of vitrification and warming procedures. Viability of the embryos was examined by the in vitro culture.

### Experiment 3

In this experiment, effect of diluent containing sucrose on in vitro viability of the embryos was examined. Embryos were directly exposed to EPS for 2 min in the ice box, vitrified and preserved. Warming of straws was done in an ice-water bath. The contents of each straw were expelled into 3.0 ml of HBI containing 0, 0.5 or 1.0 M sucrose, and kept for 5 min at room temperature. The embryos were, then, transferred to fresh HBI for additional 5 min to remove cryoprotectants. Viability of the vitrified-warmed embryos was assessed by the above-mentioned culture method.

### Experiment 4

This experiment was designed to test in vivo survival rate of the vitrified-warmed embryos employing the same vitrification-warming procedures as described in experiment 3. The vitrified-warmed embryos were washed twice with fresh HBI, and morphologically normal blastocysts were transferred into both uterine horns of recipient female rats of the same strain on day 5 of pseudopregnancy. The pseudopregnancy was confirmed by complete cease of estrus cycle, showing diestrus stage. Three to seven embryos per horn were transferred surgically. As controls, freshly collected blastocysts, which were recovered on day 5 of pregnancy, were also transferred in the same procedure. The recipient females were allowed to litter.

### Statistical analysis

The percentage of the embryos developed to the expanded or hatched blastocyst stage was subjected to arcsine transformation, and then assigned for ANOVA analysis. When ANOVA revealed a significant treatment effect, the treatments were compared by Duncan's new multiple range test<sup>7)</sup>. In the experiment 4, differences in the rate of the embryos developed to live fetus were analyzed by the chi-square test<sup>7)</sup>.

## **Results**

### Effect of vitrification solution

With increasing concentration of PEG in the vitrification solution, which is based on 40% EG, in vitro viability of the vitrified-warmed embryos was decreased gradually, while the increase in sucrose concentration showed little effect on in vitro viability of the vitrified-warmed embryos (Table 1). More than 80% of the treated embryos developed to expanded and hatched blastocysts when vitrified in the solution containing 40% EG, 5% PEG and any concentration of sucrose (Table 1). In particular, higher concentration of PEG slightly inhibited the embryonic development to the expanded and hatched blastocyst stages following 24 h of incubation. On the one hand, after 48 h of culture, approximately 75% of the vitrified-warmed embryos developed to hatched blastocyst stage when vitrified in the solution containing 5% PEG and 0.5 M sucrose (Table 2).

Table 1. Effects of adding polyethylene glycol (PEG) and sucrose (S) to ethylene glycol(40%,V/V)-based solution on *in vitro* viability of vitrified-warmed rat blastocysts after 24hr culture\*

Sucrose	0.25 <sup>1)</sup>		0.5 <sup>1)</sup>		1.0 <sup>1)</sup>	
PEG	Expanded blastocyst	Hatched blastocyst	Expanded blastocyst	Hatched blastocyst	Expanded blastocyst	Hatched blastocyst
5 <sup>2)</sup>	70.8± 9.0 <sup>a</sup>	5.7± 5.7 <sup>a,b</sup>	57.6±13.0 <sup>a,b</sup>	26.6±11.1 <sup>a</sup>	59.5± 5.0 <sup>a,b</sup>	18.3± 8.1 <sup>a,b</sup>
7.5	53.1± 8.6 <sup>a,b</sup>	7.4± 4.8 <sup>a,b</sup>	53.3± 6.2 <sup>a,b</sup>	16.4± 8.1 <sup>a,b</sup>	39.8± 5.2 <sup>b</sup>	3.1± 3.1 <sup>a,b</sup>
10	47.7±10.5 <sup>a,b</sup>	12.2± 5.5 <sup>a,b</sup>	56.1± 7.1 <sup>a,b</sup>	7.8± 4.9 <sup>a,b</sup>	—	—
15	46.1± 5.6 <sup>a,b</sup>	7.7± 4.9 <sup>a,b</sup>	52.2± 8.8 <sup>a,b</sup>	0.0± 0.0 <sup>b</sup>	—	—

<sup>1)</sup> mol

<sup>2)</sup> %, W/V

<sup>a, b</sup> Means±SE within columns with different superscripts are significantly different(P<0.01). Data are values transformed using a square root of the arc sine.

<sup>\*</sup> The experiment was replicated four to six times at 6 to 15 embryos per treatment (45 to 62 embryos/treatment). Values were calculated as number of embryos viable/number of embryos recovered.

 Table 2. Effects of adding polyethylene glycol (PEG) and sucrose (S) to ethylene glycol(40%,V/V)-based solution on *in vitro* viability of vitrified-warmed rat blastocysts after 48hr culture\*

Sucrose	0.25 <sup>1)</sup>		0.5 <sup>1)</sup>		1.0 <sup>1)</sup>	
PEG	Expanded blastocyst	Hatched blastocyst	Expanded blastocyst	Hatched blastocyst	Expanded blastocyst	Hatched blastocyst
5 <sup>2)</sup>	19.5± 5.8 <sup>a</sup>	46.4± 5.0 <sup>a,b</sup>	6.3± 6.3 <sup>a</sup>	62.3± 7.4 <sup>a</sup>	13.2± 5.4 <sup>a</sup>	46.8± 6.7 <sup>a,b</sup>
7.5	8.0± 5.1 <sup>a</sup>	29.5±10.2 <sup>b,c</sup>	10.0± 6.6 <sup>a</sup>	43.3±15.0 <sup>a,b</sup>	4.0± 4.0 <sup>a</sup>	11.4± 7.2 <sup>c</sup>
10	18.2± 8.5 <sup>a</sup>	31.6± 7.4 <sup>b,c</sup>	0.0± 0.0 <sup>a</sup>	46.0± 5.4 <sup>a,b</sup>	—	—
15	9.1± 6.1 <sup>a</sup>	32.0± 6.5 <sup>b,c</sup>	15.6± 3.3 <sup>a</sup>	10.0± 6.4 <sup>c</sup>	—	—

<sup>1)</sup> mol

<sup>2)</sup> %, W/V

<sup>a, b</sup> Means±SE within columns with different superscripts are significantly different(P<0.01). Data are values transformed using a square root of the arc sine.

<sup>\*</sup> The experiment was replicated four to six times at 6 to 15 embryos per treatment (45 to 62 embryos/treatment). Values were calculated as number of embryos viable/number of embryos recovered.

Influence of time and temperature for equilibration

As shown in Table 3, prolonged exposure of the embryos to vitrification solutions inhibited *in vitro* development of the vitrified-warmed embryos regardless of pre-treatment temperature, either in the ice box or at room temperature. Approximately 90% of the vitrified embryos could survive following pre-cooling on ice for 2 min (Table 3). Most of these embryos developed to hatched blastocyst stage after 48 h of culture (Table 3).

Table 3. Effects of temperature and time for equilibration to EPS solution on *in vitro* development of vitrified-warmed rat blastocysts\*

Treatment	No. of recovered embryos	Incubation period(hr)			
		24		48	
		Expanded blastocyst	Hatched blastocyst	Expanded blastocyst	Hatched blastocyst
Control	40	56.4 ± 6.8 <sup>a</sup>	23.7 ± 9.8 <sup>a</sup>	35.3 ± 6.9 <sup>a</sup>	49.9 ± 5.6 <sup>a</sup>
On ice <sup>1)</sup>					
2min	35	75.8 ± 8.1 <sup>a</sup>	6.5 ± 6.5 <sup>a</sup>	20.3 ± 12.0 <sup>a,b</sup>	54.6 ± 5.0 <sup>a</sup>
5min	41	66.7 ± 9.6 <sup>a</sup>	11.9 ± 7.3 <sup>a</sup>	22.1 ± 7.5 <sup>a,b</sup>	40.3 ± 3.7 <sup>a</sup>
10min	36	65.1 ± 12.0 <sup>a</sup>	16.4 ± 9.8 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	51.1 ± 2.4 <sup>a</sup>
Room temp. <sup>1)</sup>					
2min	53	63.9 ± 7.3 <sup>a</sup>	13.0 ± 8.0 <sup>a</sup>	20.7 ± 6.3 <sup>a,b</sup>	40.5 ± 13.9 <sup>a</sup>
5min	52	57.0 ± 14.2 <sup>a</sup>	16.6 ± 8.3 <sup>a</sup>	10.6 ± 6.5 <sup>b</sup>	34.6 ± 10.1 <sup>a</sup>
10min	54	0.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup> On ice (3~4°C) and room temperature (20~25°C).

<sup>a, b</sup> Mean ± SE within columns with different superscripts are significantly different (P < 0.01).

Data are values transformed using a square root of the arc sine.

\* The experiment was replicated three to five times at 8 to 16 embryos per treatment.

Effect of diluent containing sucrose

Addition of 0.5 M or 1.0 M sucrose to the diluent for recovering vitrified-warmed embryos failed to give any beneficial effects for further embryonic development of the vitrified embryos (Table 4). Following 48 h of incubation, most of the embryos which were recovered with HB1 developed to hatched blastocysts. The increased concentration of sucrose in the diluent resulted in a slight inhibition of embryonic development after vitrification and warming (Table 4).



Table 4. Effects of diluents on *in vitro* development of vitrified-warmed rat blastocysts\*

Diluent	No. of cultured embryos	Incubation period (hr)			
		24		48	
		Expanded blastocyst	Hatched blastocyst	Expanded blastocyst	Hatched blastocyst
HB1	32	45.8± 4.1 <sup>a</sup>	26.3± 2.3 <sup>a</sup>	0.0± 0.0 <sup>a</sup>	31.1± 3.0 <sup>a</sup>
HB1+0.5M Sucrose	34	59.4±14.0 <sup>a</sup>	12.7± 7.9 <sup>a</sup>	16.7± 5.8 <sup>b</sup>	31.5± 6.7 <sup>a</sup>
HB1+1.0M Sucrose	40	75.7± 8.3 <sup>a</sup>	4.6± 4.6 <sup>b</sup>	31.0± 5.8 <sup>b</sup>	17.6± 6.1 <sup>a</sup>

\*、<sup>a</sup>、<sup>b</sup> Means±SE within columns with different superscripts are significantly different(P<0.01).

Data are values transformed using a square root of the arc sine.

\* The experiment was replicated three to four times at 7 to 14 embryos per treatment.

### Pregnancy rate of the vitrified-warmed embryos

Of 27 vitrified-warmed embryos, 24 were recovered, all of which were successfully transferred to three recipient females. All recipients were established pregnancy and delivered seven to live fetuses. All of the fetuses derived from the vitrified-warmed embryos grow normally after birth and were proved to be fertile. The number and percentage of live fetuses were significantly ( $P<0.05$ ) lower than those of the control group (Table 5).

Table 5. Development of vitrified-warmed and untreated control rat blastocysts after transfer to the uteri of recipients on Day 5 of pseudopregnancy

Treatment	No. of embryos transferred	No. of pregnant recipients / No. of recipients	No. (%) of live fetuses
Control	27	2/2	17 <sup>a</sup> (62.3)
Vitrified-warmed	24	3/3	7 <sup>b</sup> (29.2)

\*、<sup>a</sup>、<sup>b</sup> Values within a column with different superscripts are significantly different(P<0.05).

## Discussion

A rapid and simple method of vitrification of rat blastocysts using EG-based solution (EPS) was successfully developed in the present experiment. This vitrification solution was superior to the previous one, in which glycerol was used as a cryoprotectant<sup>5,6)</sup>. The EG has been said to be favourable to embryos inducing easy permeation into the cells<sup>8)</sup>. Therefore, the vitrification solution containing EG is considered to be beneficial to the vitrification of mammalian embryos.

On the other hand, sucrose has also been used for freezing embryos in combination with DMSO<sup>9)</sup>, EG<sup>9)</sup>, glycerol<sup>10)</sup> and propylene glycol<sup>11)</sup>, suggesting that the inclusion of sucrose in vitrification solutions might be required to prevent the embryos from osmotic injury. In our preliminary experiment, vitrification solutions without sucrose resulted in none of viable embryos after vitrification (data not shown). However, the relationship between the embryonic viability and the concentration of sucrose in the solution was not clarified yet in the present study. Kasai et al.<sup>4)</sup> reported successful cryopreservation by vitrification of mouse embryos using the solution composed of EG, ficoll and sucrose. In the present study, the addition of PEG to the vitrification solution led to a decrease in the viability of the vitrified-warmed embryos with increasing concentration of PEG, indicating that extensive use of non-permeating polymer such as PEG might rather inhibit embryonic viability<sup>12)</sup>.

On the other hand, short period of equilibration for embryos in the ice box resulted in high survival rate of the vitrified-warmed embryos. Our previous report demonstrated that prolonged exposure of the embryos to highly concentrated cryoprotectants was harmful to rat embryos<sup>5)</sup>, suggesting that full permeation of a cryoprotectant into embryonic cells is not always necessary<sup>13)</sup>. Van Der Zwahlen et al.<sup>14)</sup> and Valdez et al.<sup>15)</sup> reported that the temperature of vitrification solution at equilibration affected the viability of the vitrified embryos. Decending of the exposing temperature is one of the strategies to protect the embryos from the harmful effect of the vitrification solution<sup>13)</sup>. Therefore, the simple procedures and the use of less harmful vitrification solutions are required.

With regard to the diluent, the utilization of sucrose was not effective for recovering the vitrified-warmed embryos in this experiment. However, sucrose has generally been used for the removal of intracellular cryoprotectants during dilution<sup>16)</sup>, and osmotic shock would be prevented by the use of sucrose as a buffer<sup>17)</sup>.

In the present experiment, the rate of pregnancy of the vitrified-warmed embryos was lower than that of the embryos frozen by conventional freezing<sup>18)</sup> and vitrification<sup>19)</sup> methods. Rall et al.<sup>20)</sup> has demonstrated that the toxic effect of cryoprotectants reduced the *in vivo* developmental ability into normal fetuses. Early embryonic development of rat embryos in the uterus has been said to be delayed by *in vitro* culture following dilution, and the delay of embryonic development related to freezing is considered to be due to the toxic effect of cryoprotectants<sup>21)</sup>. Improvement of the *in vivo* viability of vitrified-warmed embryos may be accomplished by short period of *in vitro* culture of the embryos<sup>21)</sup>.

In conclusion, the results obtained from the present study show that EG (40%)-based vitrification solution supplemented with PEG (5%) and sucrose (0.5M) can be effectively used for the vitrification of rat blastocysts with a simple and rapid vitrification method.

## References

- 1) Miyamoto, H. and Ishibashi, T. (1977) Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol. *J. Reprod. Fert.*, 50, 373-375.
- 2) Heyman, Y., Vincent, C., Garnie, V. and Cognie, Y. (1987) Transfer of frozen-thawed embryos in sheep. *Vet. Rec.*, 120, 83-85.
- 3) Voelkel, S.A. and Hu, Y.X. (1992) Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology*, 37, 687-697.
- 4) Kasai, M., Komi, J. H., Takakamo, A., Tsudera, H., Sakurai, T. and Machida, T. (1990) A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fert.*, 89, 91-97.
- 5) Ohboshi, S. and Fujihara, N. (1992) Simple and rapid cryopreservation of rat embryos by vitrification. *Low Temp. Med.*, 18, 3-7.
- 6) Ohboshi, S., Nakamichi, R., Fujihara, N. and Koga, O. (1993) Morphological features of rat blastocysts cryopreserved by vitrification. *J. Mamm. Ova Res.*, 10, 17-25.
- 7) Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. (1980) *Principales and Procedures of Statistics*. 2nd ed. New York, McGraw-hill, pp.137-194.
- 8) Szel, A., Shelton, J. M and Szell, K. (1989) Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos. *Cryobiology*, 26, 297-301.
- 9) Rayos, A. A., Takahashi, Y., Hishinuma, M. and Kanagawa, H. (1992) Quick freezing of one-cell mouse embryos using ethylene glycol with sucrose. *Theriogenology*, 37, 595-603.
- 10) Chupin, D. and de Reviers, M.M. (1986) Quick freezing of rat embryos. *Theriogenology*, 26, 157-166.
- 11) Renard, J.P., Bui-Xuan-Nguyen and Garnier, V. (1984) Two-step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J. Reprod. Fert.*, 71, 573-580.
- 12) Utsumi, K., Nishida, M., Kimura, K. and Iritani, A. (1992) preservation of rat morula by vitrification using highly concentrated solution of poly-alcohol. *J. Reprod. Dev.*, j7-j13.
- 13) Rall, W. F. (1987) Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 24, 387-402.
- 14) Van der Zwalm, P., Gaurois, B., Ectors, F. J., Touati K., Ectors F. and Massip. A. (1988) Some factors affecting successful vitrification of mouse blastocysts. *Theriogenology*, 30, 1177-1183.
- 15) Valdez, C. A., Abas, Mazni, O., Takahashi, Y., Hishimura, M. and Kanagawa, H.

- (1990) Effects of equilibration time, precooling and developmental stage on the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology*, 33: 627-636.
- 16) Schiewe, M. C., Rall, W. F., Stuart, L. D. and Wildt, D. E. (1991) Analysis of cryoprotectant, cooling rate and in situ dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. *Theriogenology*, 36, 279-293.
- 17) Oda, K., Gibbons, W. E. and Leido, S. P. (1992) Osmotic shock of fertilized mouse ova. *J. Reprod. Fert.*, 95, 737-747.
- 18) Miyamoto, H. and Ishibashi, T. (1978) The protective action of glycols against freezing damage of mouse and rat embryos. *J. Reprod. Fert.*, 54, 427-432.
- 19) Kono, T., Suzuki, O. and Tsunoda, Y. (1988) Cryopreservation of rat blastocysts by vitrification. *Cryobiology*, 25, 170-173.
- 20) Rall, W. F., Wood, M. J., Kirby, C. and Whittingham, D. G. (1987) Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *J. Reprod. Fert.*, 80, 499-504.
- 21) Whittingham, D. G. and Anderson, E. (1976) Ultrastructural studies of frozen-thawed 8-cell mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 48, 137-140.

Ethylene glycol, Polyethylene glycol 及び Sucrose を用いた  
ラット胚盤胞のガラス化凍結保存

大星茂樹、仲道麗子、藤原 昇<sup>1)</sup>

九州大学農学部、家畜繁殖生理学研究室

<sup>1)</sup>九州大学農学部、動物生理学研究室

妊娠5日目のラットの子宮から採取した胚盤胞を用いEthylene glycol (EG), Polyethylene glycol (PEG) 及び Sucrose を凍結保護物質として、簡易・迅速なガラス化凍結保存法について検討した。その結果、40%EG, 51%PEG, 0.5M Sucrose を含むガラス化溶液に胚を浸漬し、氷上(3-4℃)で2分間平衡させた場合に最も高い生存胚率が得られた。また、この方法によって得られた生存胚を雌ラットの子宮に移植して胎児が得られたが、発育ならびに成熟後の繁殖能力は正常のラットと同様であった。

## 白血病細胞増殖抑制因子 (L I F) 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

### Effects of leukemia inhibitory factor(LIF) on the developmental ability of mouse 8 - cell embryos in vitro and in vivo

加藤容子 小田垣諭司 角田幸雄

Yoko KATO, Satoshi ODAGAKI and Yukio TSUNODA

近畿大学農学部畜産学教室

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

**Abstract:** Effects of leukemia inhibitory factor(LIF) on the developmental ability of mouse 8-cell embryos in vitro and in vivo were examined.①Eight-cell embryos were cultured with M16+LIF medium in vitro to examine the development to blastocysts and the attachment to culture dish.②Blastocysts were transferred to recipient mice following the injection of LIF into the uterine lumen to examine the number of live youngs on Day 17. The results obtained were as follows.(1)When embryos were cultured in a medium supplemented with LIF, the proportion of embryos developed to hatched blastocysts was increased. Blastocysts cultured in the presence of LIF and 10% FCS attached to the surface of the culture dish at a significantly higher frequency than control blastocysts(42 vs 71 ~90%).(2)The proportion of embryos that developed into live young was significantly increased, when the LIF was directly injected into the uterine lumen, compared with the control group(15 vs 35%).

**Key words:** Leukemia inhibitory factor(LIF), Hatching, Attachment

(受付:1993年9月8日, 受理:1993年9月25日)

#### 緒 言

近年, 哺乳動物初期胚の体外での発生能に及ぼす成長因子の影響が多数検討されている<sup>1-5)</sup>. Leukemia inhibitory factor (LIF)は, 胚性幹細胞(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<sup>6-10)</sup>, 胚の着床にはこのLIFの発現が必須であることが最近明らかとなった<sup>11-12)</sup>. また, 胚の体外培養液に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ことが報告されている<sup>12)</sup>. 哺乳動物では, 体外で操作した胚を個体へ発生させるためには, 受胎雌の子宮あるいは卵管への移植が必須であるが, 胚を体外培養すると受胎率が低下することが知られている<sup>14-16)</sup>. そこで, 本実験では, LIFが8細胞期胚を培養後の脱出率と接着率に及ぼす影響, ならびにLIFの子宮腔への直接注入が移植胚の生存性を向上させるか否かについてそれぞれ検討した。



## 材料ならびに方法

## 実験1.

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5IUずつ腹腔内投与後、同系雄と交配させて、hCG投与後67~69時間目にM<sub>2</sub>液<sup>17)</sup>で卵管ならびに子宮を灌流して採取した。採取した胚は1あるいは10%の牛胎児血清(FCS)と10<sup>3</sup>あるいは10<sup>4</sup>U/mlのLIFを含むように組み合わせて添加したM16液<sup>18)</sup>を用いて6日間体外培養した。なお、用いたLIFは市販のE.Coli由来のもの(ESGRO, AMRAD社, Australia, 以下LIF-Aと称する)とBMT10cell由来のもの(LIF-B)の2種類である。各区とも5%CO<sub>2</sub>, 95%空気の気相下で37℃で培養し、胚盤胞への発生能、透明帯からの脱出能ならびにディッシュ底面への接着性を観察した。なお、胚盤胞へ発育後透明帯から完全に脱出し、ついでプラスチックディッシュ(NUNC社製, NUNCLON DELTA, 35×10)面にしっかりと付着したものを接着と判定した<sup>19)</sup>。

## 実験2.

LIF-B 10 $\mu$ l(3×10<sup>4</sup>U/ml)を偽妊娠2.5日齢マウスの子宮腔内に注入し、直後に実験1と同様に10<sup>4</sup>U/mlのLIF-Bを添加あるいは無添加M16液で一晩培養した桑実胚~胚盤胞を同子宮内へ移植した。胚は移植前にDMEM液に移して洗浄した。なお、コントロールとしては、10 $\mu$ lのダルベッコ変法イーグル培養液(DMEM)を子宮腔に注入後、同様に胚を移植したか、あるいは注入せずに常法にしたがって移植した。受胎雌は分娩直前の17日目に屠殺して生存胎子数を記録した。

なお、結果の有意差の検定は $\chi^2$ 検定により実施した。

## 結 果

Fig. 1に、LIFとFCSの添加が胚盤胞への発生能に及ぼす影響について示した。各区51~118個の8細胞期胚を供した。図から明らかなように、胚盤胞へは全区とも高率に発生した(79~100%)。また、M16にLIF-Aを添加すると、無添加区と比べて胚盤胞の脱出率が有意に増加し(68% vs 85~87%)、LIF-Bを添加した場合も増加する傾向がみとめられた(68% vs 78~80%)。1%FCSを添加したM16液の場合も同様の傾向がみとめられた。しかしながら、10%FCSを添加すると、脱出率は各区とも低下する傾向がみられ、LIF-Aの場合どちらの濃度区においても対照区と比べて有意に低下した。

Fig. 2にLIFとFCSの添加が胚のディッシュ底面への接着性に及ぼす影響について示した。ディッシュ底面への接着率は、FCS無添加の場合各区とも0~6%と極めて低い値であった。FCSを1%添加しても10<sup>3</sup>LIF-B区の8%を除き、いずれの区でも27~47%と対照区と比べて接着率に有意差はみとめられなかった。しかしながら、FCSを10%添加した場合は、LIF-A(10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>/ml)やLIF-B(10<sup>4</sup>/ml)を添加すると71~90%が接着し、これらは対照区の42%に比べて有意に高い値であった。

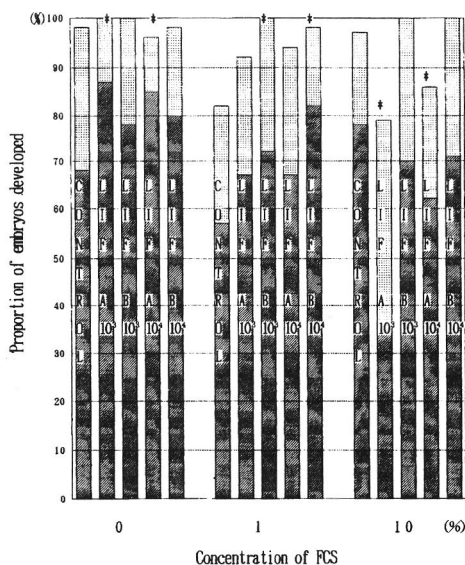


Fig. 1 Effect of the addition of LIF on the development of mouse 8-cell embryos in vitro. ■ blastocyst, ▨ hatched blastocyst  
\* significantly different from the control ( $p < 0.05$ ).

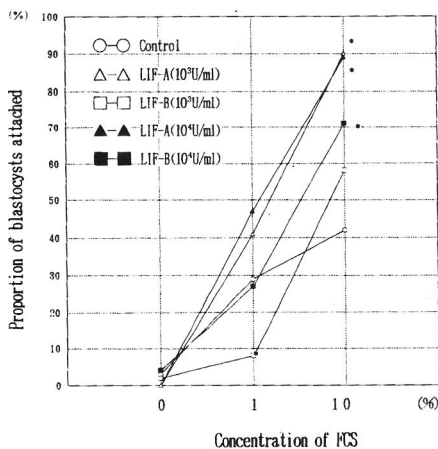


Fig. 2 Effect of the addition of LIF on the attachment of mouse hatched blastocysts in vitro.  
\* significantly different from the control ( $p < 0.05$ ).

Table 1 に移植時のLIF の注入が産子生産率に及ぼす影響について示した。各区それぞれ40~169個の胚を3~11匹の偽妊娠雌に移植したところ、50~100%の雌が妊娠した。LIFを添加して体外培養した胚を移植した場合、無添加区に比べて産子生産率は向上せず(24% vs 15%, 65% vs 50%あるいは36% vs 35%), また、移植前にLIFを子宮腔内へ注入しても改善はみられず(24% vs 36%), 常法の移植法でおこなった場合の産子生産率と比べて有意に低下する値となった(24% and 36% vs 65%)。しかしながら、

培養時にLIFを添加しなかった場合は、移植前にLIFを直接子宮腔内へ注入すると、LIF無添加の液を注入した場合と比べて有意に向上し(15% vs 35%), 常法の移植法でおこなった場合と比べて有意な差はみられなかった(35% vs 50%)。

Table 1. Effect of the injection of LIF into uterine lumen on the development of mouse embryos into live fetuses after transfer to recipients

With(+) or without(-)		No. of		
culture	LIF	blastocysts transferred	pregnant females(%)	live young (%*)
	transfer			
+	—	92	5/ 5(100)	22(24)*
	—**	40	3/ 3(100)	26(65) <sup>b</sup>
	+	77	3/ 6( 50)	14(36)*
-----				
—	—	85	5/ 6( 83)	11(15)*
	—**	169	7/11( 64)	55(50) <sup>b</sup>
	+	85	4/ 6( 67)	22(35) <sup>b</sup>

\* mean proportions of live young in pregnant females.

\*\* transfer in a minimal volume of medium.

a—b,  $p < 0.05$

## 考 察

LIF は、ES細胞を体外で継代維持するとき、その分化を抑制する働きのあるサイトカインとしてよく知られているが、最近、LIF が妊娠4日目マウスの子宮内膜腺で多量に分泌されており、胚の着床にとって必須な因子であることも明らかにされてきている。Stewartら<sup>12)</sup>は、LIF の発現を司る遺伝子を欠損したトランスジェニックマウスを作製し、欠損マウス由来の胚自体は正常であるがその子宮がLIFを分泌しないために着床できないことを示した。また、Robertsonら<sup>13)</sup>は、LIFを添加した培養液でマウス胚を体外培養すると、透明帯脱出後のディッシュ底面への接着性が高まることを報告している。本実験においても、培養液にLIFを添加すると胚盤胞の脱出率が向上する傾向がみとめられたが、10% FCSを同時に添加すると脱出率の低下が観察された。この理由については不明である。また、LIFは脱出胚盤胞のディッシュ底面への接着性を向上させる効果のあることが観察されたが、LIF 単独では効果はみとめられず(0~6%), FCSとの相乗作用によるものと考えられた。

移植時に直接LIFを子宮腔へ注入した場合、産子への発育能が上昇する傾向がみとめられた。Stewartら<sup>12)</sup>はLIF 遺伝子欠損マウスの子宮腔内にLIFを注入しても着床促進に効果が見られないことを示したが、その原因の一つとして、一回の注入では着床を継続するだけの十分な濃度を供給できなかったためとしている。本実験では、正常にLIFを分泌していると考えられる受胚雌を用いたため、子宮腔内のLIF濃度が高まり着床が促進されて妊娠率が向上したと考えられた。また、本実験では10  $\mu$ l という多量の液を子宮に注入した結果、産子生産率は常法の移植法でおこなった場合よりも有意に低下したが(15% vs 50%), LIFを添加することによってこの低下が抑制された(50% vs 35%)。したがって、高濃度のLIFをより少量注入することにより、産子生産率を一層向上させられるものと考えられる。

本実験の結果から、LIFを移植時に直接子宮腔に注入すると移植胚の産子への発生能が高まることが示された。体外培養胚を受胚雌へ移植すると、培養日数が長くなるにつれて産子への発育能が低下することが知られているが、その原因の一つとして、胚の分裂速度の低下とそれに伴う細胞数の減少<sup>14-16)</sup>が挙げられている。本実験では細胞数について検討していないが、種々の人為操作を施した胚やランクの

低い胚を移植する場合などにおいて、LIFの注入により産子への発育能が改善されることが期待される。

#### 謝 辞

本研究で用いたBMT - 10cell由来LIF をご供与頂いた大阪大学細胞生体工学センター田中亀代次教授に感謝する。また、本研究の一部は、科学技術庁振興調整費「発生工学技術の開発等に関する研究」、ヒューマンサイエンス財団基礎研究事業費、文部省科学研究費(05556050とDC)、農林水産省シーズ培養研究助成金、近畿大学環境科学研究助成金、公益信託乾太助記念動物科学研究助成基金によりおこなわれた。

#### 文 献

- 1) Heath, J.K. and Smith, A.G. (1989): Growth factors in embryogenesis. *British Medical Bulletin*, 45, 319-336.
- 2) Harvey, M.B. and Kaye, P.L. (1990): Insulin increases the cell number of inner cell mass and stimulates morphological development of mouse blastocysts in vitro. *Development*, 110, 963-967.
- 3) Mummery, C.L. and A.J.M. van den Eijnden - van Raaij (1990): Growth factors and their receptors in differentiation and early murine development. *Cell Differ. Devel.*, 30, 1-18.
- 4) Paria, B.C. and Dey, S.K. (1990): Preimplantation embryo development in vitro: Cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 4756-4760.
- 5) Nathan, C. and Sporn, M. (1991): Cytokines in context. *J. Cell Biol.*, 113, 981-986.
- 6) Smith, A.G. and Hooper, M.L. (1987): Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Dev. Biol.*, 121, 1-9.
- 7) Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M. and Rogers, D. (1988): Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336, 688-690.
- 8) Nichols, J., Evans, E.P. and Smith, A.G. (1990): Establishment of germ - line - competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. *Development* 110, 1341-1348.
- 9) Smith, A.G., Nichols, J., Robertson, M. and Rathjen, P.D. (1992): Differentiation inhibiting activity (DIA/LIF) and mouse development. *Dev. Biol.*, 151, 339-351.
- 10) 徳永智之, 林司, 岡崎正幸, 古沢軌, 須藤忠 (1991): ES細胞の増殖と分化ならびにキメラ形成能に対するフィーダー細胞層とLeukemia Inhibitory Factorの影響, *家畜繁殖誌*, 37, 285-290.
- 11) Bhatt, H., Brunet, L.J. and Atewart, C.L. (1991): Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 11408-11412.
- 12) 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 leukemia inhibitory factor. *Nature* 359, 76-79.
- 13) 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.
- 14) Bowman, P. and McLaren, A. (1970): Cleavage rate of mouse embryo in vivo and in vitro. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 24, 203-207.
- 15) Harlow, G.M. and Quinn, P. (1982): Development of preimplantation mouse embryos in vivo and in vitro. *Aust. J. Biol. Sci.* 35, 187-193.
- 16) Streffer, C.D., Van Beuningen, M., Zamboglou, N. and Schulz, S. (1980): Kinetics of cell proliferation in the pre - implanted mouse embryo in vivo and in vitro. *Cell Tissue Kinet.* 13, 135-143.
- 17) Fulton, B.P. and Whittingham, D.G. (1978): Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. *Nature* 273, 149-151.
- 18) Whittingham, D.G. (1971): Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 14, 7-21.
- 19) 角田幸雄, 槇野庸子, 入谷明, 西川義正 (1977): 体外培養によるラット胚盤胞の透明帯脱出およびガラス壁面への付着について, *日畜会報*, 48, 94 - 99.



Brinster 培養液と Dulbecco 修正 Eagle  
培養液によるキメラマウス胚の培養と移植の試み  
An attempt to culture chimeric mouse embryos in a Brinster's Medium  
and Dulbecco's Modified Eagle Medium.

川島康成・高橋寿太郎・安田泰久

Yasunari KAWASHIMA, Jutarō TAKAHASHI, 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

**Abstract:** Development of chimeric mouse embryos cultured in a Brinster's medium and a Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) was examined in an attempt to produce chimeric mouse using 8~16-cell stage aggregated embryos. Growth of chimeric mouse embryos cultured in a Brinster's medium or DMEM in vitro was slower than that of normal embryos in vivo. Both Brinster's Medium and DMEM were slightly modified by addition of glucose (0.2% concentration). When modified Brinster's medium and modified DMEM were used to culture aggregated chimeric embryos, growth of aggregated chimeric embryos were faster than aggregated chimeric embryos cultured in several basic media that containing 0.1% glucose. Furthermore, modified Brinster's medium and modified DMEM were incubated with ovaries for 2 hour in advance. When modified and conditioned Brinster's medium and modified and conditioned DMEM were used to culture aggregated chimeric embryos, growth of aggregated chimeric embryos were faster than aggregated chimeric embryos cultured in several modified and not conditioned media that containing 0.2% glucose. Transfer of aggregated chimeric embryos cultured in modified and conditioned Brinster's medium to recipients resulted in live pups. **Key words:** Cimeric mouse embryo, Brinster's medium, Dulbecco's modified Eagle medium, Development.

(受付1993年9月13日、受理1993年9月25日)

緒 言

マウス初期胚用の培養液は数多く知られるが、これらは1細胞期胚から胚盤胞期胚までの一貫した体外培養を行う目的で作られている。一方、in vivo におけるマウス初期胚の発生は卵管と子宮において行われている。キメラマウス胚の培養は、集合法で4~8細胞期胚以降、注入法で桑実胚~胚盤胞以

降の発生ステージで行われ、これは in vivo における卵管内と子宮内における発生に相当する。

今回、集合キメラ胚の効果的な培養、移植の実験系の確立を目的として、8細胞期胚以降の初期胚培養液を、一般的マウス初期胚用培養液の一つであるBrinsterの培養液を、その組成の修正、さらには調整した培養液を用いて、その培養成績を比較すると共に、以前当研究室でキメララット作出に用いたDMEMについても同条件で修正、調整した培養液を用いて、その培養成績を比較してみた。また、それぞれの培養液で培養した胚を移植、その後の発生を比較することにより、キメラマウス作出における実験系の検討を行った。

## 材料と方法

### 培養液の修正、および調整

Brinsterの培養液(BMOC-II)<sup>1)</sup>の無機塩類は全て和光純薬工業K.K.試薬特級のものを使用した。DMEMは日本K.K.の調整粉末を使用した。Brinsterの培養液に添加するビルビン酸、乳酸はSIGMA社製のものを使用、また、Brinsterの培養液およびDMEMに添加するグルコースは和光純薬K.K.工業試薬特級のものを使用した。またそれぞれの培養液のBSA(Albumin Fraction V, Boehringer Mannheim GmbH)濃度は0.5%とした。また、それぞれの培養液のグルコース濃度を修正し、通常の0.1%から、0.2%とした。また、培養成績の向上を目的に、それぞれの修正培養液に対して、胚回収の際に摘出した卵巣を培養液で洗浄後、培養液2mlに2時間浸漬し、その上清を胚の培養液に用いた。

### 集合キメラ胚の作出、および培養

胚採取用には、BALB/c系、C57BL/6系の2~3カ月齢雌マウスを使用し、PMSG(ビーメックス三共K.K.)、hCG(プベローゲン 三共K.K.)45時間間隔でそれぞれ5IUを腹腔内投与により過排卵誘起させて、それぞれ同系雄と交配させた。膣栓確認日を0日とし、2.5~2.75日に子宮および卵管より8~16細胞期胚を回収して形態的に正常なものを選び、以下 Mullen & Whittenらの方法<sup>2)</sup>に準じて、0.4%プロナーゼ(Pronase E sigma)により透明帯を除去後、0.2%フィトヘマグルチニン(Phytohemagglutinin P, difco)により胚を集合させて、この集合胚を流動パラフィン(関東化学K.K. 鹿特級)下の微小滴培地1つ当たり(40~50  $\mu$ l)1個ずつ培養を行い<sup>3)</sup>、培養開始後6、18、24、30時間毎に胚の発生を観察した。なお、培養6時間目の観察で形態的に異常な集合胚は、この段階でデータから除いた。

### 胚の移植

胚移植用には、ICR系の3~4カ月齢の経産または未経産雌マウスを使用し、同系精管結紮雄マウスと交配させて偽妊娠を成立させた。胚盤胞に発生した胚は、偽妊娠2.5~3.5日の子宮内に片側当たり平均7個移植を行った<sup>4)</sup>。なお、移植手術の際の麻酔には、アバーチン(2.2.2-Trybromoethanol Aldrich Chemical Company. Inc. 3-Methylbutyl Alcohol, 和光純薬工業K.K.)腹腔内投与<sup>5)</sup>、あるいは、ケタミン(ケタラル50, 三共K.K.)、キシラジン(セラクタール バイエルジャパンK.K.)併用の筋肉内投与を行った。

## 移植後の成績の判定

妊娠は腹部の膨満、および発情の回帰から判定した。また、妊娠が成立しなかった群は一定の妊娠期間を経過した後に剖検を行い、卵巣、子宮などの癒着、変性、壊死、あるいは、子宮蓄膿などを生じている場合には移植手術の失敗として、データから除いた。また妊娠期間中に死亡した群についても同じくデータから除いた。

## 結 果

Brinsterの培養液、およびその修正、調整培養液、DMEM、およびその修正、調整培養液における培養6、18、24時間目の集合キメラ胚の発生成績は、Table 1, 2に示した。

Table 1. Development of chimeric embryos in a Brinster's medium and a modified Brinster's medium in vitro.

Type of medium	No. of chimeric embryos	Term of culture (Hours)	Developmental stages			
			Uncomp. morula(%)	Comp. morula(%)	Early blastocyst(%)	Blastocyst(%)Expanded blastocyst(%)
Brinster's medium	*1 44	6	34 (77.3)	10 (22.7)		
		18		40 (90.9)	4 (9.2)	
		24		13 (29.5)	24 (54.6)	7 (15.9)
MBM containing 0.2% glucose	*2 60	6	44 (73.3)	16 (26.7)		
		18		43 (71.7)	14 (23.3)	3 (5.0)
		24		3 (5.0)	25 (41.7)	24 (40.0) 8 (13.3)
MBM incubated with ovaries for 2 hours		6	61 (48.0)	66 (52.0)		
		127 18		53 (41.7)	63 (49.6)	11 (8.7)
		24		1 (0.8)	47 (37.0)	57 (44.9) 22 (17.3)

\*1; Brinster's medium containing 0.1% glucose. \*2; MBM = Modified Brinster's medium.

Table 2. Development of chimeric embryos in a DMEM and a modified DMEM in vitro.

Type of medium	No. of chimeric embryos	Term of culture (Hours)	Developmental stages			
			Uncomp. morula(%)	Comp. morula(%)	Early blastocyst(%)	Blastocyst(%)Expanded blastocyst(%)
DMEM	*1 41	6	40 (97.6)	1 (2.4)		
		18	2 (4.9)	36 (87.8)	3 (7.3)	
		24		15 (36.6)	21 (51.2)	5 (12.2)
MDMEM containing 0.2% glucose	*2 43	6	36 (83.7)	7 (16.3)		
		18		30 (69.8)	13 (30.2)	
		24		10 (23.3)	15 (34.9)	18 (41.8)
MDMEM incubated with ovaries for 2 hours		6	36 (78.3)	10 (21.7)		
		46 18		28 (60.9)	14 (30.4)	4 (8.7)
		24		4 (8.7)	23 (50.0)	10 (21.7) 9 (19.6)

\*1; DMEM containing 0.1% glucose. \*2; MDMEM = Modified DMEM.

なお、各発生段階の胚は、割球の個々の細胞が明瞭に区別できるものをUncomp.morula、個々の細胞が明瞭に区別できなくなり、全体に小さくなったものをComp.morula、胚盤胞腔が生じ、その胚盤胞腔が胚盤胞全体の1/2以下のものをEarly blastocyst、胚盤胞腔が胚盤胞全体の1/2以上のものをBlastocyst、内部細胞塊を残し、胚盤胞腔が全体に広がり、全体として球形になったものをExpanded blastocystとした。修正および調整Brinsterの培養液、DMEMで培養し発生した胚の移植後の成績は、Table 3, 4に示した。

修正および調整Brinsterの培養液で培養して、キメラ胚として発生した胚を、偽妊娠2.5～3.0日目にケタミン、キシラジン麻酔下で、移植した群でのみ妊娠が成立し、かつキメラマウスが得られた。なお、アパーチン麻酔下で、移植した群は、3匹に1匹の割合で移植手術後1週間以内に死亡し、これらは剖検により、腹腔内諸臓器、腹壁の漿膜面に線維素付着、これによる諸臓器の癒着および水腫様変性が認められた。一方、ケタミン、キシラジン麻酔下で、移植した群での死亡例はなかった。また、生まれたマウス10匹の内、毛色キメラを示したものは4匹で、他は全てアルビノを示した。なおアルビノを示したマウスは毛色、虹彩からはキメラとは判定できなかった。毛色キメラを示した4匹の毛皮の有色、白色の比率はほぼ1:1であった。また、その4匹の内3匹が雄であった。これは他の集合キメラマウスに関するデータと等しい結果であった<sup>6)</sup>。

Table 3. Postimplantation development of chimeric embryos cultured in a modified Brinster's medium.

Host No.	Term of pseudopregnancy (Days)	Term of culture (Hours)	Type of *1 embryos	Type of anesthesia	Pregnant	No. of littermates
1	2.9	27	B~ExB	Avertin	-	
2	3.3	24	EB~ExB	Avertin	-	
3	3.0	36	ExB	Avertin	-	
4	2.5	36	ExB	Avertin	-	
5	2.7	30	B~ExB	Avertin	-	
6	2.9	24	EB~ExB	Ketamine and xylazine	-	
7	2.9	22	B~ExB	Ketamine and xylazine	+	3
8	2.5	44	ExB	Ketamine and xylazine	+	2
9	2.5	44	ExB	Ketamine and xylazine	+	2
10	2.6	44	ExB	Ketamine and xylazine	+	3
11	2.0	28	B~ExB	Ketamine and xylazine	-	
12	1.8	48	ExB	Ketamine and xylazine	-	
13	1.5	44	ExB	Ketamine and xylazine	-	

\*1: B=Blastocyst, ExB=Expanded blastocyst.

Table 4. Postimplantation development of chimeric embryos cultured in a modified DMEM.

Host No.	Term of pseudopregnancy (Days)	Term of culture (Hours)	Type of *1 embryos	Type of anesthesia	Pregnant	No. of littermates
1	2.9	30	EB~ExB	Avertin	-	
2	3.0	24	B~ExB	Avertin	-	
3	3.3	30	B~ExB	Avertin	-	
4	2.5	24	B~ExB	Avertin	-	
5	2.6	36	ExB	Ketamine and xylazine	-	
6	2.6	36	ExB	Ketamine and xylazine	-	
7	2.6	36	ExB	Ketamine and xylazine	-	
8	2.7	48	ExB	Ketamine and xylazine	-	

\*1: B=Blastocyst, ExB=Expanded blastocyst.

## 考 察

マウス初期胚の各発生過程でのエネルギー源は、8細胞期胚以前でピルビン酸、乳酸が主体で<sup>7)</sup>、グルコース利用効率は低い。一方、8細胞期胚以降では、ピルビン酸、乳酸は必要としなくなり、グルコースを効果的に利用するようになる<sup>9)</sup>。そのことから胚の発生をあくまで *in vivo* に近づけるには、8細胞期胚を境として、2種類の組成の培養液を用いる必要があると考え、予備実験として、それぞれの基本的培養液に比べて、グルコース濃度を0.5、2、2.5、3、4倍として胚の発生成績を検討したところ、0.5、4倍濃度でむしろ発生は遅くなり、2～3倍濃度で発生は速くなるが、それぞれに差はみられなかったことから、培養液のグルコース濃度を0.2%に修正した。本来、卵管と子宮におけるグルコース濃度は基本的培養液の0.1%よりも低く、しかし、*in vivo* においては胚のグルコースの吸収、代謝に影響するホルモン<sup>9)</sup>、あるいは他の unknown factor の介在が十分に示唆され、また、胚のグルコース吸収機序には未だ不明な点が多いが、おそらく担体を介する拡散によるところが大きいので、胚の発生を速めるには、基本的培養液に比べてグルコース濃度をある程度上げる必要があったと考えられる。なお、今回使用したBSAの代わりに、CSあるいはFBSを使用すれば先のホルモン、unknown factor の介在の余地があり、さらなる発生速度の短縮も考えられる。卵巣を浸漬した調整培養液を用いた理由もその点に関係があり、胚発生に影響しうる卵巣、卵管、子宮由来のホルモン、unknown factor があると仮定して、簡略でかつ同実験手技で胚発生率を向上させる目的で行ったものである。予備実験において、卵巣、卵管、子宮それぞれの浸漬培養液における胚の発生成績を検討したところ、卵巣浸漬培養液でより胚の発生が速くなる傾向がみられている。なお、卵巣由来の細胞増殖、分化促進因子としては、エストロジェン、プロゲステロンが知られているが、その他の unknown factor も考えられうる。

以上それぞれの修正、及びその調整培養液において、培養成績の最も良かったものは、卵巣を浸漬した、0.2%グルコースを含む修正Brinsterの培養液であった。データとしては示していないが、この培養液による無処理8細胞期胚の培養成績は *in vivo* と差がなく、よってこの無処理8細胞期胚と集合胚の発生速度の差は、集合胚における透明帯除去処理に使用するプロナーゼの胚への影響、あるいは個々の胚の持つ宿主特異免疫機構の影響<sup>10)11)</sup>ではないかと推察される。

移植後の胚の発生については、DMEMで培養したものでは、注入法による短期間の培養での移植後の発生は報告されているが<sup>12)13)</sup>、本実験において胚の発生は認められなかった。この点については、DMEMの組成、特に乳酸を含まない点に問題があるのではないかと考えられる。もっともピルビン酸を含むため、胚そのものは発生し得る。一方、マウスでは胚の着床に乳酸が何らかの意味で関与するという報告もあるが<sup>1)</sup>、しかしDMEMに乳酸を添加することは、胚の発生をかなり遅くする結果となるため<sup>14)</sup>、胚のもつ着床能力を損なうことにもなり<sup>15)</sup>、キメラマウス胚とキメララット胚の共通の培養液として、DMEMでは適切ではないと考える。また、アバーチン麻酔で胚の発生がみられなかった点についての理由は不明であった。他の実験結果では好成績を示している<sup>9)</sup>にもかかわらず、アバーチン麻酔の予備実験での麻酔の安定性、安全性における結果もよくなかったことから、アバーチンの調整方法、使用したトリプロモエタノール、第三級アミルアルコールの種類、Lot 番号も含めて問題があったものと思われる。



文 献

- 1) Brinster, R.L. (1965). Studies on the development of mouse embryos in vitro. IV. Interaction of energy source. *J. Reprod. Fert.*, 10, 227—240
- 2) Mullen, R.J. and W.K. Whitten (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.
- 3) Brinster, R.L. (1963). A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. *Exp. Cell. Res.*, 32, 205—208.
- 4) Humphrey, K. W (1969). Induction of implantation of blastocysts transferred to ovariectomized mice. *J. Endocrinol.*, 44, 299—305.
- 5) Hogan, B.L.M. Costantini, F. Lacy, E. (1986). Manipulating the Mouse Embryo. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. p. 271.
- 6) Michael, W.B. (1987). Testes of XX $\leftrightarrow$ XY chimeric mice develop from fetal ovotestes. *Dev. Genetics.*, 8, 207—218.
- 7) Iyengar, M.R., C. W. L. Iyengar, H. Y. Chen, R. L. Brinster, E. Bornslaeger and R. M. Schultz (1983). Expression of creatine kinase isoenzyme during oogenesis and embryogenesis in the mouse. *Dev. Biol.*, 96, 263—268.
- 8) Hsu, Y. C (1980). Embryo growth and differentiation factors in embryonic sera of mammals. *Dev. Biol.*, 76, 465—474.
- 9) Martin, G. R (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos culture in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78: 7634—7636.
- 10) Kelly, S. J (1977). Studies on the development potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. *J. Exp. Zool.*, 1200: 365—376.
- 11) Graham, C. F and Z. A. Deussen (1978). Features of cell lineage in preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 48: 53—72.
- 12) Tam, P. P. L and M. H. L. Snow (1980). The in vitro culture of mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 59: 131—143.
- 13) Evans, M. J. and M. H. Kaufman (1981). Establishment or culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154—156.
- 14) Cross, P. C. and R. L. Brinster (1973). The sensitivity of one-cell mouse embryos to pyruvate and lactate. *Exp. Cell. Res.*, 77: 57—62.
- 15) Spinks, N. R., J. P. Ryan and C. O' Neill (1990). Antagonists of embryo - derived platelet-activating factor act by inhibiting the ability of the mouse embryo to implant. *J. Reprod. Fert.*, 88: 241—248.

# 透明帯除去マウス卵子の体外受精 における侵入精子数の分布

## Distribution of the number of penetrating sperm in zona-free mouse eggs fertilized in vitro

山田 秀一<sup>1)</sup>・福田 芳詔<sup>2)</sup>・豊田 裕<sup>3)</sup>

Shuichi YAMADA<sup>1)</sup>, Yoshinori FUKUDA<sup>2)</sup>, and Yutaka TOYODA<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>財団法人 実験動物中央研究所 川崎市 宮前区 216

<sup>2)</sup>北里大学 獣医畜産学部 青森県十和田市 034

<sup>3)</sup>東京大学 医科学研究所 東京都 港区 108

<sup>1)</sup>Central Institute for Experimental Animals,  
Miyamae-ku, Kawasaki 216, Japan

<sup>2)</sup>School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Kitasato University  
Towada-shi, Aomori 034, Japan

<sup>3)</sup>Institute of Medical Science, Tokyo University  
Minato-ku, Tokyo 108, Japan

**Abstract:** Mouse eggs, freed from cumulus cells and zona pellucida, were inseminated at various sperm concentrations in vitro. The fertilization rates of these eggs were in direct proportion to the logarithm of sperm concentration. Sperm concentration for 50% fertilization rate in the zona-free eggs was about 1/25 of that for cumulus-free eggs. Frequency of the number of penetrating sperm in zona-free eggs closely fitted Poisson distribution at low sperm concentration ( $\leq 0.9$  cells/ $\mu$ l), suggesting that the fertilization was dependent on the random collision of an egg and a fertile spermatozoon. At higher sperm concentrations, however, incidence of monospermic fertilization was significantly higher than that expected from Poisson distribution, showing the vitelline block in these zona-free eggs. When zona-free eggs were coincubated with sperm for restricted periods, sperm attachment started in almost all eggs with 30 sec and eggs with binding sperm reached 87% at 3 min. But these binding sperm were not able to penetrate into cytoplasm immediately and sperm exposure time for more than 30 min was required to obtain high (>90%) fertilization rate. Increase in total sperm number in the fertilization medium resulted in a significant increase in the fertilization rate at a fix sperm concentration (10 sperms/ $\mu$ l). These result indicate that in vitro fertilization of zona-free mouse eggs is dependent on sperm : egg ratio in the fertilization medium. **Key words:** Mice, Zona-free, IVF

(受付1993年9月25日、受理1993年9月30日)

## 緒 言

透明帯は、多精子受精拒否機構としての透明帯反応<sup>2)</sup>や受精卵の卵管下降<sup>4)</sup>時に必要とされている。しかし、卵細胞質は正常であっても透明帯の存在によって正常な受精が妨げられるケースもある<sup>7, 11)</sup>。透明帯除去卵子の体外受精はToyoda and Changのラットの報告<sup>15)</sup>に始まり、様々な動物種でその可能性が示され、さらに種を越えて透明帯除去ハムスター卵子による精子の受精能力検定<sup>18)</sup>に応用されている。同種内での透明帯除去卵子の体外受精は、得られた受精卵が正常な個体に発育できる可能性を秘めている点<sup>13)</sup>でも非常に魅力的である。しかし透明帯除去卵子について、非常に少ない精子で正常な受精卵を得るための条件に関しては、いまだ十分な検討は行われていない。そこで我々は安定した受精率が得られる透明帯除去マウス卵子の体外受精システムの構築を試みた。

## 材料および方法

動物は全てJcl:ICRマウスを使用した。性周期と無関係に8~24週齢で馬絨毛性性腺刺激ホルモン(eCG:PMS-ゼンヤク; 日本全薬工業)と人絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG:プベローゲン; 三共製薬)各5 i. u.を48時間間隔で腹腔内投与しhCG投与後15~16時間で卵管膨大部から卵丘細胞層に包まれた卵子を採取した。培地は、修正Krebs-Ringer-Bicarbonate液のマウス体外受精用培地TYH<sup>16)</sup>を用いた。卵丘細胞の除去は、最終濃度150 N.F.U/mlのHyaluronidase(Type 1-S; Sigma)を含むTYH内で約10分の処理を行い、新鮮なTYHで3度洗浄した。以下この卵丘細胞除去卵子(Cumulus-free egg)をCFと記す。さらにCFを極く少量のTYHと共に酸性タイロード液(pH 2.0)に移し変え透明帯除去後、TYHで洗浄した。以下、この透明帯除去卵子(Zona-free egg)をZFと記す。酸性タイロード液は、136.99mM-NaCl, 2.68mM-KCl, 1.80mM-CaCl<sub>2</sub>, 0.49mM-MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.36mM-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 11.90mM-NaHCO<sub>3</sub>, 5.55mM-Glucose混合液に予め調製した0.2N-HClを0.1ml/mlの割合で添加し、ポリビニルピロリドン(PVP-360, Sigma)を3mg/mlの割合で添加し使用した。

精子は、成熟雄(2~7ヵ月齢)の精巣上体尾部から精子塊を採取し、受精能獲得のため2時間プレインキュベーションを行った。プレインキュベーション開始後1時間で1ないし2度の精子希釈を行い、最終精子濃度がCFでは9.4~600精子/ $\mu$ l、ZFでは0.5~27.3精子/ $\mu$ lになるように卵子を含む培地に添加した。

成績の判定は、精子添加後5時間に卵子のホールマウント標本作製し、新鮮標本および10%ホルマリン固定後アセトラクモイド染色した標本についてノマルスキー微分干涉顕微鏡および位相差顕微鏡で下記の判定基準で行った。

1. 受精途上卵: CFおよびZF両者で卵細胞質内に侵入精子頭部と尾部もしくは雄性前核への変形過程にあるものを受精途上卵と判定した。さらに2個以上の精子の侵入を受けたものを多精子受精卵と判定した。
2. 精子侵入卵子: CFで受精途上卵および囲卵腔内に精子の侵入を受けている卵子を含めて精子侵入卵と判定した。

3. 結合精子: Z F の新鮮標本作製時に洗浄後においても卵細胞質表面に結合していた精子を結合精子と判定した。

精子侵入率、受精率および侵入精子数と受精精子数のポアソン分布への適合度の検定には、カイ二乗検定により有意差の検定を行った。受精成績の回帰式は、最小自乗法によって求め、C F と Z F の回帰係数の有意性の判定は、F 検定によった。

## 結 果

### 精子濃度の影響

Z F の成績を Table 1、C F の成績を Table 2 に示した。

Z F における受精途上卵の割合は精子濃度が  $1\mu\text{l}$  当たり  $0.5\sim 7.1$  の範囲で上昇し、 $14.3$  精子/ $\mu\text{l}$  以上の濃度区では横這い傾向を示した。受精率は、 $0.5\sim 7.1$  精子/ $\mu\text{l}$  で精子濃度の対数値に対して  $Y=27.6X+40.1$  (決定係数  $0.92$ ) の直線回帰を示した。多精子受精の割合は、 $0.5, 0.9$  および  $1.8$  精子/ $\mu\text{l}$  ではそれぞれ  $1.9$  および  $3\%$  と低率を推移し、 $3.6, 7.1, 14.3$  および  $27.3$  精子/ $\mu\text{l}$  ではそれぞれ  $20, 37, 49$  および  $78\%$  と精子濃度の上昇に伴い多精子受精の割合が上昇した。

C F の精子侵入卵の割合は、 $150$  精子/ $\mu\text{l}$  まで精子濃度の上昇に伴い上昇した。 $300$  および  $600$  精子/ $\mu\text{l}$  では、透明帯に付着した精子が多すぎ卵腔内精子の正確な観察が困難であったため精子侵入卵のデータは、Table 2 から割愛した。精子侵入卵の殆どは受精途上卵で  $9.4\sim 150$  精子/ $\mu\text{l}$  で精子濃度の上昇に伴い受精率の増加が見られた。受精率は、 $9.4\sim 150$  精子/ $\mu\text{l}$  の範囲で精子濃度の対数値に対し  $Y=30.0X-57.7$  (決定係数  $0.96$ ) の直線回帰を示した。 $300$  および  $600$  精子/ $\mu\text{l}$  の受精率は、それぞれ  $95$  および  $87\%$  で  $150$  精子/ $\mu\text{l}$  と比較して有意でない値を維持した。多精子受精は、 $9.4\sim 150$  精子/ $\mu\text{l}$  まで  $0\sim 4\%$  と低い値を示したが、 $300$  および  $600$  精子/ $\mu\text{l}$  では、 $20$  および  $15\%$  と他の精子濃度と比較して有意に高い値であった。Z F における受精精子数の分布および C F における侵入精子数の分布をポアソン分布に当てはめた結果は、Table 1 および 2 に示す通り、低精子濃度区 (Z F  $\leq 0.9$  精子/ $\mu\text{l}$ 、C F  $\leq 18.8$  精子/ $\mu\text{l}$ ) では、観察値と期待値との間に有意なへだたりは見られなかったが、高濃度区ではポアソン分布とは明らかに異なった分布を示し、観察値における単精子受精の割合が高くなる傾向を示した。ただし Z F の  $27.3$  精子/ $\mu\text{l}$  区では、2 精子受精の頻度が最も高い値であった。

### Z F への精子結合時期および精子-卵子共存時間の影響

Z F への精子結合時期の観察結果は、Table 3 に示した。

精子-卵子を共存後  $0.5$  分には、ほぼ全ての卵子が付着した精子によって回転しながら移動するのが観察された。しかし卵子を洗浄後なお細胞質表面に結合している精子を持つ卵子の割合は、 $0.5$  および  $1$  分区では  $33\%$  および  $10\%$  で他の時間区と比較して有意に低い値であった。 $3\sim 60$  分の各時間区では  $87\sim 100\%$  の高い値を示し、各時間区の間には有意差は認められなかった。卵子 1 個当たりの結合精子は、時間の経過に伴い増加傾向を示した。

卵子-精子を種々の時間共存後、洗浄し結合精子だけを持つ卵子を移し変え  $5$  時間後にその受精率を検査した結果は Table 4 に示す通り、卵子-精子の共存時間が  $0.5$  から  $60$  分に延長するに伴い、受精率は  $9$  から  $94\%$  に増加した。卵子-精子共存時間と受精率は、

時間をX、受精率をYとした場合、共存時間0～30分間で $Y=1.31X+19.4$  (決定係数0.96)の直線回帰を示した。侵入精子数の分布は、0.5～30分間の共存区ではポアソン分布から有意なへだたりを示さなかったが、60分区では300分区と同様に未受精卵の頻度が減少し、代りに単精子受精卵の頻度が増加した。

### 受精の場の総精子数の影響

受精の場の精子濃度を10精子/ $\mu\text{l}$ に統一し受精の場の液量を2,20および200 $\mu\text{l}$  (総精子数がそれぞれ20,200および2000)に変えて受精率を調べた結果をTable 5に示した。

受精率は、受精の場の総精子数が20,200および2000でそれぞれ7.1,33.9および78.9%と上昇が認められた。また培地中の卵子の数を5,10および20に変えて受精率との関係を検討した結果、受精率は精子と卵子の比の増加にともなって上昇した。

### 考 察

ZFおよびCFの受精率は、精子濃度に依存して一定濃度内において高まった。さらにFig 1に示した如くZFとCFの受精率の回帰直線の回帰係数間に有意差が認められなかった事から、精子濃度に対して両者とも同様の反応を示す事が明らかにされた。そこで両者の回帰式から50%受精率を得るための精子濃度を算出するとCFは36.2精子/ $\mu\text{l}$ 、ZFでは1.4精子/ $\mu\text{l}$ となり、ZFはCFの約1/25の濃度で同程度の受精率が得られる事が知られた。この著しい精子濃度の差が何を意味しているかは明らかではないが、本実験下ではゴールドンハムスターで報告<sup>1)</sup>されているような低精子濃度下での授精時の精子運動性の低下が見られなかった点から、精子運動性以外の因子が関与していると示唆される。CFでは卵丘細胞除去方法等によって受精率が低下する報告もあるがItagaki and Toyoda<sup>9)</sup>は、TYHのカルシウム濃度を2倍に高める事で良好な受精率が得られると報告している。本実験では、カルシウムに関して検討を加えていないがZFにおいてどのような反応が見られるか興味深い点と考える。

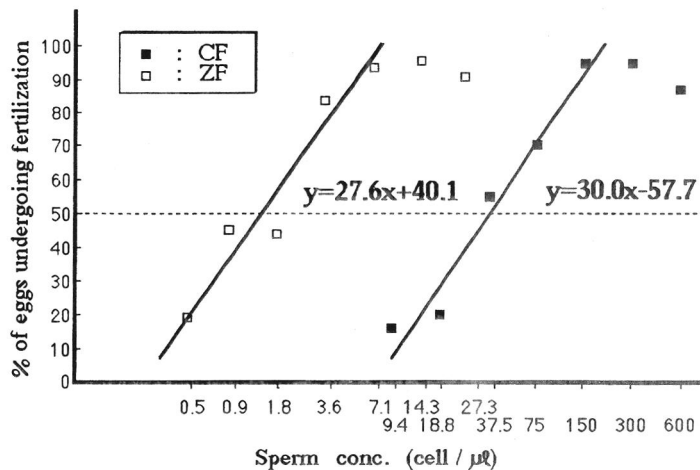


Fig1. Effect of sperm concentration on in vitro fertilization of cumulus-free and zona-free mouse eggs in vitro

C F の卵子 1 個当たりの侵入精子数と Z F の受精精子数の分布をポアソン分布にあてはめた場合、精子濃度によって適合性が異なる事が明らかにされた。この検定法は、Braden and Austin<sup>3)</sup> がマウス体内受精卵において多精子受精拒否機構としての透明帯反応の証明に用いられたものである。すなわち、もし多精子受精拒否機構が働かなかった場合、卵子への精子侵入は無作為に起こるはずである。そこで侵入精子の総数 (S)、精子の侵入を受けた総卵子数 (N)、r 個の精子の侵入を受けた卵子の出現頻度 (P r) とすると、P r は下式に示される二項分布に従う事が期待される。

$$Pr = \frac{S!}{r! \cdot (S-r)!} \cdot \left( \frac{1}{N} \right)^r \cdot \left( 1 - \frac{1}{N} \right)^{S-r}$$

この時、N および S が十分に大きければ、上式はポアソン分布に従う。そこで卵子 1 個に侵入した平均精子数を m、自然対数の底を e とすると

$$Pr = \frac{e^{-m} \cdot m^r}{r!}$$

となる。このポアソン分布の出現頻度に総卵子数 (N) を乗じて算出した期待値は、Table 1 および 2 に示した如く、低精子濃度 (CF < 18.8 精子/μl、ZF < 0.9 精子/μl) では観察値と期待値が非常によく適合し、帰無仮説の「卵子は全て精子の侵入を受ける機会が均一で、最初に侵入した精子は後から侵入する精子に何等影響を及ぼさない」とする仮説を棄却することが出来なかった。すなわち低精子濃度では、受精率が低い点から偶発的な受精と解釈され、高精子濃度では多精拒否が働いたと解釈された。特に Z F の 1.8 ~ 14.3 精子/μl および C F の 37.5 ~ 150 精子/μl では、単精子受精の割合が高く、本実験条件下では多精拒否機構として、C F での透明帯反応および Z F での卵黄遮断の存在を確認出来た。Z F の体外受精では、精子濃度の正確な制御が極めて重要である事が確認出来たが、精子濃度を変える事だけでは多精子受精を完全に抑える事が出来なかった。

Table 1 Effect of sperm concentration on fertilization of zona-free mouse eggs in vitro

Sperm conc. (cells/μl)	No of eggs examined	No. & (%) of eggs undergoing fertilization <sup>1)</sup>	No. & (%) of polyspermic eggs <sup>2)</sup>	Average no. of sperm head(s) <sup>3)</sup>	Frequency	No. of eggs with i sperm head(s) <sup>4)</sup>				
						0	1	2	3	4 &
0.5	80	15 ( 19) <sup>a</sup>	2 ( 1)	0.2	Observed	65	13	2	0	0
					Expected	65	13	1	1	0
0.9	64	29 ( 45) <sup>a</sup>	5 ( 9)	0.5	Observed	35	24	4	1	0
					Expected	37	20	5	1	0
1.8	68	30 ( 44) <sup>a</sup>	2 ( 3)	0.5	Observed*	38	28	2	0	0
					Expected	42	20	5	1	0
3.6	61	51 ( 84) <sup>b</sup>	17 ( 20)	1.3	Observed*	10	34	13	1	3
					Expected	17	22	14	6	2
7.1	52	48 ( 92) <sup>a,b</sup>	19 ( 37)	1.4	Observed*	4	29	16	2	1
					Expected	13	18	12	6	3
14.3	53	51 ( 96) <sup>a</sup>	26 ( 49)	1.6	Observed*	2	25	18	6	2
					Expected	10	17	14	8	4
27.3	81	74 ( 91) <sup>a,b</sup>	63 ( 78)	1.9	Observed*	7	11	41	13	9
					Expected	12	23	22	14	10

a, b, c, d: Values with the different superscripts are significantly different in the same column at P < 0.05.

1) No. of eggs with enlarged sperm head and/or male pronucleus.

2) No. of eggs with more than one enlarged sperm head and/or male pronucleus.

3) i = number of perivitelline sperm + enlarged sperm head + male pronucleus(-lei).

4) Significantly different from expected frequency (Poisson distribution) by chi-square test (P < 0.05).



Table 2 Effect of sperm concentration on fertilization of cumulus-free mouse eggs in vitro

Sperm conc. (cells/ul)	No of eggs examined	No. & (%) of penetrated <sup>1)</sup>	No. & (%) of eggs undergoing fertilization <sup>2)</sup>	No. & (%) of polyspermic eggs <sup>3)</sup>	Average no. of penetrating sperm	Frequency	No. of eggs with i sperm head(s) <sup>4)</sup>				
							0	1	2	3	4≤
9.4	50	10 (20) <sup>a</sup>	8 (16) <sup>a</sup>	0	0.2	Observed	40	10	0	0	0
						Expected	41	8	1	0	0
18.8	40	10 (23) <sup>a</sup>	8 (20) <sup>a</sup>	1 (3)	0.4	Observed	31	4	4	1	0
						Expected	28	10	2	0	0
37.5	74	41 (55) <sup>b</sup>	41 (55) <sup>b</sup>	3 (4)	0.6	Observed*	35	37	2	1	0
						Expected	43	24	7	1	0
75.0	44	32 (73) <sup>b</sup>	31 (70) <sup>b</sup>	1 (2)	1.0	Observed*	12	22	10	0	0
						Expected	17	16	8	2	1
150.0	41	41 (100) <sup>a</sup>	39 (95) <sup>a</sup>	1 (2)	1.4	Observed*	2	30	5	3	1
						Expected	10	14	10	5	2
300.0	55	- <sup>5)</sup>	52 (95) <sup>a</sup>	11 (20)							
600.0	62	- <sup>5)</sup>	54 (87) <sup>a</sup>	9 (15)							

a, b, c: Values with different superscripts are significantly different in the same column at  $P < 0.05$ .

1) No. of eggs with previtellicine sperm only and those undergoing fertilization.

2) No. of eggs with enlarged sperm head and/or male pronucleus.

3) No. of eggs with more than one enlarged sperm head and/or male pronucleus.

4) i = number of perivitelline sperm + enlarged sperm head + male pronucleus(-lei).

5) Because of so many binding sperms, exact number of perivitelline sperms could not be examined.

\*: Significantly different from expected frequency (Poisson distribution) by chi-square test ( $P < 0.05$ ).

多精子受精を抑制するための最も簡単な方法の一つとして、精子と卵子の共存時間を変える事で受精への影響を検討した。精子の透明帯への接着は付着(Attachment)と結合(Binding)の2段階からなるとHartman and Hutchison<sup>8)</sup>は、報告している。ZFにおいて卵子-精子共存開始直後から精子の運動による卵子の回転運動が見られたにもかかわらず、結合精子を持つ卵子の割合は、精子-卵子共存後1分までは低率に推移し、共存後3分で87%の卵子に結合精子の存在が確認された。この点からZFにおいても精子の卵細胞質への侵入は、付着と結合の2段階からなる事が推定された。卵子1個当たりの結合精子数をポアソン分布に当てはめると、授精後0.5~30分で非常によく適合した。

Table 3 Relationship between sperm-egg coincubation time and sperm binding to zona-free mouse eggs in vitro

Coincubation time (min)	No. of eggs examined	No. & (%) of eggs binding sperm	Frequency	No. of eggs bound by i sperm			
				0	1	2~5	6≤
0.5	40	13 (33) <sup>a</sup>	Observed	27	11	2	0
			Expected	27	11	2	0
1	49	5 (10) <sup>a</sup>	Observed	44	5	0	0
			Expected	44	5	0	0
3	55	48 (87) <sup>a</sup>	Observed	4	12	29	7
			Expected	1	5	39	10
5	49	44 (90) <sup>a</sup>	Observed	5	11	25	8
			Expected	2	7	36	4
10	30	30 (100) <sup>a</sup>	Observed	0	2	7	21
			Expected	0	0	15	15
15	42	41 (98) <sup>a</sup>	Observed	1	3	10	28
			Expected	0	0	15	27
30	45	45 (100) <sup>a</sup>	Observed	0	1	13	31
			Expected	0	0	6	39
60	31	31 (100) <sup>a</sup>	Observed	0	0	9	22
			Expected	0	0	2	29

a, b, c: Values with the different superscripts are significantly different in the same column at  $P < 0.05$ .

この点に関して授精後30分までは、結合可能な精子は卵子と遭遇した場合、無作為に結合し、結合した精子は後から結合する精子に何等影響を及ぼさないと考えられる。同様のポアソン分布への適合は、0.5~30分共存区の受精精子数の分布においても認められた(Table 4)。しかし、60および300分区では、ポアソン分布から有意なへだたりがあり

Table 4 Effect of sperm-egg coincubation time on fertilization rate of zona-free mouse eggs in vitro

Coincubation time (min)	No of eggs examined	No. & (%) of eggs undergoing fertilization <sup>1)</sup>	No. & (%) of polyspermic eggs <sup>2)</sup>	Average no. of sperm head and pronucleus <sup>3)</sup>	Frequency	No. of eggs with i sperm head(s) <sup>4)</sup>				
						0	1	2	3	4≤
0.5	46	4 ( 9)	0	0.1	Observed	42	4	0	0	0
					Expected	42	4	0	0	0
1.0	57	8 ( 14)	0	0.1	Observed	49	8	0	0	0
					Expected	50	7	0	0	0
3.0	50	11 ( 22)	0	0.2	Observed	39	11	0	0	0
					Expected	39	10	1	0	0
5.0	55	13 ( 24)	0	0.3	Observed	42	13	0	0	0
					Expected	43	11	1	0	0
10.0	44	21 ( 48)	4 ( 9)	0.6	Observed	23	17	4	0	0
					Expected	25	14	4	1	0
15.0	54	29 ( 54)	4 ( 7)	0.6	Observed	25	25	4	0	0
					Expected	29	19	5	1	0
30.0	42	26 ( 62)	5 ( 12)	0.7	Observed	16	21	5	0	0
					Expected	20	16	5	1	0
60.0	49	46 ( 94)	20 ( 41)	1.3	Observed*	3	26	20	0	0
					Expected	13	17	11	5	2
300.0	100	93 ( 93)	36 ( 36)	1.3	Observed*	7	56	33	2	1
					Expected	27	35	23	9	6

Values with the different superscripts are significantly different in the same column at  $P < 0.05$ .

1), 2), 3), 4) See the footnote of table 1.

※: Significantly different from expected frequency (Poisson distribution) by chi-square test ( $P < 0.05$ ).

卵黄遮断が有効に働いていることが推察された。マウス卵子への精子の融合は、本村と豊田<sup>12)</sup>の走査電子顕微鏡の観察結果では卵子細胞質表面に付着直後から速やかに開始する。さらにFukuda and Chang<sup>6)</sup>の観察では、卵子と精子の融合開始直後から表層顆粒の崩壊が起こると報告されている。これらの点から本実験条件においては、卵黄遮断には30分以上必要であると推察される。

結合精子だけをもつ卵子を新鮮な培地に移し変えた場合、授精後3分以後では、結合精子保有率はすでに87~100%に達しているにもかかわらず、受精率は精子-卵子共存時間の延長に伴って直線的に増加した。これは卵子の培地移し変え操作が精子-卵子の融合過程への物理的な悪影響を及ぼしているのか、または結合精子の中で受精に関与し得る精子が極く少数に限られているのか、もしくは受精成立には受精の場に一定数の精子の存在が必要なのかもしれない。安定した受精率を得るためには精子と卵子の共存時間が30分以上必要であることが本実験下で明らかにされた。

精子濃度を10精子/ $\mu$ lに統一し、培地の液量を変える事で受精の場の総精子数の影響を検討した結果、受精率は精子濃度が一定にもかかわらず総精子数の増加に伴って顕著に増加した。さらに精子濃度と総精子数が一定であっても、卵子と精子の比率によって受精率の変動が見られた。本条件では安定した受精率を得るために受精の場に200精子

もしくは卵子1個当たり40精子が必要である事が明らかとなった。Thadani<sup>14)</sup>は、透明帯除去マウス卵子の近傍にマイクロマニピレーターで数個の精子を授精することで63%の受精率を得ている。同様にIvani and Seidel<sup>10)</sup>は、プレインキュベーション1時間と2時間の精子を透明帯除去マウス卵子の近傍にマイクロマニピレーターで授精したところそれぞれ50および70%の受精率を得ている。マウスの体内受精の観察でBarden and Austin<sup>3)</sup>は、交配後2時間で卵管膨大部に存在する平均精子数は、17匹であると報告している。仮に卵管膨大部の体積を5 $\mu$ lと仮定した場合、精子濃度は3.4精子/ $\mu$ lとなる。この様な低精子濃度で体外受精した場合、本条件下では透明帯除去卵子でのみ受精が成立する。これは、安定した体外受精成績が得られているマウスですら、未だ体内での受精現象を完全には再現しておらず、この原因がCohen and Tyler<sup>5)</sup>の提唱する抗原性の異なる2精子集団の存在を示唆するのか、もしくはハムスター<sup>1)</sup>やモルモット<sup>17)</sup>での報告に見られるように培地の条件が整えば、卵子：精子の比率が1：1でも受精が成立するのか非常に興味深い点と考える。

Table 5 Effect of sperm:egg ratio on fertilization rate of zona-free mouse eggs in vitro

Total sperm	Vol of medium ( $\mu$ l)	Sperm : egg ratio <sup>1)</sup>	No. of eggs in a medium	No. (%) of eggs undergoing fertilization <sup>2)</sup>	No. of eggs with i sperm head(s) <sup>3)</sup>					
					Frequency	0	1	2	3	4 $\leq$
20	2	1	20	6/69 (9) <sup>a</sup>	Observed	63	6	0	0	0
					Expected	63	6	0	0	0
	2	2	10	2/34 (6) <sup>a</sup>	Observed	32	2	0	0	0
					Expected	32	2	0	0	0
	2	4	5	1/23 (4) <sup>a</sup>	Observed	22	1	0	0	0
					Expected	22	1	0	0	0
200	20	10	20	11/53 (21) <sup>a</sup>	Observed	42	11	0	0	0
					Expected	43	9	1	0	0
	20	20	10	12/39 (31) <sup>a</sup>	Observed	27	11	1	0	0
					Expected	28	9	2	0	0
	20	40	5	17/26 (65) <sup>b</sup>	Observed*	9	15	2	0	0
					Expected	13	9	3	1	0
2000	200	100	20	65/87 (75) <sup>a</sup>	Observed*	22	54	9	2	0
					Expected	35	33	14	4	1
	200	200	10	36/41 (88) <sup>a</sup>	Observed*	5	19	14	3	0
					Expected	10	14	11	4	2
	200	400	5	15/19 (79) <sup>a</sup>	Observed*	4	12	3	0	0
					Expected	7	8	3	1	0

a, b: Values with the different superscripts are significantly different in the same column at  $P < 0.05$ .

1) No. of sperm / No. of eggs

2), 3) See the footnote of table 1.

\*: Significantly different from expected frequency (Poisson distribution) by chi-square test ( $P < 0.05$ ).

体内での受精現象と体外受精との差を解明する上でも、今後更に透明帯除去卵子の体外受精系を用いた研究応用が期待される。Naitoら<sup>13)</sup>は、今回我々の行った方法に準じて透明帯除去マウス卵子を体外受精し体外培養後胚盤胞期で移植し正常な産仔を得たことを報告し、透明帯除去卵子であっても、正常に受精成立した卵子においては個体まで発生する能力があることを証明した。既報<sup>7)</sup>において我々は、90%以上の精子頭部奇形を有するマウス系統において、卵丘除去卵子では受精卵が得られない様な条件において

も透明帯除去卵子で正常な受精卵が得られる事を報告している。この様に通常の体外受精で対応の出来ない条件であっても透明帯除去卵子では正常な受精卵が得られる事は、今後ヒトを含め広く応用出来る可能性を示唆すると考える。

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金(04404016)の援助を受けて行われた。

## 文 献

- 1) Bavister, B. D. (1979): Fertilization of hamster eggs in vitro at sperm-egg ratios close to unity. *J. Exp. Zool.*, 210, 259-264.
- 2) Braden, A. W. H., Austin, C. R. and David, H. A. (1954): The reaction of zona pellucida to sperm penetration. *Aust. J. Biol. Sci.*, 7, 391-407.
- 3) Braden, A. W. H. and Austin, C. R. (1954): The number of sperm about the eggs in mammal fertilization. *Aust. J. Biol. Sci.*, 7, 543-551.
- 4) Bronson, R. A. and McLaren, A. (1970): Transfer to the mouse oviduct of eggs with and without the zona-pellucida. *J. Reprod. Fert.*, 22, 129-137.
- 5) Cohen, J. and Tyler, K. R. (1980): Sperm populations in the female genital tract of rabbit. *J. Reprod. Fert.*, 60, 213-218.
- 6) Fukuda, Y. and Chang, M. C. (1978): The time of cortical granule breakdown and sperm penetration in mouse and hamster eggs inseminated in vitro. *J. Biol. Reprod.* 19, 261-266.
- 7) 福田芳詔、山田秀一、平泉真吾、植木久仁子、豊田 裕、(1987): 高頻度に頭部奇形を有するマウス精子の体外受精について. *日本受精着床誌*, 4, 58-61.
- 8) Hartmann, J. F. and Hutchison, C. F. (1974): Contact between hamster spermatozoa and the zona pellucida releases a factor which influences early binding stage. *J. Reprod. Fert.*, 37, 61-66.
- 9) Itagaki, Y. and Toyoda, Y. (1992): Effect of prolonged sperm preincubation and elevated calcium concentration on fertilization of cumulus-free mouse eggs in vitro. *J. Reprod. Dev.*, 38, 219-224.
- 10) Ivani, K. A. and Seidel, G. E. Jr. (1991): At least of capacitated, motile mouse sperm can fertilize zona-free mouse oocytes. *J. Exp. Zool.*, 260, 406-412.
- 11) Meiwei, X., Azuma, S., Naito, K., Kunieda, T., Moriwaki, K. and Toyoda, Y. (1992): Effect of partial detection of Y chromosome on in vitro fertilizing ability of mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 47, 549-553.
- 12) Motomura, M. and Toyoda, Y. (1980): Scanning electron microscopic observations on the sperm penetration through the zona pellucida of mouse oocytes fertilized in vitro. *Jap. J. Zootech. Sci.*, 51, 595-601.

- 13) Naito, K., Toyoda, Y. and Yanagimachi, R. (1992): Production of normal mice from oocytes fertilized and developed without zona pellucida. Hum. Reprod. 7, 281-285.
- 14) Thadani, V. M. (1982): Mice produced from eggs fertilized in vitro at very low sperm-egg ratio. J. Exp. Zool., 219, 277-283.
- 15) Toyoda, Y. and Chang, M. C. (1968): Sperm penetration of rat eggs in vitro after dissolution of zona pellucida by chymotrypsin. Nature, 220, 589-591.
- 16) 豊田 裕、横山峯介、星冬四郎 (1971): マウス卵子の体外受精に関する研究 I 精巢上体精子による受精成績、家畜繁殖研誌、16, 147-151.
- 17) Yanagimachi, R. and Usui, N. (1974): Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. J. Exp. Cell Res., 89, 161-174.
- 18) Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. and Rogers, B. J. (1976): The use of zona-free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Biol. Reprod., 15, 471-478.

## Production of chimeric mice by coculture of embryonic stem cells and zona-free embryos

Tomohiro SUGINO, Sadahiro AZUMA, Eimei SATO and Yutaka TOYODA

Department of Reproductive and Developmental Biology, The Institute  
of Medical Science, The University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo 108

**Abstract:** Production of chimeras between embryonic stem (ES) cells and zone-free embryos was examined in mice under coculture conditions. A3-1 ES cells were cocultured at concentrations of  $0.5 \times 10^6$  or  $1.0 \times 10^6$  cells/ml with zona-free embryos of 8-cell or morula stage in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 5% fetal calf serum (FCS) and 23mM lactate (DMEM) or Whitten's medium containing 10% FCS (WM). Three hours later the cocultured embryos were transferred into WM and cultured again for 22-24 hr. The embryos developed to blastocyst stage were transferred into foster mother, and 17 days later the pups including chimeras were obtained. When morula stage embryos were cocultured with ES cells at a concentration of  $0.5 \times 10^6$  cells/ml in DMEM, the highest rate of production of chimeric mice (5.4%) was obtained. These our results indicate that the coculture method is useful for the production of chimeras between A3-1 ES cells and zona-free morula embryos. **Key words:** embryonic stem cells, coculture, chimera, mouse  
(Received 25 September 1993, Accepted 30 September 1993)

### Introduction

Embryonic stem (ES) cells isolated from the inner cell mass (ICM) cells of embryos and maintaining their undifferentiated pluripotency in vitro have been used for the production of chimeric mice (1,2). They are capable of producing chimeras efficiently and contributing to the development of various tissues including the germ-line of the chimera (3,4,5,6). To produce chimeric mice, the injection of several ES cells into host embryos (8-cell or blastocyst stage) has been done (7,8). However, the injection method requires an expensive micromanipulating instrument and a skillful manipulating technique. Recently the simple and efficient method of coculture of zona-free embryos with ES cells was reported for the production of chimeras (9). In these experiments, D3 and CCE ES cell lines were used, and germ-line chimeras were obtained efficiently. The main advantage of the method is that a great number of embryos could be treated at the same time. We therefore examined whether the coculture method was useful in producing chimeric mice between A3-1 ES cells derived from 129/SvJ(10) and zona-free embryos, and determined effective conditions for the production chimeras by coculture.



## Materials and Methods

### Collection of embryos

C57BL/6N (Jcl) females were superovulated with 7.5 I. U. of pregnant mare serum gonadotropin (Sankyo zoki) followed 44–48hr later by 7.5 I. U. of human chorionic gonadotropin (Sankyo zoki) and were paired with (C57BL/6NxDBA/2N) F1 (Jcl) males. 2-cell stage embryos were collected by flushing the oviducts on the 1.5 embryonic day (E1.5; plug=E0.5) with phosphate buffer saline (PBS) supplemented with bovine serum albumin at a concentration of 3 mg/ml, and cultured until the embryos developed to the 8-cell or morula stage in Whitten's medium (11).

### Preparation of ES cells

A3-1 ES cells were routinely cultured on inactivated feeder layers (mouse fetal fibroblast; E=14.5–16.5) (12). ES cells and embryonic feeders were trypsinized to obtain a single-cell suspension. Trypsin was then inactivated in stem cell medium, and the cell suspension was planted onto a normal tissue culture dish (Corning) and placed in the incubator (37°C under 5% CO<sub>2</sub> in air) for 1 hr. ES cells were collected from the supernatant and resuspended at a concentration of  $0.5 \times 10^6$  or  $1.0 \times 10^6$  cells/ml in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco) containing 5% fetal calf serum (FCS) and 23mM lactate (DMEM) or Whitten's medium containing 10% FCS (WM). Microdrops (15  $\mu$ l) of the ES cell suspension in a bacteriological dish (Iwaki) were overlaid with mineral oil (Squibb) for coculture with zona-free embryos.

### Coculture of embryos and ES cells

The zona pellucida of 8-cell or morula stage embryos was removed by treatment with acidified Tyrode's solution (pH 2.5) (13). Five zona-free embryos per drop were cocultured with ES cells at a concentration of  $0.5 \times 10^6$  or  $1.0 \times 10^6$  cells/ml in the incubator. After 3hr of incubation, the embryos were transferred into WM and cultured again to the blastocyst stage in the same medium.

### Embryo transfer and judging of chimeras

Embryos developed to the blastocyst stage were transferred to the uteri of pseudopregnant ICR (Jcl) recipient mice on 2.5 days post coitus (dpc). The pups were born from the recipients on 19.5dpc. Chimeras were judged by coat color and eye pigmentation.

## Results

Morphological profiles of the zona-free embryos during the coculture with A3-1 ES cells are shown Fig. 1. ES cells initially attached to the surface of 8-cell and morula stage embryos during

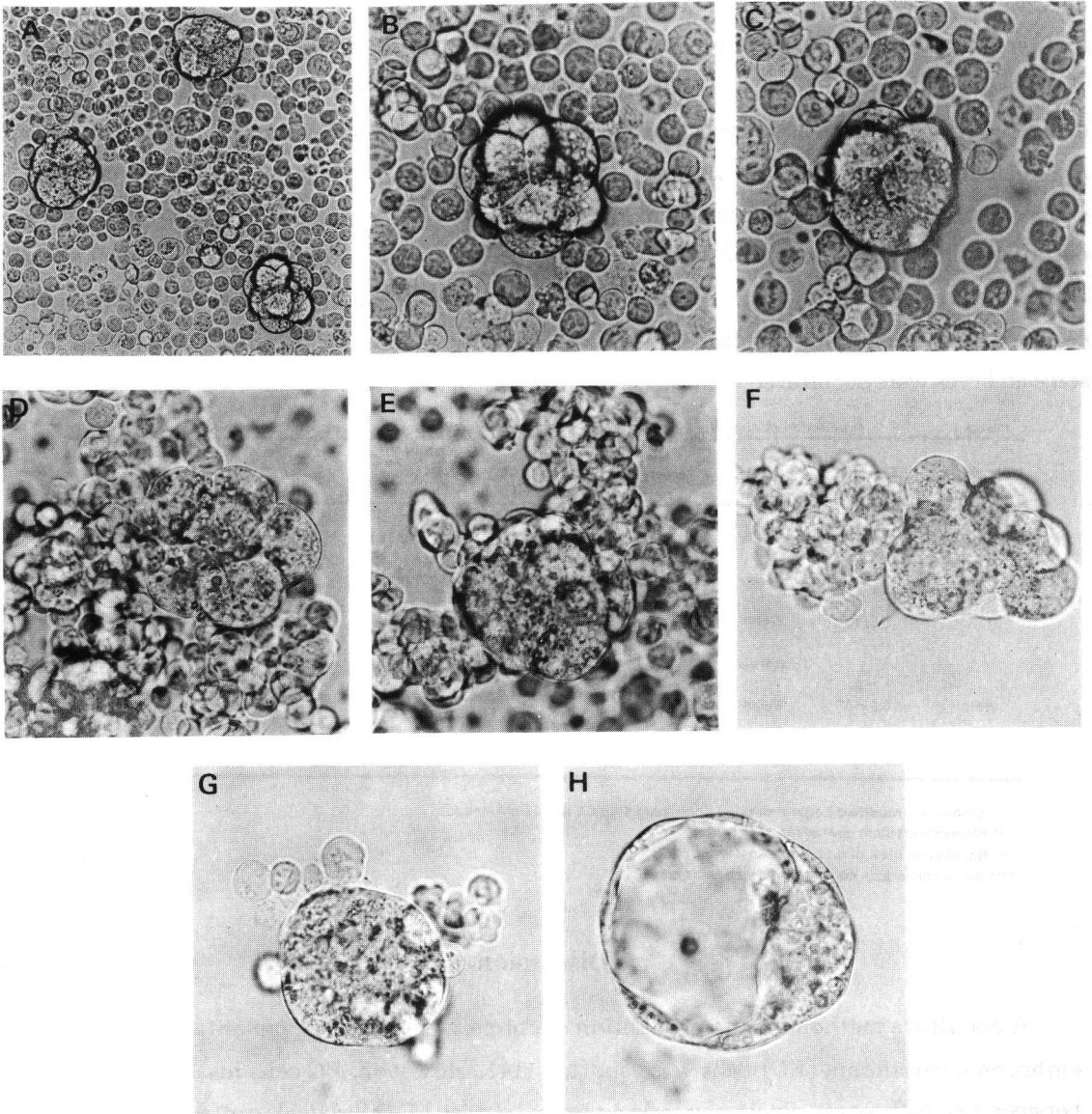


Fig 1. Zona-free mouse embryos during coculture with A3-1 ES cells. A-E: zona-free embryos just after incubation (A-C) and after 3hr of incubation (D-E) in DMEM. 8-cell (A,B,D) and morula (A,C,E) stage embryos are observed among A3-1 ES cells. F-G: cocultured embryos after transfer into WM. Note the ES cells attached to the surface of the zona-free embryos of 8-cell (F) and morula (G) stage. H: zona-free embryo developed to blastocyst stage after coculture with ES cells. A,  $\times 170$ ; B-H,  $\times 340$

the coculture, and after 22–24 hr of incubation, they had colonized the inner cell mass of the embryos developed to the blastocyst stage. When zona-free embryos at the 8-cell stage were cocultured in DMEM at concentrations of  $0.5 \times 10^6$  and  $1.0 \times 10^6$ /ml ES cells, 73.6 and 85.0% of the embryos remained intact after 3 hr of incubation and 66.0 and 55.0% of the embryos developed to the blastocyst stage (Table 1). When morula stage embryos were cocultured, the percent of embryos developed to the blastocyst stage was greater than that of the 8-cell stage embryos. Moreover, chimeric mice were produced when morula stage embryos were cocultured with ES cells at concentrations of  $0.5 \times 10^6$  and  $1.0 \times 10^6$ /ml. When embryos were cocultured in WH with ES cells at a concentration of  $0.5 \times 10^6$ /ml, 63.2 and 100.0% of 8-cell and morula stage embryos remained intact after 3 hr of incubation, and 63.2 and 89.5% of these embryos developed to the blastocyst stage. In contrast with the embryos cocultured in DMEM, chimeric mouse was obtained in WM when 8-cell stage embryos were cocultured with ES cells (Table 1).

Table 1 Production of chimeric mice between ES cells and zona-free embryos by coculture method

coculture Medium	ES cells (cells/ml)	Stage of embryos	No. embryos examined	No. embryos recovered (%)	No. embryos developed to blastocyst (%)	No. pups (%) ***	No. chimeras (%) ****
DMEM *	$0.5 \times 10^6$	8-cell	53	39 (73.6)	35 (86.0)	5 (14.3)	0 (0.0)
		morula	116	107 (92.2)	93 (80.2)	16 (17.2)	5 (5.4)
	$1.0 \times 10^6$	8-cell	20	17 (85.0)	11 (55.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
		morula	79	79 (100.0)	68 (86.1)	5 (7.4)	1 (1.5)
WM **	$0.5 \times 10^6$	8-cell	49	31 (63.2)	31 (63.2)	3 (9.7)	1 (3.2)
		morula	19	19 (100.0)	17 (89.5)	2 (11.8)	0 (0.0)

\* Dulbecco's modified Eagle's medium containing 5% FCS and 23mM lactate

\*\* Whitten's medium containing 10% FCS

\*\*\* No. of pups / No. of embryos transferred x 100

\*\*\*\* No. of chimeras / No. of embryos transferred x100

## Discussion

A coculture method for the production of chimera between preimplantation embryos and embryonal carcinoma (EC) cells was reported (14). However, EC cells had to be sandwiched between two embryos to obtain chimeric embryos because EC cells failed to attach to embryos. On the other hand, as shown in Fig. 1, ES cells were able to attach to zona-free embryos. A3-1 ES cells initially attached to the outside of embryos during coculture and they had colonized the ICM after 22–24 hr of incubation. When the embryos were transferred into foster mothers, chimeric mice derived from A3-1 ES cells were obtained (Table 1). The level of chimerism of newborns was comparable to that of newborns obtained by injection methods (10). In our experiments so far, the rate of production of chimeras has been lower than that obtained by the injection method (10). However, the coculture method could be improved by selecting suitable conditions for coculture.

With regard to the A3-1 ES cell line, a cell concentration of  $0.5 \times 10^6$  cells/ml is recommended for coculture with zona-free embryos. When cocultured with cells at a concentration of  $1.0 \times 10^6$  cells/ml, development of the embryos to pups was disturbed. Morula stage embryos are also recommended for coculture. When embryos at the 8-cell stage were cocultured, some embryos disappeared during coculture because blastomeres of the embryos become individual. Moreover, morula stage embryos had a moderate number of ES cells attached to their surface. 8-cell embryos tended to incorporate too many ES cells, and this may disturb the development of embryos.

### Acknowledgments

This study was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture and Science, Japan (03556037) and by a grant from the Association of Livestock Technology, Japan (Bioscience Research for Livestock Technology 91-2).

### References

- 1) Evans, M. F. and Kaufman, M. H. (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154-156.
- 2) Martin, G. R. (1981): Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 7634-7638.
- 3) Bradley, A., Martun, E., Kaufman, M. H., Robertson, E. J. (1984): Formation of germ-line chimeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 309, 255-256.
- 4) Gosser, A., Doetschman, T., Korn, R., Serfing, E. and Kamler, R. (1986): Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 9065-9069.
- 5) DeChiara, T. M., Efstratiadis, A., Robertson, E. J. (1990): A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature*, 345, 78-80.
- 6) McMahon, A. P., Bradley, A., (1990): The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell*, 62, 1073-1085.
- 7) Bradley, A. (1987): Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach (Robertson, E. J. ed.) IRL, Oxford, U. K., pp 133-151.
- 8) Tokunaga, T. and Tsunoda, Y. (1992): Efficacious production of viable germ-line chimeras between embryonic stem (ES) cells and 8-cell stage embryos. *Develop. Growth & Differ.*, 34, 561-566.
- 9) Wood, S. A., Pascoe, W. S., Schmidt, C., Kemler, R., Evance, M. J., and Allen, N. D.

- (1993): Simple and efficient production of embryonic stem cell-embryo chimeras by coculture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 4582-4585.
- 10) Azuma, S. and Toyoda, Y. (1991): Production of a germ-line chimeric mouse derived from newly established embryonic stem cells. Jpn. J. Anim. Reprod., 37, 37-43.
- 11) Whitten, W. K. (1971): Nutritional requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro. Adv. Biosci., 6, 129-139.
- 12) Robertson, E. J. (1987): Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach (Robertson, E. J. ed.) IRL, Oxford, U. K., pp71-112.
- 13) Hogan, B., Constantini, F. and Lacy, E. (1986): Manipulating the mouse embryo. Cold Spring Harbor Lab., Plainview, NY, pp276.
- 14) Stewart, C. L. (1982): Formation of viable chimeras by aggregation between teratocarcinomas and preimplantation mouse embryos. J. Embryol. Exp. Morph., 67, 167-179.

#### 共培養法によるES細胞キメラマウスの作出

杉野 友啓・東 貞宏・佐藤英明・豊田 裕

東京大学医科学研究所 獣医学研究部, 東京都 108

マウスA3-1 胚性幹細胞 (A3-1 ES細胞) と透明帯除去胚の共培養によってキメラマウスの作出が可能であるかどうかをいくつかの条件下で検討した。5%牛胎児血清 (FCS) と23mM乳酸ナトリウムを含むDulbecco 改変Eagle 培地 (DMEM) と10%FCSを含むWhitten培地 (WM) において2種類の濃度 ( $0.5 \times 10^6$ ,  $1.0 \times 10^6$  cells/ml) のA3-1ES細胞を8細胞期または桑実期の透明帯除去胚と共培養し、3時間後細胞が接着した胚をWMで胚盤膜まで発生させた。それらの胚を偽妊娠雌マウスに移植し分娩予定日にキメラ個体を含む産仔を得たが、 $0.5 \times 10^6$  cells/mlの濃度のES細胞と桑実胚を共培養した場合、最も高いキメラ産出率 (5.4%) を得た。従って共培養によるキメラ作出法がA3-1 ES細胞にも有効であること及び共培養中に用いる胚のステージはキメラマウス作出の効率に影響することが示された。

# 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 $\frac{5}{10}$ 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8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。

## 哺乳動物卵子学会役員

期間：平成5年4月1日～平成7年3月31日

会 長：鈴木 秋悦（慶大・医）

副会長：菅原 七郎（東北大・農）

### 理 事：

石島芳郎（東農大）	井上正人（東海大）	遠藤 克（日大）
小栗紀彦（帯畜大）	金川弘司（北大）	久保春海（東邦大）
香山浩二（兵庫医大）	佐藤和雄（日大）	佐藤嘉兵（日大）
菅原七郎（東北大）	鈴木秋悦（慶応大）	武谷雄二（東大）
角田幸雄（近畿大）	豊田 裕（東大）	永田行博（鹿児島大）
新村末雄（新潟大）	丹羽皓二（岡山大）	野田洋一（滋賀医大）
花田 章（農水省）	平尾幸久（和歌山県立医大）	広井正彦（山形大）
福田芳詔（北里大）	星 和彦（福島医大）	安田泰久（岩手大）
柳町隆造（ハワイ大）		

監事： 入谷 明                      堤 義雄

幹事： 金山喜一（日大・農獣医）      大会幹事： 栃木明人（日大・医）

### 編集委員会：

委員長	石島芳郎	副委員長	佐藤英明
委員	伊藤雅夫、井上正人、遠藤 克、北井啓勝		
	久保春海、香山浩二、堤 治、新村末雄		
	星 和彦、横山峯介		

## 哺乳動物卵子学会評議員会委員

期間：平成5年4月1日～平成7年3月31日

安部裕司（東邦大・医）	伊藤雅夫（日大・医）	上口勇二郎（旭川医大）
臼井 彰（東邦大・医）	内海恭三（京大・農）	岡田詔子（東邦大・医）
長田尚夫（日大・医）	葛西孫三郎（高知大・農）	加藤 修（永遠幸マタニティー）
金山喜一（日大・農獣医）	北井啓勝（慶応大・医）	河野友宏（東農大・総研）
小林善宗（東海大・医）	後藤和文（鹿児島大・農）	斎藤英和（山形大・医）
佐藤文彦（山形大・医）	佐藤晶子（苫小牧駒沢短大）	佐藤英明（東大・医科研）
塩谷康生（農水省・畜試）	繁田 実（兵庫医大）	下平乙夫（農水省・福島種牧）
鈴木達行（山口大・大学院）	鈴木宏志（中外製薬）	関 守利（群大・医）
高橋寿太郎（岩手大・農）	高塚亮二（永遠幸マタニティー）	田中 温（セントマザー医院）
辻井弘忠（信州大・農）	堤 治（東大・医）	栃木明人（日大・医）
戸津川清（山形大・農）	中瀧直巳（日生研）	野田善郎（愛媛大・理）
橋詰良一（東農大・生物生産）	福井 豊（帯畜大）	堀内俊孝（広島県立大）
星合 晃（近畿大・医）	三宅正史（神戸大・農）	柳田 薫（福島県立医大）
横山峯介（三菱化成生命研）	吉松宜弘（福島県立医大）	吉沢 緑（宇都宮大・農）

## 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英文または和文の原著 (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3部投稿する。掲載が決定したものについては、A4版の用紙に所定の書式(1頁36行、1行42字)に従って印刷したものと本会指定の機種を用いて入力した文書フロッピー(3.5ないし5.0インチ)を送付する。

  - (1) 英文、和文、の両論文とも、英文、和文両方の表題、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、説明は英文とし本分中に挿入する。
  - (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 $17\beta$ -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) Yanagimachi, 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、館 鄰、御子柴克彦編), p 2-10, ソフトサイエンス社, 東京.
4. 著者校正は初校正のみとし、印刷ミスについてのみ行う。
5. 原著論文は、刷り上がり8頁以内、短報は同じく3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。
6. 別刷を希望する時は50部単位で有償で受け付ける。
7. 原稿の送付および投稿に関する照会は、下記宛とする。

〒108 東京都港区白金台4-6-1

東京大学医科学研究所獣医学研究所  
哺乳動物卵子学会編集委員会

## 「学術分野における国際貢献についての 基本的提言」を採択

平成5年5月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議は、去る4月21日から23日まで第116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同総会で採択された「学術分野における国際貢献についての基本的提言」等についてお知らせいたします。

### 日本学術会議第116回総会報告

日本学術会議第116回総会（第15期・第5回）が、4月21日～23日の3日間にわたって開催された。

総会の初日の午前には、会長からの前回総会以降の経過報告に続いて、各部、各委員会等の報告が行われた。次いで、今回総会に提案されている2案件について、それぞれ提案説明がなされた後、質疑応答が行われた。

午後からも提案案件に対する質疑応答が行われた後、引き続き各部会が開催され、午前中に提案説明された総会提案案件の審議が行われた。

総会2日目の午前には、前日提案された2案件及び緊急に提案された1案件の審議・採決が順次行われた。

まず、「国際対応委員会の改組について(申合せ)」が採択された。これは、学術の国際化の急速な進展に伴い、国際学術団体及び国際学術協力事業への対応の重要性がますます増大してきており、日本学術会議としてもその職務を遂行する上で、学術の国際化に関する状況の迅速かつ的確な把握が不可欠であるという観点から、より広範囲にわたる国際学術情報の収集と、それに基づく適切な対応ができるよう、国際対応組織の充実強化を図るために、必要な措置を講じたものである。

次いで、「学術分野における国際貢献についての基本的提言」が採択された。本件については、日本学術会議第15期活動計画の中の重点目標として掲げられており、また、一昨年秋の第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、日本学術会議における重要案件として鋭意審議してきたものである。

提言は、1. 学術分野における国際貢献の意義、2. 学術分野における国際貢献の在り方、3. 学術分野における国際貢献を進めるための提案という構成内容になっており、日本学術会議は、今後とも、本提言に基づき、具体的な諸課題について検討していくこととしている。

最後に、上記の提言に基づき、日本学術会議は、国際貢献のための新しいシステムを構築するための具体的方策を直ちに検討し、その速やかな推進を図るという内容の「学術分野における国際貢献についての基本的提言に関する附帯決議」が採択された。

また、「学術分野における国際貢献についての基本的提言」に関する会長談話を22日付けで発表した。

午後からは、現在、常置委員会、特別委員会で審議されている懸案事項について、自由討議が行われた。

総会3日目は、午前には各特別委員会、午後は各常置委員会・国際対応委員会がそれぞれ開催された。

なお、近藤会長が、4月22日に河野内閣官房長官と、また、同27日に宮澤内閣総理大臣とそれぞれ会見し、「学術分野における国際貢献についての基本的提言」を手渡すとともに、同提言について報告した。

### 学術分野における国際貢献についての 基本的提言（抜粋）

（前文略）

#### 1. 学術分野における国際貢献の意義

（本文略）

#### 2. 学術分野における国際貢献の在り方

（本文略。項目のみ）

- (1) 対等・互惠の原則に基づいた国際学術協力の強化
- (2) 国際学術協力の積極的発議等
- (3) 人材育成への協力による国際貢献の推進
- (4) 我が国の学術情報の提供・紹介の促進
- (5) 学術に関する国際団体への対応強化

#### 3. 学術分野における国際貢献を進めるための提案

前節で述べた我が国の学術分野における国際貢献の在り方を踏まえ、これを推進していくために、以下の事項を提案する。

##### (1) 我が国からの情報提供機能等の充実・強化

###### ① 学会の支援・育成

我が国の学会は、高等教育研究機関や産業界の研究成果の発表の場として重要な役割を果たしてきた。また、研究者相互の活発な国際交流等を通じて、情報の提供に努めているところである。しかしながら、ほとんどの学会は、資金の不足から、必要な活動も十分にできない状況にある。

学術分野における国際貢献という観点において、非政府機関（NGO）としての学会の果たす役割は極めて大きく、それらが有する情報提供機能を最大限に発揮できるよう、学会の支援・育成を図る必要がある。

###### ② アジア地域における学術研究に関する連携の強化

我が国と地理的・歴史的・文化的な関係の深いアジア地域の学術の発展に資するため、アジア地域の科学者や学術研究機関の間の学術研究ネットワークを拡充・強化することが必要である。また、将来的には、アジアの学術振興のための国際的な組織の在り方について、関係各国の科学者と協議していく必

要がある。

## (2) 国際学術交流のための支援の充実

### ① 学術研究機関の整備等

新しい知識の創造と発展は、優れた研究者が集い、切磋琢磨するところから生まれるものであり、研究者の未知への挑戦に対して最も適切な施設・資金・支援システムなどの研究環境を提供することが必要である。したがって、全世界の研究者が日本で研究することに魅力を感じ、充実した研究生活を送れるように、学術研究機関の整備及び適切な運営を図るべきである。

### ② 来日研究者・留学生への支援の充実

学術分野における国際貢献の第一歩として、各国の人材育成への協力、とりわけ来日研究者・留学生の支援に十分な配慮がなされなければならない。したがって、内外における日本語教育の充実や、来日研究者・留学生の住居、日本人研究者・学生や地域の人々との交流を可能とする交流施設など生活・文化施設の整備・充実は早急に図るべきである。

### ③ 海外派遣研究者への支援の拡充

国際学術交流は、相手国の国情に応じた総合的配慮の下に行われる必要がある。したがって、その国の研究者との恒常的な連携・協力を維持するとともに我が国からの海外派遣研究者が必要とする各種情報の提供や連絡・調整などでもできる人材の当該国への配置など、海外派遣研究者の支援体制の拡充を検討する必要がある。

## (3) 学術分野における国際貢献のための新しいシステムの構築

国際的な学術協力については、我が国においても、既に多くの機関がその努力を重ねているところである。しかしながら、投入されている資金等そのための支援は、質・量ともに、未だ国際的な要求に応える水準にまで達しているとは言えない。しかも、現在個別に推進されている学術協力の相互の連絡・調整は、必ずしも十分ではなく、我が国の総力を挙げてこれを推進しているとは言えない状態にある。

また、今後ますます増えていくと思われる各種の国際的な学術協力プロジェクトの立案や協力、参加、推進については、これまで以上に、科学者の総意を反映しつつ、総合的かつ適切な判断を機動的になし得る場を確保しなければならない。

さらに、我が国が国際的な学術協力のための諸施策を強力に推進するためには、科学者の力のみならず、政府・産業界の協力、更には国民の理解等総合的な支援が必要である。

これらの問題点を改善し、学術分野において国際社会の期待に応える貢献をなし得るように、国民の理解の下に、諸課題の整理、必要な資金の確保・配分等を行う新しいシステム（例えば「学術協力機構」）を構築するなど、今後真剣に検討を進める必要がある。

## 終わりに

日本学術会議は、人類共通の資産としての学術の発展こそが人類の繁栄と世界の平和の礎となるとの見地から、本提言を取りまとめたものである。

なお、日本学術会議は、今後とも、本提言に基づき、内外の科学者を始め、広く関係各方面の意見を聴きながら、具体的な諸課題について引き続き検討していくことを付言したい。

## 平成5年(1993年)度共同主催国際会議

日本学術会議では、我が国において開催される学術関係国際会議のうち毎年おおむね6件について、学・協会と共同主催している。

本年もまた、6件の国際会議を共同主催することとしており、その概要は、次のとおりである。

### ◆第7回太平洋学術中間会議(6月27日～7月3日)

太平洋地域の住民の繁栄と福祉に直接関わる学術上の問題に関する研究を発展させるため、討論を行い、最新の研究情報を交換することを目的として宜野湾市(沖縄コンベンションセンター、沖縄都ホテル、メルバルク沖縄)において開催される。

参加予定人数500人(国外300人、国内200人)、参加予定国数29か国。

### ◆第6回国際気象学・大気物理学協会科学会議及び第4回国際水文学協会科学会議合同国際会議(7月11日～23日)

気象学、大気物理学及び陸水・水文学に関する研究を発展させるため、討論を行い、最新の研究情報を交換することを目的として横浜市(横浜国際平和会議場)において開催される。

参加予定人数1,500人(国外700人、国内800人)、参加予定国数68か国。

### ◆第15回国際植物科学会議(8月23日～9月3日)

植物科学に関する研究を発展させるため、討論を行い、最新の研究情報を交換することを目的として横浜市(横浜国際平和会議場)において開催される。

参加予定人数4,000人(国外1,500人、国内2,500人)、参加予定国数81か国。

### ◆第24回国際電波科学連合総会(8月23日～9月3日)

電波科学に関する研究を発展させるため、討論を行い、最新の研究情報を交換することを目的として京都市(国立京都国際会館)において開催される。

参加予定人数1,200人(国外800人、国内400人)、参加予定国数49か国。

### ◆アジア社会科学研究協議会連盟第10回総会

(9月5日～11日)

アジア・太平洋地域における社会科学の教育、研究、訓練及び普及を促進するため、討論を行い、最新の研究情報を交換することを目的として川崎市(かながわサイエンスパーク)において開催される。

参加予定人数120人(国外60人、国内60人)、参加予定国数17か国。

### ◆第21回国際純粋・応用物理学連合総会(9月20日～25日)

物理学を発展させるため、討論を行い、最新の研究情報を交換することを目的として奈良市(奈良県新公会堂)において開催される。

参加予定人数300人(国外150人、国内150人)、参加予定国数41か国。

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(代)

## アジア学術会議 11月に開催

平成 5 年 10 月 日本学術会議広報委員会

今回の日本学術会議だよりでは、アジア学術会議、本年 6 月に閣議了解を得ました平成 6 年度日本学術会議共同主催国際会議の概要及び日本学術会議が本年度において実施する地域活性化施策推進事業等についてお知らせします。

## アジア学術会議について

1 日本学術会議は、アジア地域の各国を代表する科学者を東京に招き、本年11月15日(月)から18日(木)までの4日間、アジア学術会議を開催します。

2 アジア地域との学術分野における交流の重要性については、「学術分野における国際貢献についての基本的提言」(平成5年4月、日本学術会議第116回総会採択)においても指摘されたところですが(「日本学術会議だより」(No.29)参照)、地理的、歴史的、文化的に多くの共通点を持つ近隣諸国間の交流は、それぞれの国の学術の発展、ひいてはその地域全体の学術の発展にとって極めて重要なことであります。

このことから、日本学術会議は、アジア地域の各国における学術研究の現状について情報交換を行うとともに、アジア地域における学術研究分野での連携・協力の在り方などについて討議し、併せてアジア地域の学術研究者間の相互理解と信頼を深めることを目的として、本年度からアジア学術会議を開催することとしました。

3 このアジア学術会議は、特定分野に限らない全学問領域にわたるアジア地域の科学者による連携・協力のための初の国際会議であり、その意義は極めて大きく、日本学術会議では、会議の成果をあげるため、既に本年4月、アジア学術会議実行委員会(委員長:渡邊格・日本学術会議副会長、副委員長:川田侃・同副会長)を設置し、関係学協会との御協力の下、開催に向け、鋭意、準備を進めているところです。

会議の概要は以下のとおりです。

(1) 主 催  
日本学術会議

(2) 日 程

11月15日(月)開会式(基調講演、特別講演等)

歓迎レセプション

16日(火)会議(自由討議)

17日(水)視察(筑波研究学園都市)

18日(木)会議(自由討議)、閉会式

(3) 会 場

三田共用会議所

東京都港区三田2-1-8

電話 03-3455-7591

(4) 参加者

インド、インドネシア、シンガポール、タイ、大韓民国、中華人民共和国、日本、フィリピン、マレーシアの各国の学術推進機関(アカデミー等)から推薦された人文・社会科学系及び自然科学系の科学者21名

(日本からは、近藤次郎日本学術会議会長及び川田侃同副会長が出席の予定)

(5) 議 題

「アジア地域における学術の発展とそのための連携・協力について」

## 平成 5 年度地域活性化施策推進事業の実施について

—地域の過去、現在、未来を探る—

東京一極集中を是正し、国土の均衡ある発展を図るため、地域を活性化することの必要性が叫ばれています。この中で、地域において、情報発信能力を高め、産業技術の進歩、暮らしの質的向上を促す総合的な学術研究の力の向上は、「豊かな国民生活」を実現するために不可欠のことであり、また、国際的に開かれた地域を形成するためにも有効なことと考えられます。このため、日本学術会議では、本年度において、国土庁の地域活性化施策推進費を活用して、全国3か所での地域における産学官の協力による公開フォーラムの実施とその報告書作成を柱とする“ふるさと学会”開催事業を実施することとしました。

本事業は、地域を対象とする学術研究の成果を人文、社会、自然科学を網羅して総合的に取りまとめ、その地域の過去の歴史、現在の状態、将来の予想を明らかにし、地域のアイデンティティと将来像を考える一助とするとともに、この過程において、地域の産学官の連携や学術研究者と地域住民の交流をも促進することを狙いとするモデル事業と位置づけています。

## 平成 6 年度に開催する日本学術会議共同主催国際会議

日本学術会議は、昭和28年9月の国際理論物理学会議の開催以来、平成5年度までに135件の国際会議を関係の学術研究団体と共同して開催し、我が国のみならず世界の学術水準の向上に努めてきたところです。

平成6年度においても、次表の6会議を共同主催することとし、本年6月25日、これらの国際会議の開催とこれについて所要の措置を講ずる旨の閣議了解を得ました。

また、本年は、平成8年(1996年)度開催分の国際会議について共同主催の申請を受け付けており、締切りは12月10日です。

詳しくは、下記までお問い合わせください。

【問い合わせ先】

日本学術会議事務局学術部情報国際課国際会議係  
電話03-3403-6291(内)254、255



## 平成 6 年（1994 年）度日本学術会議・国内学術研究団体共同主催国際会議概要

会 議 名	第 8 回国際神経・筋学会	第 24 回国際園芸学会議	第 30 回錯体化学国際会議
母 体 機 関	世界神経連合	国際園芸学会	国際純正・応用化学連合
共 催 団 体	日本神経学会	園芸学会	(社)日本化学会 錯体化学研究会
参加予定人数 参加予定国数	国外 1,100 人 国内 800 人 計 1,900 人〔41 か国・2 地域〕	国外 1,000 人 国内 750 人 計 1,750 人〔88 か国・2 地域〕	国外 300 人 国内 700 人 計 1,000 人〔46 か国・2 地域〕
開 催 時 期	7 月 10 日～15 日（6 日間）	8 月 21 日～27 日（7 日間）	7 月 24 日～29 日（6 日間）
開 催 場 所	京都市（国立京都国際会館）	京都市（国立京都国際会館）	京都市（国立京都国際会館）
開 催 間 隔	4 年ごと	4 年ごと	1 ないし 2 年ごと
組織委員会 委 員 長	国立精神・神経センター 名誉総長 里 吉 栄二郎	東京農業大学農学部 教授 岩 田 正 利	(準備委員会代表者)立命館大学理工学部 教授 大 瀧 仁 志

会 議 名	第 21 回世界心電学会	第 47 回国際情報ドキュメンテーション 連盟総会	第 2 回国際病態生理学会総会
母 体 機 関	世界心電学会	国際情報ドキュメンテーション 連盟	国際病態生理学会
共 催 団 体	日本心電学会 (財)日本心臓財団	(社)情報処理学会 (社)情報科学技術協会 情報知識学会	日本病態生理学会
参加予定人数 参加予定国数	国外 500 人 国内 1,000 人 計 1,500 人〔30 か国〕	国外 400 人 国内 800 人 計 1,200 人〔55 か国・1 地域〕	国外 500 人 国内 800 人 計 1,300 人〔62 か国・2 地域〕
開 催 時 期	7 月 3 日～7 日（5 日間）	10 月 2 日～9 日（8 日間）	11 月 19 日～24 日（6 日間）
開 催 場 所	横浜市（横浜国際平和会議場）	大宮市（大宮ソニックシティ）	京都市（国立京都国際会館）
開 催 間 隔	毎年	2 年ごと	4 年ごと
組織委員会 委 員 長	国立療養所中野病院 病院長 春 見 建 一	国文学研究資料館 各員教授 藤 原 鎮 男	日本臓器製薬株式会社生物活性科学研究所 所 長 大 村 裕

### 日本学術会議主催公開講演会

#### —— 女性科学研究者に期待する ——

日本学術会議は、学術の成果を国民に直接還元するための活動として、日本学術会議会員が講師となって、市民を対象に年 3 回公開講演会を開催しています。

この度、次の公開講演会を開催しますので、お知らせします。多数の方々の御来場をお待ちしています。

- (1) 日 時 平成 5 年 11 月 26 日（金）13：00～16：30
- (2) 会 場 日本学術会議講堂  
（地下鉄千代田線「乃木坂駅」下車徒歩 1 分）
- (3) テーマ 「女性科学研究者に期待する」

#### (4) 演題及び演者

- ・女性科学研究者問題に関する日本学術会議の取組  
須藤 一（第 5 部会員，東北学院大学工学部教授）
- ・女性学ジェンダー論の発展と役割  
加藤春恵子（第 1 部会員，東京女子大学現代文化学部教授）
- ・自然科学分野に見られる女性進出とこれに伴う諸問題  
本 間 愼（第 6 部会員，東京農工大学農学部教授）

- ・女性科学研究者の地位向上と基盤整備（スウェーデンを例として）

一番ヶ瀬康子（第 1 部会員，日本女子大学人間社会学部長）

#### 〔申込方法〕

聴講（入場無料）を希望される方は、はがきに、郵便番号、住所、氏名を明記し、11 月 12 日までに下記までお申し込みください（複数人の連記可，FAX 送付可）。締切り後も、席に余裕があれば、受け付けますので、下記までお問い合わせください。

〒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」

TEL 03-3403-6291(代) 内線 228

FAX 03-3403-6224

「日本学術会議だより」について御意見・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

今回の号から副編集委員長として雑誌の編集に参加するの機会をいただきました。学会の伝統を踏まえ、本誌がさらなる発展を遂げるよう、編集委員の努力を促すとともに、英文論文の掲載比率を高め、論文の質を向上させること、投稿者への配慮、編集の効率化を図ることを目指して、11巻1号から投稿規定の一部を変更いたしましたのでご注意ください。（佐藤英明）

話題の映画「ジュラシックパーク」を見てきた。琥珀の中に閉じ込められた蚊の体内に潜んでいた恐竜の血液からDNAを抽出し、遺伝子の組み換えによって恐竜を再現する話である。最近の分子生物学や生殖科学の発展によって、恐竜の再出現が現実的な話が多くなっている。我々人類は、過去の失敗から学び、未来を創っていく責任がある。恐竜の再出現は、我々の未来を脅かすかもしれない。我々は、恐竜の再出現を望まない。我々は、未来を創っていく責任がある。我々は、未来を創っていく責任がある。（伊藤雅夫）

## 編 集 委 員

委員長：石 島 芳 郎 副委員長：佐 藤 英 明

委 員：伊藤雅夫、井上正人、遠藤 克、北井啓勝

久保春海、香山浩二、堤 治、新村末雄

星 和彦、横山峯介

## 哺乳動物卵子学会誌

Jurnal of Mammalian Ova Research

第10巻 第2号

Vol.10 NO.2

平成5年9月25日 印刷

平成5年10月1日 発行

（会 員 頒 布）

発行者 哺乳動物卵子学会  
代 表 鈴木秋悦

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  
TEL.0466-81-6241（内2125）  
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）

## 賛助会員

株式会社 イワケン  
横浜営業所

セローノ・ジャパン  
株式会社

富士平工業株式会社  
渉外部

プリマハム株式会社  
新規事業推進部

カネボウ薬品(株)  
東京支社

藤沢薬品工業株式会社  
東京支社

第一製薬株式会社  
東京第一支社

エーザイ株式会社

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<sup>®</sup>**

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<sup>®</sup>**

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<sup>®</sup>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300mm<sup>3</sup>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



帝国臓器製薬株式会社  
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ので、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) 卵巣腫瘍及び多量の卵性卵巣症候群を原因とした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) 多量の卵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。

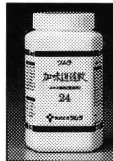
### 5. 相互作用

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。

ツムラは、ツムラ漢方製剤エキス顆粒(医療用)128品目+3品目により、高齢化社会の深まりつつある現実の治療に貢献しつつ、漢方製剤の科学的な実証を通して、21世紀に至る長寿社会の治療手段としての役割をはたしていきたいと願っております。

# 更年期障害、月経不順、月経困難に

体質虚弱な婦人で肩がこり、疲れやすく、精神不安などの精神神経症状、ときに便秘の傾向のある場合



24

カ ミ ショウ ヨウ サン  
**ツムラ加味逍遙散**  
エキス顆粒(医療用)

健保適用

更年期障害に

●血管運動神経障害様症状(のぼせ感、発汗異常、頭痛・頭重、冷感など)  
精神神経障害様症状(抑うつ、易疲労感、めまい、神経質など)  
など多彩な更年期不定愁訴症候群の改善にすぐれた効果が報告されています。<sup>1)2)</sup>

【文献】 1) 星合 昊、他：産婦人科の世界、38、4、395、1986 2) 山田知之、他：産婦人科の世界、35、7、729、1983

## 効能・効果

体質虚弱な婦人で肩がこり、疲れやすく、精神不安などの精神神経症状、ときに便秘の傾向のある次の諸症：冷え症、虚弱体質、月経不順、月経困難、更年期障害、血の道症

## 用法・用量

通常、成人1日7.5gを2～3回に分け、食前又は食間に経口投与する。なお、年齢、体重、症状により適宜増減する。

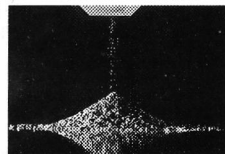
## 使用上の注意

(1) 一般的注意 1) 本剤を服用後、症状の改善が認められない場合は、他の医療用漢方製剤を考慮すること。2) 甘草を含有する漢方製剤を長期間投与する場合は、血清カリウム値や血圧の測定などを十分に行い、異常が認められたときは投与を中止すること。3) 複数の漢方製剤を併用する場合は、含有生薬の重複に注意すること(特に甘草を含有する漢方製剤の併用には、より注意を必要とする。) (2) 次の患者には慎重に投与すること。胃腸虚弱な患者(下痢に伴って腹痛を起こすことがある。) (3) 副作用 電解質代謝：長期連用により低カリウム血症、血圧上昇、ナトリウム・体液の貯留、浮腫、体重の増加等の偽アルドステロン症があらわれることがあるので、観察を十分に行い、異常が認められた場合には投与を中止すること。また、低カリウム血症の結果としてミオパチーがあらわれるおそれがある。(4) 妊婦への投与 妊婦及び妊娠している可能性のある婦人には慎重に投与すること。(以上、「使用上の注意」全文記載)  
\* 組成、取扱上の注意等は添付文書をご覧ください。



更年期障害、月経不順、月経困難に

(23) ツムラ当帰芍薬散 (57) ツムラ温清飲  
(25) ツムラ桂枝茯苓丸 (106) ツムラ温経湯



株式会社ツムラ

## 資料請求

学術資料は、弊社MR(医薬情報担当者)へ  
お問い合わせいただくか、下記住所宛ご請求下さい。

● 本社・医薬事業部：〒102 東京都千代田区二番町12番地7 ☎03(3221)0001(代)



RS-0241N-1



# 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。

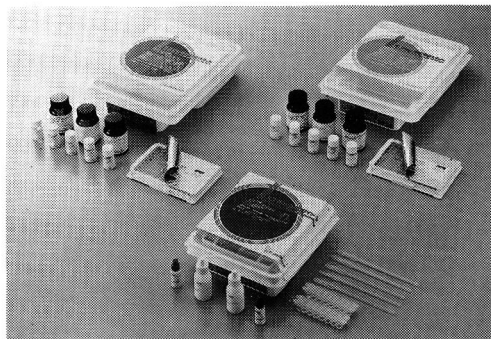
包装96ウェル/キット

## 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。

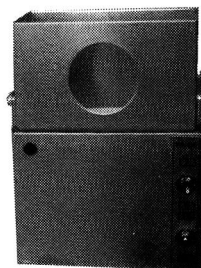


**岡崎産業株式会社**

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、休日の飼育管理の手間の節約。
- 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。



