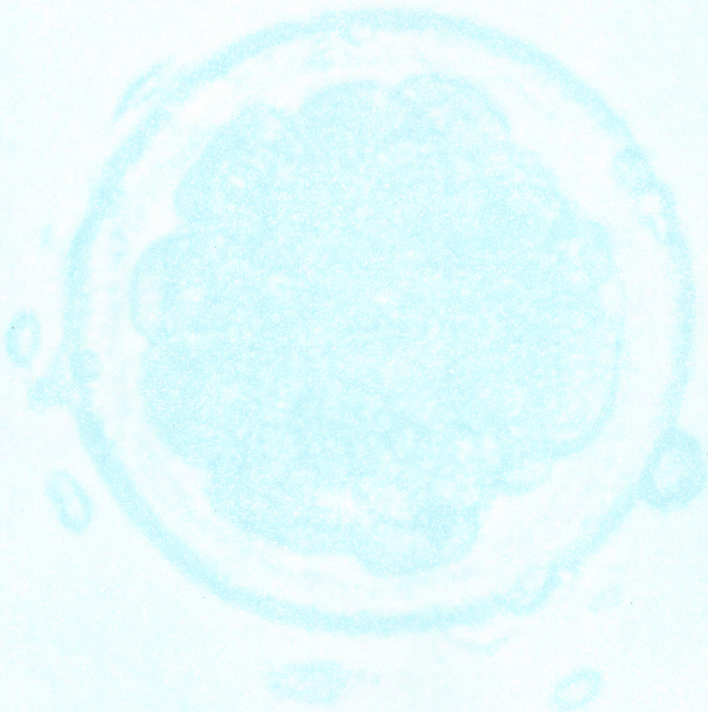


哺乳卵学誌
J. Mamm. Ova Res.

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. 11 No. 1

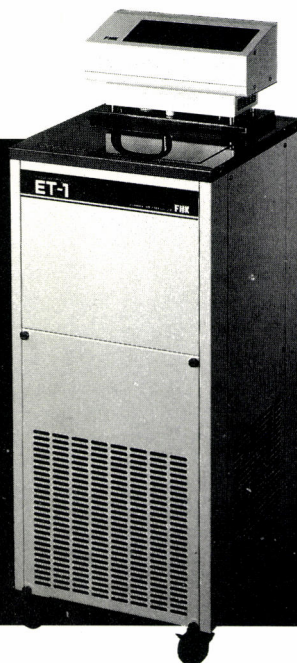
April 1994

プログラムフリーザー ET-1

- 電子プログラムによる受精卵凍結装置
- 操作はキイスイッチで容易に行えます
- 7プログラムを容易に設定・実行できます
- ET-1専用の植氷・凍結用ラック装備
- ポーズ機能・異常検出機能・バックアップ機能・オートスタート／ストップ機能などを装備

仕 様

ストロー収納数	0.25ml 20本(専用ラック)
使用温度範囲	-40℃～50℃
冷 凍 機	600W
電 源	AC100V 20A 50/60Hz
外 寸 法	360×400×1000mm
重 量	約50kg



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
—
!



タケダのすぐれた合成技術が生んだ
LH放出ホルモン製剤

動物用医薬品

コンセラル®注射液

牛の卵胞のう腫、排卵障害、
卵巢静止の治療、排卵促進に

(要指示)

製造発売元
武田薬品工業株式会社

提 携
帝国臓器製薬株式会社

哺乳動物卵子学会誌

第11巻 第1号

平成 6年4月1日

目 次

原著論文 (英文)

- マウス初期胚糖輸送担体 (GLUT1) mRNA発現のRT-PCR法による解析
----- 森田 豊・堤 治・岡 芳知・片桐秀樹・武谷雄二 --- 1
- マウス1-細胞期胚の体外発生におよぼすグルコースの影響
----- 澤井 健・林 正黙・奥田 潔・丹羽皓二 --- 8
- 卵丘除去マウス卵子の体外受精に対するブタ卵胞液の促進効果
高橋祐司・石川和男・F.P.Daen・神尾佳枝・東 貞宏・佐藤英明・豊田 裕 ---17
- ウサギ卵母細胞における表層粒の成熟分裂に伴う変化
----- 新村末雄・細江実佐 ---24
- ラット初期胚のコンパクションに及ぼすウシ血清及びウシ血清アルブミンの影響
----- 仲道麗子・大星茂樹・藤原 昇 ---31
- 体外成熟・受精系由来ウシ胚のヘキソキナーゼ活性と発生能との関係
----- 柳 在雄・菅原七郎 ---36
- 低酸素下での修正合成卵管液によるウシ核移植胚の培養
----- 田中穂積・菱沼 貢・高橋芳幸・金川弘司 ---43

原著論文 (和文)

- 血管収縮剤の局所的投与を伴うマウス胚の卵管移植
--- 鈴木宏志・上田乙也・鎌田宣夫・寺社下浩一・加藤基恵・紫野正雄 ---49

第35回哺乳動物卵子学会講演要旨集

会長講演

卵の成熟と胚発生をめぐる話題

佐藤和雄 54

ワークショップ『卵子研究における新技術』

- 酵素的サイクリング法による卵および初期胚の代謝動態解析
矢野 哲・綾部琢哉・堤 治・武谷雄二 56
- 卵細胞内Ca²⁺の画像解析と共焦点レーザー顕微鏡
白川英樹・白石浩一・宮崎俊一 58
- 培養法による胚培養の工夫 ―共培養について―
根上 晃・前田淳一・小林修一・富永敏郎 60

マウス卵子および胚発生におけるRT-PCR法の応用 栃木明人・吉永陽樹・長岡美樹・橋本芳美・早川 智・ 坂元秀樹・栃木武一・津端捷夫・佐藤和雄	62
顕微授精によるウシ精子核の低温安定性の検討 後藤和文・木之下明弘・中西喜彦	64
哺乳類の受精における分子機構の解明とその応用 森 庸厚・郭 卯戊・馬場 忠・ 森 悦子・古川 清・高崎誠一	66
一般演題	
SZIとICSIの適応症例の比較 高塚亮三・辻 敏徳・豊北美穂・藤波隆一・ 寺元章吉・道倉康仁・加藤 修	68
顕微受精の臨床評価 栗田松一郎・田中 温・永吉 基・塩見秀明・田中威づみ・ 竹本洋一・高崎博幸・井手紀子・有本恭子	70
重症男性不妊症における透明帯除去卵子の受精と胚発育について 栗田松一郎・田中 温・永吉 基・塩見秀明・田中威づみ・ 竹本洋一・高崎博幸・井手紀子・有本恭子	72
高齢雄マウス精子からの体外受精による産子の作出 若山照彦・種村健太郎・須藤淳一・今村憲吉・ 福田勝洋・倉本和直・九郎丸正道・林 良博	74
牛体外受精胚の着床前の発生速度と性 板垣佳明・木村直子・山中昌哉・須藤鎮世	76
マウス体外受精における赤血球添加培養系の効果 藤野祐司・松岡逸子・伊藤文俊・ 荻田幸雄・渡辺信和・井上正康	78
野生マウス卵子の体外受精 中瀉直己・上田 進・山内一也・土屋公幸・ 岡本正則・松田洋一・東 貞宏・豊田 裕	80
豚卵管および子宮が豚体外受精卵子の発生に及ぼす影響 吉川奈美・岩崎泰造・戸津川清	82
受精とくに前核形成過程における蛋白質リン酸化の関与 稲垣 昇・山森尚子・遠藤芳広・大隅一興・ 大庭三紀子・鈴木秋悦・野澤志郎	84
PZD, ZD, Zona thinning 法のマウス胚hatchingへの影響 矢沢浩之・柳田 薫・星 和彦・ 渡辺美佳・吉松宣弘・佐藤 章	86
マウス雄胎子期生殖細胞由来核移植卵の発生能に及ぼす電気刺激 ならびに成長因子の影響 角田幸雄・加藤容子	88

ラット1細胞期胚の発生におよぼすPHAレクチンの効果 山田雅保・内海恭三	90
マウス初期胚発育に対するbasic Fibroblast Growth Factorの効果 吉田壮一・高尾成久・原田 省、寺川直樹	92
有袋類タンマーワラビーの胚のin vitroでの発育に及ぼす 内因性血小板活性化因子の役割 小島敏之・L .A. Hinds ・ C.O' Neill , C.H.Tyndale-Biscoe	94
トリハロースを用いたVitrification とそのマウス胚の発育に及ぼす影響 石田ガブリエラ・野原 理・河内谷敏・ 平山寿雄・斉藤英和・広井正彦	96
マウス前核期卵の発生能に及ぼす培養密度の影響 加藤容子・大野博美・福山香里・角田幸雄	98
ハムスター1細胞期胚の体外発生に及ぼすタウリン及びEDTAの影響 堀内俊孝・建本秀樹	100
透明帯除去受精卵に対する人工透明帯の開発とその有用性 渡辺美佳・矢沢浩之・柳田 薫・星 和彦・佐藤 章	102
マウス4細胞期胚における割球分離・再集合操作がコンパクションに及ぼす影響 小川英彦・森 匡・清水 弘	104
バイオプシーした牛胚の凍結・融解後の生存性 沼辺 孝・高田直和・佐藤秀俊・木船厚恭・亀山賢次	106
マウス成熟卵および初期胚における Prostaglandin E ₂ receptor type 2,type 3 の発現について 高見毅司・坂元秀樹・高見雅司・佐藤和雄	108
マウスおよび豚卵母細胞におけるc-mos 発現の組織化学的検出について 山内伸彦・小林正男・佐々田比呂志・菅原七郎	110
マウス初期胚発育に対するEGFおよびTGF- α の効果と EGF受容体mRNAの発現 原田 省・吉田壮一・高尾成久・寺川直樹	112
マウス未受精卵の各種耐凍剤透過性 横山栄治・吉田直子・枝重圭祐・ 櫻井孝志・町田隆彦・葛西孫三郎	114
血管収縮剤を用いたマウス胚の卵管移植法 鈴木宏志・上田乙也・鎌田宣夫・ 寺社下浩一・加藤基恵・紫野正雄	116
牛卵核胞期卵における染色体凝集への顆粒層細胞の関与 建本秀樹・久保岳志・堀内俊孝	118
embryo scoreを用いて検討したIVF-E T成績 小林善宗・本田育子・鈴木隆弘・井上正人	120
IVF-E T妊娠後(分娩・流産・外妊)の再IVF-E T成績 鈴木隆弘・小林善宗・本田育子・井上正人	122

ヒト卵細胞質内精子注入法の臨床成績

竹中真奈美・高橋克彦・堀内俊孝 124

マウス成熟卵及び初期胚におけるphosphofructokinase・hexokinase
遺伝子発現について

高見雅司・高見毅司・坂元秀樹・佐藤和雄 126

マウス卵子成熟過程におけるc-mos mRNAの発現に関する検討

石田恵理・上谷則子・佐藤嘉兵 128

キメラマウスにおける導入Myogenin-LacZ 遺伝子の発現

金 相勇・高橋寿太郎・堤 賢一・藤沢淳子・安田泰久 130

ウシ体外受精卵の発育におけるInsulin および

Insulin-like growth factor - I の影響

松井基純・高橋芳幸・菱沼 貢・金川弘司 132

抗透明帯モノクローナル抗体(5H4)エピトープの卵胞発育過程における局在について

井上みゆき・長谷川昭子・竹村 正・香山浩二 134

マウス初期胚におけるRAG-1 遺伝子の発現

一初期発生におけるgenetic recombination の可能性一

早川 智・栃木明人・根本則道・千島史尚・白石尚美・

鈴木(唐崎)美喜・江角真理子・桜井 勇・佐藤和雄 136

断片化DNA末端標識法を用いた閉鎖卵胞検出の試み

高野りや・上谷則子・苦名 充・和氣 朗・佐藤嘉兵 138

マウス初期卵子における3H-チミジンの取り込みに及ぼす

β -メルカプトエタノール添加の影響

辻井弘忠・佐藤由希子・高田 直・高木優二 140

3次元立体内部構造顕微鏡を用いた卵管の観察

横田秀夫・樋口俊郎・工藤謙一・佐藤嘉兵 142

卵管采の卵捕獲ならびに卵輸送機能について

一特に排卵時の卵管内圧の亢進ならびに収縮性について一

長田尚夫・角田郁夫・松浦正彦・高木健一郎・吉田孝雄・

佐藤和雄・金山喜一・成相孝一・遠藤 克・佐久間勇次 144

ガラス化法により冷却された幼若ラット卵巢の組織細胞学的観察

杉本実紀・宮本 元 146

培養マウス胚盤胞における収縮運動のタイムラプスビデオによる観察

高橋英太・新村末雄 148

卵核成熟・卵細胞質成熟とMicrofilaments

寺田幸弘・深谷孝夫・矢嶋 聡 150

核除去・体外受精により作出されたマウス雄核発生卵(第1分割期)

の染色体解析

吉沢 緑・阿久沢浩・影山恭子・前田高弘・

河野友宏・中原達夫・村松 晋 152

ウシ体外受精由来胚盤胞の凍結保存にEthylene glycol を耐凍剤とした場合の
Sucrose の影響

福島護之154

ニホンザルの卵胞卵と凍結精子による体外受精

山海 直・清水慶子・長 文昭・吉川泰弘156

マイクロカプセル化した卵胞の凍結保存

利部 聰・萬場光一・牧田登之158

膜標識蛍光色素TMA-DPHを使ったマウス表層粒分泌動態の新しい評価法

田原正浩・萬本明子・増本伸之・田坂慶一・三宅 侃160

ブタの卵丘膨化における卵母細胞と卵丘細胞の役割

F.P.ダエン・佐藤英明・内藤邦彦・豊田 裕162

Contents

Originals (in English with Japanese Abstract)

MORITA, Y., O. TSUTSUMI, Y. OKA, H. KATAGIRI & Y. TAKETANI : Application of Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction to Study the Glucose Transporter Protein Gene (GLUT1) Expression in Preimplantation Mouse Embryos	1
SAWAI, K., J-M LIM, K. OKUDA & K. NIWA : Effect of Glucose in a Semi-Defined Culture Medium on Development of Mouse 1-Cell Embryos	8
TAKAHASHI, Y., K. ISHIKAWA, F.P. DAEN, K. KAMIO, S. AZUMA, E. SATO & Y. TOYODA : Stimulatory Effect of Porcine Follicular Fluid on the Fertilization of Cumulus-Free Mouse Eggs In Vitro	17
NIIMURA, S. & M. HOSOE : Changes in the Distribution and Density of Cortical Granules in Rabbit Oocytes During Meiotic Maturation	24
NAKAMICHI, R., S. OHBOSHI & N. FUJIHARA : Effects of Calf Serum and Bovine Serum Albumin on the Compaction of the Early Rat Embryos	31
RYOO, Z. Y. & S. SUGAWARA : Hexokinase Activity of Bovine Embryos Produced from IVM-IVE System and Their Subsequent Development	36
TANAKA, H., M. HISHINUMA, Y. TAKAHASHI & H. KANAGAWA : In Vitro Culture of Bovine Nuclear Transplant Embryos in Modified Synthetic Oviduct Fluid Medium under Low Concentration of Oxygen	43

Original (in Japanese with English Abstract)

SUZUKI, H., O. UEDA, N. KAMADA, K. JISHAGE, M. KATOH & M. SHINO : Improved embryo transfer into the oviduct by local application of a vasoconstrictor in mice	49
---	----

Proceeding of the 35th Annual Meeting of Japanese Society of Mammalian Ova Research

President's lecture

Topics on the oocyte maturation and early embryogenesis	
SATO, K.	54

Work shop

Analysis of metabolism in oocytes and embryos by enzymatic cycling method	
YANO, T., T. AYABE, O. TSUTSUMI & Y. TAKETANI	56
Intracellular Ca ²⁺ image analysis with conventional and confocal laser scan microscopy in mammalian eggs	
SHIRAKAWA, H., K. SHIRAIKI & S. MIYAZAKI	58

Study of quality of embryo culture using co-culture system NEGANU, A. , S. KOBAYASHI, T. TOMINAGA	60
An apprication of reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in the study of the murine oocyte and embryogenesis TOCHIGI,M. , H.YOSHINAGA, M.NAGAOKA, Y.HASHIMOTO, S.HAYAKAWA, H.SAKAMOTO, B.TOCHIGI, K.TUBATA & K.SATOH	62
Cold stability of bovine spermatoza examined by intracytoplasmic sperm injection GOTO,K. , A.KINOSHITA & Y.NAKANISI	64
Studies on molecular mechanisms in manmmalian fertilization and manipulation for reproduction MORI,T. , MAO WU GUO, T.BABA, E.MORI, K.FURUKAWA & S.TAKASAKI	66
General reports	
Comparison of SZI cases with ICSI cases TAKATSUKA,R. , T.TSUJI, M.TOYOKITA, R.FUJINAMI, S.TERAMOTO, Y.MICHIKURA & O.KATO	68
Clinical evaluation of microfertilization AWATA,S. , A.TANAKA, M.NAGAYOSHI, H.SHIOMI, I.TANAKA, Y.TAKEMOTO, H.TAKASAKI, N.IDE & K.ARIMOTO	70
Evaluation of insemination of zona-free human oocytes for severe male infertility AWATA,S. , A.TANAKA, M.NAGAYOSHI, H.SHIOMI, I.TANAKA, Y.TAKEMOTO, H.TAKASAKI, N.IDE & K.ARIMOTO	72
Production of term offspring from in vitro fertilization by spermatozoa derived from old male mice WAKAYAMA,T. , K.TANAMURA, J.SUTO, K.IMAMURA, K.FUKUTA, K.KURAMOTO, M.KUROHMARU & Y.HAYASHI	74
Developmental rate differences and sex of bovine preimplantation embryos generated <i>in vitro</i> ITAGAKI,Y. , N.KIMURA, M.YAMANAKA & S.SUTOU	76
Inhibitory effect of homologous erythrocytes to reactive oxygen species on mouse embryos development MATSUOKA,I. , Y.FUJINO, F.ITO, S.OGITA, N.WATANABE & M.INOUE	78

In vitro fertilization of oocytes of wild mice	
NAKAGATA, N., S. UEDA, K. YAMANOUCHI, K. TSUCHIYA, M. OKAMOTO, Y. MATSUDA, S. AZUMA & Y. TOYODA	80
Effects of porcine oviduct and uterus on the development of porcine oocytes derived from in vitro fertilization	
YOSHIKAWA, N., T. IWASAKI & K. TOTSUKAWA	82
Involvement of protein phosphorylation during fertilization—especially during pronuclear formation—in mouse egg	
INAGAKI, N., N. YAMAMORI, Y. ENDO, K. OSUMI, M. OBA, S. SUZUKI & S. NOZAWA	84
The effects of assisted hatching of mouse embryos by using PZD, ZD, and Zona thinning	
YAZAWA, H., K. YANAGIDA, K. HOSHI M. WATANABE, N. YOSHIMATSU & A. SATOH	86
Effects of electrical stimuli and growth hormones on the developmental ability of nuclear transferred eggs with male fetal germ cells in the mouse	
TSUNODA, Y. & Y. KATO	88
Effects of PHA lectin on <i>in vitro</i> development of rat 1-cell embryos	
YAMADA, M. & K. UTSUMI	90
Effects of basic fibroblast growth factor on the development of mouse embryos in vitro	
Y. OSHIDA S., N. TAKAO, T. HARADA & N. TERAOKAWA	92
The possible role of endogenous platelet-activating factor on the in vitro development of Tammar wallabies' blastocysts	
KOJIMA, T., L. A. HINDS, C. O' NEILL & C. H. TYNDALE-BISCOE	94
Vitrification with trehalose and its effects on mouse embryos' development	
ISHIDA, G. M., M. NOHARA, S. KAWACHIYA, T. HIRAYAMA, H. SAITO & M. HIROI	96
Effects of the culture density of mouse zygotes on the development in vitro and in vivo	
KATO, Y., H. OHNO, K. FUKUYAMA & Y. TSUNODA	98
Effects of taurine and EDTA on development of hamster 1-cell embryos in vitro	
HORIUCHI, T. & H. TATEMOTO	100
Effect of artificial zona pellucida on the development of zona pellucida-free mouse embryos	
WATANABE, M., H. YAZAWA, K. YANAGIDA, K. HOSHI & A. SATO	102

Effect of disaggregation and re-aggregation at the 4-cell stage on the formation of compacted mouse embryos	
OGAWA, H., T. MORI & H. SHIMIZU	104
Survival of frozen-thawed biopsied bovine embryos	
NUMABE, T., N. TAKADA, H. SATO, A. KIFUNE & K. KAMEYAMA	106
Ontogeny of prostaglandin E ₂ receptor type 2 and type 3 gene activation in mouse embryo	
TAKAMI, T., M. TAKAMI, H. SAKAMOTO & K. SATOU	108
Histochemical analysis for c-mos expression in murine and porcine oocytes	
YAMAUCHI, N., M. KOBAYASHI, H. SASADA & S. SUGA	
WARA	110
Stimulatory effect of EGF and TGF- α on the development of mouse embryos and expression of EGF-receptor mRNA	
HARADA, T., S. YOSHIDA, N. TAKAO & N. TERAOKAWA	112
Permeabilities of mouse oocytes to various cryoprotectants	
YOKOYAMA, E., N. YOSHIDA, K. EDASHIGE, T. SAKURAI,	
T. MACHIDA & M. KASAI	114
Improved embryo transfer into the oviduct by local application of a vasoconstrictor in mice	
SUZUKI, H., O. UEDA, N. KAMADA, K. JISHAGE, M. KATOH	
& M. SHINO	116
Granulosa cells affect the chromatin condensation of bovine oocyte at germinal vesicle stage	
TATEMOTO, H., T. KUBO & T. HORIUCHI	118
Embryo score in relation to incidence of IVF-ET pregnancy	
KOBAYASHI, Y., I. HONDA, T. SUZUKI & M. INOUE	120
Results of IVF-ET in patients with a previous IVF-ET pregnancy	
SUZUKI, T., Y. KOBAYASHI, I. HONDA & M. INOUE	122
Clinical evaluation of intracytoplasmic sperm injection in human oocytes	
TAKENAKA, M., K. TAKAHASHI & T. HORIUCHI	124
Ontogeny of phosphofructokinase and hexokinase gene activation in mouse embryo	
TAKAMI, M., T. TAKAMI, H. SAKAMOTO & K. SATOH	126
Expression of c-mos mRNA during oocyte maturation in the mouse	
ISIDA, E., N. UETANI & K. SATO	128
Expression of Myogenin-LacZ gene in chimera mice	
IM, SANG-YONG, J. TAKAHASHI, K. TSUTSUMI, A. FUJI	
SAWA & Y. YASUDA	130

Effects of insulin and insulin-like growth factor-I on the development of bovine embryos	
MATSUI, M., Y. TAKAHASHI, M. HISHINUMA & H. KANAGAWA	132
Localization of the epitope recognized by anti-zona monoclonal antibody (MAb-5H4) during folliculogenesis	
INOUE, M., A. HASEGAWA, T. TAKEMURA & K. KOYAMA	134
Expression of RAG-1 in murine preimplantation embryos ;possible genetic recombination during early embryogenesis	
HAYAKAWA, S., M. TOCHIGI, N. NEMOTO, F. CHISHIMA, H. SHIRAISHI, M. KARASAKI-SUZUKI, M. ESUMI, I. SAKURAI & K. SATOH	136
Detection of atretic ovarian follicles using DNA nick end labeling method	
TAKANO, R., N. UETANI, M. TOMANA, A. WAKE & K. SATO	138
The effect of β -mercaptoethanol on the incorporation of ^3H -thymidine in the early developing mouse embryos	
TSUJII, H., Y. SATO, N. TAKATA & Y. TAKAGI	140
Observation of oviducts by the 3 dimensional internal structure microscope	
YOKOTA, H., T. HIGUCHI, K. KUDOH & K. SATO	142
Reproductive physiology of the fallopian tube - fimbrial capture of the ovum and tunal transport of the ovum with emphasis on the ampullary construction and elevation of the tubal pressure	
OSADA, H., I. TSUNODA, M. MATUURA, K. TAKAGI, T. YOSHIDA, K. SATOH, K. KANAYAMA, K. NARIAI, T. ENDO & Y. SAKUMA	144
Histocytological examination of neonatal rat ovaries cryopreserved by vitrification	
SUGIMOTO, M. & H. MIYAMOTO	146
Time-lapse videomicrographic observations of the contraction in cultured mouse blastocysts	
TAKAHASHI, E. & S. NIIMURA	148
Localization of Microfilaments during oocyte nuclear and cytoplasmic maturation	
TERADA, Y., T. FUKAYA & A. YAJIMA	150
Chromosomal analyses of androgenetic mouse eggs at the first cleavage division	
YOSIZAWA, M., H. AKUZAWA, K. KAGEYAMA, T. MAEDA, T. KONO, T. NAKAHARA & S. MURAMATSU	152

Effect of sucrose on viability of frozen-thawed bovine IVM-IVF-IVC blastocysts using ethylene glycol as a cryoprotectant	
FUKUSHIMA, M.	154
IVF using oocytes collected from the ovarian follicles and frozen-thawed spermatozoa in Japanese monkeys (<i>Macaca fuscata</i>)	
SANKAI, T., K. SHIMIZU, F. CHO & Y. YOSHIKAWA	156
Freeze preservation of microencapsulated ovarian follicle in rat	
KAGABU, S., K. MAMBA & T. MAKITA	158
A new method of evaluating exocytosis of mouse cortical granules	
TAHARA, M., A. MAMMOTO, N. MASUMOTO, K. TASAKA & A. MIYAKE	160
Role of oocytes and cumulus cells on the expansion of porcine oocyte-cumulus complexes in vitro	
DAEN, F. P., E. SATO, K. NAITO & Y. TOYODA	162

Application of Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction to Study the Glucose Transporter Protein Gene (GLUT1) Expression in Preimplantation Mouse Embryos

Yutaka MORITA¹, Osamu TSUTSUMI^{1*}, Yoshitomo OKA²,

Hideki KATAGIRI² and Yuji TAKETANI¹

¹Department of Obstetrics and Gynecology and ²Third Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo 113, Japan

*To whom correspondence should be addressed.

Abstract: Glucose incorporation and utilization in mouse embryos increases during preimplantation development, which may depend on the amount of glucose transporter in the embryos. A reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to study the expression of glucose transporter GLUT1 mRNA in preimplantation mouse embryos. Messenger RNA was obtained from 100 of 2-cell embryos and blastocysts using the Micro-Fast Track mRNA isolation kit. RT-PCR revealed that GLUT1 mRNA is expressed in both the 2-cell embryos and blastocysts. The levels of GLUT1 mRNA increased during embryonic development. These results suggest that glucose incorporation or the switch in the substrate preference of the embryo from pyruvate to glucose during preimplantation development depends at least in part on the expression of GLUT1 at the transcription level, which results in increased amounts of GLUT1 protein. **Key words:** Glucose, Glucose transporter, mRNA, Reverse transcription-polymerase chain reaction
(Received 12 January 1994, Accepted 31 January 1994)

Introduction

Mammalian embryos undergo qualitative and quantitative changes in energy substrate utilization during the preimplantation period. Glucose is unable to support the development of oocytes and early embryos until they reach the 4-cell stage¹⁾. There is a characteristic switch in the substrate preference of embryos: from pyruvate during the early cleavage stage, to glucose after the 8-cell stage^{2,3)}. Glucose becomes the predominant energy source at the blastocyst stage. Current experimental data indicate that there is a change in the uptake or metabolism of glucose in early embryos³⁻⁵⁾. Thus, several investigators have attempted to assess the viability of embryos by measuring their glucose uptake^{3,6)}. A low level of

hexokinase activity has been proposed to explain the inability of many species of embryos, including humans, to utilize glucose⁷⁻¹⁰. Recently, investigators have proposed that the glucose transporter GLUT1, which is expressed in embryos, is involved in this substrate preference of embryos^{11,12}.

The aim of this study was to determine whether GLUT1 mRNA is expressed in embryos, and therefore may be responsible for GLUT1 protein expression and glucose uptake by the preimplantation embryo. In order to detect small amounts of mRNA, the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method, which is a sensitive technique because of its exponential amplification process, has been employed to study GLUT1 expression in preimplantation mouse embryos.

Materials and Methods

Mouse Embryos : Eight-week-old B6C3F1 female mice were superovulated with 5 IU of pregnant mare serum gonadotropin (Teikokuzoki, Tokyo), followed 48 hours later by 5 IU of human chorionic gonadotropin (hCG; Mochida, Tokyo). Mating with males of the same strain was confirmed by the presence of a vaginal plug. Two-cell embryos and blastocysts were obtained at 40 and 88 hours after hCG administration by flushing the oviducts and the uteri, respectively.

RNA Extraction : One hundred embryos were washed five times with phosphate buffered saline containing 3 mg/ml polyvinylpyrrolidone. They were collected in a small droplet ($<5\mu\text{l}$) and were quick-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . PolyA⁺RNA was extracted from the embryos by the Micro-Fast Track mRNA isolation kit (Invitrogen, San Diego, CA, USA), which allowed isolation of poly A⁺RNA directly from a very small number of cells. Briefly, the lysates of 100 embryos were directly applied to oligo (dT) cellulose for adsorption. Non-polyadenylated RNA, DNA, dissolved membranes, proteins and cellular debris were washed off the resin with a high salt buffer, and tRNA and rRNA were eluted with a low salt buffer. Finally, the polyadenylated RNA was eluted with water and ethanol precipitated. The resulting pellet of poly A⁺RNA, which was obtained by centrifugation, was resuspended in $4\mu\text{l}$ of 10mM Tris-HCl, pH 7.6 1mM EDTA, and $2\mu\text{l}$ were used for each of two RT-PCR reactions: one was for the GLUT1 mRNA assay, and the other for β -actin mRNA as an internal standard.

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction : Each $2\mu\text{l}$ of polyA⁺ RNA aliquot was incubated with 2.5 units of rTth DNA Polymerase (Perkin-Elmer/Cetus, Norwalk, CT, USA) for 15 min at 70°C in a total reaction volume of $10\mu\text{l}$ containing 1XrTth reverse transcriptase buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.3, 90 mM KCl), 0.2mM

of each dNTP, 1 mM $MnCl_2$ and 10 pmol of the appropriate antisense primer. The reverse transcription reaction was stopped by placing the tube on ice. PCR was performed in the same tube after adding 40 μ l of chelating buffer (5% glycerol, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 100 mM KCl, 0.75 mM EGTA, 0.05% Tween 20) containing 1.8 mM $MgCl_2$ and 10 pmol of the appropriate sense primers. The primers for the amplification of a GLUT1-specific sequence¹¹⁾ and those for mouse β -actin¹³⁾ are shown in Table 1. PCR was performed in a DNA thermal cycler (Perkin-Elmer/Cetus, Norwalk) according to the following protocol: an initial denaturation at 95°C for 2 min was followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, and annealing, and primer extension at 60°C for 1 min. A further 7 min extension at 60°C was performed at the end of the 40 cycles to extend any remaining single strand products. Ten microliters of the PCR amplified products were electrophoresed in a 2% agarose gel containing 0.5 μ g/ml ethidium bromide and photographed under UV-irradiation. The restriction enzyme cleavage patterns of the fragments using *Apa*I and *Pvu*II were analyzed to confirm the identity of the PCR products.

Table 1. Primers used in the RT-PCR assay for GLUT1 and β -actin in embryos.

Gene	Primers used	Product size	Residues
GLUT1	CATCGCCCTGGCCCTGCAGGAGC	361bp	1263-1285 sense strand
	GGCACCCCCCTGCCGGAAGCCGGA		1600-1623 antisense strand
β -actin	CGTGGGCCGCCCTAGGCACCA	243bp	182-202 sense strand
	TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG		403-424 antisense strand

Results

Messenger RNA was isolated from batches of embryos at the 2-cell and blastocyst stages of development. The mRNA was primed with oligo-dT and reverse transcribed. An aliquot of the product was used for amplification by PCR for each primer pair specific for actin cDNA or for GLUT1 cDNA. The assays were repeated three times with different embryo batches. The identity of the amplified products was confirmed by its size on an agarose gel and its restriction enzyme cleavage pattern. The RT-PCR products from mouse embryos are shown in Figs 1A and 1B. GLUT1 mRNA was detected in both 2-cell embryos and blastocysts as evidenced by the presence of amplified cDNA fragments of the expected 361 bp size (Fig. 1A). Repeated analysis of the intensity of the amplified fragments indicated that a relatively larger amount of mRNA is produced in the blastocysts than the 2-cell embryos. Amplified β -actin cDNA of the expected 243-bp size was also

detected in both the 2-cell embryos and blastocysts (Fig.1B). No difference was observed in the amount of this PCR product in the embryos. Restriction endonuclease digestion of the PCR-amplified DNA by PvuII and ApaI revealed that the 361 bp GLUT1 sequence was cleaved out into fragments of 209 and 152 bp, and 269 and 92 bp, respectively, as predicted from the DNA sequence (Fig.1C)

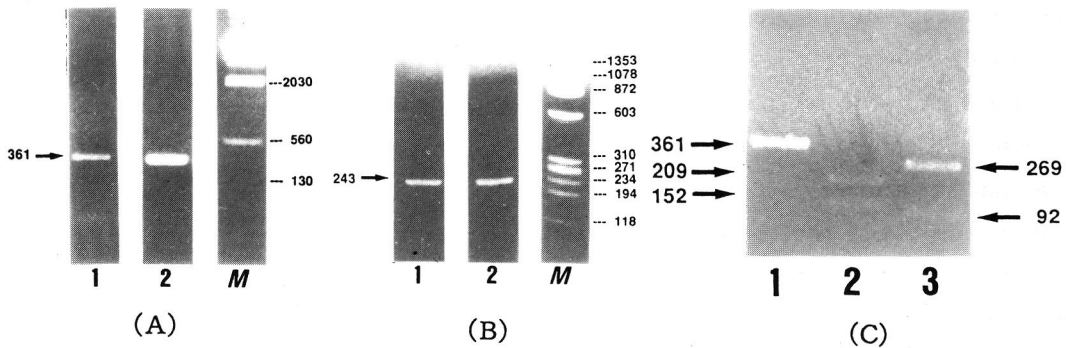


Figure 1. (A) Detection of GLUT1 transcripts in preimplantation embryos by RT-PCR. Lane 1, two-cell embryos; lane 2, blastocysts; Lane M, molecular weight markers. The position of the expected 361 bp PCR product for GLUT1 is indicated.
(B) Detection of β -actin transcripts in preimplantation embryos by RT-PCR. Lane 1, two-cell embryos; lane 2, blastocysts; Lane M, molecular weight markers. The position of the expected 243 bp PCR product for β -actin is indicated.
(C) Digestion pattern of RT-PCR products by restriction enzymes. Lane 1, untreated GLUT1 PCR product; Lane 2, fragments of 209 and 152 bp produced by PvuII digestion; Lane 3, fragments of 269 and 92 bp produced by ApaI digestion.

Discussion

Purified mRNA was isolated from mouse embryos at various stage of development by our RNA extraction procedure. Contamination of genomic DNA was ruled out by PCR amplification of each cDNA preparation using primers that flank a target sequence of the actin gene that contains an 87 bp intron. If genomic DNA were present in the cDNA, a 330 bp target sequence would be amplified as well as the 243 bp fragment representing the cDNA. No 330 bp PCR product for β -actin was detected in any of the RT-PCR reactions with embryo RNA samples (Fig.1B). This RT-PCR assay, however, is not quantitative enough to confirm the reported increase in actin mRNA levels which was detected by Northern blot analysis using thousands of embryos¹⁴.

We have shown that mouse embryos express GLUT1 using RT-PCR on mRNA

from 50 embryos (Fig. 1A and 1B) in agreement with observations obtained using Western blot analysis¹²⁾ and RT-PCR¹¹⁾. GLUT1 is the likely mediator of glucose uptake in early mouse embryos. Moreover, the levels of GLUT1 increase when embryos develop although this is not quantitative (Fig. 1A). This offers some insight into the characteristic switch in the substrate preference of embryos from pyruvate to glucose. The elevated levels of GLUT1 expression may be responsible for this increased capacity for glucose uptake, which may be related, at least in part, to substrate preference. However, it is also plausible that the levels of the enzymes involved in glucose metabolism may regulate the main energy source of the oocytes and embryos, because low hexokinase activity has been reported to explain the inability of mouse, rat, and human oocytes and embryos to utilize glucose⁷⁻¹⁰⁾.

In summary, our results suggest that increased GLUT1 expression may explain the switch in substrate preference from pyruvate to glucose, and may correlate with the exponential increase in glucose incorporation during preimplantation embryo development. This approach may be important for analyzing biochemically the process of preimplantation development, because morphological criteria, such as the rate of blastocyst formation in vitro, are not very quantitative and have limited usefulness. Thus, the determination of GLUT1 expression may be useful for investigation not only developmental changes, but also the possible involvement of certain factors influencing embryonic development. In fact, studies examining the roles of various growth factors, such as epidermal growth factor, are now in progress in our laboratory using the methodology described here.

Acknowledgment

This work was supported by grants from the Ministry of Education, Science and Culture and from the Ministry of Health and Welfare, Japan.

References

- 1) Brinster, R.L. (1965): Studies on the development of mouse embryos in vitro. II. The effect of energy source. *J. Exp. Zool.*, 158, 59-68.
- 2) Brinster, R.L. (1971): Oxidation of pyruvate and glucose by oocytes of the mouse and Rhesus monkey. *J. Reprod. Fert.*, 24, 187-191.
- 3) Leese, H.J. and Barton, A.M. (1984): Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *J. Reprod. Fert.*, 72, 9-13.
- 4) Khurana, N.K. and Wales, R.G. (1987): Effects of oestradiol and progesterone on the metabolism of [U-¹⁴C] glucose by mouse morulae and early blastocysts in

vitro. J.Reprod.Fert., 79, 267-273.

- 5) Brison, D.R. and Leese, H.J. (1991): Energy metabolism in late preimplantation rat embryos. J.Reprod.Fert., 93, 245-251.
- 6) Butler, J.E., Lechene Biggers, J.D (1988): Noninvasive measurement of glucose uptake by two population of murine embryos. Biol.Repod., 39, 779-786.
- 7) Barbehenn, E.K., Wales, R.G. and Lowry, O.H. (1974): The explanation for the blockade of glycolysis in early mouse embryo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 71, 1056-1060.
- 8) De Schepper, G.G., Van Noorden, C.J.F. and Koperdraad, F. (1985): A cytochemical method for measuring enzyme activity in individual preovulatory mouse oocyte. J.Reprod.Fert., 74 709-716.
- 9) Tsutsumi, O., Yano, T., Satoh, K., Mizuno, M. and Kato, T. (1990): Studies of hexokinase activity in human and mouse oocyte. Am. J.Obstet.Gynecol., 162, 1301-1304.
- 10) Tsutsumi, O., Satoh, K., Taketani, Y. and Kato, T. (1992): Determination of enzyme activities of energy metabolism in the maturing rat oocyte. Mol.Reprod.Dev., 33, 333-337.
- 11) Hogan, A., Heyner, S., Charron, M.J., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Thorens, B. and Schultz, G.A. (1991): Glucose transporter gene expression in early mouse embryos. Development, 113, 363-372.
- 12) Morita, Y., Tsutsumi, O., Hosoya, I., Taketani, Y., Oka, Y. and Kato, T. (1992): Expression and possible function of glucose transporter protein GLUT1 during preimplantation mouse development from oocytes to blastocysts. Biochem. Biophys. Res. Commun., 188, 8-15.
- 13) Tokunaga, K., Taniguchi, H., Yoda, K., Shimizu, M. and Sakiyama, S (1986): Nucleotide sequence of a full-length cDNA for mouse cytoskeletal β -actin mRNA. Nuc.Acids Res., 14, 2829.
- 14) Giebelhaus, D.H., Heikkila, J.J. and Schultz, G.A. (1983): Changes in the quantity of histone and actin messenger RNA during the development of preimplantation mouse embryos. Dev.Biol., 98, 148-154.

マウス初期胚糖輸送担体 (GLUT 1) mRNA 発現の RT-PCR法による解析

森田 豊¹・堤 治¹・岡 芳知²・片桐 秀樹²・武谷 雄二¹

東京大学医学部産婦人科¹, 同第三内科², 東京都文京区 113

マウス初期胚は発育分化にともない、糖取り込み能、糖利用能が急速に増加し、糖輸送担体 (GLUT 1) 蛋白の発現増加が、その要因であることが明らかになってきている。今回、RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 法を用いることにより、初期胚における GLUT 1 mRNA の解析を行った。マウス 2 細胞期胚、胞胚のそれぞれ 100 個より、ミクロスピナラムを用いて polyA⁺ RNA を抽出し、逆転写して一本鎖 cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として、マウス GLUT 1 cDNA の 361bp を規定するプライマーを用いて PCR をおこない、GLUT 1 mRNA の検出を試みた。GLUT 1 mRNA 発現は、2 細胞期胚、胞胚のいずれにおいても検出され、その発現は、胞胚において増加している可能性が示された。以上より、マウス初期胚発育にともなう糖取り込み能の発達は、GLUT 1 の転写レベルにおける発現調節によることが示唆された。

Effect of Glucose in a Semi-Defined Culture Medium on Development of Mouse 1-Cell Embryos

Ken SAWAI, Jeong-Mook LIM, Kiyoshi OKUDA and Koji NIWA
Division of Animal Science and Technology, Faculty of Agriculture
Okayama University, Okayama 700

Abstract: Mouse 1-cell embryos from C57BL/6J were cultured in CZB medium containing lactate, pyruvate, glutamine, EDTA and BSA. When examined 24, 36 and 48 h after culture, embryos developed to the 2-cell (86%), 4- to 7-cell (59%) and ≥ 8 -cell (54%) stages, respectively, but hardly to the \geq morula stage 72 h after culture. When 5.55 mM-glucose was added to the medium 24 or 36 h after culture, significantly higher proportions (71-75%) of blastocyst-stage embryos were obtained 96 h after culture compared with when glucose was added 0 (43%) and 48 (26%) h after culture. Exposure of embryos to glucose for only 12 h between 36 and 48 h after culture could support their development to the blastocyst stage (64%). If only glucose was present during this period, the additional exposure of embryos to glucose between 24 and 36 h and/or 48 and 96 h after culture neither inhibits nor promotes development of embryos to the blastocyst stage. Key words: Mouse, One-cell embryo, In vitro development, Glucose requirement (Received 19 January 1994, Accepted 8 February 1994)

Introduction

It is well known that development of 1-cell mouse embryos in vitro is blocked at the 2-cell stage with an exception of some inbred and F_1 strains¹⁻³⁾. Although it has been reported that a high lactate/pyruvate ratio⁴⁾ and the addition of ethylene diamine-tetraacetic acid (EDTA)⁵⁾ or superoxide dismutase⁶⁾ to culture medium is beneficial for culture of 1-cell embryos derived from some blocking strains of mice, there is considerable variation in the proportion of development beyond the 2-cell stage in different media. To maintain whole development in vitro of 1-cell mouse embryos to the blastocyst stage it is important to clarify the factors which affect the blastocyst formation after overcoming a 2-cell block.

Recently, Chatot et al.⁸⁾ found that 1-cell CF-1 embryos, which usually exhibit the 2-cell block to development in vitro, developed beyond the 2-cell stage but not to

the blastocyst stage when they were cultured continuously in a medium (CZB medium) lacking glucose, but that exposure of embryos to glucose from the 3- to 4-cell stage (48 h after culture) through the early morula stage (72 h after culture) is essential to maintain development of embryos to the blastocyst stage. However, in some nonblocking strains, the addition of glucose to media at the start of culture does not induce the 2-cell block and supports development to the blastocyst stage. Although 1-cell stage^{8,9)} embryos of the C57BL/6J strain do not exhibit the 2-cell block, the proportion of embryos developed to the blastocyst stage in media with glucose greatly differs by different laboratories⁹⁻¹²⁾.

In our laboratory, when cultured in CZB medium⁷⁾ which is lacking glucose, C57BL/6J 1-cell embryos could develop beyond the 2-cell stage but not to the blastocyst stage (unpublished data). Therefore, the present study was undertaken to examine the effects of glucose on development of C57BL/6J 1-cell embryos in CZB medium.

Materials and Methods

Medium : The medium used for manipulating and culture of embryos was CZB medium formulated by Chatot et al⁸⁾. This medium consisted of 81.62 mM-NaCl, 4.83 mM-KCl, 1.18 mM-KH₂PO₄, 1.18 mM-MgSO₄·7H₂O, 25.12 mM-NaHCO₃, 1.7 mM-CaCl₂·2H₂O, 31.3 mM-sodium lactate, 0.27 mM-sodium pyruvate, 1 mM-glutamine, 5 mg globulin-free bovine serum albumin (BSA; No.A-7638, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)/ml, 0.11 mM-EDTA, 0.7 mg streptomycin sulfate/ml and 100 U sodium penicillin G/ml.

Embryo Collection and Culture of Embryos : Mature (4-6 weeks old) random-bred C57BL/6J female mice which were originally purchased from Clea Japan Inc. and maintained under controlled light (14 h light: 10 h darkness; light on at 6:00) were superovulated with intraperitoneal injection of 5 IU PMSG (Teikoku-Zoki Co., Tokyo) followed by 5 IU hCG (Sankyo Co., Tokyo) 48 h later and naturally mated with males of the same strain. On the following morning (24-25 h after hCG), 1-cell embryos were flushed from the excised oviducts in about 0.1 ml CZB medium supplemented with 0.1% hyaluronidase (No. H-3506, Sigma Chemical Co.). After cumulus cells were completely dispersed, embryos were washed three times with the medium without hyaluronidase. Nine to 20 embryos were then placed in a 50- μ l drop of the same medium under paraffin oil (No. 261-17, Nacalai Tesque Inc., Kyoto) in a 35 \times 10 mm falcon polystyrene culture dish (No.1008, Becton and Dickinson, NJ, USA) and cultured in a CO₂ incubator (5% CO₂ in air at 37°C).

Experimental Studies : To clarify the process of early cleavage of embryos cultured in CZB medium, embryos were examined at a 12-h interval from 24 to 48 h after culture in Experiment 1. To examine the effect of glucose on development of embryos at different stages, embryos cultured in CZB medium were transferred to newly prepared medium supplemented with 5.55 mM-glucose 0, 24, 36, 48 and 96 h after culture in Experiment 2. In Experiment 3, to examine the effect of the presence of glucose during various culture periods on development of embryos, those cultured in CZB medium were washed three times and transferred to newly prepared medium with 5.55 mM-glucose 24 or 36 h after culture and again washed three times and transferred to glucose-free CZB medium 12-36 h later. In Experiments 2 and 3, embryos were examined 48, 72 and 96 h after culture for their developmental stages under a phase-contrast microscope.

Statistical analysis : Each experiment was replicated 3 (Experiments 1 and 3) or 4 (Experiment 2) times. In Experiments 2 and 3, the proportions of embryos developing to each stage were subjected to an arc-sine transformation and the transformed values were assigned for one-way analysis of variance (ANOVA). When ANOVA revealed a significant treatment effect, the treatments were compared by Duncan's multiple range test.

Results

Early development of embryos in CZB medium (Experiment 1)

As shown in Table 1, almost all embryos (86%) completed the first cleavage 24 h after culture. The embryos could develop beyond the 2-cell stage reaching to the ≥ 4 -cell (59%) and ≥ 8 -cell (54%) stages 36 and 48 h after culture, respectively.

Development of embryos in CZB medium supplemented with glucose at various times after culture (Experiment 2)

As shown in Table 2, the proportion of embryos developed to the ≥ 4 -cell stage 48 h after culture was significantly ($P < 0.05$) lower in the medium with glucose from the start of culture (69%) than in the medium without glucose until 24 (91%), 36 (92%) and 48 (86-93 %) h after culture. High proportions of \geq morula (88 %) and blastocyst (75 %) stage embryos were obtained 72 and 96 h after culture, respectively, when glucose was not added to the medium until 36 h after the start of culture. These values were not different from those of embryos that had been cultured without glucose until 24 h after the start of culture (83% for

\geq morulae and 71% for blastocysts) but significantly ($P < 0.05$) higher than those (10-66% for \geq morulae and 0-43% for blastocysts) of all other groups.

Table 1. Early cleavage of C57BL/6J 1-cell embryos cultured in CZB medium^a

Time of observation	No. and % ^b of embryos developed to				
(h)	1-cell	2-cell	3-cell	4-7 -cell	\geq 8-cell
24	4 (4)	96 (86)	11 (10)	0 (0)	0 (0)
36	4 (4)	26 (23)	5 (5)	65 (59)	2 (2)
48	4 (4)	8 (7)	2 (2)	24 (22)	60 (54)

^aA total of 111 embryos was cultured in 3 replicates.

^bPercentage of the number of embryos cultured.

Table 2. Development of C57BL/6J 1-cell embryos in CZB medium supplemented with glucose (5.55 mM) at various times after the start of culture

Time of glucose addition	No. of embryos cultured	No. and % ^a of embryos developed to		
(h)		\geq 4-cell [48] ^b	\geq Morula [72] ^b	Blastocyst [96] ^b
0	58	40 (69) ^c	38 (66) ^{c,d}	25 (43) ^c
24	58	53 (91) ^d	48 (83) ^{d,e}	41 (71) ^d
36	60	55 (92) ^d	53 (88) ^e	45 (75) ^d
48	58	54 (93) ^d	28 (48) ^c	15 (26) ^c
96 (no addition)	58	50 (86) ^d	6 (10) ^f	0 (0) ^e

^aPercentage of the number of embryos cultured.

^bNumbers in parenthesis indicate the time of examination (h after culture).

^cValues with different superscripts within an each column are significantly different, $P < 0.05$ at least.

Development of embryos exposed to glucose in CZB medium for different periods (Experiment 3)

As shown in Table 3, development of embryos to the \geq 4-cell stage was not affected by the different periods (12-36 h) of the exposure to glucose from 24 or 36 h after culture. When embryos were exposed to glucose for 12 h from 24 h after culture, the proportion (48%) of \geq morula-stage embryos was significantly ($P < 0.01$) lower than in those exposed to glucose for 24 (81%) and 36 (87%) h but not different from the values in those exposed to glucose for 12 (72%) and 24 (76%) h from 36 h after culture. However, blastocyst development (64-70%) was greatly promoted ($P < 0.01$) when embryos were exposed to glucose for 24-36 and 12-24 h from 24 and 36 h after culture, respectively, compared with those exposed to glucose only between 24 and 36 h after culture.

Table 3. Effect of the presence of glucose (5.55 mM) in CZB medium during various culture periods on the development of C57BL/6J 1-cell embryos

Presence of glucose during (h)	No. of embryos cultured	No. and %* of embryos developed to		
		≥4-cell [48] ^b	≥Morula [72] ^b	Blastocyst [96] ^b
24-36	50	41 (82)	24 (48) ^c	11 (22) ^c
24-48	54	47 (87)	44 (81) ^d	36 (67) ^d
24-60	54	47 (87)	47 (87) ^d	38 (70) ^d
36-48	50	45 (90)	36 (72) ^{c,d}	32 (64) ^d
36-60	50	44 (88)	38 (76) ^{c,d}	33 (66) ^d

*Percentage of the number of embryos cultured.

^bNumbers in parenthesis indicate the time of examination (h after culture).^{c,d}Values with each different superscripts are significantly different within each column, P<0.01 at least.

Discussion

The results of the present study indicate that C57BL/6J 1-cell embryos can develop beyond the 2-cell stage but hardly to the morula and blastocyst stages when they were cultured in CZB medium⁷⁾ which contains lactate, pyruvate, glutamine, EDTA and BSA but no glucose. To maintain blastocyst formation, the addition of glucose to the medium was essential. However, the presence of glucose for the first 24 h of culture rather inhibited blastocyst formation. Exposure of embryos to glucose for only 12 h from 36 to 48 h after culture could support their development to the blastocyst stage. If only glucose was present during this period, the additional exposure of embryos to glucose between 24 and 36 h and/or 48 and 96 h after culture neither inhibits nor promotes development of embryos to the blastocyst stage. This requirement of glucose was also applicable to development of embryos to the morula stage with less strictness compared with for blastocyst formation.

The specific role(s) of glucose during culture of 1-cell embryos obtained from various strains of mice that do not generally exhibit the 2-cell block has been examined in detail^{8,9)}. However, it seems that the pattern of glucose requirement for development to the blastocyst stage is slightly different according to the different strains. Chatot et al⁸⁾. have reported that some 1-cell embryos obtained from B6D2F1/J (C57BL/6J × DBA/2J) or CD1 females mated to B6SJL F1/J (C57BL/6J × SJL/J) males could develop to the blastocyst stage in CZB medium but that the addition of glucose to the medium from the start of culture optimally maintained blastocyst development; the beneficial effect of the addition of glucose 48 h after culture as observed in blocking strain⁷⁾ was not observed. Although

Chatot et al⁸⁾. suggested that this was the result of an intrinsic difference in the ability of the blocking and nonblocking strains to metabolize glucose, this hypothesis was not necessarily supported by Du and Wales¹³⁾ who recently observed that both strains responded similarly to the presence of glucose. On the other hand, Brown and Whittingham⁹⁾ have reported that no 1-cell embryos from B6CBF1 (C57BL/6 × CBA/ca) mice mated to the same strain males developed to the blastocyst stage when glucose was omitted from bicarbonate-buffered mouse embryo culture medium, M16¹⁴⁾, which contains lactate and pyruvate but that an exposure of embryos to glucose for a 22-24h period at any stage during the first 72 h of culture supported development to the morula and blastocyst stages. These findings may suggest that there is some differences in the requirement of glucose among different nonblocking strains. In the present study, exposure of C57BL/6J embryos to glucose was only necessary from 36 through 48 h after culture, at which time of culture embryos developed to the 4-to 8-cell stage, for development to the morula to blastocyst stage in CZB medium. The requirement of glucose during this specific period was quite similar to that observed in 1-cell embryos from blocking strain, CF-1 females mated to B6SJLF1 males⁷⁾. Although it has been reported that uptake and incorporation of glucose by mouse embryos increase at the 4-to 8-cell stage^{15,16)}, the precise nature of the specific timing and of the strain difference of the requirement of glucose remains unclear. It seems that glucose is required for the synthesis of some stage-specific embryonic component(s) involved in development to the morula and blastocyst stages.

The requirement of glucose for development of embryos in vitro is different according to animal species. In the cattle, the presence of glucose throughout culture is detrimental for development of 1-cell embryos to the blastocyst stage^{17,18)} but blastocyst formation from the 8- to 16-cell stage is promoted by the presence of glucose¹⁷⁻¹⁹⁾. Participation of glucose in in vitro developmental block of embryos at specific stage is also reported in the sheep²⁰⁾, hamster²¹⁾, and pig²²⁾. However, glucose is an essential component in chemically defined medium for development of rat 1-cell embryos to the blastocyst stage²³⁾.

In conclusion, development of C57BL/6J 1-cell embryos to the morula and blastocyst stages is inhibited when they were cultured in CZB medium with glucose for the first 24 h or without glucose throughout culture but greatly promoted when they were exposed to glucose for 12 h between 36 and 48 h after culture.

References

- 1) Whitten, W.K. and Biggers, J.D. (1968): Complete development in vitro of the preimplantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. *J.Reprod.Fertil.*, 17, 399-401.
- 2) Kaufman, M.H. and Sachs, L. (1976): Complete preimplantation development in culture of parthenogenetic mouse embryos. *J.Embryol. exp.Morph.*, 35, 179-190.
- 3) Goddard, M.J. and Pratt, H.P.M. (1983): Control of events during early cleavage of the mouse embryo: an analysis of the '2-cell block'. *J. Embryol. exp.Morph.*, 73, 111-133.
- 4) Cross, P.C. and Brinster, R.L. (1973): The sensitivity of one-cell mouse embryos to pyruvate and lactate. *Expl.Cell Res.*, 77, 57-62.
- 5) Abramczuk, J., Solter, D. and Koprowski, H. (1977): The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. *Devel.Biol.*, 61, 378-383.
- 6) Noda, Y., Matsumoto, H., Umaoka, U., Tatsumi, K., Kishi, J. and Mori, T. (1991): Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol.Reprod.Devel.*, 28, 356-360.
- 7) Chatot, C.L., Ziomek, C.A., Bavister, B.D., Lewis, J.L. and Torres, I. (1989): An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J.Reprod.Fertil.*, 86, 679-688.
- 8) Chatot, C.L., Lewis, J.L., Torres, I. and Ziomek, C.A. (1990): Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium. *Biol. Reprod.*, 42, 432-440.
- 9) Brown, J.J.D. and Whittingham, D.G. (1991): The roles of pyruvate, lactate and glucose during preimplantation development of embryos from F₁ hybrid mice in vitro. *Development*, 112, 99-105.
- 10) Levey, T.L., Troike, D.E. and Brinster, R.L. (1977): Effect of α -amanitin on the development of mouse ova in culture. *J.Reprod.Fertil.*, 50, 147-150.
- 11) Kasai, K., Minato, Y. and Toyoda, Y. (1978): Fertilization and development in vitro of mouse eggs from inbred strains and F₁ hybrid. *Jpn.J.Anim. Reprod.*, 24, 19-22.
- 12) Toyoda, Y., Azuma, S., Itagaki, Y. and Takeda, S. (1992): Strain difference in the development of preimplantation mouse embryos in a medium supplemented with superoxide dismutase or ethylenediamine tetraacetic acid. *J.Mamm.Ova.Res.*, 9, 180-190.

- 13) Du, Z.F. and Wales, R.G. (1993): Some effects of genotype and composition of the culture medium on the development of mouse zygotes in vitro. *Reprod. Fertil.Dev.*, 5, 405-415.
- 14) Whittingham, D.G. (1971): Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl., 14, 7-21.
- 15) Brinster, R.L. and Thomson, J.L. (1966): Development of eight-cell mouse embryos in vitro. *Exp.Cell Res.*, 42, 308-315.
- 16) Gardner, D.K. and Leese, H.J. (1988): The role of glucose and pyruvate transport in regulation nutrient utilization by preimplantation mouse embryos. *Development*, 104, 423-429.
- 17) Kim, J.H., Funahashi, H., Niwa, K. and Okuda, K. (1993): Glucose requirement at different development stage of in vitro fertilized bovine embryos culture in semi-defined medium. *Theriogenology*, 39, 875-886.
- 18) Lim, J.M., Kim, J.H., Okuda, K. and Niwa, K. (1993): Effect of glucose during fertilization and/or culture in a chemically semi-defined medium on the development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *J.Reprod.Dev.*, 39, 237-242.
- 19) Kim, J.H., Niwa, K., Lim, J.M. and Okuda, K. (1993): Effects of phosphate, energy substrates and amino acids on development of in vitro-matured and in vitro-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biol.Reprod.*, 48, 1320-1325.
- 20) Thompson, J.G., Simpson, A.C., Pugh, P.A. and Tervit, H.R. (1992): Requirement for glucose during in vitro culture of sheep preimplantation embryos. *Mol.Reprod.Dev.*, 31, 253-257.
- 21) Seshagiri, P.B. and Bavister, B.D. (1989): Glucose inhibits development of hamster 8-cell embryos in vitro. *Biol.Reprod.*, 40, 599-606.
- 22) Petters, R.M., Johnson, B.H., Reed, M.L. and Archibong, A.E. (1990): Glucose, glutamine and inorganic phosphate in early development of the pig embryos in vitro. *J.Reprod.Fertil.*, 89, 269-275.
- 23) Miyoshi, K., Funahashi, H., Okuda, K. and Niwa, K. (1994): Development of rat one-cell embryos in a chemically defined medium: Effects of glucose, phosphate and osmolarity. *J.Reprod.Fertil.*, 100, In press.

マウス1-細胞期胚の体外発生におよぼすグルコースの影響

澤井 健・林 正黙・奥田 潔・丹羽皓二

岡山大学農学部家畜繁殖学研究室, 岡山市 700

C57BL/6J系マウス1-細胞期胚をCZB培地を用いて体外培養した結果, 胚はそれぞれ24, 36および48時間後に, 2-(86%), 4~7-(59%)および ≥ 8 -(54%)細胞期に到達したが, さらに培養を継続しても桑実期以降への発生は困難であった。培養開始後24または36時間で胚をグルコース(5.55 mM)添加CZB培地に移した場合, 培養開始後96時間の胚盤胞形成率(71-75%)は, 培養開始時(43%)あるいは培養開始後48時間(26%)からグルコースの存在下で培養された胚と比較して、有意($P < 0.05$)に高かった。グルコースの存在下で培養する時期を培養開始後36(4-細胞期)から48(8-細胞期)時間までの12時間に限定することによって, 64%の胚は胚盤胞まで発生したが, この時期以外にさらに培養開始後24から36時間までの12時間および48から96時間までの48時間のいずれか一方または両者の期間グルコースの存在下で培養しても胚盤胞形成率(67-75%)は抑制も促進もされなかった。以上の結果から、CZB培地においてC57BL/6J系1-細胞期胚の胚盤胞への発生を維持するためには4~8-細胞期の段階でグルコースを添加する必要があることが示唆された。

Stimulatory Effect of Porcine Follicular Fluid on the Fertilization of Cumulus - Free Mouse Eggs In Vitro

Yuji TAKAHASHI, Kazuo ISHIKAWA, Ferdinand P. DEAN, Kae KAMIO
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: This study was designed to investigate the ability of porcine follicular fluid to increase the efficiency of fertilization of cumulus-free mouse oocytes. Porcine follicular fluid (pFF) was fractionated by ultracentrifugation, and termed Top, Second, Third, Bottom. The addition of Top fraction to the sperm preincubation medium and the fertilization medium raised the fertilization rate significantly and dose-dependently (10% Top: 11%, 20% Top: 25%, $P < 0.01$), while the others exhibited no effect. pFF Top fraction also increased the number of capacitated spermatozoa (control: 21%, Top: 36%, $P < 0.05$) as revealed by chlortetracycline assay after 2 h preincubation. Additionally, the length of time necessary for zona lysis with chymotrypsin greatly decreased. These results indicated that pFF might facilitate sperm capacitation and prevent hardening of zona pellucida, resulting in increasing efficiency in the fertilization of cumulus-free mouse oocytes. **Key Words:** porcine follicular fluid, in vitro fertilization, capacitation, zona hardening (Received 27 December 1993, Accepted 2 February 1994)

Introduction

Porcine follicular fluid (pFF) has been introduced to complete oocyte maturation in vitro, and to facilitate sperm penetration and subsequent early cleavage in pigs¹⁾. Porcine oocytes matured in modified KRB solution²⁾ containing pFF were more likely to form male and female pronuclei after insemination than those matured in modified KRB solution. Mattioli et al³⁾ revealed that follicle somatic cells and the conditioned medium which had been previously used for maturation of follicular oocyte markedly improved sperm penetrability into the oocytes and male pronuclear formation in pigs. These results suggested that some component(s) of pFF interact with the plasma membrane and cytoplasm of the oocytes and/or sperm, resulting in high incidence of sperm penetration and pronuclear formation. DeFelici et al⁴⁾ indicated that the addition of human follicular fluid or pFF to the maturation medium of mouse oocytes

prevented zona hardening. Although it is still not certain that zona hardening which has been thought to be the conversion of ZP2 to ZP2f⁵⁾ reflects the physiological condition, proteolytic modification of ZP2 by exocytosis of cortical granules might be a critical event in sperm binding to zona pellucida or sperm penetration.

The present study was undertaken to examine whether components of pFF could improve the fertilization of cumulus-free mouse eggs in vitro, and to explore the effects of pFF on sperm and oocytes.

Materials and Methods

Preparation of porcine follicular fluid: The protocol for the preparation of pFF was described previously⁶⁾. Briefly, pFF was collected by aspiration from ovaries (the diameter of the follicles ranged from 2 to 5 mm) obtained at a local abattoir. The debris was removed from pFF by centrifugation, and then the pFF was ultracentrifuged at $220,000 \times g$ for 48 h. The pFF fractions (termed Top, Second, Third and Bottom) were stored at -80°C before use. Bottom fraction was added to TYH medium⁷⁾+1.0 mg/ml polyvinylpyrrolidone (PVP-40, Sigma Chemical Co., TYH-PVP). Bottom fraction was diluted with TYH-PVP to 20% before storage, because it was difficult to remove Bottom fraction from the centrifugation tube.

In vitro fertilization assay : Female and male Jcl:ICR mice were purchased from CLEA Japan Inc. Females (7-12 weeks old) were superovulated by intraperitoneal injections of 7.5 IU PMSG, followed after 48 h with 7.5 IU hCG. Fifteen to 16 h after hCG injection, cumulus-oocyte complexes were collected from the oviducts and treated with 0.05 % hyaluronidase (Type IV-S, Sigma Chemical Co.) in TYH-PVP to remove the cumulus cells. Ten to 20 oocytes were placed in each 200 μl drop of the fertilization medium (TYH-PVP or TYH-PVP containing pFF fractions).

Spermatozoa were collected by extruding from the slitted portion of the epididymal duct of the excised caudae epididymides, and directly introduced into the preincubation medium (TYH-PVP, TYH-PVP containing pFF fractions, or TYH supplemented with 4.0 mg/ml bovine serum albumin, BSA-01, fatty acid free, Yagai Co. Ltd., Japan). Spermatozoa were preincubated for 2-3 h at 37°C under 5 % CO_2 in air, and then small aliquots of sperm suspension were transferred to the fertilization medium at a concentration of 100-150 sperm/ μl . Five to 7 h after insemination, oocytes were mounted on glass slides, pressed gently with a cover slip, fixed with 2.5% glutaraldehyde in phosphate buffer (pH 7.4) and then with 10% neutral formalin in phosphate buffer overnight. The fixed oocytes were stained with 0.25 % acetolacmoid and examined under a Nomarski differential interference

microscope (AFX-IIA, Nikon). Statistical analysis was conducted by chi-square test and Fisher's exact test.

Assessment of sperm capacitation and zona hardening of oocytes: The capacitated sperm were evaluated under an epi-fluorescence microscope (BH2-RFC, OLYMPUS) by chlortetracycline (CTC) assay, according to the method of Ward and Storey⁸⁾. Three different fluorescence patterns were identified with this assay: sperm with intact plasma membranes and acrosomes (no reaction), sperm in a perfusion state (capacitation), and fully acrosome reacted or dead sperm. Ten to 20 oocytes was washed three times in 200 μ l drops of TYH-PVP, and preincubated in 200 μ l drops of control or experimental medium for the length of time indicated. The oocytes were then exposed to 200 μ l drops of 2.0 mg/ml alpha-chymotrypsin (Type-I, Sigma Chemical Co.) in modified PBS and the number of zona-lysed oocytes was counted under a stereomicroscope at 5 min intervals.

Results

Effects of pFF and pFF fractions on fertilization

The effects of pFF and pFF fractions on the fertilization rate of cumulus-free mouse eggs are shown in Figure 1. pFF Top fraction promoted the fertilization of cumulus-free mouse eggs significantly and dose-dependently (10% Top: 11%, 20% Top: 25%, $P < 0.01$). On the other hand, few eggs were fertilized in TYH-PVP supplemented with pFF Second and Third fractions, but not in such a medium with Bottom fraction.

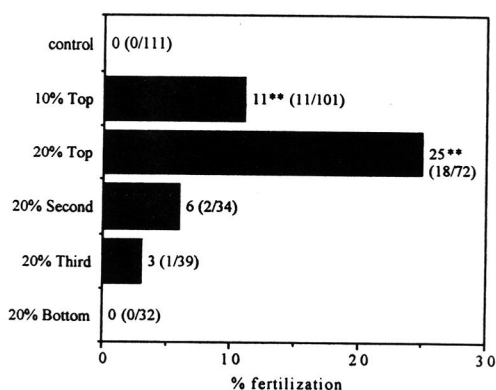


Fig 1. Effects of pFF fractions on the fertilization of cumulus-free mouse eggs in vitro. Each fraction obtained by ultracentrifugation was added to TYH-PVP (sperm preincubation and fertilization medium) at a final concentration of 20% unless otherwise indicated. **: $P < 0.01$

Effects of pFF Top fraction on sperm capacitation

Supplementation of pFF Top fraction (20%) in TYH-PVP markedly increased the number of spermatozoa in the perfusion state (36%; $P < 0.05$), compared to spermatozoa preincubated in TYH-PVP (negative control; 21%) (Fig.2). When spermatozoa were preincubated in TYH-BSA (positive control), they were well capacitated (39%). pFF Top fraction, on the other hand, had no effect on acrosome reaction.

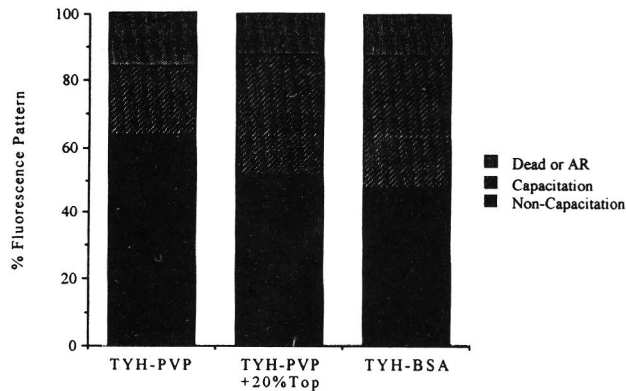


Fig 2. Percentage of fluorescent patterns of spermatozoa preincubated for 2 h in TYH-PVP, TYH-BSA or TYH-PVP-20% Top. Data are represented as mean for four different experiments. AR: acrosome reaction.

Prevention of zona hardening by pFF Top fraction

Denuded oocytes were preincubated in TYH-PVP or TYH-PVP-Top for 0, 2, 4 and 6 h, and then treated with 0.2% chymotrypsin in modified PBS (Fig.3). Longer preincubated oocytes were resistant to chymotrypsin, and therefore, revealed the spontaneous zona hardening. The spontaneous zona hardening was attenuated by

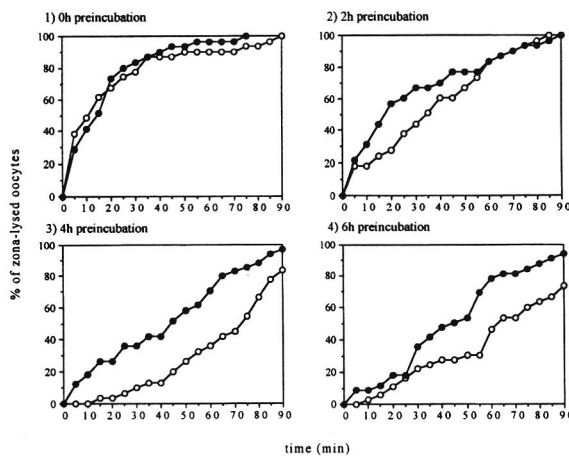


Fig 3. Percentage of zona-lysed oocytes against 0.2% chymotrypsin in modified PBS. (open circles: oocytes were preincubated in TYH-PVP, closed circles: oocytes were preincubated in TYH-PVP-20% Top). The values are means of three replicate experiments.

supplementation of pFF Top fraction in the preincubation medium because the length of time necessary for lysis of zona pellucida with chymotrypsin was reduced.

Discussion

Follicular oocytes can undergo spontaneous meiotic maturation in a chemically defined culture medium. However, lower incidence and abnormal male pronuclear formation were reported⁹. The need for cytoplasmic and oolemmal maturation for sperm penetration and early development was suggested by several investigators^{3,9}. Fukui¹⁰ indicated that follicle cells might play an important role in cytoplasmic maturation and fertilization in cattle oocytes, in view of the results of co-culture. Insufficient maturity was markedly improved and a high rate of normal male pronuclear formation was observed when pFF was added to the culture medium^{2,6}. The developmental ability of oocytes matured and fertilized in the medium with pFF was also increased^{1,2}. These results demonstrated that soluble factor(s) secreted from follicle somatic cells might regulate not only the oocyte maturation but fertilization. Our data shown here suggested that pFF Top fraction contain fertilization-promoting factor(s).

The physiological roles of follicular fluid on fertilization have been reported; improving the rate of acrosome reaction^{10,11}, and preventing zona hardening⁴. No direct evidence of promoting the acrosome reaction was obtained in our experiments, but spermatozoa were well capacitated after 2 h preincubation in TYH containing Top fraction. Meizel et al¹² revealed that progesterone which was synthesized by granulosa and cumulus cells triggered the acrosome reaction in human. Margalioth et al¹³ also indicated that a lower concentration of progesterone may stimulate sperm capacitation. Although it was unclear whether the fertilization-promoting factor in pFF was progesterone or not, it is conceivable that this factor remained within the cumulus-oocyte complexes after ovulation. pFF influenced the fertilizing capacity of human spermatozoa¹⁴, and this effect might be associated with stimulation of the acrosome reaction¹¹.

Inhibition of zona hardening by pFF Top fraction, which was thought to be the reason for low penetrability of sperm into the oocytes, was confirmed. Spontaneous zona hardening was caused by spontaneous exocytosis of cortical granules which contained protease-like materials¹⁵. The inhibitory effect of pFF on zona hardening, therefore, might result from the action of protease inhibitor present in pFF. Our data suggested that fertilization-promoting factor(s) in pFF was not species-specific, but rather ordinarily existing.

In conclusion, pFF included fertilization-promoting factor(s), which was related to the enhancement of sperm capacitation and to inhibition of zona hardening, and the activities were expressed in a non species-specific manner.

References

- 1) Naito, K., Fukuda, Y. and Ishibashi, I. (1989): Developmental ability of porcine ova matured in porcine follicular fluid in vitro and fertilized in vitro. *Theriogenology*, 31, 1049-1057.
- 2) Ishibashi, I., Takeda, M., Takagishi, K. and Naito, K. (1992): Effects of porcine follicular fluid added to the maturation medium on fertilization and development into the two-cell stage of rat follicular oocytes in vitro. *Jpn.J. Reprod.Dev.*, 38, 229-233.
- 3) Mattioli, M., Barboni, B., Bacci, M.L. and Seren, E. (1990): Maturation of pig oocytes: Observation on membrane potential. *Biol.Reprod.*, 43, 318-322.
- 4) DeFlici, M., Salustri, A. and Siracusa, G. (1985): "Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during in vitro culture. II. The effects of follicular fluid and glycosaminoglycans. *Gamete Res.*, 12, 227-235.
- 5) Ducibella, T., Kurasawa, S., Rangarajan, S., Kopf, G.S. and Schultz, R.M. (1990): Precocious loss of cortical granules during oocyte meiotic maturation and correlation with an egg-induced modification of the zona pellucida. *Dev.Biol.*, 137, 46-55.
- 6) 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.
- 7) Toyoda, Y., Yokoyama, M. and Hosi, T. (1971): Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. I. In vitro fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. *Jpn.J.Anim.Reprod.*, 16, 147-151.
- 8) Ward, C. and Storey, B. (1984): Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev.Biol.*, 104, 287-296.
- 9) Motlik, J. and Fulka, J. (1974): Fertilization of pig follicular oocytes cultivated in vitro. *J.Reprod.Fertil.*, 36, 235-237.
- 10) Fukui, Y. (1990): Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. *Mol.Reprod.Dev.*, 26, 40-46.
- 11) Suraz, S.S., Wolf, D.P. and Meizel, S. (1986): Induction of the acrosome

- reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. Gamete Res., 14, 107-121.
- 12) Meizel, S., Pillai, E., Perez, D. and Thomas, P. (1990): Initiation of the human sperm acrosome reaction by components of human follicular fluid and cumulus secretions including steroids. In Fertilization in Mammals (Bavister, B.D., Cummins, J. and Roldan, E.R.S., eds), pp. 205-222, Serono Symposia USA, Norwell.
- 13) Margalioth, E.J., Bronson, R.A., Cooper, G.W. and Rosenfeld, D.L. (1988): Luteal phase sera and progesterone enhance sperm penetration in the hamster egg assay. Fertil. Steril., 50, 117-122.
- 14) Siegel, M.S. and Graczykowsky, J.W. (1991): Influence of porcine follicular fluid on the fertilizing capacity of human spermatozoa. Fertil. Steril., 55, 1204-1206.
- 15) Zhang, X., Rutledge, J. and Armstrong, D.T. (1991): Studies on zona hardening in rat oocytes that are matured in vitro in a serum-free medium. Mol. Reprod. Dev., 28, 292-296.

卵丘除去マウス卵子の体外受精に対する ブタ卵胞液の促進効果

高橋祐司・石川和男・Ferdinand P. Daen・神尾佳枝・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, 東京都港区 108

卵丘除去マウス卵子の受精に対するブタ卵胞液の影響について検討した。ブタ卵胞液を超遠心 (220,000×g)により分画し, Top, Second, Third, Bottomの4分画を得た。精子の前培養培地及び受精培地にTop分画を添加すると, 受精率が有意に上昇した。また, 受精促進効果は濃度依存的であった (10% Top: 11%, 20% Top: 25%, $P<0.01$)。しかし, 他の分画を添加した時には, 受精率の上昇は認められなかった。一方, Top分画は受精能獲得精子の数を有意に増加させるとともに (control: 21%, Top: 36%, $P<0.05$), キモトリプシンによる透明帯の溶解に必要な時間を大きく減少させた。これらの結果から, ブタ卵胞液は精子の受精能力を増加させるとともに卵子透明帯の変性を妨げることにより, 受精促進効果を示すものと考えられた。

Changes in the Distribution and Density of Cortical Granules in Rabbit Oocytes during Meiotic Maturation

Sueo NIIMURA and Misa HOSOE

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Niigata University,
Niigata-shi 950-21

Abstract: Using Lens culinaris agglutinin(LCA) conjugated with fluorescein isothiocyanate, changes in the distribution and density of cortical granules (CGs) in rabbit oocytes were lectin-histochemically examined during meiotic maturation in vivo and in vitro. A small number of LCA-reactive CGs existed throughout the cytoplasm of every oocyte with the germinal vesicle and of all the oocytes 6 hrs after copulation. The density of CGs rose slightly in the cytoplasm of the oocytes 9 hrs after copulation, though the distribution did not vary. In the ovulated oocytes 12 hrs after copulation, CGs further increased and came to be localized mainly in the cortex except for the small CG-free domain. In the oocytes cultured in vitro, changes in the distribution and density of CGs in the course of culturing were similar to those in the oocytes matured in vivo, though about half of the oocytes cultured only for 9 hrs showed the same distributional pattern of CGs as in vivo oocytes 12 hrs after copulation. **Key Words:** Rabbit oocyte, Cortical granule, Meiotic maturation, LCA, Histochemistry (Received 24 January 1994, Accepted 8 February 1994)

Introduction

It is well known that already in unfertilized mammalian eggs, cortical granules (CGs) are membrane-bound secretory granules located immediately beneath the plasma membrane, in order to prevent polyspermic fertilization¹⁾. Electron microscopic observations have clarified, in rats²⁾ and mice³⁾, that CGs first appear in the oocytes in primordial follicles, while in hamsters^{2,4)} and rabbits⁵⁾, in those in secondary follicles having bilayered granulosa cells, and in monkeys⁶⁾ and humans⁷⁾, in those having multilayered granulosa cells. Changes in the distribution and density of CGs in the oocytes during meiotic maturation have also been electron-microscopically observed in rats²⁾, mice³⁾, hamsters^{2,4)}, pigs⁸⁾ and cows⁹⁾. However such observations have not been done in rabbit oocytes. Recently, it has become practicable to demonstrate CGs in mammalian oocytes at light microscopic level, using a lectin, Lens culinaris agglutinin (LCA), conjugated either with

biotin or fluorescein isothiocyanate (FITC); using the LCA as a CG probe, then, the number and distribution of CGs have been observed in hamster and mouse oocytes during meiotic maturation¹⁰⁻¹⁴). Because the LCA method allows a rapid and accurate visualization of CG distribution in the cytoplasm of oocytes, this method is considered to have many advantages over the electron microscopic method^{11,14}). In the present investigation, therefore, the authors utilized LCA conjugated with FITC, in order to observe the changes in distributional patterns of CGs in rabbit oocytes during meiotic maturation in vivo and in vitro.

Materials and Methods

In this experiment, 39 female rabbits of Japanese White were used: they were kept and fed normally in a room at 24°C, lit 14 hrs a day from 4 a.m. to 6 p.m.

To observe the changes of CGs in the oocytes during meiotic maturation in vivo, 20 females were mated with males, and the oocytes were taken from the antral follicles 0, 6 and 9 hrs after mating and from the oviducts 12 hrs after mating. Meanwhile, to observe the changes of CGs in the oocytes during meiotic maturation in vitro, the oocytes taken from the antral follicles of unmated 19 females were cultured in BAE and FOOTE medium¹⁵) at 37°C for 6, 9 and 12 hrs in a CO₂ incubator (CO₂ 5 %, air 95 %).

CGs in the oocytes from both the groups were stained with LCA conjugated with FITC (E-Y Laboratories, San Mateo, U.S.A.), according to the method of DUCIBELLA et al.¹³) The oocytes were immersed in a phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)¹⁶) containing 0.1 % hyaluronidase in order to disperse the cumulus cells, and then were further immersed in a PBS containing 0.2 % pronase to dissolve zonae pellucidae. The naked oocytes were washed in a PBS and fixed in a PBS containing 3.7 % paraformaldehyde for 30 min at room temperature. They were, then, washed 3 times in a blocking solution composed of 3 mg bovine serum albumin (BSA, Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.), 7.51 mg glycine (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) and 1 ml PBS, and were immersed in a PBS containing 0.1 % Triton X-100 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) for 5 min at 20°C and were replaced in the blocking solution. The oocytes were finally immersed in a staining solution composed of 10 µg LCA, 0.1 µl Triton X-100, 3 mg BSA and 1 ml PBS, for 30 min at 20°C. As for the controls, some oocytes were pretreated in a PBS containing 100 mM α-methylmannoside (Fluka Biochemika, Buchs, Switzerland) for 10 min at 20°C, and were immersed in a staining solution containing 100 mM α-methylmannoside for 30 min at 20°C. The oocytes thus

treated were thoroughly washed in a PBS containing 0.01 % Triton X-100 and 0.3 % BSA, and were placed on glass slides to be photographed under a reflected-light fluorescing microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan). Atretic oocytes were eliminated from observation.

To observe the state of nuclei, some oocytes matured in vivo and in vitro were taken to be immersed in a 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.4) containing 2.5 % glutaraldehyde, and were fixed in ethanol:acetic acid (3:1) for 48 hrs at 4°C. The oocytes thus prepared were immersed in ethanol, and stained with 1.0 % aceto-orcein. They were washed in 20 % acetic acid solution, and were placed on glass slides to be photographed under a phase-contrast microscope.

Results

Nuclear status : The germinal vesicle was present in every oocyte from unmated rabbits and females immediately after copulation. The oocytes from mated animals were at the diakinesis stage of Prophase I 6 hrs after copulation, at the Telophase I 9 hrs and at the Metaphase II 12 hrs. In the oocytes cultured in vitro, also, the nuclear division progressed in the similar course of time as observed in the oocytes from mated animals, although some cultured oocytes reached the Metaphase II as early as 9 hrs of culturing.

Distributional patterns of CGs : When the oocytes were treated with LCA conjugated with FITC, granular fluorescence was observed in the cytoplasm (Figs.1,2). The fluorescent granules were regarded as showing the presence of CGs, because such granules did not appear in the control oocytes treated with α -methylmannoside (Fig.3).

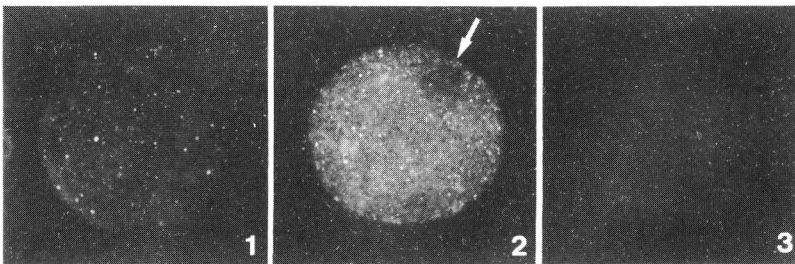


Fig.1. An oocyte with germinal vesicle collected from an antral follicle, showing a small number of fluorescent CGs spread in the cytoplasm.

Fig.2. An oocyte collected from the oviduct 12 hrs after copulation, showing a large number of fluorescent CGs in the cortex of cytoplasm, but not in the CG-free domain (arrowed).

Fig.3. A control oocyte collected from the oviduct 12 hrs after copulation, showing no fluorescent granules in the cytoplasm.

Whole mount preparations of rabbit oocytes, taken at a magnification of $\times 250$ by epifluorescence microscopy. The oocytes in Figs.1 and 2 were treated with FITC-conjugated LCA, and the oocyte in Fig.3 was treated with α -methylmannoside and then with FITC-conjugated LCA and α -methylmannoside.

Given in Fig.4 are the illustrations of changes in the distribution and density of CGs in rabbit oocytes during meiotic maturation *in vivo* and *in vitro*. An oocyte having the germinal vesicle always exhibited a small number of LCA-reactive CGs as single particles scattered throughout the cytoplasm (Fig.1). Such a distributional pattern was observed in the oocytes 6 and 9 hrs after copulation, but the density of the CG rose slightly at 9 hrs. In the oocytes 12 hrs after copulation (Fig.2), the CGs further increased and came to exist mainly in their cortices, though not at the small CG-free domain (CGFD).

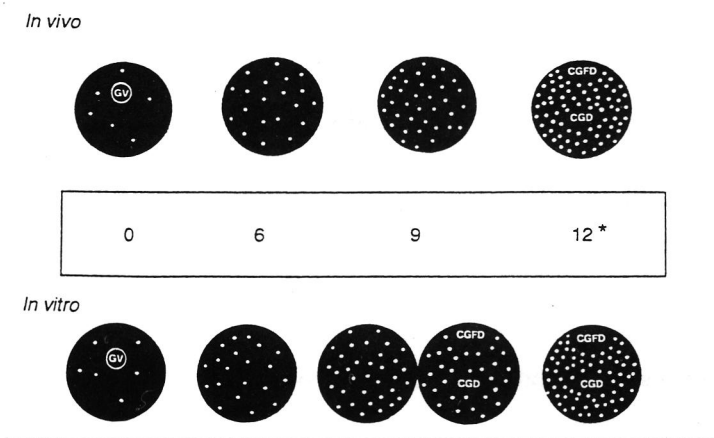


Fig.4. Diagram of the distribution and density of CGs in rabbit oocytes during meiotic maturation.

* Hours after copulation or maturation culture.

GV: germinal vesicle, CGD: CG domain, CGFD: CG-free domain.

In the oocytes cultured *in vitro*, meantime, changes in the distribution and density of CGs in the course of time were similar to those in the oocytes matured *in vivo*, although at 9 hrs of culturing, about half of cultured oocytes showed the same distributional pattern of CGs as *in vivo* oocytes 12 hrs after copulation did.

Discussion

In the rabbit, it has been reported that CGs first appear in the oocytes in secondary follicles⁵⁾, and that a large number of CGs exist mainly in the cortical cytoplasm of oocytes just before¹⁷⁾ and after¹⁸⁾ ovulation, and there appears the CGFD in the cortex of each oocyte immediately after ovulation¹⁸⁾. Changes in the distribution and density of CGs in rabbit oocytes during meiotic maturation, however, have not been examined. The present experiments concerning this period proved that LCA-reactive CGs existed in a low density throughout the cytoplasm of rabbit oocytes at the germinal vesicle stage, which with the elapse of time after

copulation, increased and came to be localized mainly in the cortex of oocytes, and that the density of CGs reached its maximum in ovulated oocytes 12 hrs after copulation (Metaphase II).

With the LCA method employed, it has been observed that in the hamster¹⁹⁾, the density of CGs reaches its maximum in the oocytes in antral follicles 87 hrs before ovulation, and in the mouse¹¹⁻¹⁴⁾, in the oocytes in antral follicles just before ovulation. Our present experiments showed that in rabbit oocytes, the density of CGs reached its highest 12 hrs after copulation (immediately after ovulation). Such periodic differences among animals at which the density of CGs reaches the maximum, seem to depend on mechanical differences among them to prevent polyspermic fertilization. In rabbits, as the vitelline block to prevent polyspermy is more functional than the zona reaction as compared with that in hamsters and mice²⁰⁾, it seems that in rabbit oocytes, a larger number of CGs are necessary even after ovulation.

FLECHON et al.²¹⁾ have reported that there was no CGFD observed in rabbit oocytes(immediately after ovulation). In the present experiments, however, the authors confirmed the presence of CGFDs in the cortical cytoplasm of rabbit oocytes immediately after ovulation. Since the CGFD in rabbit oocytes is very small, it is suspected that FLECHON et al.²¹⁾ were not able to recognize CGFDs electron-microscopically.

In mice oocytes¹³⁾, it has been reported that changes in the distribution and density of CGs during meiotic maturation in vitro are similar to those in the oocytes matured in vivo. In the present experiments, also, such changes of CGs after resumption of meiotic division were almost the same in rabbit oocytes either matured in vivo or in vitro, except for the formation of CGFD and for the movement of CGs to the peripheral cytoplasm in some of the oocytes cultured for 9 hrs. Since earlier changes in the distribution of CGs were observed in the cultured oocytes in which there was earlier progression of nuclear division occurred, it can be said that the phenomenon was not abnormal developmentally.

Acknowledgment

The authors wish to thank Dr. Kazuo ISHIDA for his critical reading of the original manuscript.

References

- 1) Gulyas, B.J. (1980): Cortical granules of mammalian eggs. *Int. Rev. Cytol.*, 63, 357-392.

- 2) Szollosi, D. (1967): Development of cortical granules and the cortical reaction in rat and hamster eggs. *Anat. Rec.*, 159, 431-446.
- 3) Odor, D. L. and Blandau, R. J. (1969): Ultrastructural studies on fetal and early postnatal mouse ovaries. II Cytodifferentiation. *Am. J. Anat.*, 125, 177-216.
- 4) Selman, K. and Anderson, E. (1975): The formation and cytochemical characterization of cortical granules in ovarian oocytes of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. Morph.*, 147, 251-274.
- 5) Zamboni, L. and Mastrianni, L. Jr. (1966): Electron microscopic studies on rabbit ova. 1. The follicular oocyte. *J. Ultrastruct. Res.*, 14, 95-117.
- 6) Hope, J. (1965): The fine structure of the developing follicle of the rhesus ovary. *J. Ultrastruct. Res.*, 12, 592-610.
- 7) Baca, M. and Zamboni, L. (1967): The fine structure of human follicular oocytes. *J. Ultrastruct. Res.*, 19, 354-381.
- 8) Cran, D. G. and Cheng, W. T. K. (1985): Changes in cortical granules during porcine oocyte maturation. *Gamete Res.*, 11, 311-319.
- 9) Kruip, T. A. M., Cran, D. G., van Beneden, T. H. and Dieleman, S. J. (1983): Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. *Gamete Res.*, 8, 29-47.
- 10) Cherr, G. N., Drobnis, E. Z. and Katz, D. F. (1988): Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. *J. Exp. Zool.*, 246, 81-93.
- 11) Ducibella, T., Anderson, E., Albertini, D. F., Aalberg, J. and Rangarajan, S. (1988): Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. *Dev. Biol.*, 130, 184-197.
- 12) Ducibella, T., Duffy, P., Reindollar, R. and Su, B. (1990): Changes in the distribution of mouse oocyte cortical granules and ability to undergo the cortical reaction during gonadotropin-stimulated meiotic maturation and aging in vivo. *Biol. Reprod.*, 43, 870-876.
- 13) Ducibella, T., Kurasawa, S., Rangarajan, S., Kopf, G. S. and Shultz, R. M. (1990): Precocious loss of cortical granules during mouse oocyte meiotic maturation and correlation with an egg-induced modification of the zona pellucida. *Dev. Biol.*, 137, 46-55.
- 14) Ducibella, T. (1991): Mammalian egg cortical granules and the cortical reaction. In *Elements of Mammalian Fertilization* (Wassarman, P. M., ed.) p205-231, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston.
- 15) Bae, I-H. and Foote, R. H. (1980): Maturation of rabbit follicular oocytes in a defined medium of varied osmolality. *J. Reprod. Fert.*, 59, 11-13.
- 16) Dulbecco, R. and Vogt, M. (1954): Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.*, 99, 167-174.

- 17) Oh, Y.K. and Brackett, B.G. (1975): Ultrastructure of rabbit ova recovered from ovarian follicles and inseminated in vitro. *Fertil. Steril.*, 26, 665-685.
- 18) Hadek, R. (1963): Submicroscopic study on the cortical granules in the rabbit ovum. *J. Ultrastruct. Res.*, 8, 170-175.
- 19) Hosoe, M., Niimura, S. and Ishida, K. (1992): Changes of cortical granules in hamster oocytes during folliculogenesis and meiotic maturation. *Anim. Sci. Technol. (Jpn.)*, 63, 1253-1258.
- 20) Wolf, D.P. (1981): The mammalian egg's block to polyspermy. In *Fertilization and Embryonic Development In Vitro* (Mastrianni, L. Jr. and Biggers, J.D., eds.) p183-197, Plenum Press, New York.
- 21) Fléchon, J-E., Huneau, D., Solari, A. and Thibault, C. (1975): Réaction corticale et blocage de la polyspermie dans l'oeuf de lapine. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, 15, 9-18.

ウサギ卵母細胞における表層粒の成熟分裂に伴う変化

新村末雄・細江実佐

新潟大学農学部家畜生産学教室, 新潟市 950-21

卵核胞期の卵母細胞と交配後 6, 9 および 12 時間のウサギ卵母細胞について, 表層粒の分布と密度が成熟分裂の再開に伴ってどのように変化するかを, LCA を用いてレクチン組織化学的に観察した。併せて, 卵核胞期の卵母細胞を培養し, 体外で成熟過程にある卵母細胞についても表層粒の変化を観察した。LCA に陽性の表層粒は, 卵核胞期と交配後 6 時間の卵母細胞では少なく, 細胞質全域に分布していた。交配後 9 時間の卵母細胞では表層粒は増加したが, 分布状態は変化しなかった。交配後 12 時間の排卵直後の卵母細胞では表層粒はさらに増加し, 主として細胞質表層に分布していたが, 細胞質表層には小型の表層粒を欠く領域(cortical granule-free domain: CGFD) がみられた。一方, 成熟培養した卵母細胞において, 表層粒の分布と密度の状態は体内で成熟過程にあるものとはほぼ同様であったが, 培養後 9 時間の卵母細胞の約半数では, 表層粒は主として細胞質表層に分布しており, 細胞質表層に CGFD を有していた。

Effects of Calf Serum and Bovine Serum Albumin on the Compaction of the Early Rat Embryos

Reiko NAKAMICHI, Shigeki OHBOSHI and Noboru FUJIHARA

Laboratory of Animal Reproduction, Department of Animal Sciences,
College of Agriculture, Kyushu University
46-06, Higashi-ku, Hakozaki, Fukuoka 812

Abstract: Effects of calf serum (CS) and bovine serum albumin (BSA) on the compaction of 8-cell rat embryos were investigated. Brief culture of pre-compacted 8-cell rat embryos with a medium containing CS led to 100% compaction of the embryos. In contrast, BSA-treated and untreated (control) embryos showed no signs of cell flattening (compaction) even after 12 h of culture. Approximately 30% of the CS-treated embryos developed into the blastocysts following 18 h of incubation, and around 80% resulted in blastocyst stage after 24 h of culture. These results suggest that the development of rat 8-cell embryos is probably influenced by CS which may have some factor(s) responsible for the stimulation of compaction. **Key Words:** rat, 8-cell embryos, blastocysts, calf serum, compaction (Received 7 January 1994, Accepted 17 February 1994)

Introduction

At the 8-cell stage, the blastomeres of the preimplantation mouse embryo undergo a dramatic shape change, i.e. compaction. It is believed that the events of compaction have an important influence on the process involved in blastocyst formation¹⁾. During compaction, the cells flatten against one another, thus maximizing intercellular contact and obscuring intercellular boundaries²⁾. This process involves major changes in the physical relationships between the constituent cells of the embryos with establishment of gap junctional communication^{1,3,4,5)}. A number of substances have been indentified which affect the formation and permeability of gap junctions. Some of these reduce the rate of junction formation (e.g. removal of serum from medium), while others increase the rate (e.g. addition of retinoic acid)⁶⁾.

In this paper, we describe the effects of calf serum (CS) and bovine serum albumin (BSA) on the compaction and embryonic development of rat 8-cell embryos.

Materials and Methods

Medium for culture : The basic medium used for embryo culture was a modified HECM (hamster embryo culture medium)-2⁷⁾. The difference in the chemical composition of this medium is shown in Table 1. For the experiment, 1% (v/v) CS and 1 mg/ml BSA was supplemented with the basic medium.

Collection of embryos : Female SD rats (9–11 weeks of age) kept under controlled light (12 h light and 12 h dark) and temperature (20–22°C) were used. The females having regular estrous cycles were mated with the same strain males. Day 1 of pregnancy was designated by the presence of sperm in vaginal smear. Around 0400–0500 on Day 4, 8-cell embryos were flushed from the oviducts with the basic medium.

In vitro culture : Only well developed 8-cell embryos (pre-compaction) were collected. Each embryo was transferred to a 100 μ l drop of the desired culture media covered with white mineral oil (Katayama Chemical, Japan) using plastic 12 well plates (Corning 2588-12). The plates were equilibrated for at least 10 h in a humidified gas phase of 5% CO₂ in air at 37°C before the culture of the embryos. The embryos were cultured for 30 h, observing their development every 6 h.

Statistical analysis : All the data were subjected to statistical analysis using chi-square test⁸⁾.

Results and Discussion

Rat 8-cell embryos cultured for 6 h in the medium containing CS were fully (100%) compacted, whereas few embryos from BSA-treated (5.6%) and control (0.0%) groups showed signs of cell flattening after 6 h of culture. Only a few compactioning embryos were observed in the BSA-treated (16.7%) and control (18.7%) embryos following 12 h of culture, but even in these groups, most of the embryos were compacted after 18 h of incubation (94.4% and 93.8%, respectively). After 18 h of culture, some (31.6%) of the CS-added embryos developed into blastocysts, while none of the BSA-treated and control embryos did so. At this time of incubation, most of the BSA-treated (94.4%) and control (93.8%) groups were still flattened. In the BSA-treated and control embryos, blastocysts were first observed after 24 h of incubation (55.6% and 43.8%, respectively). On the other hand, few embryos of the CS-supplemented group developed to the stage of expanded or hatched blastocysts and most of these were degenerated. From the present results, it is likely that in the presence of CS, blastomeres of the 8-cell stage rat embryos were able to compact. In contrast, in the BSA-added and control groups, the blastocyst formation

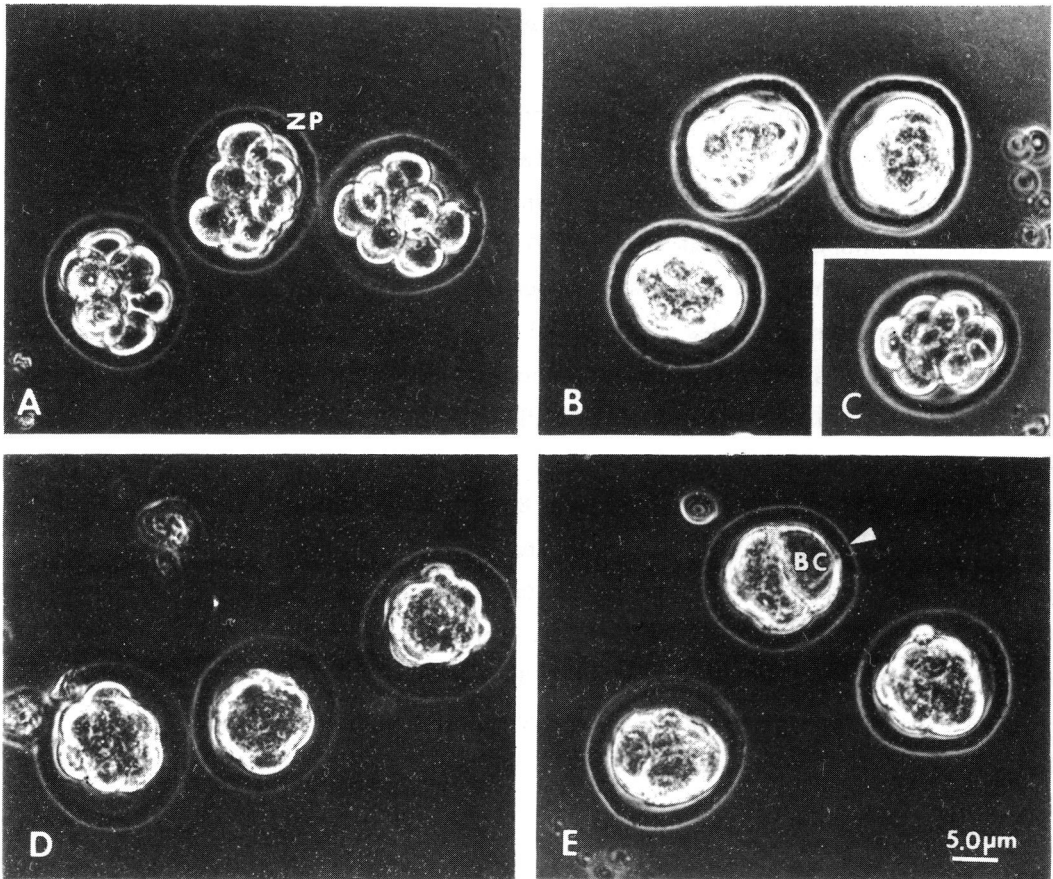


Figure 1. Photographs of 8-cell and compacted embryos in rats. These photographs show that embryos cultured with well plate were collected in culture dish for taking picture: A) Freshly collected 8-cell embryos. B) Flattened 8-cell embryos cultured for 6 h in CS-supplemented medium. C) Note flattened 8-cell embryos cultured for 6 h in BSA-treated medium. D) BSA-treated embryos cultured for 18 h. Note that blastomeres are flattened. E) CS-added embryos cultured for 18 h. The arrowhead points to the early blastocyst. ZP: zona pellucida, BC: Blastocoele. All the pictures were taken by the same magnification and then scale bar indicates 5.0 μ m.

was not found until 24 h of culture, suggesting that BSA may have no positive effect on the development of the rat 8-cell embryos.

Compaction is considered to be a fundamental event in mammalian development and leads to the formation of blastocyst. In the early mouse embryos, compaction involves major change in the physical relationships between the constituent cells of embryos such as Ca-dependent cell-cell adhesion system ^{1,9,10)}. In the course of compaction, cells have been shown to possess gap junctions and zonular apical tight

junctions. Following fertilization, gap junction structures are first detected in 8-cell stage mouse embryos^{1,5)}. This phenomenon is in agreement with the electrophysiological detection of gap junctional communication amongst most of the blastomeres of the early 8-cell embryo just prior to compaction^{3,4)}. Furthermore, Lee¹¹⁾ described that communication through gap junctions may be involved in the maintenance of compaction. Our present results suggest that CS probably increase the formation of junction and communication through gap junctions, resulting in the stimulation of development of the rat 8-cell embryos. This also indicates that CS may have some factor (s) responsible for inducing the compaction of the early rat embryos.

Table 1. Composition of modified hamster embryo culture medium.

Component	mM	Component	mg/L
Basic medium:		Amino acids:	
NaCl	98.0	L-arginine·HCl	63.20
KCl	3.2	L-cysteine	12.00
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.0	L-histidine HCl·H ₂ O	21.00
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.5	L-isoleucine	26.25
NaHCO ₃	25.0	L-leucine	26.20
		L-lysine·HCl	36.25
Na lactate	10.0	L-methionine	7.55
Na pyruvate	0.2	L-phenylalanine	16.50
glucose	5.0	L-threonine	23.80
		L-tryptophan	5.10
		L-tyrosine	18.00
		L-valine	23.40
		L-glutamine	146.15

pH=7.2

Table 2. Effects of calf serum (CS) and bovine serum albumin (BSA) on the compaction and subsequent development of rat 8-cell embryos *in vitro*.

		No. (%) of embryos developed to									
		Incubation time (h)									
		6		12		18		24		30	
Treatment	No. of embryos	8-cell embryos	Compacted morula	8-cell embryos	Compacted morula	Compacted morula	Blasto-cyst	Compacted morula	Blasto-cyst	2Blasto-cyst	
Control	16	16 ^a (100.0)	0 ^a (0.0)	13 ^a (81.3)	3 ^a (18.7)	15 ^{ab} (93.8)	0 ^{ab} (0.0)	9 ^a (56.2)	7 ^a (43.8)	15 ^a (93.8)	
BSA [*]	18	17 ^a (94.4)	1 ^a (5.6)	15 ^a (83.3)	3 ^a (16.7)	17 ^a (94.4)	0 ^a (0.0)	7 ^{ab} (38.9)	10 ^a (55.6)	15 ^a (83.3)	
CS [*]	19	0 ^b (0.0)	19 ^b (100.0)	0 ^b (0.0)	19 ^b (100.0)	13 ^b (68.4)	6 ^b (31.6)	3 ^b (15.8)	15 ^a (78.9)	15 ^a (78.9)	

^{*} BSA : 1mg/ml, CS : 1% (v/v).^{**} Values within a column with different superscripts are significantly different (χ^2 , $P < 0.05$).

References

- 1) Ducibella, T. and Anderson, E (1975): Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo: prerequisites for morphogenesis of the blastocyst. *Dev. Biol.*, 47, 45-48.
- 2) Pratt, H. P. M., Ziomek, C. A., Reeve, W. J. D. and Johnson, M. H. (1982): Compaction of the mouse embryo: an analysis of its components. *J. Embryol. exp. Morph.*, 70, 113-132.
- 3) Goodall, H. and Johnson, M. H. (1982): Use of carboxyfluorescein diacetate to study formation of permeable channels between mouse blastomere. *Nature*, 295, 524-526.

- 4) Goodall, H. and Johnson, M. H. (1984): The nature of intercellular coupling within the preimplantation mouse embryo. *J. Embryol. exp. Morph.*, 79, 53-76.
- 5) Nishi, M., Kumer, N. M. and Gilula, N. B. (1991): Developmental regulation of gap junction gene expression during mouse embryonic development. *Dev. Biol.*, 146, 117-130.
- 6) Macdonald, C. (1985): Gap junctions and cell-cell communication. *Essays in Biochem.*, 21, 86-118.
- 7) Seshagiri, P. B. and Bavister, B. D. (1989): Phosphate is required for inhibition by glucose of development of hamster 8-cell embryo in vitro. *Biol. Reprod.*, 40, 607-614.
- 8) Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. (1980): Principles and Procedures of Statistics. 3rd ed., McGraw-Hill, New York, pp. 469-520.
- 9) Richa, J., Damsky, C. H., Buck, C. A., Knowles, B. B. and Solter, D. (1985): Cell surface glycoproteins mediate compaction, trophoblast attachment, and endoderm formation during early mouse development. *Dev. Biol.*, 108, 513-521.
- 10) Johnson, M. H., Maro, B. and Takeichi, M. (1986): The role of cell adhesion in the synchronization and orientation of polarization in 8-cell mouse blastomeres. *J. Embryol. exp. Morph.*, 93, 239-255.
- 11) Lee, S., Gilula, N. B. and Warner, A. E. (1987): Gap junctional communication and compaction during preimplantation stages of mouse development. *Cell*, 51, 851-860.

ラット初期胚のコンパクションに及ぼすウシ血清 及びウシ血清アルブミンの影響

仲道麗子・大星茂樹・藤原 昇

九州大学農学部畜産学科家畜繁殖生理学研究室, 福岡市 812

SD 系雌ラットの妊娠 4 日目に卵管から採取した 8-細胞期胚を, ウシ血清 (CS) 及び血清アルブミン (BSA) を添加した HECM-2 培養液で培養し, 胚のコンパクションとその後の発育について検討した。CS を添加することによって, 胚の発育は著しく促進され, 培養開始後 6 時間ですべての胚にコンパクションがみられた。これに対し, BSA 区および対照区の胚の発育は僅かに遅れたが, 培養時間が進むにつれて徐々に回復し, 18 時間培養後には両区とも 90% 以上の胚がコンパクションを起こした。次に, 80% 以上の胚が胚盤胞にまで発育する時間を比較すると, CS 区では 24 時間, BSA 区並びに対照区では 30 時間であった。しかし, CS 区の場合, さらに継続培養を行っても拡張胚盤胞あるいは孵化胚盤胞に到達する胚は少なく, 多くの胚は退行変性した。これらの結果から, CS はラット初期胚 (8-細胞期胚) のコンパクションを促進するものと考えられた。

Hexokinase Activity of Bovine Embryos Produced from IVM - IVF System and Their Subsequent Development

Z. Y. RYOO and S. SUGAWARA

Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Agriculture,
Tohoku University, Sendai 981

Abstract: To investigate the Embden - Meyerhof pathway (EMP) in bovine embryos, individual 1-cell to blastocyst stage embryos produced from in vitro maturation (IVM) and in vitro fertilization (IVF) systems were subjected to measure hexokinase activity using a cyclin enzyme method. In the present study, we found that Ca^{++} , Mg^{++} -free phosphate buffered saline, PBS(-), could be used as a reaction solution instead of Tris - HCl buffer and that after measurement the viability of the embryo could be maintained followed by subsequent development. When measured by adding glucose as a substrate, hexokinase activity was 227.9 ± 18.6 , 261.9 ± 19.0 , 337.8 ± 29.8 , 241.8 ± 37.7 and $252.2 \pm 17.7 \times 10^{-9}$ mol/embryo/hr in the 2-cell, 4-cell, 8-cell, morula and blastocyst stage embryos, respectively, indicating a significant difference between embryos at the 2-cell stage and those at more advanced stages ($P < 0.05$). In embryos at all stages examined, the level of hexokinase activity was increased by adding the substrate. When subsequent development after measurement was examined using the 4-cell stage embryos, the development rate to the blastocyst stage was not significantly correlated to the hexokinase activity. The results suggest that the onset of glucose metabolism in the early embryos may be directly related to the synthesis of one or more key glycolytic enzyme, **Key Words:** Embden-Meyerhof pathway, enzyme cycling method, hexokinase, bovine embryo (Received 10 October 1993, Accepted 8 February 1994)

Introduction

Glucose is a 6-carbon molecule that occupies a central position as a substrate for both energy production and synthesis of complex molecules. After entry into the cell and phosphorylation to glucose-6-phosphate (G6P), glucose enters several major pathways. The Embden-Meyerhof pathway (EMP) comprises the initial steps for glucose catabolism and the generation of ATP. Several studies

have qualitatively estimated the EMP and pentose phosphate pathway (PPP) activity of embryos in rabbits^{1,3)}, mice^{2,5)} and rats⁴⁾ using glucose radiolabeled at the first and sixth positions of its carbons; the ratio of C-1 and C-6 was determined. Javed and Wright⁶⁾ determined the quantitation of the EMP and PPP activity in bovine embryos by measuring $^{14}\text{CO}_2$, $^3\text{H}_2\text{O}$ and total glucose metabolism through mathematical calculations. In pigs^{7,8)}, using the same procedure, glucose metabolism of in vivo derived preimplantation embryos via both glycolysis (Embden-Meyerhof pathway; EMP) and PPP was measured. Neither study however, followed subsequent development of the embryos after measurement of the EMP and PPP activity. On the other hand, recently, an enzymatic cycling method of the pyridine nucleotide⁹⁾, in which an oxidized or reduced form of the nucleotide produced by the enzyme reaction amplified by a cyclic process, has been applied in order to assay enzyme activity in a fresh single embryo^{10,11)}.

The objective of the present study was to investigate the glycolytic activity of bovine embryos produced from the IVM-IVF system by measuring the activity of hexokinase, which catalyzes glucose as the first step of glycolysis, and its involvement in the developmental capacity of the embryo.

Materials and Methods

Preparation of embryos : The ovaries were collected from cows at a local slaughterhouse and under warm conditions (about 33°C) transported to the laboratory within 1 hour. The oocytes were aspirated from small follicles (2 to 5 mm in diameter) with an 18 gauge needle attached to a 10 ml syringe. Morphologically normal oocytes with dense layers of cumulus cells were used in the experiment. Twenty-five to 30 oocytes were cultured for 22 hours in 350 μl droplets of TCM-199 (Nissui Co., Japan) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Gibco Lab., USA) covered by paraffin oil (Nacalai Chemicals Co., Japan) in a dish (60 x 15mm, Nunc Co., Denmark) under a highly humidified condition (5% CO_2 , 95% air, 38.5°C). After in vitro maturation, the oocytes were inseminated with sperm suspension (5×10^6 cells/ml) in BO medium¹²⁾ containing 10 mM caffeine plus 1% BSA. The sperm suspension was prepared by the following procedure ; after thawing at 33°C, 1.5ml of commercially purchased frozen semen was suspended in 5ml of BO medium containing 10 mM caffeine plus heparin (10 $\mu\text{g/ml}$) and then washed three times by centrifugation for 8 min at 450xg under room temperature. Six hours after insemination, all ova were washed with TCM 199 and co-cultured with a monolayer of cumulus cells in droplets of TCM 199 containing 5% FCS for 1 to 7 days under

the above condition.

Measurement of hexokinase activity in the embryos : All assays for hexokinase were carried out on individual embryos at different cell stages by an enzyme cycling method¹³⁾. In brief, a reaction mixture for hexokinase contained 5 mM glucose, 0.6 mM NADP⁺, 6 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.05% (w/v) BSA and 6 μ l/ml G6PDH in Ca⁺⁺, Mg⁺⁺-free phosphate buffed saline [PBS (-), pH 7.3] or 100 mM Tris -HCl buffer (pH 8.0). Individual embryos were transferred into a 1 μ l drop of the reaction mixture under paraffin oil and incubated at 37°C for 20 min. The 4-cell stage embryos were then co-cultured under the above conditions and their subsequent development was examined. Immediately after removal of the embryos, 1 μ l of 0.2 M NaOH was added to the reaction mixture to stop the reaction and destroy unreacted NADP⁺. Two μ l of this reaction mixture were placed in 1 μ l of a cycling reaction mixture and incubated at 37°C for 1 hour. The cycling reaction mixture consisted of 5 mM α -ketoglutarate, 1 mM G6P, 25 mM ammonium acetate, 0.1 mM ADP, 0.02% BSA, 7.88 μ g/ml G6PDH and 103 μ g/ml glutamate dehydrogenase (GLDH : EC 1.4.13) in 100 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. After adding an indicative reaction mixture to oxidize 6-phosphogluconate produced, the fluorescence of each sample was measured with a CAM-220 (Fluorometer, Nikon, UV Fluor x20). Hexokinase activity was indicated as a production of NADPH in mol/embryo/hour.

Statistical analysis : The significance of data between cell stages was analyzed by Student's t-test by means of G6PDH activity or chi-square analysis for development rate in relation to the activity.

Results

In the preliminary examination, hexokinase activity of 2 to 4-cell stage embryos was generated at about the same level in PBS(-) or Tris-HCl buffer as an enzymatic reaction mixture, but the embryos in Tris-HCl buffer (pH 8.0) did not develop after measuring of enzyme activity (Table 1). Table 2 shows hexokinase activity of bovine embryos from the 2-cell to the blastocyst stage. When measured by adding glucose as a substrate, hexokinase activity was 227.9 ± 18.6 , 261.9 ± 19.0 , 337.8 ± 28.9 , 241.8 ± 37.7 and $252.2 \pm 17.7 \times 10^{-3}$ mol/embryo/hr in the 2-cell, 4-cell, 8-cell, morula and blastocyst stage embryos, respectively. Among these, there was significant difference between embryos at 2-cell stage and those at more advanced stages ($P < 0.05$). At any cell stage, NADPH was generated at a high level in the reaction when glucose was added as a substrate. Hexokinase activity of bovine

Table 1. Hexokinase activity of bovine 2- to 4-cell stage embryos using either Tris-HCl buffer or PBS(-)

Enzyme reaction medium	Cell stage	No. of embryos measured	Hexokinase activity* ($\times 10^{-9}$ mol/embryo/hr)
Tris-HCl	2-cell	8	177.9 \pm 23.1
	4-cell	10	233.3 \pm 21.7
PBS(-)	2-cell	8	233.1 \pm 22.0
	4-cell	10	292.1 \pm 44.1

*Mean \pm SE

Table 2. Hexokinase activity of bovine embryos with or without the substrate (Glucose)

Cell stage	Glucose conc. (mM)	No. of embryos measured	Hexokinase activity* ($\times 10^{-9}$ mol/embryo/hr)
2-cell	0	8	152.8 \pm 17.5 ^a
	5	8	227.9 \pm 18.6 ^a
4-cell	0	10	227.6 \pm 30.2 ^a
	5	13	261.9 \pm 19.0 ^b
8-cell	0	10	283.0 \pm 27.4 ^b
	5	10	337.8 \pm 28.9 ^c
Morula	0	8	176.3 \pm 21.6 ^{a,d}
	5	7	241.8 \pm 37.7 ^{b,d}
Blastocyst	0	8	225.0 \pm 31.2 ^{b,d}
	5	9	252.2 \pm 17.7 ^b

^{a,b,c,d} Different superscripts within a column differ significantly ($P < 0.05$).

*Mean \pm SE

embryos at 1,2,4,8-cell, morula and blastocyst stages ranged from 234.7 \pm 18.9 to 360.0 \pm 35.7 ($\times 10^{-9}$ mol/embryo/hr). The hexokinase activity increased with development, peaked at the 8-cell stage and then became stable (Table 3).

In the experiment, in which subsequent measurement for enzyme activity was examined using the 4-cell stage embryos, the range of the hexokinase activity among 4-cell stage embryos examined was from 80.0 to 370.0 $\times 10^{-9}$ mol/embryo/hr. When the embryos were classified into five categories on the basis of their hexokinase activity, there was no significant relationship between the activity and developmental ability to the blastocyst stage (Table 4).

Table 3. Hexokinase activity at different cell stages and subsequent development of bovine embryos in presencence of substrate

Cell stage	No. of embryos measured and then cultured	Hexokinase activity* ($\times 10^{-9}$ mol/embryo/hr)	No. of blastocyst (%)
1-cell**	16	234.7 \pm 18.9 ^a	—
2-cell	14	241.3 \pm 10.9 ^a	4 (28.6)
4-cell	13	279.9 \pm 16.6 ^a	5 (38.4)
8-cell	10	360.0 \pm 35.7 ^b	5 (50.0)
Morula	7	291.5 \pm 19.7 ^{a,b}	6 (85.7)
Blastocyst	8	277.9 \pm 13.2 ^a	—

*Different superscripts within a column differ significantly (P<0.05).

*Mean \pm SE

**These embryos were not culture after measurement

Table 4. Relationship between hexokinase activity and subsequent developmental ability of bovine 4-cell embryos to blastocyst

Range of hexokinase activity* ($\times 10^{-9}$ mol/embryos/hr)	No. of embryos measured and then cultured	No. of developed to		
		8-cell	Morula	Blastocyst (%)
80.0-130.0	5	4	2	1 (20.0)
135.0-180.0	7	4	1	1 (14.3)
190.0-250.0	18	14	8	6 (33.3)
250.0-300.0	14	10	7	5 (35.7)
310.0-370.0	7	5	2	2 (28.6)
Control**	53	41	31	23 (43.4)

*Mean \pm SE

**Hexokinase activity was not measured of in these embryos.

Discussion

In the prasent study, using the enzyme cycling method, we measured hexokinase activity in the bovine embryos produced from an IVM-IVF system to evaluate the involvement of EMP during early development. We found that Ca^{++} , Mg^{++} -free phosphate buffered saline, PBS(-), could be used as a reaction solution instead of Tris-HCl buffer and that after measurement, the viability of the embryo could be maintained, followed by subsequent development. Hexokinase activity increased with develoment, peaked at the 8-cell stage and then became stable.

Javed and Wright⁶⁾ reported that in good quality bovine embryos much of the glucose metabolism before 16-cell stage occured via the PPP and that total glucose utilization increased drastically at the morula stage with a predominance of the glycolytic pathway, e.g. EMP. Our results are substantially consistent with their

results. Rieger & Guay¹⁴⁾ concluded that in bovine blastocysts, glucose is metabolized by the pentose shunt and the Embden-Meyerhof pathway, although glycolysis is blocked due to an inhibition of pyruvate kinase. These studies and the present study suggest that the pattern of glucose utilization during the preimplantation stage in bovine embryos is similar to those in porcine⁷⁾ and ovine¹⁵⁾ embryos.

The level of hexokinase activity was increased by adding glucose as a substrate, in any cell stage embryo. These results indicate that a facilitated glucose entry mechanism of bovine embryos is present from the first cleavage division onwards and glucose is effective as an energy source for the bovine embryo.

In the present study, we did not observe a correlation between hexokinase activity and development rate from the 4-cell to the blastocyst stage, and we did not examine the pregnancy rate after transfer.

A part of this study was supported by the scientific grants (No.02404018) from Japanese Ministry of Education, Science and Culture (Japan).

References

1. Friedhandler, L. (1961): Pathways of glucose metabolism in fertilized rabbit ova at various preimplantation stages. *Exp.Cell.Res.*, 22: 303-316.
2. Brinster, R. L. (1967): Carbon dioxide production from glucose by the preimplantation mouse embryo. *Exp.cell Res.*, 47:271-277.
3. Brinster, R. L. (1968): Carbon dioxide production from glucose by the preimplantation rabbit embryo. *Exp.cell Res.*, 51:330-334.
4. Sugawara, S. and Takeuchi, S. (1973): On glycolysis in rat eggs during preimplantation stages. *Tohoku J.Agric.*, 24:76-85.
5. Clough, J. R. and Whittingham, D. G. (1983): Metabolism of [¹⁴C] glucose by postimplantation mouse embryos in vitro. *J.Embryol.Exp.Morphol.*, 74:133-142.
6. Javed, M. H. and Wright, R.W., Jr. (1991): Determination of pentose phosphate and Embden-Meyerhof pathway activities in bovine embryos. *Theriogenology*, 35:1029-1037.
7. Flood, M. R. and Wiebold, J. L. (1988): Glucose metabolism by preimplantation porcine embryos. *J.Reprod.Fertil.*, 84:7-12.
8. Selgrath, J. P., Flood, M. R. and Wright, R. W., Jr. (1989): Glucose utilization by enzymatically formed trophoblastic vesicles and day-14 porcine blastocysts. *Theriogenology*, 32:37-43.
9. Lowry, O. H. and Passoneau, J. V. (1972): A Flexible System of Enzymatic

Analysis. Academic Press, New York.

10. Brinster, R. L. (1971): Measuring embryonic enzyme activity. In "Method in mammalian embryology", (Daniel, J. C., Jr.ed), pp.215-227 Freeman, San Francisco.
11. Barbehenn, E. K., Wales, R. G. and Lowry, O. H. (1978): Measurement of metabolites in single preimplantation embryos; a new means to study metabolic control in early embryos. J.Embryol.Exp.Morph., 43:29-46.
12. Brackett, B. G. and Oliphant, G. (1975): Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. Biol.Reprod., 12:260-274.
13. Koike, M., Sugawara, S. and Masaki, J. (1990): Methodology for measurement of 6-phosphogluconate dehydrogenase activity in fresh rat ovum. Jpn. J. Anim. Reprod., 36:171-175, (in Japanese).
14. Rieger, D. and Guay, P. (1988): Measurement of the metabolism of energy substrates in individual bovine blastocysts. J.Reprod.Fertil., 83:589-591.
15. Thompson, J. G. E., Simpson, A. C., Pugh P.A., Wright, R. W., Jr., and Tervit, H. R. (1991): Glucose utilization by sheep embryos derived in vivo and in vitro. Reprod.Fertil. Dev., 3:571-576.

体外成熟・受精系由来ウシ胚のヘキソキナーゼ活性と 発生能との関係

柳 在雄・菅原七郎

東北大学農学部動物生殖科学講座, 仙台市 981

ウシ初期胚の解糖系 (EMP) を解析するために体外成熟・受精系で生産された1細胞期から胚盤胞期の胚を用い酵素周期法によりヘキソキナーゼ活性を測定した。本研究ではトリス緩衝液の代わりに Ca^{++} Mg^{++} イオンを除いた磷酸緩衝液 (PBS-) を反応液として胚1コ当たりの酵素活性を測定した後、胚は培養を継続し、その発生能を調べた。グルコース添加時の2, 4, 8, 桑実期、胚盤胞期のヘキソキナーゼ活性はそれぞれ 227.9 ± 18.6 , 261.9 ± 19.0 , 337.8 ± 28.9 , 241.8 ± 37.7 , $252.2 \pm 17.7 \times 10^{-9} \text{mol/embryo/hr}$ で、基質無添加時と比べ活性が高くなったが、8細胞期意外では有意差は認められなかった。4細胞期についてヘキソキナーゼ活性と発生能との件では酵素活性の度合と直接的な関係は認められず、活性の低いものでもほぼ同率に発生した。

In Vitro Culture of Bovine Nuclear Transplant Embryos in Modified Synthetic Oviduct Fluid Medium under Low Concentrations of Oxygen

Hozumi TANAKA, Mitsugu HISHINUMA,

Yoshiyuki TAKAHASHI, and Hiroshi KANAGAWA

Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine,
Hokkaido University, Sapporo 060

Abstract: Bovine nuclear transplant embryos were cultured in modified synthetic oviduct fluid medium (mSOF) in an atmosphere of 5% CO₂-5%O₂-90% N₂ at 39°C. The developmental rate of the reconstituted embryos was compared with that of embryos co-cultured with bovine oviduct epithelial cells (BOEC) under 5% CO₂ in air at 39°C. No significant difference was observed in the developmental rates to morula and blastocyst stages between the embryos cultured in mSOF under low concentrations of oxygen (16.0 and 9.0%, respectively) and those co-cultured with BOEC (12.0 and 5.0%, respectively). **Key Words:** bovine, nuclear transplant embryos, synthetic oviduct fluid, oxygen, oviduct epithelial cell (Receive 31 January 1994, Accepted 18 February 1994)

Introduction

The ability to produce large numbers of identical bovine offspring is of great importance for evaluation, selection and multiplication of genotypes with superior economic value. Since the first calf derived from nuclear transfer was reported¹¹⁾, a number of studies on nuclear transplantation of cattle embryos conducted to develop efficient and reliable methods have been reported^{2,12,19)}. Recently, the recipient cytoplasm and donor nuclei derived from in vitro maturation, fertilization and culture (IVM, IVF, IVC) have been used to produce reconstituted embryos^{15,16,20)}. Nuclear transplant embryos were cultured in CR-1aa¹³⁾. The developmental rate of embryos cultured in CR-1aa was compared with those co-cultured with bovine oviduct epithelial cells (BOEC) in TCM-199 and those cultured in ligated sheep oviducts¹⁰⁾. The method of co-culture with BOEC is generally used for in vitro culture but the procedure for co-culture of embryos with BOEC is complicated. The method of culture in synthetic oviduct fluid medium (SOF) is simple. McLaughlin et al.⁹⁾ cultured nuclear transplant embryos in SOF in a gas atmosphere of 5% CO₂-5% O₂-90% N₂. However, the developmental rate of embryos cultured in SOF under

low concentrations of oxygen has not been compared with those co-cultured with BOEC. In the present study, in vitro culture of bovine nuclear transplant embryos in modified SOF (mSOF) under low concentrations of oxygen was attempted to examine the utility of the method, and the developmental rates to morula and blastocyst stages were compared with those of embryos co-cultured with BOEC. Moreover, the present study was undertaken to examine the influence on the cell number of embryos cultured in mSOF under low concentrations of oxygen.

Materials and Methods

Nuclear Donor Embryos : Ovaries were collected from a slaughterhouse and brought to the laboratory within 4 hr after slaughter. Oocytes were collected by aspiration of antral follicles (2– 7mm in diameter) with an 18-gauge needle and a sterile syringe. Cumulus-oocyte complexes (COC) were washed twice with modified Tyrode's solution (TALP)¹¹. The oocytes were then matured in TCM-199 supplemented with Earle's salts, 25mM HEPES (Gibco, GrandIsland, NY, USA), 10% fetal calf serum (FCS, Gibco), $0.02 \mu\text{g ml}^{-1}$ FSH, $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ estradiol, $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ gentamycin (Sigma, St Louis, MO, USA) and $21.8 \mu\text{g ml}^{-1}$ pyruvate for 22 hr in an atmosphere of 5% CO₂ in humidified air at 39°C.

Frozen-thawed semen from one Holstein bull was used for in vitro fertilization. Frozen semen was thawed in a water bath at 35°C for 1 min. The motile sperm were separated using 45 and 90% Percoll (Gibco) diluted with an isotonic defined medium (BO)¹² supplemented with 13.9mM glucose and 1.25mM pyruvate by centrifugation at 700g for 20 min and subsequently washed using BO medium without bovine serum albumin (BSA, Sigma) by centrifugation at 500g for 5 min. The sperm were co-incubated with about 15 COC at the concentration of 5×10^6 cells ml⁻¹ in a 100 μl microdrop of BO medium containing 3mg ml⁻¹ BSA and 2.5mM theophylline and covered with paraffin oil for 18 hr under 5% CO₂ in air at 39°C. After removing cumulus cells by vortexing for 5 min, one-cell embryos were cultured in 50 μl microdrops of mSOF¹⁴ supplemented with 3mg ml⁻¹ BSA and $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ insulin (Sigma) for 116 hr under 5% CO₂-5% O₂-90% N₂ at 39°C. The embryos were then selected as donors for nuclear transfer. The average cell number of these embryos was 23.1 ± 3.0 (mean \pm SEM).

Recipient Cytoplasm : The COC collected from ovaries were matured in vitro for 20–22hr. After the cumulus cells were removed, the oocytes with a first polar body were selected as recipients. The oocytes were placed in micromanipulation drops of Dulbecco's phosphate- buffered saline (DPBS)¹⁸ containing 20% FCS, $5 \mu\text{g ml}^{-1}$

cytochalasin B (CB, Sigma) and $0.3 \mu\text{g ml}^{-1}$ nocodazole (Aldrich Chem., Milw, USA), and enucleated by removing the first polar body and the adjacent cytoplasm presumably containing the nuclear material¹¹⁾. Enucleation was confirmed by staining the oocytes with $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Hoechst 33342 (Sigma)¹⁷⁾. The enucleated oocytes were further cultured for a total of 42 hr from the beginning of maturation⁶⁾.

Nuclear Transfer and Membrane Fusion : The zona pellucidae of donor embryos were removed with 0.5% pronase (Actinase, Kaken Co., Tokyo, Japan) in DPBS. Blastomeres of donor embryos were isolated by pipetting the embryos in Ca^{2+} - Mg^{2+} -free DPBS. Nuclear transplantation was carried out as described by McGrath and Solter^{7,8)}. A blastomere of the donor embryo was introduced into the perivitelline space of the enucleated oocyte by an injection pipette ($35\text{--}40 \mu\text{m}$ in diameter) through a slit in the zona. The blastomere-oocyte complexes (BOC) were placed in an electrode chamber (BTX, San Diego, CA, USA) filled with 0.3 M mannitol containing 0.1 mM MgSO_4 , 0.05 mM CaCl_2 and 0.05 mg ml^{-1} of BSA. The BOC were aligned by exposure to alternating current (A.C.) pulses of 0.6 MHz, 10 V for 6 sec. Thereafter, two direct current (D.C.) pulses of 1.0KV cm^{-1} for 70 μsec (each pulse 1 sec apart) were applied for membrane fusion of the blastomere and enucleated oocytes⁴⁾ via an Electro Cell Fusion instrument (LF 100, Life Tec., Tokyo, Japan). About 15 BOC were cultured in a $50 \mu\text{l}$ drop of mSOF under 5% CO_2 -5% O_2 -90% N_2 at 39°C or co-cultured with BOEC in drops of TCM-199 supplemented with 10% FCS under 5% CO_2 in air at 39°C . The procedure for co-culture of embryos with BOEC was previously described by Eyestone and First⁵⁾. The fusion rate of BOC was examined after 1 hr and the cleavage rate of embryos was investigated after 24 hr of culture. The nuclear transplant embryos were cultured for 6 days (147 hr) and examined for development to the morula and blastocyst stages. All of the mSOF was replaced with fresh medium at 96 hr after fusion and half of the TCM-199 was replaced with fresh medium every 48 hr.

Cell Counting : The embryos that developed to morulae and blastocysts after 147 hr of culture were prepared for cell counting¹⁴⁾. Briefly, embryos were placed in 0.9% sodium citrate supplemented with 0.3% FCS for 15 min. They were then treated with fixative I (methanol:acetic acid:distilled water=10:3:7) and fixative II (methanol:acetic acid=3:1). After staining with 5% Giemsa (Merck, Darmstadt, Germany) at pH 6.8 for 5 min, the total cell number, including metaphase plates but excluding pyknotic nuclei, was counted under a microscope.

Statistical Analysis : The fusion rate of BOC and the cleavage and developmental rates of embryos were analysed by χ^2 test. The cell numbers of the embryos were

analysed by Student's *t* test.

Results and Discussion

In the present study, the donor nuclei and recipient cytoplasm were derived from IVM-IVF-IVC. The extrusion rate of the first polar body in the recipient oocyte was 73.1% at 20–22 hr postmaturation and the successful enucleation rate was 78.4%. The results of in vitro culture of the nuclear transplant embryos are shown in Tables 1 and 2. No significant difference was observed between the culture in mSOF without somatic cells and TCM-199 with BOEC in the proportions of fused oocytes (90.6 vs 87.0%), cleavage (74.1 vs 80.0%) and development to morulae (12.0 vs 16.0%) and blastocysts (5.2 vs 9.0%). The cell numbers of morulae and blastocysts were not significantly different between the two culture systems.

Table 1. In vitro development of nuclear transplant embryos^a

Type of culture	No. used	No. (%) oocytes fused	No. (%) embryos cleaved	No. (%) developed to ^b	
				morula	blastocyst
TCM-BOEC ^c	64	58(90.6)	43(74.1)	7(12.1)	3(5.2)
mSOF ^d	115	100(87.0)	80(80.0)	16(16.0)	9(9.0)

a: The results from 5 replicates were pooled.

b: No. embryos/ No. oocytes fused.

c: Coculture with bovine oviduct epithelial cells.

d: Modified synthetic oviduct fluid medium.

Table 2. Cell numbers of nuclear transplant embryos^a

Type of culture	Morula		Blastocyst	
	No.	Cell No.	No.	Cell No.
TCM-BOEC	7	22.0 ± 2.6	3	61.0 ± 7.1
mSOF	16	29.9 ± 3.6	9	114.8 ± 14.2

a: Mean ± SEM.

In co-culture with BOEC under 5% CO₂ in air, the developmental rates of reconstituted embryos to the morula and blastocyst stages have been reported to be 20 and 18%, respectively^{10,20}. The reconstituted embryos cultured in SOF under 5% CO₂-5% O₂-90% N₂ showed developmental rates of 11.7 and 8.6% to morula and blastocyst stages, respectively⁹ and were similar to the results of this study. Northey et al.¹⁰ reported no difference in the developmental rate of reconstituted embryos to morula and blastocyst stages between co-culture in TCM-199 with BOEC and culture in CR-1aa.

In conclusion, there was no difference in the development of reconstituted embryos to morula and blastocyst stages between culture in mSOF under 5% CO₂-5% O₂-90% N₂ and co-culture in TCM-199 with BOEC under 5% CO₂ in air. The present

study demonstrates that this method using mSOF can be used successfully to culture reconstituted embryos.

References

- 1) Bavister, B. and Leibfried, M. L. (1983): Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biol.Reprod.* 28, 235-247.
- 2) Bondioli, K.R., Westhusin, M. E. and Looney, C. R. (1990): Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology* 33, 165-174.
- 3) Brackett, B. G. and Oliphant, G. (1975): Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol.Reprod.* 12, 260-274.
- 4) Cheong, H. T., Taniguchi, T., Hishinuma, M., Takahashi, Y. and Kanagawa, H. (1991): Effects of various electric fields on the fusion and in vitro development of mouse two-cell embryos. *Theriogenology* 36, 875-885.
- 5) Eyestone, W. H. and First, N. L. (1989): Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. *J.Reprod.Fertil.* 85, 715-720.
- 6) Leibfried-Rutledge, M. L., Northey, D. L., Nuttleman, P. R. and First, N. L. (1992): Processing of donated nucleus and timing of post-activation events differ between recipient oocytes 24 or 42 hr of age. *Theriogenology* 37, 244.
- 7) McGrath, J. and Solter, D. (1983): Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 220, 1300-1302.
- 8) McGrath, J. and Solter, D. (1984): Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. *Science* 226, 1317-1319.
- 9) McLaughlin, K. J., McLean, D. M., Lewis, P. A., Hicks, L., Stevens, G., Bartsch, B. D. and Seamark, R. F. (1992): In vitro culture of bovine nuclear transfer embryos in synthetic oviduct fluid medium (SOFM). *Theriogenology* 37, 255.
- 10) Northey, D. L., Leibfried-Rutledge, M. L., Nuttleman, P. R., and First, N. L. (1992): Development of bovine nuclear transfer embryos in in vivo versus in vitro culture system. *Theriogenology* 37, 266.
- 11) Prather, R. S., Barnes, F. L., Sime, M. M., Robl, J. M., Eyestone, W. H., and First, N. L. (1987): Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocytes. *Biol.Reprod.* 37, 859-866.
- 12) Robl, J. M., Prather, R., Barnes, F., Eyestone, W., Northey, D., Gilligan,

- B. and First, N. L. (1987): Nuclear transplantation in bovine embryos. J. Anim. Sci. 64, 642-647.
- 13) Sime, M. M., Rosenkrans, C. F. Jr. and First, N. L. (1991): Development in vitro of bovine embryos derived from nuclear transfer. Theriogenology 35, 272.
- 14) Takahashi, Y. and First, N. L. (1992): In vitro culture of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. Theriogenology 37:963-978.
- 15) Takano, H., Koyama, K., Kozai, C., Kato, Y. and Tsunoda, Y. (1993): Effect of aging of recipient oocytes on the development of bovine nuclear transfer in vitro. Theriogenology 39, 909-917.
- 16) Ushijima, H. and Eto, T. (1992): Production of a calf from nuclear transfer embryos using in vitro matured oocytes. J. Reprod. Dev. 38, 61-65.
- 17) Westhusin, M. E., Levanduski, M. J., Scarborough, R., Looney, C. R. and Bondioli, K. R. (1990): Utilization of fluorescent staining to identify enucleated demi-oocytes for utilization in bovine nuclear transfer. Biol. Reprod. 42 (Suppl 1), 407.
- 18) Whittingham, D. G. (1971): Survival of mouse embryos after freezing and thawing. Nature 233, 125-126.
- 19) Wlladsen, S. M., Janzen, R. E., McAlister, R. J., Shea, B. F., Hamilton, G. and McDermid, D. (1991): The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. Theriogenology 35, 161-170.
- 20) Yang, X., Jiang, S., Farrell, D. and Foote, R. H. (1993): Nuclear transfer in cattle: Effect of nuclear donor cells, cytoplasm age, co-culture, and embryo transfer. Mol. Reprod. Dev. 35, 29-36.

低酸素下での修正合成卵管液によるウシ核移植胚の培養

田中穂積・菱沼 貢・高橋芳幸・金川弘司

北海道大学獣医学部家畜臨床繁殖学講座, 札幌市北区 060

本研究では、低酸素下での修正合成卵管液 (mSOF) によるウシ核移植胚の培養を行い、さらに、再構築の桑実期と胚盤胞期への発育率を、ウシ卵管上皮細胞との共培養と比較した。レシピエント細胞質には、体外成熟卵子を、ドナー核には、体外成熟・体外受精・体外培養由来胚の割球を使用した。桑実期と胚盤胞期への発育率は、それぞれ 16.0, 9.0% と 12.0, 5.0% で、低酸素下での修正合成卵管液による培養とウシ卵管上皮細胞との共培養との間で差は認められなかった。

血管収縮剤の局所的投与を伴うマウス胚の卵管移植

Improved Embryo Transfer into the Oviduct by Local Application
of a Vasoconstrictor in Mice

鈴木宏志¹⁾・上田乙也¹⁾・鎌田宣夫¹⁾・寺社下浩一¹⁾・加藤基恵²⁾・紫野正雄³⁾

Hiroshi SUZUKI¹⁾, Otoya UEDA¹⁾, Nobuo KAMADA¹⁾, Kouichi JISHAGE¹⁾,
Motoe KATO²⁾ and Masao SHINO³⁾

¹⁾ 中外製薬株式会社, 現所属: (株)CSKリサーチパーク, 静岡県御殿場市 412

²⁾ (財)食品薬品安全センター, 神奈川県秦野市 257

³⁾ 麻布大学獣医学部, 神奈川県相模原市 229

¹⁾ Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., Present address: CSK Research Park, Inc.,
Gotemba, Shizuoka 412

²⁾ Food and Drug Safety Center, Hatano 257 ³⁾ Azabu University, Sagami-hara 229

Abstract: Embryo transfer into the oviduct was improved by local application of a vasoconstrictor. Conventional embryo transfer into the oviduct (Conventional method), embryo transfer through the oviducal wall (Nakagata method) and embryo transfer into the oviduct by means of a vasoconstrictor (Vasoconstriction method) were compared by two technicians. In the Conventional method, the bursa over the infundibulum has a hole torn in it with watchmaker's forceps, In the Nakagata method, the oviducal wall is cut with a fine scissors and a pipette inserted into the oviduct. In the Vasoconstriction method, several microliters of the epinephrin solution (Bosmin) are applied onto the surface of the bursa before tearing a hole in it. Developmental rates after embryo transfer were not significantly different among three methods. By means of the vasoconstrictor, however, the percentage of time taken for introducing embryos was significantly reduced. Although results of postimplantation development after transfer tended to show that the Vasoconstriction method was more successful than those of the other methods, these differences were not significant. Development rates to newborns indicate that the application of a vasoconstrictor to the bursa does not affect the maintenance of pregnancy.

Key Words: mouse, embryo transfer, vasoconstrictor.

(受付 1993年12月19日, 受理 1994年1月21日)

緒 言

胚の卵管移植は、発生工学および生殖工学的技術として最も基本的な技術であるとともに、最も熟練を要する技術のひとつである。一般的に汎用されている卵管移植法¹⁻⁴⁾は、卵巣嚢をノエス剪刀あるいはピンセットを用いて切開し、その開口部から移植用ピペットを卵管采に挿入し、胚を注入するものであるが、卵巣嚢が毛細血管に富んでいることおよび卵管采の位置やその形状が個体によって様々であることが、この技術の困難さを招いているように思われる。卵管移植をより簡便化する試みとして電気メス⁵⁾あるいは双極電気凝固装置⁶⁾を用いた卵巣嚢の切開や経卵管壁卵管移植⁷⁾が報告されているが、これらはいずれも卵巣嚢からの出血を回避するために考案されてきた方法である。本実験では、卵管移植に際して卵巣嚢に血管収縮剤を塗布し、その有効性について検討した結果、良好な成績が得られたもので報告する。

材料および方法

移植胚にはヒトIL-6トランスジェニックマウス⁸⁾（背景はC57BL/6J）の体外受精卵を用い、受容雌にはICR系成熟雌マウスを用いた。体外受精は豊田ら⁹⁾の方法に準じて行い、卵管移植については、後述する条件以外は、既報¹⁰⁾に従って行った。授精後6時間および24時間のそれぞれ、前核期卵および2細胞期胚を陰栓確認日の受容雌の左右の卵管に8個ずつ、以下の3つの方法で2名（RosおよびOt）の術者が移植し、それぞれの術者が移植に要した時間の計測、着床数および生存産仔数についての観察を行った。卵管移植は、卵巣嚢を2本のピンセットで用いて引き裂く一般的な方法（Conventional法）³⁾、中瀉が開発した経卵管壁卵管移植法（Nakagata法）⁷⁾および卵巣嚢に数 μ lのエピネフリン製剤である血管収縮剤（ボスミン、Bosmin, 第一製薬）を塗布後、Conventional法と同様に、卵巣嚢を引き裂く（Vasoconstriction法）方法を比較検討した。一連の卵管移植の工程はFig.1に示す通りであるが、移植所要時間の計測は、皮膚の切開から縫合までの合計時間および左右それぞれの卵巣嚢の切開（卵管壁の切開）開始から胚の注入終了までの時間について行った。尚、術者Rosは、Conventional法に熟練しており、術者Otは、専らNakagata法を用いての卵管移植をルーチンワークとしていた。さらに、卵巣の血流量に及ぼすボスミンの影響を検討するために、麻酔下のICR系雌マウスの卵巣嚢に数 μ lのボスミンを塗布し、その30秒後にレーザー血流計（レーザーメドALF21, アドバンス社）を用いて血流量を測定し、ボスミン塗布前後における血流量の変化を比較した。尚、移植成績の統計学的処理には、 χ^2 検定を用いた。

結 果

術者RosおよびOtそれぞれのConventional法、Nakagata法およびVasoconstriction法による卵管移植所要時間は、Table 1に示す通りであった。術者Rosにおいては、平均移植所要時間がConventional法およびVasoconstriction法で、それぞれ5分55秒であり、両者に差は認められず、また、卵巣嚢切開から胚の注入終了までの平均時間も、Vasoconstriction法がわずか1秒短いのみであり、所要時間に及ぼす血管収縮剤の効果は認められなかった。また、術者

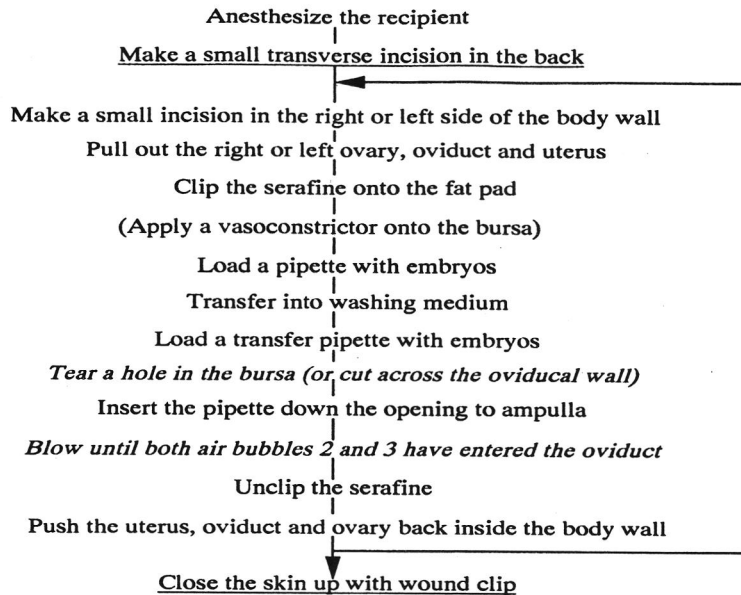


Fig. 1. Procedure of embryo transfer via oviduct

The time taken from making a incision in the back to closing the skin up (underlined) and from tearing a hole in the bursa or cutting across the oviducal wall to introducing the embryo (*italics*) was recorded.

Otにおいては、平均移植所要時間が最も短かったのは、Nakagata法の10分56秒であり、次いでVasoconstriction法の11分55秒で、この時間はConventional法に比べ1分35秒短い成績であった。この傾向は、卵巣嚢の切開あるいは卵管壁の切開開始から胚の注入時間までの時間（注入所要時間）においても認められ、最も短かったのはNakagata法の1分42秒であり、次いでVasoconstriction法の2分7秒、Conventional法の2分58秒の順であった。また、移植所要時間に占める注入所要時間の割合は、RosではConventional法およびVasoconstriction法

Table 1. Records of the time taken embryo transfer via the oviduct in mice

Technician ¹⁾	Methods	Mean time taken (range) from:				2B/A x 100
		n=	Making a incision in the back to closing the skin up (A)	n=	Tearing a bursa or cutting across a oviduct to introducing eggs (B)	
Ros	Conventional ²⁾	6	5' 55" (5' 33"-7' 01")	11	0' 42" (0' 16"-1' 25")	23.7
	Vasoconstriction ³⁾	7	5' 55" (5' 22"-8' 08")	14	0' 41" (0' 19"-2' 00")	22.8
Ot	Conventional ²⁾	3	13' 30" (11' 22"-14' 53")	14	2' 58" (1' 07"-9' 07")	44.0
	Nakagata ⁴⁾	3	10' 56" (9' 40"-12' 59")	14	1' 42" (0' 51"-4' 09")	31.1
	Vasoconstriction ³⁾	3	11' 55" (9' 10"-13' 32")	14	2' 07" (1' 07"-4' 23")	35.5

1) Ros is skilled in the conventional methods. Ot is inexperienced in the conventional method, while he carries out the embryo transfer by Nakagata method, routinely.

2) The bursa was torn by two pairs of watchmaker's forceps.

3) Several ul of the vasoconstrictor were applied onto the surface of bursa, and then the bursa was torn by two pairs of watchmaker's forceps.

4) The oviducal wall was cut across by a fine scissors and the pipette was inserted into the oviduct.

でそれぞれ、23.7%および22.8%であった。また、Otにおけるこの割合は、Nakagata法で31.1%であったがConventional法では44.0%と高い割合を占めていた。しかしながら、Vasoconstriction法では35.5%であり、血管収縮剤の使用によって、移植所要時間に占める注入所要時間の割合を、約10%低下させる効果が認められた。

Table 2 には、Conventional法、Nakagata法およびVasoconstriction法による卵管移植後の産仔への発生成績を示した。RosのConventional法およびVasoconstriction法による産子への発生率は、それぞれ67%および68%であり、また、OtのConventional法、Nakagata法およびVasoconstriction法による産子への発生率は、それぞれ、50%、52%および64%であった。RosおよびOtいずれ術者においても、Vasconstriction法が他の方法と比較して産仔への発生率および着床率が高い傾向であったが、移植方法の違いによる統計学的な有意差は認められなかった。また、ボスミン塗布による卵巣組織内の血流量の低下は極めて顕著であり、その血流量は、塗布前の46%にまで減少したが（Table 3）、移植成績は、血管収縮剤が移植後の妊娠維持に影響を及ぼさないことを示すものであった。

Table 2. Offsprings developed from hIL-6 transgenic mouse eggs fertilized in vitro and transferred into the oviduct of recipients

Technician	Methods	No. of eggs transferred	No. (%) of liveborns	No. (%) of implantation sites
Ros	Conventional	48	32 (67)	38 (79)
	Vasoconstriction	80	54 (68)	68 (85)
Ot	Conventional	48	24 (50)	27 (56)
	Nakagata	48	25 (52)	28 (58)
	Vasoconstriction	48	29 (64)	34 (71)

The eggs at pronucleus and 2-cell stage were transferred to the pseudopregnant recipients on day 0.

Table 3. Effect of vasoconstrictor on the blood flow of ovary in mice

Blood flow (ml/min/100g tissue)		% of reduction
0 sec ¹⁾	30 sec ¹⁾	
24	12	50
27	7	74
17	9	47
20	3	85
Mean		64

1) Measurement was performed by using laser flowmeter before and 30 sec after the application of vasoconstrictor.

考 察

卵管移植に際して、血管収縮剤の使用は極めて有効であった。術者Rosにおいては、血管収縮剤の使用は移植所要時間の成績に反映しなかったが（Table 1）、卵巣囊の血流量の減少により、血管走行に関係なく卵巣囊を切開することができるため、操作性は極めて良好であった。また、一般に行われている卵管移植法（Conventional法）、経卵管壁卵管移植法（Nakagata

法)および血管収縮剤の使用による卵管移植法(Vasoconstriction法)の三者を比較した術者Otの成績では、Otにとって習熟度の高いNakagata法が最も短時間で操作を終了し、移植所要時間に占める卵管壁切開から卵の注入終了までの注入時間の割合も31%と、他の二法と比較して小さいものであった。しかし、Vasoconstriction法とConventional法と比較してみると、前者が移植所要時間で約1分30秒、注入所要時間で約50秒程度、後者と比べ短時間で操作を終了しており、また、移植所要時間に占める注入所要時間の割合も10%程度の減少が認められた。血管収縮剤の塗布により、卵巢組織内の血流量は顕著に減少したが(Table 3),移植後の胚発生への影響は、全く認められなかった(Table 2)。本実験における術者間の移植成績の比較から、卵管移植に関しては、移植操作時間の短縮が、移植後の発生成績の向上を促す要因のひとつと考えられる。

文 献

- 1) 館鄰・横山峯介・館澄江(1981): 初期胚の移植, 哺乳動物の初期発生, (妹尾左知丸・加藤淑裕・入谷明・鈴木秋悦・館鄰編), pp.257-262, 理工学社, 東京.
- 2) 福田芳詔(1986): 卵子の移植法, 図説哺乳動物の発生工学実験法, (菅原七郎編) pp.127-133, 学会出版センター, 東京.
- 3) Hogan, B., Costantini, F. and Lacy, E. (1986): Manipulating the Mouse Embryo, pp.135-145, Cold Spring Harbor Laboratory.
- 4) 横山峯介(1987): 胚の移植, 発生工学実験マニュアル, (勝木元也編), pp.77-103, 講談社ライフサイエンティフィック, 東京
- 5) 鈴木宏志・新谷参郎・富樫守・宮井達也・岡本道生(1987): 肥満性糖尿病(bd/db)マウスの体外受精と産仔への発生能. 家畜繁殖誌, 33, 96-100.
- 6) 中潟直巳(1990): マウスおよびラット卵管内胚移植における卵巢囊切開術への双極電気凝固装置(bipolar coagulator)の応用. 実験動物, 39, 593-595.
- 7) 中潟直巳(1992): マウスにおける経卵管壁卵管内胚移植の試み. 実験動物, 41, 387-388.
- 8) Suematsu, S., Matsusaka, T., Matsuda, T., Ohno, S., Miyazaki, J., Yamamura, K., Hirano, T. and Kishimoto, T. (1992): Generation of plasmacytomas with the chromosomal translocation t(12;15) in interleukin 6 transgenic mice. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 89, 232-235.
- 9) 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. 家畜繁殖誌, 16, 147-151.
- 10) Jishage, K. and Suzuki, H. (1993): Maintenance of the fertilizing ability in capacitated mouse spermatozoa. J.Reprod.Dev. 39, 363-367

第 35 回

哺乳動物卵子学会

プ ロ グ ラ ム

大会長：佐 藤 和 雄

日本大学医学部教授

会 期 平成 6 年 4 月 27, 28 日
会 場 日本大学会館（東京都）

お 知 ら せ

第35回哺乳動物卵子学会および総会を開催致しますので、多数の皆様のご参加をお待ち致しております。

大会参加の方々へ

1. 参加費5,000円をお支払いの上、参加章に氏名と所属をご記入下さい。
2. 会場では、必ず参加章をお付け下さい。
3. 会員の方は、哺乳動物卵子学会誌11巻1号に本大会の抄録が掲載されていますので御持参下さい。

なお、当日、年会費（5,000円）をお支払いいただければ幸いです。

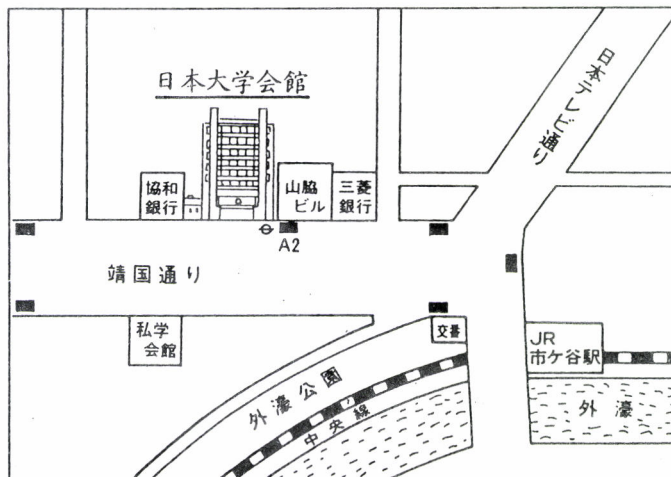
発表者の方々へ

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

懇親会のご案内

1. 懇親会を27日（水）午後6時00分から、私学会館5階で行います。多数の皆様のご出席をお待ちしております。
2. 懇親会にご出席の方は、参加費5,000円を当日お支払下さい。

会場のご案内



(J R 市ヶ谷駅下車 徒歩2分)
(営団、都営地下鉄市ヶ谷駅下車 徒歩2分)

日 程 表

時 刻

4 月 27 日

9:00	開 会 の 辞
9:05	
	一 般 講 演 1 ~ 11
11:30	
11:40	
	理 事 会
12:40	
13:00	
	会 長 講 演
13:40	
13:50	
	一 般 演 題 12 ~ 29
17:40	
18:00	
	懇 親 会
20:00	

時 刻

4 月 28 日

9:00	
	一 般 講 演 30 ~ 43
11:58	
12:10	
	評 議 員 会
13:00	
13:15	
	総 会
13:45	
13:55	
	一 般 講 演 44 ~ 48
14:55	
15:05	
	ワーキングショップ
17:35	
17:40	閉 会 の 辞

理事会：私学会館5階 赤城

一般講演，会長講演：日大会館大講堂

懇親会：私学会館（5階）穂高

評議員会：日大会館大講堂

総 会：私学会館5階 穂高

第35回 哺乳動物卵子学会 プログラム

会長講演

第1日 4月27日(水) 13:00~13:40

日本大学医学部教授 佐藤和雄

『卵の成熟と胚発生をめぐる話題』

座長 鈴木秋悦(慶応大・医)

ワークショップ

第2日 4月28日(木) 15:05~17:35

『卵子研究における新技術』

座長 佐藤英明(東大・医科研)

堤 治(東大・医)

1. 酵素的サイクリング法による卵および初期胚の代謝動態解析
○矢野 哲・綾部琢哉・堤 治・武谷雄二(東大・医)
2. 卵細胞内Ca²⁺の画像解析と共焦点レーザー顕微鏡
○白川英樹・白石浩一・宮崎俊一(東京女子医大・第二生理)
3. 培養法をによる胚培養の工夫—共培養について—
○根上 晃*・前田淳一・小林修一・富永敏朗(笠原病院・産婦*福井医大)
4. マウス卵子および胚発生におけるRT-PCR法の応用
○栃木明人・吉永陽樹・長岡美樹・橋本芳美・早川 智・坂元秀樹・
栃木武一・津端捷夫・佐藤和雄(日大・医)
5. 顕微授精によるウシ精子核の低温安定性の検討
○後藤和文・木之下明弘・中西喜彦(鹿児島大・農)
6. 哺乳類の受精における分子機構の解明とその応用
○森 庸厚・郭 卯戌・馬場 忠*・森 悦子・古川 清・高崎誠一
(東大・医科研, 筑波大・応用生系*)

一般演題

第1日 4月27日(9:05~11:27)

座長 久保春海(東邦大・医)

1. S Z I と I C S I の適応症例の比較
○高塚亮三・辻 敏徳・豊北美穂・藤波隆一・寺元章吉・道倉康仁・
加藤 修*(永遠幸マタニテクリニック, 加藤レデスクリニック*)
 2. 顕微受精の臨床評価
○栗田松一郎・田中 温・永吉 基・塩見秀明・田中威づみ・竹本洋一・
高崎博幸・井手紀子・有本恭子(セントマザー産婦人科医院)
 3. 重症男性不妊症における透明帯除去卵の受精と胚発育について
○栗田松一郎・田中 温・永吉 基・塩見秀明・田中威づみ・竹本洋一・
高崎博幸・井手紀子・有本恭子(セントマザー産婦人科医院)
- 座長 石島芳郎(東農大・生物産業)

4. 高齢雄マウス精子からの体外受精による産子の作出

○若山照彦・種村健太郎・須藤淳一*・今村憲吉*・福田勝洋*・
倉本和直**・九郎丸正道・林 良博（東京大・農、農水省・家衛試*、
都・老人研**）

5. 牛体外受精胚の着床前の発生速度と性

○板垣佳明・木村直子・山中昌哉・須藤鎮世（伊藤ハム・中研）

座長 佐藤嘉兵（日大・農獣医）

6. マウス体外受精における赤血球添加培養系の効果

○藤野祐司・松岡逸子・伊藤文俊・荻田幸雄・渡辺信和*・井上正康*
（大阪市大・医・産婦、生化*）

7. 野生マウス卵子の体外受精

○中瀧直己・上田 進・山内一也・土屋公幸*・岡本正則**・
松田洋一**・東 貞宏***・豊田 裕***
（日生研・宮崎医大*・放医研**・東大医科研***）

8. 豚卵管および子宮が豚体外受精卵子の発生に及ぼす影響

○吉川奈美・岩崎泰造・戸津川清（山形大・農）

座長 野田洋一（滋賀医大）

9. 受精とくに前核形成過程における蛋白質リン酸化の関与

○稲垣 昇・山森尚子・遠藤芳広*・大隅一興**・大庭三紀子***・
鈴木秋悦・野澤志郎（慶応大・医、遠藤クリニック*、
三菱油化ビーシーエル**、森永乳業・生科研***）

10. P Z D, Z D, Zona thinning 法のマウス胚hatchingへの影響

○矢沢浩之・柳田 薫・星 和彦・渡辺美佳・吉松宣弘・佐藤 章
（福島県立医大・産婦）

11. マウス雄胎子期生殖細胞由来核移植卵の発生能に及ぼす電気刺激ならびに成長因子の影響

○角田幸雄・加藤容子（近畿大・農）

一般演題

第1日 4月27日(13:50~17:36)

座長 葛西孫三郎（高知大・農）

12. ラット1細胞期胚の発生におよぼすPHAレクチンの効果

○山田雅保・内海恭三（京大・農）

13. マウス初期胚発育に対するbasic Fibroblast Growth Factorの効果

○吉田壮一・高尾成久・原田 省・寺川直樹（鳥取大・医）

14. 有袋類タンマーワラビーの胚のin vitroでの発育に及ぼす内因性血小板活性化因子の役割

○小島敏之・L .A. Hinds*・C.O' Neill**・C.H. Tyndale-Biscoe*
（農林水産省・畜試, CSIRO*, Royal North Shore Hospital**, Australia）

座長 塩谷康生（農林水産省・畜試）

15. トリハロースを用いたVitrification とそのマウス胚の発育に及ぼす影響
○石田ガブリエラ・野原 理・河内谷敏・平山寿雄・斉藤英和・広井正彦
(山形大・医)
16. マウス前核期卵の発生能に及ぼす培養密度の影響
○加藤容子・大野博美・福山香里・角田幸雄(近畿大・農)
17. ハムスター 1 細胞期胚の体外発生に及ぼすタウリン及びEDTAの影響
○堀内俊孝・建本秀樹(広島県立大・生物資源)

座長 斉藤英和(山形大・医)

18. 透明帯除去受精卵に対する人工透明帯の開発とその有用性
○渡辺美佳・矢沢浩之・柳田 薫・星 和彦・佐藤 章(福島県立医大)
19. マウス 4 細胞期胚における割球分離・再集合操作がコンパクションに及ぼす影響
○小川英彦・森 匡・清水 弘(北大・農)
20. バイオプシーした牛胚の凍結・融解後の生存性
○沼辺 孝・高田直和・佐藤秀俊・木船厚恭・亀山賢次*
(宮城県・畜試, 全農受精卵移植研*)

座長 新村末雄(新潟大・農)

21. マウス成熟卵および初期胚におけるProstaglandin E₂ receptor type 2, type 3 の発現について
○高見毅司・坂元秀樹・高見雅司・佐藤和雄(日大・医)
22. マウスおよび豚卵母細胞におけるc-mos 発現の組織化学的検出について
○山内伸彦・小林正男・佐々田比呂志・菅原七郎(東北大・農)
23. マウス初期胚発育に対するEGFおよびTGF- α の効果とEGF受容体mRNAの発現
○原田 省・吉田壮一・高尾成久・寺川直樹(鳥取大・医)

座長 星 和彦(福島県立医大)

24. マウス未受精卵の各種耐凍剤透過性
○横山栄治・吉田直子・枝重圭祐・櫻井孝志・町田隆彦・葛西孫三郎
(高知大・農)
25. 血管収縮剤を用いたマウス胚の卵管移植法
○鈴木宏志・上田乙也・鎌田宣夫・寺社下浩一・加藤基恵*・紫野正雄**
(中外製薬・CSK リサーチパーク, 食品薬品安全センター*, 麻布大・獣医)
26. 牛卵核胞期卵における染色体凝集への顆粒層細胞の関与
○建本秀樹・久保岳志・堀内俊孝(広島県立大・生物資源)

座長 香山浩二(兵庫医大)

27. embryo scoreを用いて検討したIVF-E T成績
○小林善宗・本田育子・鈴木隆弘・井上正人(東海大・医・産婦)

28. I V F - E T 妊娠後 (分娩、流産、外妊) の再 I V F - E T 成績
 ○鈴木隆弘・小林善宗・本田育子・井上正人 (東海大・医・産婦)
29. ヒト卵細胞質内精子注入法の臨床成績
 ○竹中真奈美・高橋克彦・堀内俊孝*
 (広島HARTクリニック, 広島県立大・生物資源*)

一般演題

第2日 4月28日(9:00~11:58)

座長 角田幸雄 (近畿大・農)

30. マウス成熟卵及び初期胚におけるphosphofructokinase、hexokinase
 遺伝子発現について
 ○高見雅司・高見毅司・坂元秀樹・佐藤和雄 (日大・医)
31. マウス卵子成熟過程におけるc-mos mRNAの発現に関する検討
 ○石田恵理・上谷則子・佐藤嘉兵 (日大・農獣医)
32. キメラマウスにおける導入Myogenin-LacZ 遺伝子の発現
 ○金 相勇・高橋寿太郎・堤 賢一・藤沢淳子*・安田泰久
 (岩手大・農, 国立精神神経センター*)

座長 井上正人 (東海大・医)

33. ウシ体外受精卵の発育におけるInsulin およびInsulin-like growth factor-I
 の影響
 ○松井基純・高橋芳幸・菱沼 貢・金川弘司 (北大・獣医)
34. 抗透明帯モノクローナル抗体(5H4) エピトープの卵胞発育過程における
 局在について
 ○井上みゆき・長谷川昭子・竹村 正・香山浩二 (兵庫医大・産婦)

座長 河野友宏 (東農大・総研)

35. マウス初期胚におけるRAG-1 遺伝子の発現
 - 初期発生におけるgenetic recombination の可能性 -
 ○早川 智・栃木明人・根本則道*・千島史尚・白石尚美・
 鈴木 (唐崎) 美喜・江角真理子**・桜井 勇*・佐藤和雄
 (日大・医・産婦, 第二病理*, 総医研**)
36. 断片化DNA末端標識法を用いた閉鎖卵胞検出の試み
 ○高野りや・上谷則子・苦名 充・和氣 朗・佐藤嘉兵 (日大・農獣医)
37. マウス初期卵子における 3H-チミジンの取り込みに及ぼすβ-メルカプト
 エタノール添加の影響
 辻井弘忠・○佐藤由希子・高田 直・高木優二 (信州大・農)

座長 小林善宗 (東海大・医)

38. 3次元立体内部構造顕微鏡を用いた卵管の観察
 ○横田秀夫・樋口俊郎*・工藤謙一・佐藤嘉兵**
 (神奈川科学技術アカデミー, 東大・工*, 日大・農獣医**)

39. 卵管采の卵捕獲ならびに卵輸送機能について

ー特に排卵時の卵管内圧の亢進ならびに収縮性についてー

○長田尚夫・角田郁夫・松浦正彦・高木健一郎・吉田孝雄・佐藤和雄・
金山喜一*・成相孝一*・遠藤 克*・佐久間勇次*

(日大・医, 農獣医*)

40. ガラス化法により冷却された幼若ラット卵巢の組織細胞学的観察

○杉本実紀・宮本 元(京大・農)

座長 内海恭三(京大・農)

41. 培養マウス胚盤胞における収縮運動のタイムラプスビデオによる観察

○高橋英太・新村末雄(新潟大・農)

42. 卵核成熟、卵細胞質成熟とMicrofilaments

○寺田幸弘・深谷孝夫・矢嶋 聰(東北大・医)

43. 核除去・体外受精により作出されたマウス雄核発生卵(第1分割期)

の染色体解析

○吉沢 緑・阿久沢浩*・影山恭子・前田高弘・河野友宏*・

中原達夫*・村松 晉(宇都宮大・農、東京農大・総研*)

一般演題

第2日 4月28日(13:55~15:05)

座長 伊藤雅夫(日大・医)

44. ウシ体外受精由来胚盤胞の凍結保存にEthylene glycol を耐凍剤とした場合
のSucrose の影響

○福島護之(兵庫県立中央農業技術センター)

45. ニホンザルの卵胞卵と凍結精子による体外受精

○山海 直・清水慶子*・長 文昭・吉川泰弘

(予研・霊長類センター, 京大・霊長研*)

46. マイクロカプセル化した卵胞の凍結保存

○利部 聡・萬場光一・牧田登之(山口大・農)

座長 金山喜一(日大・農獣医)

47. 膜標識蛍光色素, TMA-DPH, を使ったマウス表層粒分泌動態の新しい評価法

○田原正浩・萬本明子・増本伸之・田坂慶一・三宅 侃(阪大・医)

48. プタの卵丘膨化における卵母細胞と卵丘細胞の役割

○F.P. ダエン・佐藤英明・内藤邦彦・豊田 裕(東大・医科研)

第35回哺乳動物卵子学会

講演要旨集

Proceeding of the 35th Annual Meeting Japan Society for
Mammalian Ova Research.

哺乳動物卵子学会

会長講演

卵の成熟と胚発生をめぐる話題

Topics on the Oocyte Maturation and early Embryogenesis

佐藤和雄

Kazuo SATOH

日本大学医学部産科婦人科学教室

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

(はじめに)卵巣には2つの大切な働きがある。一つは排卵であり、もう一つはホルモンを分泌することである。この排卵現象は、間脳-下垂体-卵巣系の調節機構によって巧みに調節されている。排卵の過程は、卵胞壁頂部の融解と卵の放出、卵細胞の成熟、顆粒膜細胞の黄体化という三つの現象から成り立っているが、これには下垂体からのゴナドトロピン分泌、卵胞での性ステロイドホルモン産生が重要である。プロスタグランジン(PG)が局所のホルモンとしても、この卵成熟、排卵機構に関与していることが明かにされてきている。ここでは排卵、卵の成熟および胚発生におけるPGの働きを中心に述べる。

(排卵過程におけるPG)排卵過程に伴うPG値の変動については、種々の動物において報告がみられる。過排卵処理ラットでは卵巣中のPGは、HCG投与後上昇し、排卵に向かってさらに増加し、排卵後急激に減少する。一方、これらのPG増加をインドメタシンなどのシクロオキシゲナーゼ阻害剤などで抑制すると、排卵も抑制され、PGの補充によって排卵が回復する。このLHやhCGを引金として始まるPGの増加は、LHがアデニル酸シラーゼを活性化させ、細胞内cAMPを上昇させる結果起こるとされている。これと平行してOMIやcAMPにより第一減数分裂前期で成熟が停止している卵は、LHなどの刺激で分裂が再開され、卵核崩壊がおこる。核の成熟である第一極体形成はインドメタシンの投与で抑制され、 PGE_2 、 $\text{PGF}_2\alpha$ 投与で回復を認める。細胞質の成熟の指標としてグルコース代謝系の最も重要な酵素であるphosphofructokinaseを上げることが出来る。この酵素活性もインドメタシン添加で容量依存的に抑制され、 PGE_2 、 $\text{PGF}_2\alpha$ 添加で活性の回復をみることでより卵丘細胞で産生される PGE_2 や $\text{PGF}_2\alpha$ は、核の成熟のみならず、細胞質の成熟も促すことが明かとなった。しかし、PGの内でも PGI_2 は排卵の回復には効果的であるが、卵の成熟にはあまり影響せずPGにより作用は一樣ではない。

(卵とPG)卵丘細胞-卵細胞複合体では ^{14}C -アラキドン酸から PGE_2 、 $\text{PGF}_2\alpha$ や6-keto- $\text{PGF}_1\alpha$ への変

換を認めるが、卵細胞ではその変換を認めない。しかし、PG代謝酵素である15-OH PG dehydrogenaseの活性が卵の成熟とともに減少することは卵におけるPGの効果発現のための調節機構が働いていることを示している可能性がある。電子顕微鏡的には、卵細胞と卵丘細胞との間のgap junctionがLHやPGの刺激により開離して卵成熟の過程が見られる。

(卵とcyclooxygenase)卵および卵巣におけるcyclooxygenaseやPG産生能の個体発生的変化を知ることは、PGの作用を知る上で必要である。幼若ラットにPMS-hCGで過排卵処理後の卵巣で ^{14}C -アラキドン酸からの ^{14}C -PG産生が、hCG投与後の時間に依存して増加をみることは、LH刺激によるcyclooxygenase活性の上昇や酵素の誘導が考えられる。実際、ラット卵胞の器官培養実験ではPMS刺激後のhCG投与はPGE₂、PGF₂ α や6-keto-PGF₁ α の産生増加を容量依存的に起し、しかもこの現象は、アラブイノシトールで抑制されることからLHによる酵素の誘導が示唆される。cyclooxygenaseのmonoclonal antibodyを用いた卵胞の免疫組織学的検索でもhCG投与後はPMS投与後にくらべ、その染色性に変化が認められ、その量的変化が推察される。しかし、卵細胞自体でのPG産生能は、その活性の有無や量的問題が有り明かでない。そこで、cyclooxygenase蛋白やmRNAの検索を行った。100個の卵細胞を用いたWestern blot法では、75kDの位置にcyclooxygenase-1に相当するバンドを認め、卵細胞ではアラキドン酸からPGへの変換は検出出来なかった。mRNAの検出にはRT-PCR法を用いた。cyclooxygenase-1、-2に対するプライマーを作成して行った。顆粒膜細胞でのmRNAの発現はPMS-hCG投与ではhCG投与後に増強した。また、mRNAの個体発生では4細胞胚以降で発現を認め、Western blot法やmRNAの発現からみても卵や胚でのcyclooxygenaseの存在が示唆される。

(胚発生とPG)胚発生におよぼすPGの影響をみるために、イノシトールで前培養した卵と精子の受精能をみた。この受精率には変化を認めなかったが、その後の胚発生は抑制された。この抑制はPGE₂、PGF₂ α 、PGI₂でほぼ回復した。成熟卵自体でのPG産生とその働きを知るために、anti cyclooxygenase-1 monoclonal antibodyを受精直前に顕微鏡下で注入した。これらの卵では受精は成立するが、2細胞胚への発育が阻害された。卵の成熟と胚発生に影響する解糖系の重要な酵素であるhexokinaseは、2細胞胚ではイノシトール処理で活性が低下し、PGE₂投与で回復をみた。

(PGとcAMP)PGE₂添加により受精卵のcAMP産生は増加を認めたが、2細胞胚や桑実胚では認めなかった。しかし、PGE₂受容体(EP3)はRT-PCR法で桑実胚に発現しており、これはcAMP産生に対するPGE₂の反応の相連によるものであろう。

よって、卵の成熟はphosphofructokinaseの活性と同調し、それはPG、特にPGE₂の調節を受けていた。受精後の胚のpyruvateからglucoseへの糖利用の変化はPGによって調節されるhexokinaseの誘導による。卵の成熟、核や細胞質の成熟および胚の分化はPGによって調節されるが受精は影響されない。cyclooxygenaseは卵や初期胚に存在するがmRNAの転写は4ないし8細胞期である。

W-1 酵素的サイクリング法による卵および初期胚の代謝動態解析

Analysis of metabolism in oocytes and embryos by enzymatic cycling method

○矢野哲 綾部琢哉 堤 治 武谷雄二

Tetsu YANO, Takuya AYABE, Osamu TSUTSUMI,
Yuji TAKETANI

東京大学産科婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology of Tokyo University

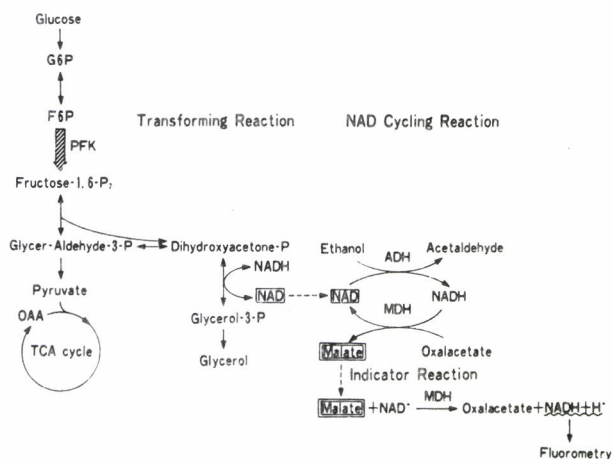
【目的】体外受精・胚移植が不妊症治療の一手段として用いられるようになり、卵・初期胚の成熟分化の過程に対する関心は高まった。しかし、卵が微小であるという方法論的制約により、従来の研究は卵核崩壊 (GVBD)、第1極体形成、卵割、胞胚形成など形態学的指標によるものを中心であった。現在、卵成熟を検討するには、これら形態を指標とする「核の成熟」だけでなく、「細胞質の成熟」をも考慮する必要があることが指摘されている。我々は超微量定量法である酵素的サイクリング法を確立し、細胞1個の生化学的分析を可能にした。本研究では、卵・初期胚のエネルギー代謝をその細胞質の成熟の指標とみなし、サイクリング法を用いて解糖系の律速酵素である phosphofructokinase (PFK) および hexokinase (HK) の活性の変化を検討することにより、初期発生のメカニズムの解明を試みた。

【材料および方法】1. 卵・初期胚の採取、培養 卵はPMSあるいはPMS-hCGで処理した25日齢Wistar系幼若雌ラットより採取した。PMS投与48時間後に卵巣より採取した卵丘細胞-卵細胞複合体 cumulus-oocyte complex (COC)、卵丘細胞除去卵 denuded-oocyte (DO) および卵胞を培養し、各種薬剤を添加して、卵成熟動態に対する効果を検討した。初期胚は8週齢ICR雌マウスをPMS-hCG過排卵処理後雄と交配させ、hCG投与56時間後に卵管内より4細胞期胚を採取し、卵と同様に培養実験に供した。2. 試料の調整と酵素活性の測定 卵は培養終了後、GVBDあるいは第1極体形成の率を倒立位相差顕微鏡で観察した後、ガラス試料板に載せ-30℃にて凍結乾燥した。卵1個のPFK活性は解糖に続く glycerol 生成経路で産生されるNADを基質とし、NADサイクリング法により増幅定量した。培養36時間後の初期胚は桑実胚期にあったが、卵と同様に処理し個々のHK活性を測定した。HK活性は五炭糖 shunt で産生されるNADPを基質とし、NADPサイクリング法により測定した。また卵胞培養終了後、培養液中の prostaglandin (PG) E_2 , $F_2\alpha$, progesterone (P_4) 含量をRIAにて測定した。

【結果】(1)PMS投与48時間後に卵はGVBDを起こさないが、PFK活性は有意に上昇した。hCGは卵のPFK活性を *in vivo* 系、卵胞培養系のいずれでも未熟卵の約3倍に増加させた。またGVBD率もhCGにより0%から100%に上昇した。(2)PG合成阻害剤であるIndomethacinは *in vivo* 系、卵胞培養系でhCGにより誘導されたPFK活性と第1極体形成を抑制した。Indomethacinによる抑制作用はPGの同時投与で消失した。またPGは単独でhCGと同程度に卵胞卵を成熟させた。phosphodiesterase阻害剤のIBMXと(Bu)₂cAMPの存在下で、COCとDOのGVBDは完全に抑制されていたが、PGはPFK活性のみを上昇させた。(3)adenylate cyclase賦活剤のforskolinとIBMXは、COCのGVBDとPFK活性を抑制した。卵胞培養系では、forskolinは卵成熟を促進したが、IBMXはPFK活性のみを上昇させ、GVBDは起こさなかった。(4)EGF、C-kinase活性化剤およびCa ionophoreは卵胞培養卵を成熟させるとともに、IBMXと(Bu)₂cAMPの存在下でDOのPFK活性を高めた。(5)前記(3)(4)の卵胞培養系において、PGとP₄がhCG添加群と同程度に産生された。(6)4細胞期胚の培養系にP₄を添加してもHK活性に変化はないが、3 β -HSD阻害剤のtrilostaneの添加により抑制され、P₄補充により回復した。しかし、このP₄の回復効果はP₄の受容体 antagonistのRU38486により阻害された。

【考察】(1)酵素的サイクリング法による単一卵細胞レベルのエネルギー代謝の測定が、初期発生のメカニズムを解析する上で有用であることを明らかにした。(2)卵の細胞質の成熟が核の成熟と独立してまたは先行して起きることが示された。(3)卵成熟過程において、PGが必須な因子であることが示唆された。(4)A-kinase系、C-kinase系、Ca受容蛋白質系、EGF(tyrosine kinase系)などの情報伝達系のいずれもが、顆粒膜細胞の成熟分化に対し促進的に作用する一方、卵自体に対してA-kinase系は抑制的に、PGを含めたその他のシグナルは促進的に作用することが示唆された。(5)初期胚において、それ自身が産生するステロイドホルモンが特異な autocrine 的機序により、自己の成熟分化に作用すると考えられた。

Measurement of PFK Activity



W-2 卵細胞内 Ca^{2+} の画像解析と共焦点レーザー顕微鏡

Intracellular Ca^{2+} image analysis with conventional and confocal laser scan microscopy
in mammalian eggs

○白川英樹、白石浩一、宮崎俊一

Hideki SHIRAKAWA, Koichi SHIRAIISHI, Shunichi MIYAZAKI

東京女子医科大学 第二生理学教室

Department of Physiology, Tokyo Women's Medical College

〈目的〉 ほとんどすべての動物種の卵において受精直後に卵細胞内 Ca^{2+} 濃度の急激な上昇が観察され、後口動物に共通して伝播性の Ca^{2+} 波が起こる¹⁾。哺乳動物では、卵細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は一定の間隔をおいて受精後数時間にわたり繰り返される (Ca^{2+} 振動)。 Ca^{2+} 反応は、zona reactionによる多精拒否や以後の卵発生にとって重要な生理作用を持つと考えられているが、その発生機構の解明には細胞内 Ca^{2+} の時間的空間的变化の測定が必須である。ここでは、 Ca^{2+} 感受性蛍光色素Fura-2による卵細胞での画像解析法について、ハムスター卵受精時の Ca^{2+} 反応におけるイノシトール三リン酸 (IP_3) 受容体/ Ca^{2+} チャネルの関与を示した最近の研究²⁾を例にとり解説する。また近年普及してきた共焦点レーザー走査顕微鏡 (Confocal Laser Scan Microscope; CLSM) を利用した高解像度の Ca^{2+} 画像解析法についても論ずる。

〈方法〉

(1) Fura-2による画像解析法

蛍光試薬の導入 — 採取した卵は、透明帯を除去した後実験に供する。Fura-2の卵内への導入は、ガラス微小ピペットからの直接注入か、膜透過性の誘導体Fura-2/AMを取り込ませることによって行なう。受精時の Ca^{2+} 反応に対する細胞膜非透過性の試薬 (今回の例では IP_3 受容体に対する単クローン抗体) の効果を調べる際には、試薬をFura-2とともに卵に注入しておく。
 Ca^{2+} 濃度の測定 — 細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定は、二つの異なる波長の紫外光 (340 nm と 360 nm) で励起したときの蛍光像の比を計算することによって行う。すなわち、 Ca^{2+} 濃度増加にともなう増強する340 nmの励起光による蛍光強度を、 Ca^{2+} 濃度に依存しない360 nmの励起光での蛍光強度で割ることによって、色素の不均一な分布や細胞の厚みに由来する蛍光強度の違いを補正する。画像の取得、蛍光比の計算や濃度のキャリブレーションにはイメージプロセッサを用いる。媒精の際は、ウシ副腎髄質抽出液とヒト血清によって活性化した精子を培地中に与え、卵に精子が付着した直後から蛍光測定を開始する。また特定の試薬の細胞内投与時の Ca^{2+} 反応を見る際には、先端の非常に鋭い微小ピペットから電気泳動的に注入する。注入量

はピペット内の濃度、流す電流の大きさと時間によって容易に調節ができる。

(2) CLSMを用いた画像解析法

蛍光試薬の導入 — Ca^{2+} 感受性蛍光色素としては、Fluo-3、Calcium green、Fura redなど、可視光域に励起波長を持つものを用いる。卵内への導入はFura-2の場合と同様、AM誘導体の取り込ませや直接注入によって行なう。

蛍光の測定 — アルゴンレーザーからの 488 nmの励起レーザー光をX/Yミラーによって二次元的に走査する。蛍光は 540 ± 25 nm (Fluo-3とCalcium greenの場合)のフィルターを通し、さらに微小な孔(ピンホール)を通して非焦点面からのシグナルを除去したのち、光電子増倍管によって検出し二次元画像として再構築する。レーザー光の位置制御、シグナルの取得・定量、画像の構築・保存などはすべてコンピュータによって統合的に行う。卵への刺激としては、Fura-2の場合と同様の媒精や薬物の微量注入も行えるが、そのほかに、caged化合物(紫外光照射によって活性物質を遊離する)による方法も適用可能である。

《結果》 受精直後に起こる初期 Ca^{2+} 反応と IP_3 の一過的注入によって誘発される Ca^{2+} 反応のいずれにおいても、 Ca^{2+} 濃度の上昇は刺激部位から始まり数秒のうちに卵全体に伝播する Ca^{2+} 波が観察された。 IP_3 受容体に対する単クローン抗体は、 IP_3 注入による Ca^{2+} 反応を非競合的に抑制し、また受精時の Ca^{2+} 波、 Ca^{2+} 振動も完全に抑制した²⁾。一方、CLSMによるimagingでは、z軸方向の解像度が飛躍的に改善されたため非常に薄い光学断面像を得ることができ、受精や IP_3 注入による Ca^{2+} 反応では Ca^{2+} 濃度の上昇は細胞表層部だけでなく細胞深部へも伝播していることが確認された。さらに未受精卵において精子や IP_3 などによって誘発される Ca^{2+} 反応では、細胞質のみならず卵核胞内でも Ca^{2+} 濃度の上昇が認められた。

《結論・考察》 細胞内 Ca^{2+} 画像解析法と微小注入法の併用によって、受精時の Ca^{2+} 反応には IP_3 受容体を介した Ca^{2+} 遊離が必須であることの直接的な証明が得られた。しかしながら、卵のように大きな細胞におけるより詳細な Ca^{2+} 動態の検討には従来の蛍光顕微鏡法では不十分である。新しい手法としてCLSMを用いた画像解析法は、caged 化合物との併用などその応用範囲も広く、今後の主流として有力であると思われる。

《文献》

- 1) Miyazaki, S., Shirakawa, H., Nakada, K. & Honda, Y. (1993) : Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev. Biol.* 158, 62-78.
- 2) Miyazaki, S., Yuzaki, M., Nakada, K., Shirakawa, H., Nakanishi, S., Nakade, S. & Mikoshiba, K. (1992) : Block of Ca^{2+} wave and Ca^{2+} oscillation by antibody to the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science* 257, 251-255.

W-3 培養法による胚培養の工夫
— 共培養について —

Study of quality of embryo culture using co-culture system

福井県笠原病院産科婦人科*、福井医科大学産婦人科
Akira I. Negami*, Jun-ichi Maeda, Shuichi Kobayashi
and Toshiro Tominaga

根上 晃*、前田 淳一、小林 修一、富永 敏朗
Department of Obstetrics and Gynecology, Kasahara Hospital* and
Fukui Medical School.

『目的と方法』

体外受精・胚移植などの配偶子操作の際の培養操作・条件は多くの工夫がなされてきたが、培養条件の詳しい設定・検討がなされていないため一定の結論や定説に至っていない。一方、体細胞との共培養法は Vero 細胞を中心にして精力的に研究が進められているものの、その優位性は確立していないのが現状である。今回われわれは培養温度、培養時の浸透圧、培養液の蒸散を培養環境の制御因子と考え、胚発育を観察し共培養の効果を再検討してみた。

ウシの卵巢皮質から細切法により未成熟卵を回収し、その後体外成熟培養を経て、体外受精を行った。受精後 48 時間後に胚を通常の培養、共培養、順化培地で胚発生を検討した。共培養細胞は、卵丘細胞、卵管細胞、Vero 細胞を使用し、順化培地は卵丘細胞、卵管細胞、Vero 細胞のそれを使用した。使用した胚は通常の胚（4 細胞胚）、桑実胚、胚盤胞などを使用した。

胚発育の観察は共培養後の胚発育を継時的に行った。分離胚の検討は桑実胚、胚盤胞を使用し、2 分離後の胚発育の検討を行った。桑実胚・胚盤胞を使用し凍結・解凍時の胚損傷の検討等を行い共培養の効果併せて検討した。

『結果と結論』

培養条件は培養皿や培養インキュベーターの設定条件でも変化する。培地の浸透圧は培養皿の形状や培養インキュベーターの設定温度、扉の開閉によっても影響を受ける。

浸透圧は胚発育にかなりの影響を与えた。浸透圧の影響を少なくするためにはパラフィンを使用する胚培養が効果的であった。パラフィンを使用しない場合は1～2日毎の培地交換が必要であった。

ウシ体外受精胚を体細胞と共培養すると胚発育が観察される。この効果は卵丘細胞を共培養細胞とすると最も効果的に観察される。また、共培養細胞の順化培地でも同様に胚発育が観察されるが初期胚では順化培地の効果は少ない。

胚発育が進んだものの共培養の効果は共培養細胞の種類に関係なく存在する。この効果は順化培地でも同様であった。

2分離後の胚発育の検討や凍結胚の胚発育では共培養は不可欠で、これらの効果は卵丘細胞、卵管細胞、Vero細胞のいずれにも観察された。分離後、解凍後の胚損傷の回復や細胞数の修復が共培養環境下で観察された。

以上のことから胚発育の各過程で共培養（細胞効果）や順化培地（液性因子）の効果が観察され、共培養が不可欠なステージが存在することが示唆された。これらの培養効果は初期胚が卵管内で受精後、卵管を移動し子宮腔に入るまでの自然の培養環境（卵丘細胞－卵管細胞－子宮内膜細胞）を示し、ステージ毎の培養条件設定が胚培養に必要なになるかもしれないと思われた。

W-4 マウス卵子および胚発生における R T - P C R 法の応用

An application of reverse transcriptase - polymerase chain reaction
(RT - PCR) in the study of the murine oocyte and embryogenesis

栃木明人、吉永陽樹、長岡美樹、橋本芳美、早川 智、坂元秀樹、
栃木武一、津端捷夫、佐藤和雄

Meijin TOCHIGI, Haruki YOSHINAGA, Miki NAGAOKA, Yoshimi HASHIMOTO, Satoshi HAYAKAWA,
Hideki SAKAMOTO, Buichi TOCHIGI, Katsuo TSUBATA, Kazuo SATOH

日本大学医学部産科婦人科学教室

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

(目的) 近年開発されたPCR¹⁾は、非常に精巧なin vitro遺伝子増幅法である。RT-PCR法は逆転写酵素によりmRNAからcDNAを作成し、その後にPCRによって増幅を行う高感度遺伝子検出法で、微量のmRNAを解析する方法として種々の分野で用いられている²⁾。卵や初期胚は、大量の検体を一度に採取することが困難であるため、微量の検体で行えるPCR法は発生学的な解析などに特に応用が期待される。今回、成熟卵および初期胚について、細胞の増殖や情報伝達に重要な働きをしているecosanoidosに関連した酵素(cyclooxygenase-1, -2 : COX-1, COX-2)や prostaglandin E₂ receptor(type:EP₁³⁾, EP₂⁴⁾, EP₃⁵⁾), TXA₂ receptor⁶⁾ のmRNAの発現の状況を知ることを目的として、RT-PCR法を用いマウスで検討を行った。

(方法) ICR系成熟雌マウスにPMS 10単位、48時間後にhCG 5単位を腹腔内投与し過排卵処理を行った。成熟未受精卵はhCG投与24時間後に卵管を摘出し、ヒアルロン酸^{*}(500 μg/ml)含有のBWW液中で卵管膨大部より採取した。受精卵および各段階の初期胚は、hCG投与後同系の雄と同居させ、腔栓の確認出来たマウスの卵管および子宮腔を洗浄して採取した。各卵および着床前の胚100個は、mediumで洗浄後直ちに滅菌チューブ^{*}に移しcDNA合成に用いた。RNA の抽出は RNAzolTMB(200 μl)を用いて乾ギ^{*}、抽出、遠沈、洗浄の操作に従い行った。cDNAの合成はrandom primerとMMLV RTaseによって行った。primerは報告されている cDNA sequenceよりgenomic DNAが報告されているものは1つ以上のintronをまたぐように設計した。反応は total 20 μl 【 dH₂O 14.4 μl, (1.5mM MgCl₂・10mM Tris-HCl(pH 8.3)・50mM KCl・0.01%(W/V)gelatin)/2 μl, 2.5mM 4XdNTP 1.6 μl, primer(10pmol each mix)/1 μl, template 1 μl, Taq polymerase 0.5U/0.1 μl】

の反応系でsingle PCR (denaturation 94℃ 1min, extension 72℃ 1min, annealingはT_mによる。の条件で35回)を行った。internal controlとして β -actin mRNAを用い、反応産物は agarose gelで電気泳動後、ethidium bromideで発色して発現を検討した。

(結果) 卵および初期胚から抽出したtotal RNAは260nmの吸光度測定では検出出来なかった。従ってtotal RNAを用いてcDNA 15 μ lを合成した。 β -actin mRNAの検出についてcDNA 1 μ lおよびその64倍希釈(0.1個の卵相当)でもPCRで検出可能であった。COX-1、-2のmRNAの発現は表に示すごとくCOX-1は8-cell embryoから、COX-2は4-cell embryoから検出可能であった。

表 Ontogeny of COX-1 and COX-2 mRNA

	mature oocyte	1-cell embryo	2-cell	4-cell	8-cell	morulla	blasto cyst
COX-1	-	-	-	-	+	+	+
COX-2	-	-	-	+	+	+	+
β -actin	+	+	+	+	+	+	+

用いたprimerによる各receptor mRNAは腎臓や顆粒膜細胞で検出可能であった。マウスaromatase mRNAは顆粒膜細胞で検出可能であり、卵処理時の顆粒膜細胞の混入の指標とした。TXA₂ receptor mRNAは受精後に発現を認めたが、EP₁などは未受精卵の段階から認めた。

(考察) マウス成熟卵および初期胚各期におけるCOX-1および-2 mRNAの発現および PGE₂, TXA₂ receptorのmRNAの発現を検討した結果、酵素とそれらの受容体のmRNAの発現には時間的な相違が認められ、eicosanoidosの刺激を早期より受ける機構の存在が示唆された。

(文献)

- 1) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Erlich, H. A., et al.: Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase, Science, 1988, 239, 487-491
- 2) 早川 智、千島史尚、佐藤和雄: PCR(Polymerase Chain Reaction)の応用、産科と婦人科、1993, 60(3), 353-362
- 3) Watanabe, A., Sugimoto, Y., Honda, A., et al: Cloning and expression of cDNA for a mouse EP₁ subtype of prostaglandin E receptor, J. Biol. Chem., 1993, 268, 20175-20178
- 4) Honda, A., Sugimoto, Y., Namba, T., et al: Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP₂ subtype, J. Biol. Chem., 1993, 268, 7759-7762
- 5) Sugimoto, Y., Namba, T., Honda, A., et al: Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP₃ subtype, J. Biol. Chem., 1992, 267, 6463-6466
- 6) Namba, T., et al: Biochem. biophys. Res. Commun, 1992, 184, 1197-1203

W-5 顕微授精によるウシ精子核の低温安定性の検討

Cold stability of bovine spermatozoa examined by intracytoplasmic sperm injection

後藤和文 木之下明弘 中西喜彦

Kazufumi GOTO, Akihiro KINOSHITA, Yoshihiko NAKANISHI

鹿児島大学農学部家畜繁殖学教室

Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Agriculture

〔目的〕哺乳動物の精子核は低温や高温処理に対してきわめて安定で、殺したのち凍結保存（ -20°C ）された精子でも細胞質内に注入されることにより個体まで発生すること¹⁾、高温（ 90°C ，30分）処理された精子でも初期胚までの発生能をもっていること²⁾が報告されている。本研究では、凍結・融解を繰り返して殺した直後の精子あるいは殺したのち30-90日間凍結保存（ -20°C ）した精子を用いて卵細胞質内への顕微授精をおこない、両群の受精卵の発生能を比較した。

〔方法〕既報³⁾にしたがって耐凍剤を添加してあらかじめ凍結保存（ -196°C ）していた精巢上部尾部精子を融解し、3回遠心分離により洗浄して耐凍剤を除去した。その後 swim-up 法により活力のよい精子を集め、耐凍剤を含まない液中で2-3回凍結・融解を繰り返して精子を殺した。一部の死滅精子はそのまますぐに、残りは分注して冷凍庫（ -20°C ）に30-90日間保存してから顕微授精に用いた。卵子はと場由来のウシ卵巣から採取し、既報⁴⁾にしたがって体外培養で成熟させ、第一極体を放出した卵子のみを実験に用いた。卵細胞質内への顕微授精は既報¹⁾にしたがっておこない、授精後の発生はあらかじめ作成していた顆粒膜細胞の単層上でおこなった。すべての培養は、 38.7°C 、5% CO_2 、95% 空気の条件下でおこなった。

統計処理は χ^2 検定によりおこなった。

〔結果〕殺した直後の精子を用いた顕微授精卵の分割、桑実胚、胚盤胞率は、それぞれ32.1（18/56），27.8（5/18），22.2（4/18）%であった。殺したのち30-90日間凍結保存した精子を用いたときの各ステージへの発育率はそれぞれ30.8（16/52），25.0（4/16），18.8（3/16）%であった。分割胚、桑実胚、胚盤胞期胚への発育率はいずれも二群間に有意差はなかった（ $P>0.05$ ）。

Table 1. Intracytoplasmic injection of bovine spermatozoa stored
in the freezer after killing

Days of storage at -20°C	N	Cleaved (%)	Morula/Cleaved (%)	Blastocyst/Cleaved (%)
0	56	18 (32.1)	5/18 (27.8)	4/18 (22.2)
30-90	52	16 (30.8)	4/16 (25.0)	3/16 (18.8)

No significant differences between groups ($P>0.05$).

〔考察〕ウシ精子は凍結保存にきわめて安定で、殺したのち30-90日間凍結保存しても殺した直後の精子と同等の顕微授精後の発生能を保持していることがわかった。本結果と凍結・融解を繰り返して殺したのち凍結保存していた精子を用いてすでに顕微授精により産子が得られていること¹⁾を考え合わせると冷凍庫内(-20°C)精子保存は、将来ヒトで重症乏精子患者や精巣上体からしか精子が採取できない患者に対する顕微授精用の簡易な精子保存法として役立つものと推察される。

〔文献〕

- 1)Goto, K., Kinoshita, A., Takuma, Y. & Ogawa, K.:Fertilisation of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa. Vet. Rec. 127:517-520, 1990.
- 2)Yazawa, H., Yanagida, K., Kanno, Y., Watanabe, M., Suzuki, K., Hoshi, K. & Sato, A.: Examination of developmental ability of embryos fertilized by microinjection of heat treated spermatozoa. J. Mamm. Ova Res. 10:58-59, 1993.
- 3)Goto, K., Kajihara, Y., Koba, M., Kosaka, S., Nakanishi, Y. & Ogawa, K.:In vitro fertilization and development of in vitro matured bovine follicular oocytes. J. Anim. Sci. 67:2181-2185, 1989.
- 4)Goto, K., Kajihara, Y., Kosaka, S., Koba, M., Nakanishi, Y. & Ogawa, K.:Pregnancies after coculture of cumulus cells with bovine embryos derived from in vitro fertilization of in vitro matured follicular oocytes. J. Reprod. Fertil. 83:753-758, 1988.

Studies on molecular mechanisms in mammalian fertilization
and manipulation for reproduction

東京大学医科学研究所 (Inst. Med. Sci. Univ. Tokyo)
筑波大学応用生系* (Inst. Appl. Biochem. Univ. Tsukuba)

[illegible]

4) マウスの精子上に発現されているMHC class II分子に対応するレセプターとして卵細胞膜上にCD4分子の存在を見出した。しかもこのMHC class II分子のモノモルフィック部位とCD4分子は特異的なドメイン間の結合によって、受精の細胞融合の段階で重要な役割をはたしていることをIVFの系へそれぞれの部位を認識するモノクローナル抗体の添加による阻害実験で証明した。更に卵子においてCD4分子にp56lckが卵細胞膜直下で会合していることを見出し、受精における情報伝達の新たな機構の存在をクローズアップさせた。

「結論」

哺乳類の受精における精子-卵子相互作用の素過程で重要と考えられるリガンド-レセプター群の分子を同定し、それぞれの構造と機能を解明した。精子上のMHC class IIと卵子のCD4分子のドメイン-ドメイン間結合部位に種特異性を担うアミノ酸配列構造を見出し、受精研究における最重要課題に対する一つの正解を得たと考えている。

「応用」

1) sp38糖蛋白質は調べた範囲では精子特異的蛋白であり、マウス、ヒトでも発現しており、将来有望な避妊ワクチンの一つになり得よう。

2) マウス精子のMHC class II分子がpSV₂CATをキャリングし、受精の細胞膜融合の段階まで持ち込まれることをオートラジオグラフィ法で観察した。これは精子をベクターとして卵へ外来遺伝子を導入する技術的開発の可能性が考えられた。

3) 精子MHC class II-卵子CD4-p56lck複合体の存在の発見は卵卵腔精子注入による顕微受精の理論的基盤、つまり受精素過程の最終段階でも精子と卵子は特異的リガンド-レセプター系を構成し、多精拒否につながる表層顆粒反応への情報伝達経路の存在を示すものであった。

References

- 1) Mori, T., Guo, M.W., Mori, E., Shindo, Y., Mori, N., Fukuda, I. and Mori, Ta., Expression of class II major histocompatibility complex antigen on mouse sperm and its roles in fertilization., *Am.J.Reprod.Immunol.*, 24, 9-14, 1990.
- 2) Mori, E., Takasaki, S., Hedrick, J.L., Wardrip, N.J., Mori, T. and Kobata, A., Neutral oligosaccharide structures linked to asparagines of porcine zona pellucida glycoproteins., *Biochemistry*, 30, 2078-2087, 1991.
- 3) Mori, T., Guo, M.W. and Mori, E., Expression of CD4-like structure on murine egg vitelline membrane and its signal transductive roles through p56lck in fertilization., *Am.J. Reprod.Immunol.*, 26, 97-103, 1991.
- 4) Guo, M.W., Nose, K., Mori, E. and Mori, T., Binding of foreign DNA to mouse sperm mediated by its MHC class II structure., *Am.J.Reprod.Immunol.*, 24, 120-126, 1990.
- 5) Mori, T., Guo, M.W., Yoshida, H., Saito, S. and Mori, E., Expression of the signal transducing regions of CD4-like and lck genes in murine egg., *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 182, 527-533, 1992.
- 6) Mori, T., Immunological studies on mammalian fertilization and implantation. In "Biology of Germ Line-in Animals and Man" ed. by Mohri, et. al., pp 253-269, 1993, Japan. Sci. Soc. Press, Tokyo.
- 7) Takasaki, S., Mori, E., Hirano, T., Furukawa, K., Amano, J., Mori, T., Hedrick, J.L. and Kobata, A., Structures of sugar chains included in porcine zona pellucida glycoproteins., *J. Reprod. Devel.* 39 (Supple), 39-40, 1993.
- 8) Mori, E., Baba, T., Iwamatsu, A., and Mori, T., Purification and characterization of a 38-kDa protein, sp 38, with zona pellucida-binding property from porcine epididymal sperm., *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 196, 196-202, 1993.

1 SZIとICSIの適応症例の比較

Comparison of SZI cases with ICSI cases

高塚亮三、辻 敏徳、豊北美穂、藤波隆一、寺元章吉、道倉康仁、加藤修*

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

永遠幸マタニティクリニック、* 加藤レディースクリニック

Towako Maternity Clinic, Kato Lady's Clinic

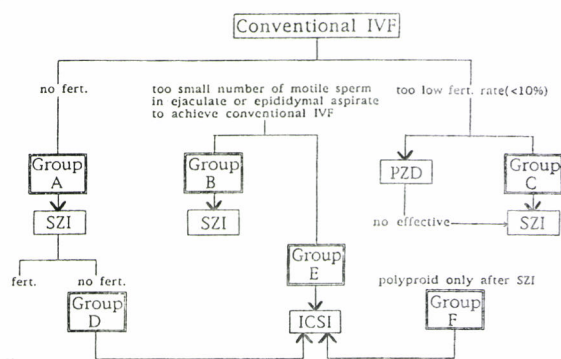
[目的] 卵卵腔内精子注入法 (SZI) や卵細胞質内精子注入法 (ICSI) は精子の透明帯通過を補助することにより従来のIVFでは受精不可能な配偶子でも受精を可能にした。しかしそのような配偶子がSZIの適応となるか、ICSIの適応となるかは試行錯誤の結果であるのが現状である。一方SteirteghemらはSZIよりもICSIではるかに高い受精率が得られることを報告している^{1,2)}。

そこで本研究においては、1993年中に当院において実施した顕微受精の結果についてretrospectiveに解析し、SZIとICSIの適応症例の比較検討を行った。

[方法] 研究対象は当院で1993年中にIVF-ETのために過排卵処理した858周期のうちSZI及びICSIの適応となった238周期 (27.7%)、156症例である。このうち138症例 (88.5%) に男性不妊原因が認められた。顕微受精を行った238周期中、183周期にSZI、35周期にICSI、20周期にSZIとICSIの併用法を適応した。

SZI適用周期の14周期 (胚移植周期当り10.5%)、ICSI適用周期の1周期 (胚移植周期当り5.9%)、SZIとICSIの併用周期の2周期 (胚移植周期当り18.2%) で妊娠が認められた。精巢上体精子を用いた9周期を含む全周期で、精子の調整はミニパーコール法を用いて行われた。SZI及びICSIは透過型ノマルスキ-微分干渉装置を備えたオリンパスIM-IIにナリングの三次元ジョイスティック油圧四方向マイクロマニピュレータを装着したものをを用い、基本的にはCohenらの方法に従った³⁾。

Scheme of Micromanipulation



顕微受精操作による機械的損傷率はSZIで1.7%、ICSIで、11.1%であり、ICSIで有意に損傷率は高かった ($P < 0.01$)。SZI及びICSIの適応症例は右図に従って分類した。統計学的検討は χ^2 検定で行った。

[結果]SZI適応症例130例のうち、A群が20.8%、B群が73.1%、C群が6.2%であり、全SZI症例の80.8%が胚移植可能であった。卵子当りの受精率はA群、B群、C群の順で高くなり、多精子受精率 (PS rate) は逆にA、B、C群の順で低くなった。卵子当りの胚移植率はA、B、C群の順で高くなったが統計的有意差はなかった (Table 1)。

ICSI 適応症例29例のうちD群が27.6%、E群が55.2%、F群が17.2%であり、全ICSI症例の55.2%がET可能であった。F群の受精率及び胚移植率は他の二群と比べて有意に高かった (Table 2)。

SZIとICSIの併用周期のうち、SZIを行った卵子にのみ受精が認められた周期は10%、ICSIのみに受精が認められた周期も10%、SZIとICSIの双方に受精が認められた周期は45%、残りの35%の周期ではSZI、ICSI双方共受精が認められなかった。併用周期でSZIとICSIの受精率、胚移植率に有意差は認められなかった (Table 3)。

Table 1. Results of SZI.

Group	Patients		Cycles		Oocytes		
	Fert. Rate	ET Rate	Fert. Rate	ET Rate	Fert. Rate	PS Rate	ET Rate
A	21/27 77.8%	19/27 70.4%	30/40 75.0%	25/40 62.5%	93/225 41.3%	41/93 44.1%	43/225 19.1%
B	86/95 90.5%	79/95 83.2%	115/131 87.8%	98/131 74.8%	421/917 45.9%	166/421 39.4%	212/917 23.1%
C	7/8 87.5%	7/8 87.5%	11/12 91.7%	10/12 83.3%	45/83 54.2%	17/45 37.8%	23/83 27.7%
Overall	114/130 87.7%	105/130 80.8%	156/183 85.2%	133/183 72.7%	559/1225 45.6%	224/559 40.1%	278/1225 22.7%

Table 2. Results of ICSI.

Group	Patients		Cycles		Oocytes	
	Fert. Rate	ET Rate	Fert. Rate	ET Rate	Fert. Rate	ET Rate
D	3/8 37.5%	3/8 37.5%	3/8 37.5%	3/8 37.5%	4/28 14.3%	4/28 14.3%
E	9/16 56.3%	9/16 56.3%	10/22 45.5%	10/22 45.5%	34/187 18.2%	27/187 14.4%
F	4/5 80.0%	4/5 80.0%	4/5 80.0%	4/5 80.0%	7/21 33.3%	6/21 28.6%
Overall	16/29 55.2%	16/29 55.2%	17/35 48.6%	17/35 48.6%	45/236 19.1%	37/236 15.7%

Table 3. Results of SZI combined with ICSI.

	Fert rate per cycle			Oocytes		
	only from SZI	only from ICSI	from both	Fert rate	Polyloid occurrence	ET Rate
SZI	2/20 10%		9/20	30/108 27.8%	6/30 20.0%	17/108 15.7%
ICSI		2/20 10%	45%	25/98 25.5%	3/25 12.0%	21/98 21.4%

[考察]SZIに比べてICSIで卵子の機械的損傷率が高い。この損傷は非特異的と考えられ、ICSIにおいて高度な技術的習熟度が要求される。SZIでは受精率が高いが多精子受精率も高く、結果として胚移植率はICSIと殆ど変わらないが、従来のIVF法で受精率が低い症例 (C群) では比較的受精率が高く、多精子受精率が低いいため、この群に特にSZIが有効と考えられる。他方ICSIはSZIで多精子受精のみしか認められないような症例 (F群) に特に有効である。SZIとICSIの併用周期の結果ではSZIで受精するものはICSIでも受精し、SZIで受精しないものはICSIでも受精しにくく、SZIとICSIの受精率にも差がなかったことから、操作の技術的習熟度がSZIとICSIの適応の選択基準になる可能性が大きい。

[文献]1) Palermo, G., et al: Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet, 1992; 340: 17

2) Van Steirteghem, A. C., et al: Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subsonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. Human Reprod, 1993; 8: 1055

3) Ed by Cohen, J.: Micromanipulation of Gametes and Embryos. 1992: P. 250

Clinical evaluation of microfertilization

栗田松一郎, 田中 温, 永吉 基, 塩見 秀明,
 Shoichiro Awata Atsushi Tanaka Motoi Nagayoshi Hideaki Shiomi
 田中威づみ, 竹本 洋一, 高崎 博幸, 井手 紀子,
 Izumi Tanaka Yoichi Takemoto Hiroyuki Takasaki Noriko Ide
 有本 恭子
 Kyoko Arimoto

セントマザー産婦人科医院

Department of Obstetrics & Gynecology, St. Mother Hospital

【目的】男性因子による不妊症の場合、体外受精における受精率、妊娠率は低く、顕微受精の対象となる。射出精子数500万/ml以下、または精子運動率30%以下の症例に対して1992年より当院で臨床応用してきた顕微受精の成績について報告する。

【方法】顕微受精の手技の選択としては、射出精子数300～500万/ml、運動率30%以下 (moderate～low motility) の場合はmanual partial zona cutting (PZC)、50～300万/mlあるいは30%以下 (low motility) ではSUZI、50万/ml以下あるいは10%以下 (low motility) の症例ではICSIを用いた。この選択法は絶対的なものではなく、microdrop内の最終精子処理後の状態で決定されることが多かった。精子処理法は、PZCの場合3層パーコール遠心後に6～8%ヒト卵胞液で30分間培養、SUZIでは2層パーコール遠心後、K-3法(1)で先体反応を誘起した。異物が多く混在するものではミニパーコール法を行った。ICSIの場合は10%血清HTFで遠心後、K-3法を行うか、凍結保護物質を含まない状態で凍結-融解を3回繰り返して先体反応を起こした(2)。以上の処理を行った精子懸濁液を20～50μlのmicrodropとして、約6時間前培養した卵子を注入した。manual PZCの手技は、採卵後約6時間20%血清HTFで培養後0.1%ヒアルロニダーゼおよびピペッティングで裸化卵とした。0.5M sucrose添加HTFで卵細胞質を収縮させ围卵腔を開大する。口にくわえたゴムチューブの先端に把持ピペットを装着し左手に持ち、卵子を固定、右手で1ccツベルクリン注射筒に27G針を付けて実体顕微鏡下に透明帯を切り開いた。K-3処理法は、射精精液を4層パーコールで遠心し上清除去、NaCl, NaHCO₃, CaCl₂を超純水に入れたK-3液で2回遠心・洗浄。ガラスキャピラリーにペレットを密封し、40℃30～60分間培養し、遠心後20%血清HTF microdrop内へ処理精子を注入した。

【結果】

		受 精	分 割	多精子受精	妊 娠
PZC		22% (687/3124)	14% (437/3124)	8% (250/3124)	11% (34/309) (4:流産 8:分娩)
SUZI		15% (21/1371)	12% (16/1371)	8% (11/1371)	8% (8/100) (2:流産 3:分娩)
ICSI	dead sperm + A23187	23% (111/481)	19% (91/481)	0	4% (2/51) (2:流産)
	live sperm + K-3法	35% (445/1272)	30% (322/1272)	0	8% (8/103) (2:流産 6:妊娠継続)

(1994.1)

【考察】PZCやSUZIにおける妊娠率は約10%で、臨床上の有用性が確立されたものとする。とりわけmanual PZCは手技の簡便化によって日常の治療現場でもしばしば行われている。ICSIも最近では受精率、分割率が向上しているが、死滅精子にカルシウムイオノフォア(A23187)を用いたものでは成績が悪く、necrozoospermiaに対しては現在、K-3法で精子の先体反応を誘起後にzona-free oocytesと媒精している。

K-3法は精子の先体反応を誘起させるために行なうが、代謝基質を含まない液を用い、精子を高濃度の状態で比較的高温の嫌気環境下におくことによって精子の呼吸活性が活発化し、ごく短時間のうちに酸素は消費され尽くす。ATPの産生は止まり消費が増加するためATPの急激な枯渇により精子細胞基質膜のカルシウムポンプが作動しなくなり、自然拡散による細胞外カルシウムイオンの流入が先体反応を誘起する。ATPが使い果されると精子の運動も消失するがこれは可逆的な変化でATP産生回復のため酵素や代謝基質を補うと精子は運動を再開する。

【主要文献】

- 1) Kusunoki H, et al : J. Exp. Zool. 249 : 322, 1989
- 2) Goto K, et al : Vet. Rec. 127 : 517, 1991
- 3) 田中 温, 他 : 産婦人科治療 65 : 560, 1992
- 4) Steirteghem AC, et al : Hum Reprod 8 : 1055, 1993

3 重症男性不妊症における透明帯除去卵子の受精と 胚発育について

Evaluation of insemination of zona-free human oocytes for severe male infertility

栗田松一郎, 田中 温, 永吉 基, 塩見 秀明,
Shoichiro Awata Atsushi Tanaka Motoi Nagayoshi Hideaki Shiomi
田中威づみ, 竹本 洋一, 高崎 博幸, 井手 紀子,
Izumi Tanaka Yoichi Takemoto Hiroyuki Takasaki Noriko Ide
有本 恭子
Kyoko Arimoto

セントマザー産婦人科医院

Department of Obstetrics & Gynecology, St. Mother Hospital

【目的】透明帯除去マウス卵子を用いた体外受精によって健常な子孫が得られた(1)との報告があるが、ヒトにおいて重症男性不妊症の症例に対して同様の手技を行った。白血球やdebrisを多量に含む 1×10^4 /ml程度の重症乏精子症の場合、従来の方法では先体反応を完了した精子を確保することがたいへん困難である。またほとんど運動性のない重症精子無力症(<10%)に対して、従来の顕微授精による受精率はいまだ低率である。これらの症例に対応するために、透明帯を完全に除去して、精子と卵細胞との接着可能面積をできる限り拡大した。

【方法】採卵後5~6時間20%非動化血清含有HTFで前培養の後、0.1%ヒアルロニダーゼで顆粒膜細胞を除去、透明帯のまわりの卵丘細胞を除くためにpipettingを行う。裸化卵細胞を0.5M sucrose を含むHTFの中に入れ、卵細胞質を収縮させ、囲卵腔を増大させる。実体顕微鏡下で卵細胞を holding pipette の先に固定する。pipetteの他端はゴム管に連結され、術者が口にくわえて吸引する。右手1ccツベルクリン注射筒を把持し、27G針で透明帯に切開を入れる。次に透明帯の外側から軽く圧迫し、収縮した卵細胞質を外へ押し出す。出た卵を20%HTFで4回洗浄して元の大きさへ戻し、30分間培養の後に、精子の入った流動パラフィン包埋20%HTF小球(micro drop)10~20 μ l の中へ注入する。精子処理については、重症乏精子症の場合遠心分離後のペレットを直接20 μ lのHTF小球内へ注入する。重症精子無力症の場合はミニ・パーコール法を用いて精子を集め、K-Ⅲ法(3,4)で先体反応を起こす。

媒精3~4時間後、卵細胞質と精子との接着を確認後、20 μ lHTFへ移す。媒精12時間後に前核の有無およびその後の分割を観察した。

また、受精後に再び透明帯へ還納した状態での胚発育も調べた。0.5M sucroseでもう一度収縮させた受精卵を、空になった透明帯の中へ用手的に入れた後、20%HTFへ移して元の大きさにもどして培養を行った。

【結果】

透明帯除去卵の胚発育と媒精時の精子の濃度および運動率との関係

Sperm concentration at insemination (μ l)	Sperm motility at insemination (%)	No. of patients	No. of oocytes inseminated	Fertilization rate (%)	polyspermy rate (%)	2 cell rate (%)	4 cell rate (%)	8 cell rate (%)	Morula rate (%)	Blastocyst rate (%)
>50/ μ l	10-30	1	8	88(7/8)	88(7/8)	50(4/8)	25(2/8)	13(1/8)	0	0
	1-9	1	11	82(9/11)	36(4/11)	36(4/11)	27(3/11)	0	0	0
	0	1	12	50(6/12)	25(3/12)	25(3/12)	17(2/12)	8(1/12)	8(1/12)	0
10-50/ μ l	10-30	2	21	76(16/21)	48(10/21)	52(11/21)	33(7/21)	24(5/21)	19(4/21)	10(2/21)
	1-9	4	37	73(27/37)	43(16/37)	41(15/37)	22(8/37)	19(7/37)	16(6/37)	9(3/37)
	0	1	7	57(4/7)	14(1/7)	29(2/7)	14(1/7)	0	0	0
5-9/ μ l	10-30	5	47	68(32/47)	34(16/47)	45(21/47)	23(11/47)	9(4/47)	4(2/47)	4(2/47)
	<10	3	28	57(16/28)	14(4/28)	35(10/28)	25(7/28)	11(3/28)	7(2/28)	4(1/28)
<5/ μ l	10-30	3	34	50(17/34)	15(5/34)	17(6/34)	12(4/34)	3(1/34)	3(1/34)	3(1/34)
	<10	2	20	15(3/20)	10(2/20)	0	0	0	0	0
Average				61(137/225)	34(77/225)	25(57/225)	20(45/225)	10(22/225)	7(16/225)	4(9/225)

【考察】 zona-free の場合、受精率は60%で、25%が2細胞期へ進むが、精子の状態がさほど悪くない場合の従来のIVFと比較すると率は低い。しかしひとたび2細胞期になると8細胞期や桑実期まで分割する率はさほど悪くない。だが更に胚盤胞期まで至る割合は少ない。

透明帯除去に酸性タイロド液を用いると単為発生が比較的高率に起こった。現在、PZDの簡易法として我々の行っている“manual partial zona cutting (PZC)”の手法と同様の処理を卵子に施して透明帯除去を行っている。

処理後の精子の濃度と運動率別に受精率をみると、>50匹/ μ lでは約90%の卵細胞が受精するがそのほとんどは多精子受精である。運動率が10~30%であれば至適濃度は5匹/ μ l、10%以下なら10匹/ μ lと考えている。

zona-freeのままの状態で分割が進むと、ヒトの場合、形が崩れて平坦化しやすい。またこのままの状態で子宮内へ戻すとマクロファージや細菌による障害を受けやすいといわれている。そこで受精卵を再び透明帯の中へ戻す操作を加えた。agaroseやsodium alginateを用いた人工透明帯(artificial zona pellucida, AZP)では囲卵腔が消失するため4分割から8分割への移行が困難である。我々が行った方法では16%の受精卵が4分割まで至った。

【主要文献】

1. Natio, K., Y. Toyoda and R. Yanagimachi, 1992. Hum. Reprod. 7 : 281-285
2. 山田秀一, 福田芳詔, 豊田 裕, 1993. 哺乳卵学誌. 10 : 206-215
3. Kusunoki, H., M. Sakaue and S. Kato et al, 1989. J. Exp. Zool. 249 : 322-328
4. Kusunoki, H., S6 S. Kato and S. Kanda, 1989. J. Exp. Zool. 250 : 346-348

4 高齢雄マウス精子からの体外受精による産子の作出

Production of Term Offspring from in vitro Fertilization
by Spermatozoa derived from Old Male Mice.

若山照彦、種村健太郎、須藤淳一^{*}、今村憲吉^{*}
福田勝洋^{*}、倉本和直^{**}、九郎丸正道、林 良博

Teruhiko Wakayama, Kentaro Tanemura, Junichi Suto^{*}, Kenkichi Imamura^{*},
Katuhiro Fukuta^{*}, Kazunao Kuramoto^{**}, Masamichi Kurohmaru and Yoshihiro Hayashi

東京大学農学部獣医解剖学教室、^{*}農水省家畜衛生試験場、
^{**}東京都老人総合研究所

Department of Veterinary Anatomy, The University of Tokyo, ^{*}National
Institute of Animal Health, ^{**}Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

目的：体外受精は不妊症の改善や家畜の育種改良に利用されているが、トキのように絶滅に瀕している希少動物の保護にも応用できると考えられている。たとえば、高齢により雄の交尾能力が低下し、雌の側も排卵や受胎能力がなくなった場合、交配可能な同一種・別系統の卵子と体外受精を行って遺伝子を保存しなくてはならないだろう。そこで本研究では、高齢で交尾能力が著しく低下した雄マウスの精子を異なる系統の若いマウスの卵子と体外受精させ、正常な産子を作出することが可能かどうか検討した。

方法：本実験で使用した高齢雄マウスは、東京都老人総合研究所において33カ月飼育されたBDF₁マウスであり、採卵及びレシピエント用の雌マウスは家畜衛生試験場で飼育されていた3カ月齢のICRマウスである。体外受精は豊田らの方法¹⁾に準じて行った。受精の確認は極体の放出及び前核の有無で行い、倒立顕微鏡により多精子侵入の有無を確認した。また採取した精巣上体尾部精子の一部はスライドガラスに塗抹し、ギムザ染色後、Krzanowska²⁾の分類法によって形態異常精子の割合を求めた。一部の個体については、精巣を摘出し、薄切切片を作製して精巣内部の形態を観察した。受精卵はEDTAを加えたTYHで一晩培養し、2細胞期胚へ分裂したものをレシピエントマウスの卵管内へ移植した。生まれた産子の一部は離乳後、尾の先端を切りとり、1週間培養後、染色体異常の有無を確認した。

結果：7個体の高齢雄マウスのうち4個体の精巣上体尾部から精子が採取できたが、その内の2個体は右側にしか精子が存在しなかった。受精率は69.5～91.5%と高かったが、No.3の左右の精子以外は多精子侵入の割合が増加した。しかし、前核を3つ以上形成する多精子受精はほとんど起こらなかった。形態異常精子の割合は平均3%で、特にひどい異常精子は見られなかった。切片による精巣内部の形態は、我々の以前の報告と同様³⁾、一部の精細管ではほぼ正常な精子発生像が認められたものの、精子発生不全像を示す精細管横断面が頻繁に観察され、ここでは精上皮内に精細胞の脱落による空胞が多くみられた。また形態的に異常を示す精祖細胞は存在しなかった。移植後の産子の出生率は、右側の精巣上体尾部精子由来の受精卵からは73.4% (47匹)であったが、左側由来の受精卵からは45.8% (22匹)にすぎず、有意な低下を示した ($p < 0.01$)。染色体を調べた個体には異常は見られなかった。現在、交配による繁殖能力の検定を行っている。

Table. 1 In vitro Fertilization and Embryo Transfer from Aged Mouse Spermatozoa.

Male No.	Right or Left	Fertilization Rate	Polyspermy Rate	No. of Recipient	No. of Embryo Transfer	No. of young born			
						Total(%)	Male	Female	Death
1	R	75.5	63.3	1	16	10(62.5)	6	4	0
	L	no spermatozoa							
2	R	90.6	76.6	1	16	10(62.5)	3	5	2
	L	84.3	49.0	2	32	16(50.0)	9	7	0
3	R	78.3	13.0	1	16	14(87.5)	6	6	2
	L	69.5	20.3	1	16	6(37.5)	4	2	0
4	R	91.5	50.8	1	16	13(81.3)	4	7	2
	L	no spermatozoa							
Total	R	84.9	53.2	4	64	47(73.4) ^a	19	22	6
	L	76.4	33.6	3	48	22(45.8) ^b	13	9	0

a vs b; $p < 0.01$

Three male mice have no spermatozoa.

考察：加齢により卵母細胞数が急激に減少する卵巣に対して⁴⁾、精巣の幹精祖細胞は減少はするものの死ぬまで分裂能力を失わないと考えられている⁵⁾。したがって高齢化した希少動物の遺伝資源保全のためには、この雄の特性を有効利用することが効果的である。本実験において、7匹中4匹の高齢雄マウスから精子が採取でき、それらの精子から外見的に正常な産子が作出できたことから、遺伝子の保存のために体外受精は有効な手段であることが確認できた。しかし通常の体外受精ではほとんど起こらない多精子侵入が高率に生じ、精子に形態的には判別できない異常がある可能性が示された。また3個体からは精子が採取できず、2個体は左側の精巣上体尾部に精子が存在しなかった。精子が採取出来なかった個体の精巣横断面の形態観察から、精上皮基底部の精祖細胞は、生殖細胞としての機能を完全には失っていないと思われるが、精細胞の多くが分化の途中で精上皮から脱落したため、結果として精上皮における精子細胞が極端に減少し、精子が精巣上体尾部に到達する事が出来なかったものと考えられた。

今後高齢な希少動物の遺伝的保存のためには、精巣上体尾部精子による体外受精だけではなく、精巣内の未成熟精子細胞を卵子へマイクロインジェクションする体外受精⁶⁾についても検討しなくてはならないだろう。

参考文献：

- 1) 豊田 裕、横山峯介、星 冬四郎 (1971) 家畜繁殖誌 16; 147-152.
- 2) Krzanowska, H. (1981) J. Reprod. Fert. 62; 385-392.
- 3) Tanemura, K., Kurohmaru, M., Kuramoto, K., and Hayashi, Y., (1993) J. Vet. Med. Sci. 55; 703-710.
- 4) 北嶋明子、一戸喜兵衛 (1991) 哺乳卵学誌 8; 55-56.
- 5) Gosden, R.G., Richardson, D.W., Brown, N., and Davidson, D.W. (1982) J. Reprod. Fert. 64; 127-133.
- 6) Ogura, A. and Yanagimachi, R., (1993) Biol. Reprod. 48; 219-225.

5 牛体外受精胚の着床前の発生速度と性

Developmental Rate Differences and Sex of Bovine Preimplantation Embryos Generated *In Vitro*

坂垣佳明 木村直子 山中昌哉 須藤鎮世

Yoshiaki ITAGAKI, Naoko KIMURA, Masaya YAMANAKA
and Shizuyo SUTOU

伊藤ハム 中央研究所

Central Research Institute, Itoham Foods Inc.

目的：着床前の牛胚の発生速度と性との関係について、雄胚のほうが雌胚よりも早く、あるいは進んだ時期へ発生することが示されている。これらの研究では、胚盤胞期胚を発生段階によって形態的に分類し、染色体¹⁾あるいは雄特異的塩基配列²⁾によって性を決定しており、このような発生速度による性差が受精後どの段階から現われるかについては詳細には検討されていない。最近、Yadav *et al.*³⁾は体外受精胚の体外での第1卵割の終了が媒精後5日での発生に影響をおよぼすことを示すとともに、第1卵割時期が早い胚（媒精後24～30時間：hpi）では遅い胚（40～62 hpi）よりも雄胚が多いことを報告している。一方、我々もPCR法を用いて脱出胚盤胞の性比の変動について報告し⁴⁾、さらに別の観点から第1卵割時期と胚盤胞への発生率との関係について明らかにした⁵⁾。そこで、本研究では体外受精胚の体外での第1卵割の終了が脱出胚盤胞の性比にどのように影響するかについてPCR法を用いて検討した。

方法：屠場より入手した卵巢より卵胞内卵子を採取し、体外成熟-体外受精（IVM-IVF）により受精卵を得た。体外受精には1頭の種雄牛から採取した凍結-融解精液を用い、ヘパリンを含むBO液で受精能獲得を誘起した。22 hpiにすべての卵子/胚を卵丘細胞層より剥離して裸化した。観察は22, 26, 30および44 hpiに行い、それぞれの時点で出現した卵割（2-細胞期）胚を別に用意した卵丘細胞層の拡がった400 μ lの培地に移し換え、39℃、5% CO₂の気相下で共培養を続けた。4つのグループに分けて培養した胚の観察は164～248 hpiまで12時間間隔で行い、それぞれの時間に観察された脱出胚盤胞を採取し、PCR用のサンプルとした。PCRのためのプライマー、反応条件およびPCR産物のアガロースゲル電気泳動による判定は既報⁴⁾に従って行った。

結果：体外受精に供した669個の卵子のうち、全体では504個(75.3%)が卵割し、183個(27.4%)が脱出胚盤胞へ発生した。第1卵割の終了のピークは26 hpiでみられ(45.0%)、得られた総卵割胚の69.6% (351/504)が22～26 hpiで観察された(Table 1)。脱出胚盤胞への高い発生率は22 hpiで得られた胚でみられた(56.5%)。一方、30～44 hpiで観察された胚では、14.4% (22/153)しか脱出胚盤胞へ発生しなかった。26 hpiでは、この時間で得られた胚に対する割合では40.1%となったが、総卵割胚数に対する割合では18.1%と22 hpiより多くの脱出胚盤胞が得られた。PCRによる性判別は171個(93.4%)で可能であった(Table 2)。判定できなかった12個の胚

Table 1 Cleaving and Hatching Rates of Bovine Embryos Classified According to the Interval from Insemination to Completion of Their First Cleavage

Zygotes/embryos	Interval to completion of first cleavage (hpi)				Total
	22	26	30	44	
Cleaved	124	227	88	65	504
Total cleaved (%)	24.6	45.0	17.5	12.9	100
Hatched	70	91	19	3	183
Total cleaved (%)	13.8	18.1	3.8	0.6	36.3
Cleaved in classification (%)	56.5	40.1	21.6	4.6	36.3

Table 2 Distribution of 171 Sex-Determined Embryos Classified According to the Interval from Insemination to Completion of Their First Cleavage

Interval to completion of cleavage (hpi)															
	22			26			30			44			Total		
hpi	M	F	(%)	M	F	(%)	M	F	(%)	M	F	(%)	M	F	(%)
176	1	0	(100)	1	0	(100)							2	0	(100)
188	9	7	(56.3)	4	3	(57.1)							13	10	(56.5)
200	11	8	(57.9)	9	5	(64.3)	2	2	(50.0)	1	0	(100)	23	15	(60.5)
212	4	8	(33.3)	13	16	(44.8)	4	1	(80.0)	1	0	(100)	22	25	(46.8)
224	5	5	(50.0)	6	10	(37.5)	4	2	(66.7)				15	17	(46.9)
236	2	3	(40.0)	4	5	(44.4)	1	2	(33.3)	0	1	(0)	7	11	(38.9)
248	1	2	(33.3)	4	3	(57.1)	1	0	(100)				6	5	(54.5)
Total	33	33	(50.0)	41	42	(49.4)	12	7	(63.2)	2	1	(66.7)	88	83	(51.5)

%. No. of males/No. of sexed; M: male; F: female.

はPCR装置の温度設定ミスによるものであった。観察時間内の全体での性比は88:83 (51.5%)であったが、脱出胚盤胞が観察された時間別では早い時間(～200 hpi)で雄胚が多い傾向にあった(38:25, 60.3%)。それぞれの第1卵割時期別で得られた胚では、30～44 hpiでやや雄胚が多い傾向にあったが(14:8, 63.6%)、22～26 hpiでは性比に差はなかった(74:75, 49.7%)。

考察：IVM-IVFによる牛胚の体外作出では、体内と比較して発生率は低く、また時間的にも遅い。このことは、現在行われている体外培養系が材料面も含めて完全ではないことを示している。本研究では、卵子成熟から第1卵割までのきわめて発生の初期段階で(正常な)体内発生との時間的一致、あるいは最小限の遅延がその後の脱出胚盤胞への発生に重要であることが明らかとなった。これらの発生速度による差異は染色体異常などの細胞学的に検出可能な原因以外にも様々な要因³⁾が関連しているように思われる。性比については、透明帯より早く脱出した胚盤胞に雄胚が多い傾向がみられ、以前報告した我々の結果とよく一致した⁴⁾。一方、第1卵割の終了を指標とした場合、22～26 hpiでは性比に差はみられず、それぞれの卵割時期において早い時間に得られた脱出胚盤胞で雄胚が多かった。本研究では第1卵割時の性および第1卵割後途中で発生を停止した胚の性について検討を加えていないが、着床前の発生における性差の発現は第1卵割期以降の胚のゲノムの活性化との関連が示唆された。

文献：1) Xu, K. P., Yadav, B. R., King, W. A. and Betteridge, K. J. (1992). Mol. Reprod. Dev. 31: 249-252.

2) Avery, B., Jorgensen, C. B., Madison, V. and Greve, T. (1992). Mol. Reprod. Dev. 32: 265-270.

3) Yadav, B. R., King, W. A. and Betteridge, K. J. (1993). Mol. Reprod. Dev. 36: 434-439.

4) Itagaki, Y., Kimura, N., Yamanaka, M. and Suiou, S. (1993). J. Mamm. Ova Res. 10: 1-10.

5) 板垣佳明, 山中昌哉, 木村直子, 須藤鎮世 (1993). 第87回日本畜産学会講演要旨 p280.

6 マウス体外受精における赤血球添加培養系の効果

Inhibitory effect of homologous erythrocytes to reactive oxygen species on mouse embryos development

藤野祐司 松岡逸子 伊藤文俊 荻田幸雄 渡辺信和* 井上正康*

Itsuko Matsuoka, Yuji Fujino, Fumitosi Ito, Sachio Ogita, Nobukazu Watanabe and Masayasu Inoue

大阪市立大学医学部産科婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Osaka City University Medical School

大阪市立大学医学部第1生化学教室*

Department of Biochemistry 1st, Osaka City University Medical School

【目的】

マウス体外受精においては、従来より 2-cell Block の存在が知られておりその解除メカニズムに関して精力的に研究されている。この原因の1つとして培養環境における Reactive Oxygen Species (ROS) の関与が考えられている。そこで、今回、マウス体外受精における培養系に赤血球を添加し、赤血球の抗酸化防御機構が受精および受精卵分割、さらに胚発育に及ぼす影響を検討した。

【方法】

(1) 実験1 (in vitro fertilization) :

ICR雌マウス(8~10週齢)にhMG(ヒュメゴン)25単位、48時間後にhCG(HCGモチダ)10単位を腹腔内投与して過排卵処理し、hCG投与14時間後に頸椎脱臼法により屠殺、卵管より卵細胞塊を採取した。また、ICR雄マウス(8週齢)の精巣上体尾部より精子採取し、 1×10^5 /dishの割合で培精し赤血球添加培養系(Hams F10+0.5%赤血球)および赤血球非添加培養系(Hams F10)で24時間培養(CO₂インキュベーター:37℃、5%CO₂)後、受精率、卵分割率を比較検討した。なお赤血球はICR雌マウスより無菌的に採血したものを扱い、PBSにて3回洗浄後、最終濃度0.5%Ht値相当になるように調整し、培養液(Hams F10)に添加し実験に供した。

(2) 実験2 (in vivo fertilization) :

ICR雌マウス(8~10週齢)にhMG25単位、hCG10単位を腹腔内投与後、雄マウ

スとメイテング、hCG投与44時間後に頸椎脱臼法により屠殺、卵管より2細胞胚を採取し、実験(1)と同様に赤血球添加培養系、および赤血球非添加培養系で24時間培養(37℃、5%CO₂)し、胚発育率を比較検討した。

[成績]

(1) *in vitro fertilization* 群において、24時間後の受精率は、赤血球非添加培養系で77.4%に対し、赤血球添加培養系では71.4%と受精率においては特に差は認められなかった。一方、卵分割率は赤血球非添加培養系で12.5%に対して、赤血球添加培養系で42.4%と赤血球添加培養系で有意に高い分割率であった($P < 0.05$)。

(2) 一方、*in vivo fertilization* 群において、赤血球非添加培養系、赤血球添加培養系における2細胞期胚の発育に対する影響を24時間後の4細胞期胚への発育率で検討したところ、赤血球非添加培養系で発育率が8.3%に対し、赤血球添加培養系では発育率が61.5%と赤血球添加培養系で有意に高い4細胞胚への発育率であった($P < 0.05$)。

[結論]

従来のマウス体外受精培養系(Hams F10)にマウス赤血球を添加することにより、受精率には差はないものの、受精卵分割率、および胚発育率に改善が認められた。ことから赤血球添加培養系は、赤血球の持つ抗酸化防御機構により培養環境におけるReactive Oxygen Species (ROS)の影響を解除するとともに、酸素毒性から受精卵ならびに胚を保護することにより、胚細胞発育に良好な環境をもたらす可能性が推察された。

[主要文献]

井上正康、渡辺信和；赤血球病態と活性酸素：活性酸素と病態（井上正康編著）、pp127-144. 学会出版センター、1992.

Pabon JE. et al.; The toxic effects of short exposures to atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. Fertility Sterility 51, 896-900. 1989.

Nasr-Esfahani MH. et al.; Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed in vitro or in vivo. Development 109, 501-507, 1990.

Umaoka Y. et al.; Developmental potentiality of embryos cultured under low oxygen tension with superoxide dismutase. J. in Vitro Fertilization and Embryo Transfer 5, 245-249, 1991

7 野 性 マ ウ ス 卵 子 の 体 外 受 精

In vitro fertilization of oocytes of wild mice.

○中潟直己・上田 進・山内一也・土屋公幸*・岡本正則**

松田洋一**・東 貞宏***・豊田 裕***

Naomi NAKAGATA, Susumu UEDA, Kazuya YAMANOUCI, Kimiyuki TSUCHIYA*, Masanori OKAMOTO**

Yoichi MATSUDA**, Sadahiro AZUMA***, Yutaka TOYODA***

(財) 日本生物科学研究所, * 宮崎医大, **放射線医学総合研究所, *** 東京大学医科学研究所
Nippon Institute for Biological Science, * Miyazaki Medical College, **National Institute of
Radiological Sciences, *** The Institute of Medical Science, The University of Tokyo.

【目的】近年、実験用マウス (Mus musculus domesticus) の体外受精は確立された技術として、さまざまな分野で応用されている。しかしながら、野生マウスに関する体外受精の報告はほとんどなく、体外受精の基礎的研究もほとんど成されていないのが現状である。そこで、本研究では野生マウスの体外受精に関する基礎的研究として、実験用マウスで確立された体外受精法を用いて数種の野生マウスの体外受精を行なった結果、若干の知見を得たので報告する。

【方法】体外受精：実験には Mus dunni (India), Mus hortulanus (Yugoslavia), Mus platythrix (India), Mus spretus (Spain) および Mus musculus に属する3亜種 (Mus musculus castaneus; India, Mus musculus molossinus; Japan, Mus musculus musculus; Denmark) の計7種を用いた。体外受精はほぼ豊田らの方法¹⁾に従った。即ち、卵子はPMSG (2.5-10iu) とHCG (2.5-10iu) を48時間で投与し過排卵処理を施した成熟雌の卵管膨大部より、HCG 投与後15-16 時間に採取した。一方、精子は成熟雄の精巣上体尾部より採取し、HTF 培地内²⁾で1.5 時間前培養した。媒精は卵子を含む受精用培地に前培養した精子の一部を導入することにより行なった (精子濃度：180-620 精子/ μ l)。卵子の観察は媒精後6時間に倒立顕微鏡下で行ない、第2極体と2個の前核を有する卵子を受精卵と判定した。また、受精卵と判定した卵子については100 μ M EDTAを含む培地内で更に培養を続け、体外での発生能について検討した。

【結果】各種における体外受精成績、即ち、媒精後6時間に倒立顕微鏡下で観察した受精率は、Mus spretus 以外の種において57~84% の範囲であり、そのほとんどが2 2時間後の培養により2細胞期へ発生した。しかしながらMus spretus においては受精卵はまったく得られなかった (Table 1)。また一部の種の受精卵においては2細胞期以降も発生を続け、胚盤胞へ発生したのも認められた。以上の結果から、実験用マウスにおいて開発された体外受精法により野生マウスの体外受精が可能であることが知れた。しかしながら、種によっては従来のマウスの体外受精法ではまったく受精しない種もあることから、今後更に検討を要するものと考えられる。

Table 1. In vitro fertilization of oocytes of wild mice.

Species	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes fertilized ^{a)}	No. (%) of oocytes developed to 2-cell stage
<u>Mus dunni</u>	98	80 (81.6)	80 (81.6)
<u>Mus hortulanus</u>	19	16 (84.2)	16 (84.2)
<u>Mus musculus castaneus</u>	130	102 (78.5)	101 (77.7)
<u>Mus musculus molossinus</u>	35	22 (62.9)	21 (60.0)
<u>Mus musculus musculus</u>	20	16 (80.0)	16 (80.0)
<u>Mus platythrix</u>	23	13 (56.5)	13 (56.5)
<u>Mus spretus</u>	40	0 (0)	-

a) Oocytes with two pronuclei and a second polar body.

文献

- 1) 豊田 裕、横山峯介、星冬四郎 : 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. 家畜繁殖誌 16 : 147, 1971
- 2) Quinn, P.Q., Kerin, J.F., & Warnes, G.M. : Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. Fertil. Steril. 44: 493, 1985

8 豚卵管および子宮が豚体外受精卵子の発生に及ぼす影響

Effects of Porcine Oviduct and Uterus on the Development of Porcine Oviduct Derived from In Vitro Fertilization

吉川 奈美・岩崎 泰造・戸津川 清

Nami YOSHIKAWA, Taizo IWASAKI, Kiyoshi TOTSUKAWA

山形大学農学部 生物機能調節学講座

Section of Bioprocess Engineering, Faculty of Agriculture,
Yamagata University

目的：豚の受精卵を体外で培養した場合、一般に4細胞期で発生が停止する。そのため、この4-cellブロックを回避して胚盤胞まで発生させ得る培養体系の確立が求められている。これまでに卵胞液及び卵管灌流液の添加が、胚盤胞への発生率を高めることが報告されている¹⁾。そこで本研究では、卵子の環境としての卵管及び子宮、特にそれらの分泌液に注目し、豚体外受精卵子の発生に及ぼす影響を検討した。

方法：卵胞内卵子は、屠場で入手した卵巣の直径5mm以下の卵胞から採取し、PBSで3回洗浄すると同時に、細胞質が形態的に均一で、卵丘細胞が緊密に付着した卵子のみを選抜した。卵子は10%FCSを含む修正TCM199に投入し、5%CO₂、95%Air、38.5℃の条件下で48～50時間成熟培養を行った。精子（射出精子）はPBSで洗浄後、修正TCM199に入れ、37℃で4～5時間培養し、受精能を獲得させた。体外受精は、成熟卵子と受精能獲得精子を修正TCM199中で共培養することによって行った。

＜実験1＞修正TCM199に25%卵管灌流液（OLF）あるいは子宮灌流液（ULF）を添加し、発生に及ぼす影響を比較検討した。＜実験2＞修正TCM199培地における、卵管（OC）及び子宮（UC）上皮細胞との共培養が発生に及ぼす影響を比較検討した。＜実験3＞修正TCM199培地における、卵管各部位（卵管膨大部：OA、卵管狭部：OI、子宮・卵管接合部：UJ）の上皮細胞との共培養が発生に及ぼす影響を比較検討した。＜実験4＞修正TCM199培地における卵管上皮細胞との共培養、あるいは卵管上皮細胞コンディショニング培地（CM）が発生に及ぼす影響を比較検討した。

結果：＜実験1＞OLF区における発生率は、修正TCM199（C:control）区と比較して有意に高い（ $P<0.05$ ）結果であった。しかしULF区における発生率は、C区と比較しても有意差は見られなかった。＜実験2＞OC区における発生率は、C区と比較して有意に高かった（ $P<0.05$ 、Table. 1）。UC区においては、2-cellでは有意差が見られた（ $P<0.05$ ）が、4-cell、Blastocystでは差が無かった。＜実験3＞OA区及びOI区における発生率はC区と比較して有意に高かったが、UJ区では有意差は見られなかった（ $P<0.05$ 、Table. 2）。＜実験4＞C区と比較すると、OC区、CM区ともに全ての発生段階において有意に発生率が高く（ $P<0.05$ ）、また、両区間には有意差は見られなかった。

考察：本研究により、豚卵管液には受精卵の発生を促進する物質が含まれ、それは卵管上皮細胞から分泌されることが示唆された。KOBAYASHI²⁾らは牛の顆粒膜細胞から分泌される発生促進因子を、また河岸³⁾らは豚卵胞液中に含まれる卵成熟促進因子を同定しているが、豚卵管液中の発生促進因子の同定も必要と思われる。

Table. 1 Development of porcine IVM/IVF embryos in co-culture with porcine oviduct or uterous epithelial cells.

Culture condition	No. of embryos examined	No. (%) of embryos developed to		
		2-cell	4-cell	Blastocyst
O C	178	88(49.4) ^{a*}	81(45.5) ^a	30(16.9) ^a
U C	163	76(46.6) ^a	69(42.3) ^{ab}	15(9.2) ^b
C	228	81(35.5) ^b	70(30.7) ^b	15(6.6) ^b

* Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

Table. 2 Development of porcine IVM/IVF embryos in co-culture with porcine oviduct ampulla, oviduct isthmus and utero-tubal junction epithelial cells.

Culture condition	No. of embryos examined	No. (%) of embryos developed to		
		2-cell	4-cell	Blastocyst
O E	163	88(54.0)	79(48.5)	25(15.3) ^{a*}
O M	150	78(52.0)	70(46.7)	23(15.3) ^a
U E	142	68(47.9)	56(39.4)	14(9.9) ^b
C	150	65(43.3)	57(38.0)	10(6.7) ^b

* Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

参考文献

- 1) 戸津川清ら(1992) 豚体外受精卵の発生に及ぼす豚血清、卵胞液及び卵管灌流液の影響, 哺乳動物卵子学会誌, 9, 61-62.
- 2) KOBAYASHI, K. et al. (1992) Development of Early Bovine Embryos to the Blastocyst Stage in Serum-Free Conditioned Medium from Bovine Granulosa Cells., In Vitro Cell. Dev. Biol., 28A, 255-259.
- 3) 河岸洋和ら(1992) 豚卵胞液中の卵成熟促進活性に関する生理・生化学的研究, 食肉に関する助成研究調査成果報告書, 30-36.

9 受精とくに前核形成過程における蛋白質リン酸化の関与

Involvement of protein phosphorylation during fertilization - especially
during pronuclear formation - in mouse egg

稲垣 昇 山森尚子 *遠藤芳広 **大隅一興 ***大庭三紀子 鈴木秋悦 野澤志朗

Noboru INAGAKI, Naoko YAMAMORI, *Yoshihiro ENDO, **Kazuoki OSUMI, ***Mikiko OBA,
Shuetsu SUZUKI, Siro NOZAWA

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

Department of Gynecology and Obstetrics, Keio University, *Endo Clinic
MBC Company, *Morinaga Milk Company

【目的】以前雄性前核形成因子というものが論じられていた時期があるが、その実体については結論の出ないままに現在に至っている。しかし卵への精子進入の後、前核形成がどのようにして起こるのかは非常に興味のあるところである。近年、signal transduction (情報伝達) の領域は目ざましく発達してきた。中でもリン酸化はsignal transductionをダイナミックに観察しうる指標として注目され、非常に多くのことが解明されつつある。今回、我々はリン酸化を通し精子進入から第2極体(2PB)の放出、前核(PN)形成に於ける過程までについて観察し非常に興味ある結果を得たのでここに報告する。

【方法】1) 体外受精法によるリン酸化の検討: ICR雌マウス(6-8週齢)にPMSG 5 IU投与48時間後HCG 5 IU投与し14時間後に卵管より採卵ヒアルロニダーゼ(0.05%)にて卵丘細胞を除去の後4回洗浄、顕微鏡下にて肉眼的に第1極体を確実に観察しえた卵を、ICR雄マウス精巢上体より採取しswim up(90%以上の運動率)させ2時間前培養し $100 \times 10^4 \text{ mm}^3$ に調整した精子と媒精し1時間後にピベッティング操作にて4回洗浄し廻りの付着精子をできるだけ取り除き1. 2時間後より次にあげるリン酸化に関与する試薬を各濃度で入れた培養液にうつし第2極体の放出・前核形成につき観察をおこなった。形態観察にはlacmoid染色、染色体観察にはHoechst33342を用いた。また ^{32}P phosphateを用いてリン酸の取り込みについて1次元の電気泳動で検討を行った。

検討試薬: cyclic nucleotide依存性protein kinase系 (dbcAMP·dbcGMP·H8)

C kinase系 (TPA·diC8·staurosporin)

tyrosine kinase 系 (EGF·genistein)

protein phosphatase 系 (okadaic acid)

2) chemical activation による前核形成を用いたリン酸化の検討: Ca ionophore $20 \mu\text{M}$ 入った培養液の中に5分間卵をいれた後2回洗浄し培養を続けると46%の卵に第2極体の放出、また45%に前核(雌性)の形成が観察されることからこの実験系を用いて

activationを行った後1)と同じ試薬を使い第2極体の放出・前核の形成について観察した。またTPA 200 ng/mlが入った培養液の中に5分間卵を入れることによって前核形成が48%しうることから(但し第2極体の放出は17%)この系との比較も行った。以上培養液はmKRBを用いた。

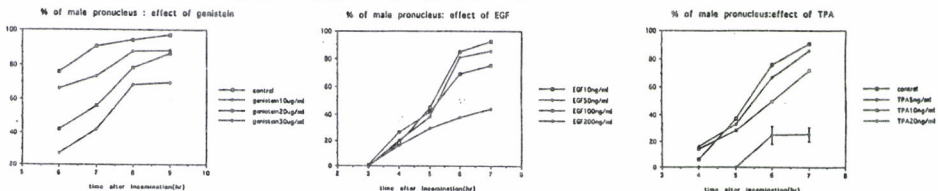
【結果】1) ①dbcAMP・dbcGMP・H8では明らかな変化は見られなかった。

②TPA・diC8においては濃度依存性に第2極体の放出・(雄性)前核形成を抑制した。また 32 P phosphateの取り込みも減少しdown regulationの可能性が示唆された。staurosporinにおいては第2極体の放出を抑制するものの(雄性)前核形成は早期にはむしろ促進する結果となった。ただし電気泳動においては 32 P phosphateの取り込みが抑制されていた。

③EGFにおいては媒精後4-6時間の間では10-50 ng/mlの濃度では第2極体の放出・(雄性)前核形成促進作用がみられたが逆に高濃度では抑制する結果となった。 32 P phosphateの取り込みは促進されていた。またこの作用はgenisteinにより抑制された。genisteinのみでも第2極体放出・前核形成は抑制され 32 Pの取り込みは抑制されていた。

④okadaic acid(OA)については濃度依存性に第2極体の放出・前核形成が抑制されたが時間がたてば染色質はdecondensationし得た。我々は正常受精直後電気泳動上58 k d蛋白が分子量位置が56 k dに変化し約2時間後に元に戻る事を観察し得たが、OAにおいてはこの変化が延滞することを観察した媒精後5-7時間においては91 k d蛋白の 32 P phosphateの取り込みが亢進逆に33 k dの蛋白の取り込みが減少することを観察した。

2) TPA・staurosporin・EGF・genistein・OAについては第2極体の放出・(雌性)前核形成に対しほぼ同様な結果が得られた。Ca ionophore activationとTPA activationの相乗効果は認められなかった。ただしCa ionophore 100 μ MにてactivationさせるとTPA 200 ng/mlと同じく第2極体の放出は抑制された。



【考察】受精に伴い一連のイノシトールリン酸系が活性化され Ca^{2+} の上昇、C kinaseの活性化が起こるが、C kinaseは活性化された後は速やかに不活化されるものと思われ、C kinaseを持続的に活性化することでは逆に前核形成・極体放出を抑制し、また一時的にも活性化の度合いが高いと極体放出を抑制するものと思われる。Tyrosine kinaseについては精子侵入後ごく初期の段階で関与し、1時間も経つと関与がなくなっていることがわかる。しかしEGFを介した雄性前核形成促進に関しては受精直後ではなく精子侵入後ある一定時間(20-30分)が経ってはじめてみられており精子侵入後のTyrosine kinaseの生理的な関与に対してはEGF receptorと関係ないと考えられる。

【主要文献】

- 1: Sarah K. Howlett and Virginia N. Bolton, 1985. J. Embryo. exp. Morph. 87:175-206
- 2: Hugo D. Ribot, Jr., Edward A. Eisenman, and William H. Kinsey, 1984. J. Biol. Chem. 259: 5333-5338
- 3: Daniel A. Schwartz and Richard M. Schultz, 1991. Dev. Biol. 145:119-127

10 PZD, ZD, Zona thinning 法のマウス胚 hatching への影響

The effects of assisted hatching of mouse embryos by using
PZD, ZD, and Zona thinning

矢沢浩之 柳田薫 星和彦 渡辺美佳 吉松宣弘 佐藤章

Hiroyuki.YAZAWA, Kaoru.YANAGIDA, Kazuhiko.HOSHI, Mika.WATANABE,

Nobuhiro.YOSHIMATSU, and Akira.SATOH.

福島県立医科大学産婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology of Fukushima Medical Collage.

【目的】胚の透明帯脱出(hatching)は発生学上重要な現象であり、子宮内でhatchingの障害、遅延が起これば妊娠は成立しない。また、近年の生殖医学の発展に伴い、体外受精(IVF-ET)において qualityの良好な受精卵が高率に得られるようになってきているにも関わらず、その着床率はいまだ満足できる状態にないのが現状であり、体外受精、体外培養胚の透明帯硬化(in vitro induced zona hardening)に起因する hatchingの障害が低着床率の一因として考えられ¹⁾、これを解決する手段としてmicromanipulationを用いた assisted hatchingによる着床率の向上が期待されている。そこで本研究では、その臨床応用に先立つ基礎実験として、様々な方法による assisted hatchingが以後の胚発育に与える影響をマウス胚を用いて検討した。

【方法】6~8週令のB6C3F1雌マウスをPMSとHCGを用いて過排卵処理を行った後に、同系雄マウスと交配させ、HCG投与50時間後に4細胞期胚を卵管より採取し実験に供した。培養液はHTFを用いた。まず、蛋白源として3.5%BSAを用いた場合、10%臍帯血清を用いた場合に比較して胚のhatching率は有意に低下することを確認して、以後はこれを hatching障害のコントロールとしてこの培養系(HTF+3.5%BSA)を用いて実験を行った。得られた4細胞期胚の透明帯にmicromanipulatorを用いて以下のような操作を加えた。(1) Pierce; SUZI, ICSI時の操作と同様に透明帯に微細なneedleを穿刺しただけのもの。(2) S-PZD (small PZD); 透明帯にpartial zona dissection法を用いて円周の約1/8程度の切開を加えたもの。(3) L-PZD (large PZD); 円周の約1/4程度の切開を加えたもの。(4) ZD; Zona drilling法により透明帯を開孔したもの。(5) P-ZT (partial zona thinning); Zona drilling 法を用いて透明帯の一部を菲薄化したもの。(6) C-ZT (circumferential ZT); Acid Tyrodeのdrop中に胚を数秒間浸すことにより透明帯を全周性に菲薄化したもの〔5)の方法はmicromanipuletorを用いていない〕。これらの胚を5%CO₂, 5%O₂, 90%N₂下で培養し、24時間毎にhatchingの状態を観察した。

【結果】透明帯を穿刺しただけでは hatching の促進効果は認められなかった。PZD法では、hatchingの開始は良好であるが、切開孔が小さいとほとんどの胚は途中で透明帯に trapされて hatchingを完了することができない。切開孔が大きい場合には十分なhatching促進効果が認められた(72時間後のhatching完了率; 59.7%)。ZD法では、比較的大きな孔が形成されるため(15-30um)、やはりhatchingの完了は良好であった(56.3%)。これら透明帯開孔法を行った胚は、

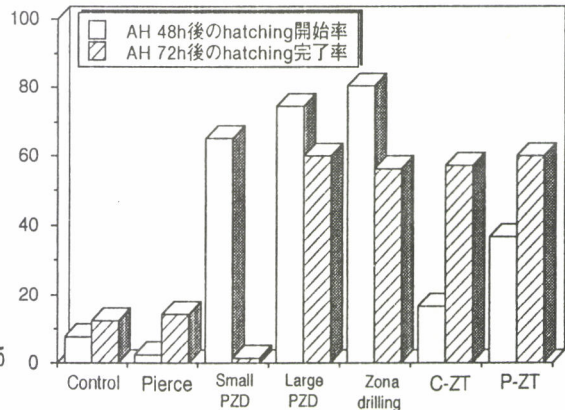


図 Effects of assisted hatching(AH) of mouse embryos

blastocystのexpansionによる透明帯の菲薄化が起こらないままhatchingが進行した。ZT法では、透明帯の菲薄化がある程度進行した後にhatchingを開始するため、より生理的に近い形での良好なhatching促進効果が認められた。

【考察】透明帯開孔法(PZD, ZD)では、胚移植時に割球の損失が起こり得ること、移植後に子宮内の免疫細胞による侵襲を受ける可能性があることなどが指摘されており、ZT法はこれらの欠点を克服したすぐれた方法であるといえる²⁾。しかし、透明帯の biophysicalな性質がヒトとマウスでは異なるため、ヒトでの assisted hatchingには余り有効でないとの報告もある³⁾。今後は、さらに検討を加えることで、ヒトIVFでのassisted hatchingによる妊娠率の向上をめざしたい。

文献

- 1)Cohen,J, Elsner.C, Kort.H, Malter.H, Massey,J, Mayer.M, and Wiemer.K,(1990) Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisted hatching using micromanipulation, Human Reprod, 5:7-13.
- 2)Gordon. J.W, Dapunt.U,(1993) Restoration of normal implantation rates in mouse embryos with a hatching impairment by use of a new method of assisted hatching, Fertil.Steril. 59:1302-1307.
- 3)Tucker.M.J, Biol.M.I, Wiker.S.R, and Kort.H.I,(1993) Embryonal zona pellucida thinning and uterine transfer.Assist.Reprod.Rev, 3:168-171.

11 マウス雄胎子期生殖細胞由来核移植卵の発生能に 及ぼす電気刺激ならびに成長因子の影響

Effects of electrical stimuli and growth hormones on the developmental ability of
nuclear transferred eggs with male fetal germ cells in the mouse

○角田幸雄・加藤容子

Yukio TSUNODA & Yoko KATO

近畿大学農学部畜産学教室

Laboratory of Animal Reproduction, College of Agriculture,
Kinki University

目的：演者らはこれまで、生殖隆起より単離したマウス胎子期生殖細胞は個体への発生能（全能性）を維持しているか否かを調べるため、染色体を除去した第2減数分裂中期卵細胞質への核移植を行ってきた。すなわち、胎子期生殖細胞を1個、あらかじめキスト染色後蛍光顕微鏡下で染色体を除去した卵細胞質へ不活化センダイウイルスを用いて融合させ、直後にエタノール処置によって単為発生刺激を与え、核が形成された再構築胚の発生能を調べた。その結果、G₀期の¹⁾、小さな形態を示す雄胎子期生殖細胞²⁾を用いた場合に胚盤胞期への発生率が高いことを明らかにした。しかしながら、核形成率が低いため得られる胚盤胞が少なく、レシピエントへ核移植後の個体への発生能を十分に検討できなかった。そこで本実験では、核形成率ならびに再構築胚の胚盤胞への発生率を向上させることを目的として、1). 電気刺激の影響および 2). 脱メチル化剤である5-AzacytidineとG₀→G₁期への移行を促進する成長因子PDGFならびに FGFによる胎子期生殖細胞の前培養の影響を検討した。

方法：1). 予備実験として、F₁ (C57BL/6×CBA)雌マウスよりhCG 投与後15時間目に採取後裸化した卵子に、異なった条件の電気刺激(BTX-200)を与えて4日間培養し、前核形成率ならびに胚盤胞への発生率を調べた。ついで、既報²⁾に従って15.5日齢雄胎子期生殖細胞の核移植を行い、最も良い条件の電気刺激を与えた後培養し、得られた桑実胚～胚盤胞をレシピエント雌子宮へ移植した。2). 5-Azacytidine(3 μM), PDGF (5ng/ml)あるいは FGF(50ng/ml)を加えた20% FCS加M16液で15.5日齢雄胎子期生殖細胞を2～3時間前培養後、1)と同様に核移植を行った。

結果：1). Zimmermann液へ1～6回移すだけで41～48%の卵子に前核が形成され胚盤胞へ発生すること、最も良い条件の電気刺激（150V-100 μ sec1回、50V-50 μ sec2回、20分間隔）処置区ではすべての卵子で前核が形成され、94%が胚盤胞へ発生することが判明した。この条件下で核移植を行うと、供試卵の46%が融合して90%が核を形成し、63%が桑実胚～胚盤胞へ発生した。しかしながら、これらの發育胚の移植によって着床はみられなかった。2). PDGFならびに FGFで胎子期生殖細胞を前処置後核移植しても、この濃度では再構築胚の発生率は control区と比べて大差がみられなかった（95%vs 95%, 33%vs58%）。しかしながら、5-Azacytidine処置を行った場合は、全く発生がみとめられなかった。

文献：

- 1). Tsunoda, Y., T. Tokunaga, H. Imai and T. Uchida, 1989. Development 107:407-411.
- 2). Tsunoda, Y., Y. Kato and G. T. O'Neill, 1992. J. Reprod. Fert. 96:275-281.

12 ラット 1 細胞期胚の発生におよぼす P H A レクチンの効果

Effects of PHA lectin on *in vitro* development of rat 1-cell embryos

山 田 雅 保 ・ 内 海 恭 三

Masayasu Yamada & Kyozo Utsumi

京都大学農学部 家畜繁殖学教室

Department of Animal Reproduction, Kyoto University

緒言：ラット 2 細胞期胚は、修正 KRB 培養液を用いた体外培養では、2 細胞期から 4 細胞期でその発生を停止する。しかし、最近我々は、修正 KRB 培養液からリン酸を除去し、さらに NaCl 濃度を 118mM から 85mM まで低下させることによって、そのような発生の停止は解除され、さらに前核期胚の約 80% が胚盤胞期へ発生することを報告している。また我々はこの一連の研究の中で、受精直後の胚を同様な培養条件下で培養した結果、胚盤胞期への発生率は約 20% であり、受精直後の胚の体外での発生能は前核期胚に比べて非常に低いことを明らかにしている。

同様のことが、Bavister らによって報告されている。彼らはハムスター前核期胚はリン酸およびグルコースを含まない HECM-3 培養液で培養することによって高率（約 70%）に桑実期/胚盤胞期へ発生するが、受精直後の胚の桑実期/胚盤胞期への発生率は約 10% まで低下すること、およびその発生率を改善するために卵管液中に高濃度で存在し精子の生理機能に影響をもつハイポタウリンの効果を検討した結果、1mM ハイポタウリンを培地に添加することによって、その発生率は約 30% にまで改善されることを明らかにしている。これらの結果から、ラットおよびハムスター胚の受精直後から胚盤胞期への発生は、胚が受精から前核期までの間に卵管環境内から受ける影響によって調節されることが示唆される。

本実験において、受精直後のラット胚の体外での発生条件を検討し、以下の結果を得たので報告する。上述のラット胚の発生に対して改良された培養液（以下、RECM と称す。）からグルコースを除去することによって胚盤胞期への発生率は改善されるが、ハイポタウリン添加によっては発生は全く影響されなかった。またハイポタウリンが活性酸素のスカベンジャーとしての機能をもつことから SOD についても検討したが、改善効果は認められな

かった。ところが、体外での卵成熟に対して促進作用をもち、かつ種々の細胞に対して分裂促進作用を有するレクチン、特にPHA-Pについて検討した結果、グルコース不含RECM (RECM(Glc-)) にPHA-Pを添加することによって胚盤胞期へさらに高率に発生することが判明した。

方法：自家繁殖ウィスター系ラットから排卵後6～8時間に受精胚を回収した。回収胚は、0.1%ヒアルロニダーゼ処理により顆粒膜細胞を除去した後、RECMあるいはRECM(Glc-)で、あるいは種々の濃度のハイポタウリン、SOD、PHA-Pを添加したRECM(Glc-)で120時間培養した。PHA-P処理においては、最初の24時間処理し、その後RECM(Glc-)でさらに96時間培養する実験もおこなった。受精胚は、侵入精子および第2極体の観察、そして2細胞期への発生によって確認した。

結果および考察：排卵6～8時間後に回収した胚をRECMで培養した結果、ほとんどの胚は4～8細胞期で発生を停止し、培養120時間後にわずか20%の胚が胚盤胞期へ発生した。しかし、RECM(Glc-)では、培養96時間には、約70%の胚が桑実期へ発生したが、120時間後の観察から、胚盤胞期への発生率は約40%であった。また、ハイポタウリン(1～10mM)あるいはSOD(300～3000unit)をRECM(Glc-)に添加しても胚盤胞期への発生率には全く影響は認められなかった。

次に、PHA-Pの効果について検討した。10 μ g/mlの濃度で培養開始後24時間処理した結果、培養開始96時間での観察から、PHA-P無処理区では、約70%の胚が桑実期以降に、そして約20%が胚盤胞期へ発生したが、一方処理区では、約95%が桑実期以降へ、そして約50%が胚盤胞期へ発生した。培養開始120時間後では、胚盤胞期への発生率は無処理区では約40%であったが、処理区では約80%と高率であった。以上の結果から、PHA-Pは受精直後の胚の発生に促進効果をもち、さらに桑実期から胚盤胞期への発生に大きく影響をおよぼすことが明かとなった。また、PHA-Pの効果は用量依存性であり、10 μ g/mlで最大の促進活性を示し、それ以上の濃度では、その活性は低下する。一方、PHA-P(10 μ g/ml)添加RECM(Glc-)で120時間培養すると、桑実期までの発生速度の遅延および形態的に異常な胞胚腔形成が観察された。

PHA-Pは、Eサブユニット(E)とLサブユニット(L)からなる4量体である。予備的結果ではあるが、PHA-Pと同様の促進活性がEのみからなるPHA-E₄ではなくLのみからなるPHA-L₄に認められた。PHA-Pは一般には細胞表面上のアスパラギン結合型複合糖鎖でGal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 2Mann構造を含むオリゴ糖、糖ペプチドに親和性をもつが、E₄はさらに β -Mann残基に結合しているbisecting GlcNAc残基との相互作用を必要とし、L₄はそれを必要としないことから、EとLとは異なった複合糖鎖を認識している。従って、PHA-Pの胚発生促進効果は、1細胞期胚の細胞表面のL₄特異的結合糖鎖を認識することによって発揮されることが示唆される。

以上の結果から、ラット胚の受精後から胚盤胞期への発生はグルコースを必要とせず、またPHA-Pの作用を受精後24時間の間に受ける事によって促進されることが明かとなった。

13 マウス初期胚発育に対するbasic Fibroblast Growth Factorの効果

Effects of basic fibroblast growth factor on the development of mouse embryos
in vitro.

吉田 壮一・高尾 成久・原田 省・寺川 直樹

Souichi YOSHIDA, Naruhisa TAKAO, Tasuku HARADA, Naoki TERAKAWA

鳥取大学産科婦人科学教室

Department of Gynecology and Obstetrics, Tottori University Faculty of Medicine

目的：細胞成長因子は初期胚の増殖・分化に関与することが知られている。線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor:FGF)は、両生類の中胚葉形成を誘導するが、マウス初期胚においても同様の作用が示唆されている^{1)~4)}。FGFファミリーには、遺伝子の相同性から7種類以上が存在すると考えられている。FGF受容体も4種類が知られており、それぞれのリガンドが様々な親和性で受容体と結合する。マウス胚盤胞にはFGF受容体1 (FGFR1)が発現していることが証明されているが⁵⁾、初期胚発生における役割については明らかでない。

したがって、本研究ではRT-PCR法を用いて、マウス着床前初期胚におけるFGFR1の発現を確認するとともに、FGFR1と高親和性をもって結合する塩基性線維芽細胞増殖因子(b-FGF)のマウス着床前初期胚に対する作用を2細胞期胚から胚盤胞への発生率、および蛋白合成を指標として検討した。

方法：4~6週令のB6C3F1雌マウスにPMS 7.5単位、hCG 10単位を48時間間隔で腹腔内投与して過排卵処理し、hCG投与時に同系雄マウスと同室した。hCG投与44時間後に卵管を摘出し、卵管を灌流することにより2細胞期胚を採取した。

(RT-PCR) 採取した2細胞期胚を、0.1%BSA添加BWW培養液にて37°C、5%CO₂ in airで44時間培養し、胚盤胞を得た。30個の胚盤胞からtotal RNAをguanidine thiocyanate法にて回収し、RTによりcDNAを合成した。マウスFGFR1 cDNA配列から合成したプライマーを用いてPCRを行い、2%アガロースゲルに泳動後、エチジウムブロマイド染色により陽性バンドを検出した。

(胚発生率、蛋白合成) 0.1%BSA添加BWW培養液にb-FGFを0、0.1、1、5、10、50、100ng/mlの濃度で加え、37°C、5%CO₂ in airで44時間培養した。この時点で各濃度における胚盤胞への発生率を検討した。それぞれの胚を³H-leucine(5 μ Ci/ml)添加培養液に移し4時間培養した。培養後、胚を冷PBSにて5回洗浄し、凍結・融解を2回繰り返し細胞を破壊した。次に、TCA不溶性の成分の放射能を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

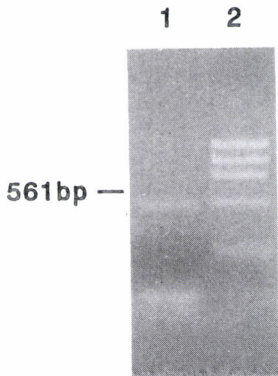
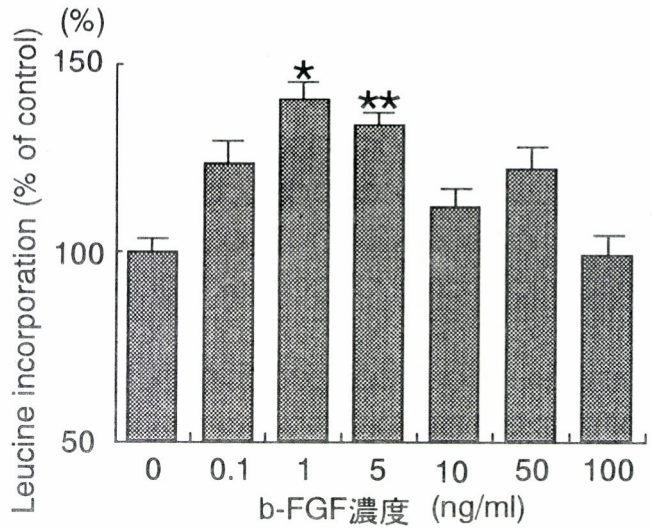


図1. マウス胚盤胞におけるFGFR1の発現.

lane 1. FGFR1 mRNAの
RT-PCR産物(561bp)
lane 2. Marker



* $p < 0.01$
** $p < 0.05$

図2. b-FGFと胚蛋白合成.

結果：RT-PCR法によって、マウス胚盤胞においてFGFR1 mRNAの発現が認められた(図1)。

いずれの濃度においても培養液へのb-FGFの各濃度の添加は2細胞期胚から胚盤胞への発生率に影響を及ぼさなかった。

b-FGF 1および5ng/ml添加は、 ^3H -leucinの取り込みを指標とする胚盤胞の蛋白合成をコントロール(b-FGF 0ng/ml)に比して有意に促進した(図2)。

考察：FGFファミリーは形態形成と血管新生に重要な役割を果たすことが知られているが、近年、発生における作用が検討されつつある。FGFR1は、FGFファミリーのうちa-FGFおよびb-FGFと高親和性をもって結合する。今回RT-PCRによりマウス胚盤胞においてこのFGFR1 mRNAが発現していることが確認された。さらに、1および5ng/mlのb-FGFを培養液中に添加することによりマウス初期胚の蛋白合成を促進することが明らかとなった。

以上の結果より、b-FGFはマウス着床前初期胚の増殖分化に関与する可能性が示唆された。

文献：

1. Haub, O. and Goldfarb, M. (1991) Devel., 112, 397-406.
2. Hebert, J.M., Boyle, M. and Marrin, G.R. (1991) Devel., 112, 407-415.
3. Niswander, L. and Martin, G.R. (1992) Devel., 114, 755-768.
4. Wilkinson, D.G., Peters, G., Dickson, C. and McMahon, A.P. (1988) EMBO J., 7, 691-695.
5. Campbell, W.J., Miller, K.A., Anderson, T.M., Shull, J.D. and Rizzino, A. (1991) In Vitro Cell. Dev. Biol., 28A, 61-66.

14 有袋類タンマーワラビーの胚の in vitro での発育に及ぼす 内因性血小板活性化因子の役割

The possible role of endogenous platelet - activating factor
on the in vitro development of Tammar wallabies' blastocysts

小島敏之¹, L. A. Hinds², C. O'Neill³, C.H. Tyndale- Biscoe²

¹農水省畜試繁殖部

¹Department of Animal Reproduction, National Institute of Animal Industry

²CSIRO, 野生生活生態学研究部門、オーストラリア

²Division of Wildlife and Ecology, CSIRO, Australia

³王立ノースショア病院、オーストラリア

³ Human Reproduction Unit, Royal North Shore Hospital of Sydney, Australia

目的：本実験は、哺乳動物初期胚の発育をin vitroで制御する系の確立を目指す研究の一環として行われた。その実験モデルとして有袋類であるタンマーワラビー (Tammar wallaby, *Macropus eugenii*) を選んだ理由は、その胚自体が泌乳性および季節性 (日長時間) のembryonic diapauseを示すからである。直接の研究目的は、diapauseからの人為的な活性化誘起処置 (この場合は、腹囊の中で吸乳している子を取り去る処置；以下、RPYと呼ぶ。Removal of pouch young の意) 後、活性化に至る種々のステージにある胚盤胞を培養し、その発育の如何を観察することによりdiapauseを示す胚の発育を促す要因を分析することであった。

方法：RPY後、0、3、4、5、6、7および8日後の動物各4頭計28頭の子宮を摘出し下向性に0.1%BSA加TCM199 (Hank's salt) で灌流し胚盤胞を回収した。得られた胚盤胞は、回収後直ちに10%FCS加TCM199中に移し、35℃、5%CO₂、95%空気の湿度飽和の気相条件下で保持した。一定時間後、それぞれの胚を表1に示した培養液に移し代え24時間培養を継続した。成績の評価は、正立顕微鏡 (×400) を用いてハンギング・ドロップ法により観察することにより行った。表1に示した子宮内膜浸出液のPAF濃度および末梢血液中のプロジェステロン濃度は、既報 (Kojima *et al.* 1993) において報告している。

結果：数少ない胚数の条件下で培養条件を種々検討したので、体系的な実験とはならなかった。しかしながら、胚の径が明らかに増大したもの (表1では、developedと記載) の7例のうち4例では、培養液として用いた子宮内膜浸出液に血小板活性化因子 (以下、PAFと呼ぶ) が検出されていた。他の3例ではそれらの胚が得られた母体の子宮内膜のPAF濃度が比較的高値を示していた。これら両者の条件を備えていながら明瞭な発育を示さなかった例は、2例あった。

考察：休止状態にある黄体および胚盤胞は、RPYにより活性化されるが胚盤胞が実際に発育を再開するのはRPY後5～6日経過してからである。そして、その発育の再開にはRPY後4～5日で起こる黄体よりのプロジェステロン (P) の大量放出が必要であると言われている。しかし、RPYからPの大量放出までに要する日数には個体間差が大きく、RPYによる

活性化処置後の現象を検討する際には末梢血液中のP濃度のピークの出現を確認する必要があることがわかった(表1のA~Eの分類の根拠; Kojima *et al.* 1993)。さらに、P濃度のピークのほぼ1日前にPAF分泌のピークがあることが子宮内膜浸出液中のPAFを分析することによって明らかになった(Kojima *et al.* 1993)。したがって、PAFはRPYによる黄体の活性化を起こす信号物質である可能性が示唆された。本研究においては、PAFが休止期にある胚盤胞に対しても直接の活性化効果を有している可能性が示された。

Table 1. In vitro development of Tammar wallabies' blastocysts

Animal No.	Group ¹	Day after RPY ²	PAF in endometrium ³	medium ⁴	PAF in medium	development ⁵
6725	A	0	93	Day6EM+P	-	NS
6797	A	0	166	Day6EM+P	-	developed
7085	A	0	17	M199+FCS	-	deg.
7245	A	0	141	Day0EM-P	+	NS
6175	B	3	388	M199+FCS	-	NS
7100	B	3	169	M199+FCS	-	NS
7187	B	3	109	Day3EM-P	+	developed
7193	B	3	20	Day5EM-P	+	developed
7221	B	4	127	Day5EM+P	±	developed
7399	B	4	1479	Day4EM+P	+	NS
7251	B	5	820	Day6EM+P	-	deg.
7253	B	6	5	M199+BSA	-	N/A
7083	B	7	487	M199	-	developed
7086	C	4	775	M199+FCS	-	NS
7133	C	4	1387	M199+FCS	-	NS
7134	C	5	147	Day0EM+P	+	developed
7139	C	6	362	M199+7139serum	-	no change
7192	C	7	50	-	-	UFO
7109	C	7	59	M199+FCS	-	NS
7128	D	5	232	M199+FCS	-	no change
7079	D	5	61	M199+FCS	-	NS
7090	D	6	N/A	-	-	UFO
7189	D	6	460	M199+BSA	-	developed
7154	D	7	85	-	-	Nothing Found
7172	D	8	92	DMEM+6372serum	-	NS
6638	D	8	N/A	-	-	Nothing Found
7168	D	8	96	M199+FCS	-	NS
7136	E	8	390	DMEM+6372serum	-	deg.

¹ The groups were defined as follows: Group A, animals that were autopsied on Day 0; Group B, no changes in peripheral progesterone; Group C, progesterone increasing to or on peak; Group D, past progesterone at time of autopsy; Group E, unable to be classified.

² Day 0 = the day performed RPY (removal of pouch young)

³ in pmol/g, N/A=not available

⁴ EM means endometrial exudates, P addition of progesterone (1 ng/ml), BSA, bovine serum albumin, and FCS fetal calf serum.

⁵ NS indicates not significant growth, deg. degeneration, and UFO unfertilized ovum.

引用文献:

T. Kojima, L. A. Hinds, J. Muller, C. O'Neill and C. H. Tyndale-Biscoe Production and secretion of progesterone *in vitro* and presence of platelet-activating factor (PAF) in early pregnancy of the Marsupial, *Macropus eugenii*. Reprod. Fertil. Dev., 5, 15-25 (1993).

15 トリハロースを用いたVitrificationとそのマウス胚の発育に及ぼす影響

Vitrification with trehalose and its effects on mouse embryos' development

石田ガブリエラ、野原理、河内谷敏、平山寿雄、斉藤英和、広井正彦
Gabriela M. Ishida, Makoto Nohara, Satoshi Kawachiya, Tosio
Hrayama, Hidekazu Saito, Masahiko Hiroi

山形大学医学部 産科婦人科学教室
Department of OB & GYN, Yamagata Univ. Sch of Med

目的：

8細胞のマウス胚をVitrification法にて凍結するときに、凍結保護剤と胚を平衡する時間が胚の発育に関してどのような影響を及ぼすかについて検討した。また、培養液中に5-bromo-2-deoxyuridineを加えてVitrification法がDNAに及ぼす影響についても姉妹染色分体交換より検討した。

方法：

8細胞期胚は過排卵処理されたマウスより採取され、7つのグループに分けられた。対照群は凍結保護剤に暴露せず、直接培養した群とし、残りの6グループは5°Cの凍結保護剤に1、2、5、10、20、40分間平衡させた。各時間平衡させた後、胚を容量0.25mlのFrenchストローに入れ、液体窒素に直接浸け急速冷凍した群とした。凍結保護剤は、Hepes-HTF液にFicol18%(w/V), trehalose0.3Mを解かし、さらにこの液にethylene glycolを40%(V/V)になるように加えた。融解は、ストローを20°Cの温水に5秒間浸け、凍結保護剤を融解した後、胚を含む凍結保護剤を直ちに0.33Mのtrehaloseを含むHepes-HTF液に入れた。5°C、5分間平衡した後、0.25Mのtrehaloseを含むHepes-HTF液に胚を移し。さらに5分間平衡した。次に胚を10%非動化血清を加えたHTFに移しさらに5分間平衡させた後、10%非動化血清添加HTF培養液にて培養した。24時間後の胞胚形成率と胚の姉妹染色分体交換について検討した。

成績：

14回の胞胚形成率の平均は対照で73.7%、1分の平衡で43.7%、2分で58.8%、5分で62.3%、10分で59.2%、20分で60.3%、40分で60.4%であり、胞胚形成率では1分の平衡のグループでは対照に比較し明かに低値を示した。また5分以上の平衡時間を持ったグループでは対照に比較するとやや低い、ほぼ一定の値を示した。また、姉妹染色分体交換の検討では、対照群に比較し1、2分の平衡群は高い姉妹染色分体交換を示し、5分平衡まで下降傾向し以後上昇に転じ、高い姉妹染色分体交換を示した。

平衡時間 (分)	胞胚形成率 (%) 平均	SD	姉妹染色分体交換 (平均) (/metaphase)	SD
対照 (0)	73.7	20.1	13.7	5.3
1分	43.7*	30.3	20.6*	6.3
2分	58.8	20.5	17.2*	6.1
5分	62.3	19.4	10.1*	4.2
10分	59.2	17.5	16.0*	5.0
20分	60.3	22.2	19.8*	4.5
40分	60.4	29.4	21.7*	5.2

*: $P < 0.05$

考察:

Vitrification は従来の凍結法に比較し簡単に胚を保存できる方法ではあるが、この安全性についてはまだ明かではない。我々はこのVitrification法を用いて8細胞期の胚を凍結・融解後生存胚を得ている。5°Cで胚を凍結保護剤と平衡させることによって、全ての平衡時間より生存胚を得ている。しかし、その胞胚への発育率からみると2分以上の平衡時間が必要であると考えられる。これは葛西らが述べているように、低温では平衡時間を長くしても胚への障害は少ないと述べていることに一致する。また胚を扱う際にはある程度の時間の余裕があることが必要であり、この上でも低温で凍結保護剤と平衡させることは利点がある。また、胚の姉妹染色分体交換を検討すると5分の平衡で最も低い値を示し、10、20、40分では対照群よりも高い値を示し、5°Cで凍結保護剤と平衡するにしても、長ければ長い程良い訳でもなく、5分が最適平衡時間と考えられた。これは凍結保護剤には2つの作用、すなわち胚に対する毒性と凍結の際の細胞小器官、膜、蛋白の保護作用があるためと考えられた。

主要文献:

1. Kasai M, et al 1992. Biol Reprod 47: 1134-1139
2. Kasai M, et al 1990, J. Reprod Fert. 89: 91-97
3. Rall WF, et al 1985. Nature 313: 573-575
4. Rall WF, et al 1987 J. Reprod Fert. 80: 499-504
5. Trouson A, et al 1987. Fertil Steril. 48, 843-850
6. Rudolph AS, et al 1985. Cryology 22, 367-377
7. Saito H, et al 1984. Fertil Steril 41, 761-765

16 マウス前核期卵の発生能に及ぼす培養密度の影響

Effects of the culture density of mouse zygotes on the development
in vitro and in vivo

○加藤容子・大野博美・福山香里・角田幸雄

Yoko KATO, Hiromi OHNO, Kari FUKUYAMA, Yukio TSUNODA

近畿大学農学部畜産学教室

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

目的：最近，哺乳動物初期胚を体外で培養する時の胚の培養密度が，その後の発生能に大きく影響することが示唆されている．演者らも第85回日本畜産学会で，ウシ体外受精卵を体外培養する場合に，培養液 $10\mu\ell$ に対して胚5個あるいは10個を培養したときに胚盤胞への発生率が高いこと，また，胚を複数個培養することが発生率を向上させるのに重要であることを報告した（日畜会報，64，904-908，1993）．本実験では，マウス前核期卵を用いて胚の体外発生能および移植後の産子への発育能におよぼす培養密度の影響について検討した．

方法：供試した前核期卵は，CD-1系雌マウスに48時間間隔でPMSGとhCGを各5IUずつ腹腔内投与した後，同系雄と交配させてhCG投与後20時間目に卵管より採取した．回収した胚はヒアルロニダーゼで裸化して実験に供した．実験1．培養密度の検討：回収した胚は， $10\mu\ell$ の①M16培地，②M16培地+EDTA，③M16培地+SOD+thioredoxin，④CZB培地でそれぞれ1，5，10，20，40および60個ずつ培養した．各ステージへの発生は毎日観察し，hCG投与後120時間目に胚盤胞の細胞数を計測した．実験2．培養液量の検討：培養胚数対培養液量の比率を1：1すなわち，胚1個に対して培養液 $1\mu\ell$ となるような比率に固定し， $1\sim 10\mu\ell$ の培養液②でそれぞれの個数の前核期卵を体外培養して胚盤胞への発生能を検討した．各ステージへの発生は観察せず，hCG投与後120時間目に胚盤胞へ発育した胚の割合とその細胞数を計測した．実験3．産子への発育能の検討：1個あるいは10個の前核期卵を $10\mu\ell$ の培養液②で4日間体外培養して得られた胚盤胞を，偽妊娠3日目マウスの子宮へ移植した．受胎雌は妊娠17日目に開腹し，生存胎子の有無を検討した．

結果：実験1：Figure 1に4種類の培養液 $10\mu\ell$ でそれぞれ1, 5, 10, 20, 40および60個ずつ培養後、胚盤胞へ発生した胚の割合を示した。図から明らかなように胚盤胞への発生率が高い比率は、培養液②および③の場合、1 : 1 (44~48%)あるいは2 : 1 (55%)であった。M16培養液のみ(①)では、培養密度にかかわらず胚盤胞へは全く発生しなかった。また、培養液④を用いた場合の胚盤胞への発生率は、1 : 1の比率では14%, 2~6 : 1では32~37%といずれも低率であり、また、最適な比率は明らかにできなかった。実験2：比率を1 : 1に固定して培養すると、培養液の量を変化させても胚盤胞への発生率は大差がみられなかった(50~81%)。しかしながら、胚盤胞期における細胞数は胚を $1\mu\ell$ の培養液中で1個培養した場合に減少する傾向がみとめられた。実験3： $10\mu\ell$ の培養液に前核期卵1個を培養して得られた胚盤胞(53/140, 38%)を移植すると、10個培養して得られた胚盤胞(94/150, 63%)を移植した場合と比べて、産子生産率が低下する傾向がみとめられた(15% : 26%)。

以上の結果より、マウス前核期卵においても、体外培養時の培養密度が胚の発生能に大きく関わっており、最適な比率であっても胚を単一で培養すると発生能が低下する傾向がみられ、複数で培養する必要があることが示唆された。

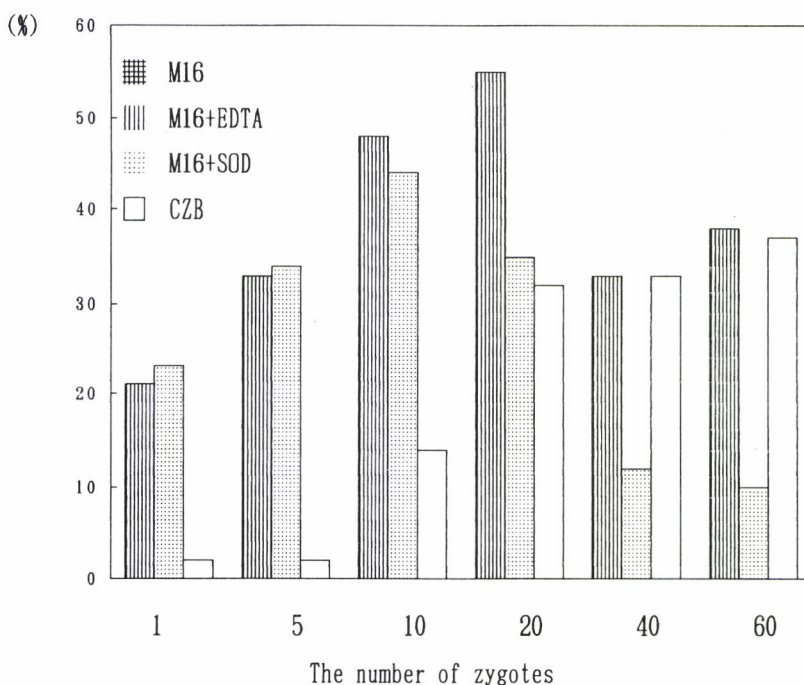


Fig.1 The proportion of blastocysts developed from zygotes cultured in $10\mu\ell$ varied medium.

17 ハムスター 1 細胞期胚の体外発生に及ぼす タウリン及び EDTA の影響

E Effects of taurine and EDTA on development of hamster 1 - cell embryos in vitro

堀内俊孝・建本秀樹

Toshitaka HORIUCHI, Hideki TATEMOTO

広島県立大学 生物資源学部 生物資源開発学科

Department of Bioresources, Hiroshima Prefectural University

目的：哺乳動物胚の多くは、体外培養すると胚発生を停止することが知られている。特に、シリアン・ハムスターは、2細胞期、4細胞期、8細胞期で発生停止が生じるため、体外培養は非常にむずかしいとされてきた。最近、Bavisterらの活発な研究から(1,2)，①培養液中のグルコースとリン酸塩の存在がこの発生停止の一要因であること，②ビルビン酸の添加で1細胞期胚は4細胞期以降への発生を低下させること，③初期1細胞期胚の発生は、ハイポタウリンの添加で改善されることなどが明らかにされた。また、Umaokaらは、ハムスター胚が光に曝されることで発生停止を生ずることを報告し(3)，発生停止の原因として活性酸素生成を指摘した。

そのため、①卵管液中に比較的多く含まれるタウリンと②スーパーオキシドなどと反応する重金属イオンのキレート剤であるEDTAに注目し、本研究は、雌雄両前核の認められる1細胞期胚の体外発生に及ぼすタウリン及びEDTAの影響について検討した。また、ゴールデン系とアルビノ系のハムスターを用いて系統差についても調べた。

方法：シリアン・ハムスターは、オリジナル毛色であるゴールデン系（アグーチ）と白色のアルビノ系を用いた。これらハムスターは、清水実験材料から購入、または本研究室で自家繁殖させた。6～8週令の雌ゴールデン及びアルビノ・ハムスターは、発情周期第1日目（Ovulation Discharge 放出日）の午前10時にPMSG 15 iuを腹腔内投与し、3日目の夕方、同系の成熟雄ハムスターと同居させた。翌朝、膣内に精子が確認されたものを妊娠1日目として、妊娠1日目の午後3時に卵管灌流し、雌雄両前核期の1細胞期胚を採取した。採卵は電気スタンドのみ点灯した暗所で行い、実体顕微鏡には赤いフィルターを付けた。卵管灌流にはHepes-HECM3を、ハムスター胚培養の基礎培地にはHECM3を使用し、37.5℃、10%CO₂、10%O₂の気相条件下で培養した。タウリンは、0、5、10、20mMの添加、EDTAは、0、25、50、100μMの添加とし、胚発生は培養後72時間で調べた。

結果：胚発生に及ぼすタウリンの影響は、Fig.1に示した。ゴールデン系では、5～20mMのタウリン添加で4細胞期、8細胞期、桑実期と胚盤胞期(M&BI)への発生率は無添加区と比較し有意に増加し、5mM区でM&BIは最も高くなった(56%：41/73)。アルビノ系では、8細胞期までの発生率に差はないが、10mM区でのM&BIは46%(46/106)と有意に高くなった。EDTAの影響は、Fig.2に示した。ゴールデン系では8細胞期への発生率は25～100

μ Mで有意に高く, M&BI率は100 μ Mで高くなった(19% : 19/79)。アルビノ系では25 μ M添加で8細胞期(69% : 58/84)とM&BI(56% : 47/84)への発生率が最も高くなった。

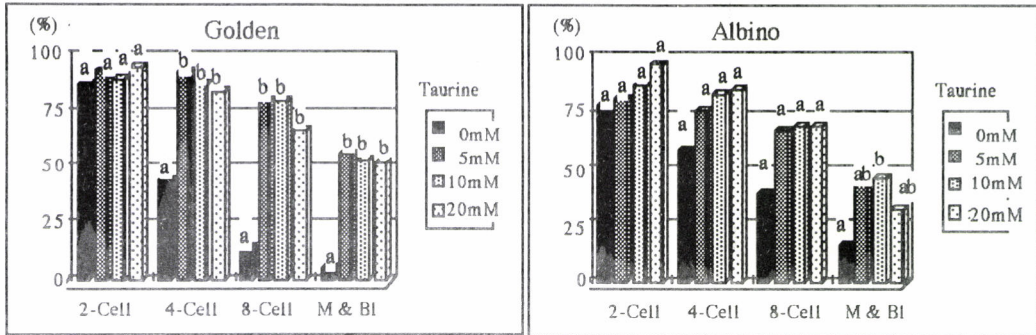


Fig.1 Effect of taurine on development of golden and albino hamster 1-cell embryos in vitro.
a, b : $P < 0.05$, Fishers's PLSD.

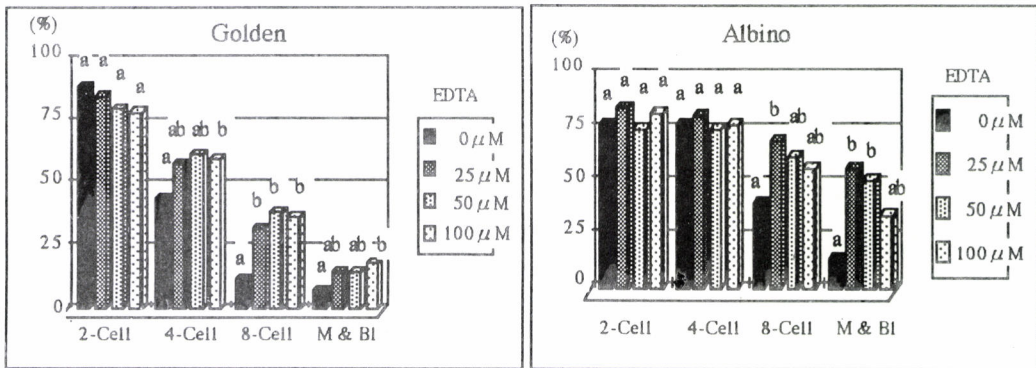


Fig.2 Effect of EDTA on development of golden and albino hamster 1-cell embryos in vitro.
a, b : $P < 0.05$, Fishers's PLSD.

考察：本研究ではHECM3のみでハムスター1細胞期胚を培養した場合, Barnettらの報告(2)よりかなり低い発生率であった。HECM3にタウリン及びEDTAを添加することで, 発生率は改善された。その効果は, ゴールデン系ではタウリンが, アルビノ系ではEDTAが顕著であり, ハムスター胚の体外発生に遺伝的差異が認められた。また, マウスでの報告(4)と同様, ハムスターでもEDTAで胚発生が改善されたことは, 少なくとも活性酸素生成が胚発生停止の一要因であるものと考えられる。

主要文献：

1. McKiernan, S.H., B.D. Bavister and R.J. Tasca, 1991. Human Reprod. 6:64-75.
2. Barnett, D.K. and B.D. Bavister, 1992. Biol. Reprod. 47:297-304.
3. Umaoka, Y. et al, 1992. Theriogenology 38:1043-1054, 1992.
4. Toyoda, Y. et al, 1992. J. Mamm. Ova Res. 9:180-190.

18 透明帯除去受精卵に対する人工透明帯の開発とその有用性

Effect of artificial zona pellucida on the development
of zona pellucida - free mouse embryos

渡辺美佳 矢沢浩之 柳田薫 星和彦 佐藤章

Mika WATANABE, Hiroyuki YAZAWA, Kaoru YANAGIDA,

Kazuhiko HOSI, Akira SATO

福島県立医科大学産婦人科教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Fukushima Medical College

＜目的＞顕微授精は受精障害症例には不可欠な治療法になりつつある。しかし、特殊な技術を要するのが難点で、だれにでもできる治療法ではない。透明帯を除去した卵の受精は極めて少数の精子で可能であることが知られているので透明帯を除去すれば理論的には顕微授精と同様な受精が期待できる。しかし透明帯は卵を物理的刺激から保護し、分割卵の割球の分離を抑える役割があり、未受精卵でも受精卵でも透明帯を除去するわけにはいかない。今回われわれは、人工透明帯開発を試み、透明帯除去受精卵に用いたときの有用性について *in vivo*, *iv vitro* で検討したので報告する。

＜方法＞人工透明帯としてアルギン酸カルシウムを用いた。3%アルギン酸ナトリウムを1.5%塩化カルシウムに反応させたものが、ラット子宮内における溶解性から適切と判断され、この濃度で人工透明帯を作成した。

B6C3F₁の雌マウスにPMS10U、その48時間後にhCG10Uを投与し過排卵させ、同種雄と交配させた。hCG投与から45時間後に2細胞期受精卵を採卵し、透明帯をPH2.5タイロード液にて除去した後、人工透明帯を装着させ、37℃、5%CO₂下にHTF+3.5%BSA内で培養した。

人工透明帯の装着は以下のような方法で行った。透明帯除去卵を少量の3%アルギン酸ナトリウム溶液と一緒にピペット内に吸引し、1.5%塩化カルシウム溶液内に吹き込む。それにより直径約200～250 μ mのアルギン酸カルシウムのゲル状の塊が卵周囲に付着することになる。これを洗浄した後HTF+3.5%BSA内で37℃、5%CO₂下に48時間培養し胞胚期までの発育

を観察した。なおアルギン酸ナトリウム、塩化カルシウムはHTFにて溶解した。

また、コントロール群としては透明帯を除去しない2細胞期卵(zona intact群)と、人工透明帯を装着しない透明帯除去卵(zona free群)を用いた。

＜結果＞人工透明帯を装着させた群とコントロール群との比較を示す(図)。胞胚期までの発育率は人工透明帯装着群95%(229/242)、Zona intact群93%(108/116)、Zona free群では培養卵83%(100/121)であった。また、透明帯除去胚では割球が分散してしまうことを確認できた。

人工透明帯装着群とコントロール群の比較

blastocyst数／培養卵数

Zona intact	108 / 116	(93%)
Zona free	100 / 121	(83%)
Zona free+人工透明帯	229 / 242	(95%)

さらに、人工透明帯装着群の胞胚期卵を偽妊娠マウスに移植したところ妊娠が得られた。胞胚期まで発育した卵の人工透明帯を剥離し、偽妊娠マウスの子宮内に移植した。hCG投与16日後に開腹し着床の様子を観察した。マウス3匹の左右の子宮にそれぞれ2～3個の卵を移植したところ、1匹が妊娠し3匹の胎仔が確認できた。右子宮に425mg、左子宮に206mg、448mgと1児にIUGRを認めたが、外表奇形はなく胎盤の付着も正常であった。

＜結語＞アルギン酸カルシウムによる人工透明帯は胚の発育に有害ではないという結論が得られた。in vivoにおいて胚が胞胚期になる頃溶解する人工透明帯は着床の障害にならず、また人工透明帯を装着することは、4～8細胞期に胚移植することを余儀なくされているヒトのIVF-ETでは、着床前胚発育に有利に働く可能性も示唆される。囲卵腔内精子注入法(SUZI)に代わる体外授精法として本法の有用性を検討していきたい。

＜文献＞

- 1)Kunihiro Naito, Yutaka Toyoda and Ryuzo Yanagimachi(1992) Production of normal mice from oocytes fertilized and developed without zonae pellucidae. Human Reproduction. 7(2);281-285
- 2)Jerry L. Hall, Ph.D., Paul R. Gindoff, M.D., and Robert J. Stillman, M.D. (1993) Use of the Aertificial Zona Pellucida and Zona Replacement in Assisted Reproduction 3(3);129-135

19 マウス 4 細胞期胚における割球分離・再集合操作が コンパクションに及ぼす影響

Effect of disaggregation and re - aggregation at the 4 - cell stage
on the formation of compacted mouse embryos.

小川 英彦・森 匡・清水 弘

Hidehiko OGAWA, Tadashi MORI, Hiroshi SHIMIZU

北海道大学農学部畜産科学科

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture,

Hokkaido University

目的：哺乳動物初期胚において最初にみられる形態変化に、コンパクションの形成がある。この変化は、発生過程の最初の分化、すなわち内部細胞塊と栄養芽層への分化に必要であるとされており、マウスでは8細胞期の後期にみられる。コンパクション形成に必要なDNAの転写は胚ゲノムの活性が開始される2細胞期後期に始まり、4細胞期中期（4細胞期胚への分裂後約6時間）には完了していることが報告されている¹⁾²⁾³⁾。

本実験では、4細胞期胚の割球分離と再集合操作が、その後の発生、特にコンパクションの形成に及ぼす影響について、電子顕微鏡による微絨毛の観察、ギャップ結合構成蛋白質であるコネキシン43(Cx43)抗体を用いたギャップ結合の検出を指標として検討した。

方法：7～10週齢のF1マウス(C57BL/6×C3H)の雌にPMSGを投与し、その48時間後にhCGを投与し過排卵処理を施し、ICRの雄と交配させた。膣栓を確認したマウスの卵管よりhCG投与後45～48時間に2細胞期胚を採取し、培養液(BWW)で培養した。培養後、2時間おきに胚を観察し、4細胞への分裂の認められた胚については、Ca, Mg free PBS(PBS⁻)で割球間の接着を弱めた後、0.5%プロナーゼ溶液で透明帯を除去し、ピペッティングにより割球を分離した。その後、集合までの時間を変えた3種類の再集合胚、分離直後に再集合（集合胚①）、分離4時間後に再集合（集合胚②）、分離8時間後に再集合（集合胚③）、を作成し、再び培養した。割球の集合には、フィトヘマグルチニン(PHA)含有BWW液を用いた。対照区として、透明帯の除去のみを施した胚を用いた。集合胚③を作成終了後4～12時間に、8細胞期への発生、コンパクションの有無について、2時間毎に顕微鏡観察を行った。電子顕

微鏡観察用試料は、3%グルタルアルデヒド+0.5%パラホルムアルデヒドで前固定、導伝染色、1%四酸化オスミウムで後固定、アルコール脱水後、臨界点乾燥を行った。抗体染色用試料は、3.7%ホルマリンを含むPBSで固定後、抗Cx43抗体(ZYMED Laboratories, Inc.)とFITC二次抗体を反応させ、共焦点レーザー顕微鏡で蛍光分布を観察した。

結果：8細胞期への発生は集合胚③で対照区と比較して2時間の遅れが観察されたが、集合胚①および②は対照区と差はなかった。コンパクションの形成時間は、集合胚①で対照区とほぼ同時であったが、集合胚②、③で2時間遅れる傾向がみられた。

電子顕微鏡観察による微絨毛の分布は、対照区、全ての集合胚で、集合胚③作成後6時間では均一であったが、10時間後には、局在化がみられた。

一方、ギャップ結合構成蛋白質Cx43の胚内分布を調べた結果、集合胚③作成後4時間では細胞質内に蛍光がみられた。6時間後には、対照区、集合胚①で割球接触部分に強い蛍光が認められたが、集合胚②および集合胚③では、細胞質内の蛍光しかみられなかった。8時間後には、集合胚②、集合胚③でも割球接触部分に強い蛍光がみられた。この強い蛍光を示す部位には、斑状の蛍光が存在したことから、この部位をギャップ結合存在部位と判断した。これらの結果より、ギャップ結合の形成は集合胚②、③で2時間遅れることが示された。

考察：4細胞期胚の割球接触がコンパクション形成に及ぼす影響を調べる目的で、割球分離から再集合までの時間を0、4、および8時間にした集合胚を用いて、その後の発生について検討した。コンパクションの形成は、対照区、集合胚①と比較して、集合胚②および③で2時間の遅れがみられた。また、割球分離から集合までの分離継続時間が異なるにも関わらず、コンパクション形成の遅れが同程度であったことから、コンパクション形成には4細胞期中期までの割球接触が大きな役割を持っていることが示唆された。コンパクションの形成時にみられる微絨毛の局在化とギャップ結合の形成について調べた結果、微絨毛の局在化には差はみられなかったものの、ギャップ結合の形成の遅れはコンパクション形成の遅れと一致していた。したがって、コンパクションの形成には、ギャップ結合の形成が関連していることが示唆された。また、コンパクション形成に必要なDNAの転写は4細胞期中期までに完了しているとされているが、合成されたギャップ結合構成蛋白質が細胞内輸送により割球接触部分に移動する過程において、この時期の割球の接触が必要であることが考えられた。

文献：1) Kidder GM, McLachlin JR (1985) Dev. Biol. 112:265-275.

2) McLachlin JR, Kidder GM (1986) Dev. Biol. 117:146-155.

3) Levy JB, Johnson MH, Goodall H, Maro B (1986) J. Embryol. Exp. Morphol. 95:213-237.

20 バイオプシーした牛胚の凍結・融解後の生存性

Survival of frozen - thawed biopsied bovine embryos

沼辺 孝・高田直和・佐藤秀俊・木船厚恭・亀山賢次*

Takashi NUMABE, Naokazu TAKADA, Hidetoshi SATO

Atutaka KIFUNE, Kenji KAMEYAMA *

宮城県畜産試験場, *全農受精卵移植研究室

Miyagi Prefectural Animal Industry Experiment Station

*Embryo Transfer Laboratory, Zen-Noh.

目的：畜産分野における人為的な雌雄の生み分け技術の確立は、とりわけ乳牛においてその意義は大きい。我々は、雌雄生み分け技術のひとつとして、胚の性染色体分析による方法を検討し、希望する性の子牛生産を行っている¹⁾。一方、PCR法による性判別により、子牛生産も行われている^{2, 3)}。そこで、これら牛胚の性判別技術の利用範囲を広げるため、透明帯の一部を切開し、細胞を採取された胚（バイオプシー胚）の凍結保存法の確立が必要である。本研究では、体外受精由来胚を用いて、3種類の凍結法でバイオプシー胚を凍結し、融解後の生存性を検討するとともに、移植による受胎性についても調べたので報告する。

方法：〔凍結・融解後の生存性〕供試胚は、既報⁴⁾により得られた体外受精由来の拡張胚盤胞胚（d7～d8:Aラック）を用いた。バイオプシーの方法は、胚を0.1Mショ糖を含む修正PBSに入れシャーレ底面に付着させ、金属刃をセットしたマイクロマニピュレーターを用いて、栄養膜の10%程度を採取し行った。細胞を採取された胚を、5%子牛血清（以下CS）添加TCM-199で1時間卵丘細胞との共培養を行った後、以下の3種の耐凍剤に投入した。耐凍剤は20%CS添加PBSを基本媒液として、①10%グリセロール+0.2Mショ糖、②10%エチレングリコール+0.2Mショ糖、③8%グリセロール・プロパンジオール+0.2Mショ糖の3種類とした。凍結操作は、①については30分間平衡し、②③は5分間胚を浸漬した後、0.25mlのストローに充填した。凍結曲線は-7℃に直接投入し、2分後に植氷、さらに8分間保持した後、-23℃まで毎分0.5℃づつ下げ10分間保持後LN₂へ投入し保存した。融解はLN₂から取り出した後5秒間空気中で保持後35℃の温湯中で行った。融解後、あらかじめ38℃に加温しておいた20%CS0.2Mショ糖添加PBSに入れ耐凍剤を除去後、5%CS添加TCM-199で卵丘細胞と共培養し、24および48時間後に観察した。判定は明確な胞胚腔が確認できた胚を生存胚とした。

〔移植による受胎性〕 バイオプシー胚を、①の凍結方法を基本にストロー内希釈(One step 希釈法⁵⁾)を行えるように充填し、d7の受胚牛に移植を行い、d60以降に妊娠鑑定を実施して受胎を調べた。

結果：〔凍結・融解後の生存性〕 バイオプシー胚の凍結・融解後の生存率を Table 1に示した。融解後24時間培養における生存率は、①10%グリセロール区86%(43/50)、②10%エチレングリコール区78%(39/50)、③8%グリセロール・プロパジオール区90%(45/50)であり、48時間培養では、それぞれ70%(35/50)、66%(33/50)および80%(40/50)であった。

〔移植による受胎性〕 バイオプシー胚をOne step法により移植した場合の受胎率は 33.3 %(7/21)であった。

考察：体外受精由来胚の凍結方法については、耐凍剤や凍結曲線など種々検討され、報告者により融解後の生存率・受胎率が大きく異なっている。今回用いた耐凍剤についての有用性は、すでに明らかにされているが、本研究の結果から、バイオプシー胚においても変わらない生存性・受胎が得られることが示唆された。

Table 1. Effect of various frozen media on survival rates of frozen-thawed biopsied and intact bovine embryos derived from IVF

Frozen medium	Treatment of embryos	No. of embryos frozen-thawed	No. of embryos survived (%)	
			24 h	48 h
10%Glycerol +0.2MSucrose	Biopsied	50	43 (86)	35 (70)
	Intact(cont)	50	44 (88)	42 (84) ^a
10%Etyrenglycol +0.2MSucrose	Biopsied	50	39 (78)	33 (66)
	Intact(cont)	50	40 (80)	31 (62) ^b
8%Glycerol + Propa-nediol +0.2MSucrose	Biopsied	50	45 (90)	40 (80)
	Intact(cont)	50	42 (84)	41 (82) ^a

χ^2 test; a vs b(P<0.05)

Table 2. Results of transfer of frozen-thawed biopsied and intact bovine embryos derived from IVF

Frozen medium	Treatment of embryos	No. of recipients	No. of pregnancies (%)
10%Glycerol +0.2MSucrose	Biopsied	21	7 (33.3)
	Intact(cont)	76	37 (48.7)

主要文献：

- 1) 沼辺孝；第7回家畜繁殖技術研究会講演要旨；16(1993)
- 2) Kameyama, K., Aoyagi, Y., Takedomi, T., Konishi, M. and Itakura, H.; Theriogenology, 39, 241 (1993)
- 3) Itagaki, Y., Sato, S., Sitanaka, Y., Kudo, T., Yamaguchi, Y. and Sutou, S.; J. Reprod. Dev, 39, 65~72 (1993)
- 4) Takada, N., Ohisa, N., Numabe, T. and Isikawa, Y.; Vet. Rec, 30, 307 (1991)
- 5) 大久範幸, 高田直和, 沼辺孝, 石川勇志；哺乳動物卵子研究会誌, 8, 9~14 (1991)

21 マウス成熟卵および初期胚におけるProstaglandin E2 receptor type 2, type 3の発現について

Ontogeny of Prostaglandin E2 receptor type 2 and type 3 gene activation in mouse embryo

高見毅司 坂元秀樹 高見雅司 佐藤和雄

Takeshi Takami Masashi Takami Hideki Sakamoto Kazuo Satoh

日本大学医学部産科婦人科学教室

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

(目的) 我々は、マウス成熟卵におけるprostaglandin (以下PG) 合成系の機能が受精の時期を越え、初期の胚分化の時期にまで広く影響を及ぼしていることを示唆する知見を得た。¹⁾ そこで更にPG特に特異的なreceptorを通して数々の生物学的作用を示すPG E2 受容体についてその卵と胚における発現をRT-PCRを用い検討した。PG E2 receptorはリガンド特異性やadenylate cyclase活性化などの違いで3タイプに分けられ、それぞれEP1、EP2、EP3と呼ばれている。すでにマウスEP2、EP3のcDNAがcloningされており^{2) 3)}、今回、我々はEP2、EP3のontogenyについて成熟卵、初期胚について検討した。

(方法) 8週令雌マウスにPMS 5単位投与後、48時間後にHCG5単位投与し、18時間後に卵管膨大部より成熟卵を採取した。また、同様に過排卵した雌マウスと8週令雄マウスをmatingし12時間後に雌マウスの膣栓を確認し、卵管膨大部より受精卵を採取した。雌マウスの膣栓を確認した日を第1日として第4日に子宮内洗浄により胚盤胞を採取した。

成熟卵、受精卵、胚盤胞それぞれ100個よりRNAzolB(Bioteck Lab.Inc.)にてmRNAを抽出し、その後First strand cDNA synthesis kit (Pharmacia)にてreverse transcriptionによりcDNAを作成した。異なった時期に調整したcDNAを用いて検討を計3回行なった。

RT-PCR法の反応系は全量20 μ lとし、組成は10 \times Taq buffer 2 μ l、2.5mM dNTP 1.6 μ l、Taq polymerase 5units/ μ l(TOYOBO)0.05 μ l、1mMMgCl₂1 μ l、primer1 μ l、DDW12.2 μ l、template cDNA1-2 μ lを加え、denaturation94°C 1min、annealingはEP2が54°C、EP3が58°C 1min、extention 72°C 2minを1サイクルとして、計35サイクル増幅した。使用したprimerは、EP2 5'-CAG TAA AGC CAT AGA GAA GAT-3'、3'-CCT GAT GGA ATG TCG ACT GAA-5' EP3 5'-GGG GCA AGA CGA CAC AGA GCA-3'、3'-TAG CAC GGT AGT AAA GGG ACG-5'であり、また同時に β -actin (5'-TGT ATT CCC CTC CAT CGT GG-3'

3' -CAA ACT CTG GAA GTT GTG GG- 5')も同一条件下で増幅しPCR効率の指標とした。

(結果) EP2 mRNAは、顆粒膜細胞、胚盤胞で検出され、成熟卵、受精卵では検出されなかった。また、EP3 mRNAも、顆粒膜細胞、胚盤胞で検出され、成熟卵、受精卵では検出されなかった。

(考察) PGの生殖生理における意義は多岐にわたっている。これまで、排卵、受精、着床の一連の過程がPGに依存性であることが数々の実験で明かにされてきた。今回、PGE2 receptor mRNAが胚盤胞で検出されたことは、胚盤胞でPGE2 receptor遺伝子のtranscriptionが行なわれ、PGE2が着床に関与するということに合致する。我々は、卵-初期胚におけるPG合成系の機能についての知見として、Western blotによる成熟卵、受精卵中のPG合成律速酵素cyclooxygenase(COX)蛋白の存在、microinjection実験によるCOXの2細胞胚への分化の抑制、またCOX遺伝子の読み取りは2細胞期では起こらず、胚盤胞で起こることを得ている¹⁾。

今回の結果と併せて、胚自身のPG合成系および受容体遺伝子のtranscriptionは胚盤胞以前には起こらないが、その機能は胚盤胞の時期までに完成していると推定される。

主 要 文 献：

1. 高見毅司, 坂元秀樹, 高見雅司, 早川 智, 佐藤和雄 (1994) マウス成熟卵および初期胚分化における卵由来cyclooxygenaseの意義とそのontogenyに関する研究、日産婦誌、in press
2. Yukihiro Sugimoto, Atsushi Ichikawa, Shuh Narumiya (1992): cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP3 subtype. J. Biol. Chem. 267, 6463-6466
3. Akiko Honda, Yukihiro Sugimoto, Shuh Narumiya, Atsushi Ichikawa (1993) cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin receptor EP2 subtype. J. Biol. Chem. 268, 1-4

22 マウスおよび豚卵母細胞におけるc-mos発現の組織化学的検出について

Histochemical analysis for c-mos expression in murine and porcine oocytes

山内伸彦・小林正男・佐々田比呂志・菅原七郎
N. Yamauchi, M. Kobayashi, H. Sasada and S. Sugawara

東北大学農学部 動物生殖科学講座
Laboratory of Animal Reproduction
Faculty of Agriculture, Tohoku University

目的

脊椎動物の未受精卵は第二減数分裂の中期で分裂を停止しており、この分裂停止は細胞質中に存在する細胞分裂抑制因子(CSF)の作用であると考えられている。この因子の重要な成分がc-mos原癌遺伝子産物であることがアフリカツメガエルを中心とした研究で明らかにされている¹⁾。哺乳類では、マウスで主に卵子中にc-mosの発現が確認されている²⁾が、他の動物ではCSFおよびc-mos原癌遺伝子に関する研究はほとんどない。卵子成熟とCSFの関係を明らかにする上で、c-mos発現とその動態を明確にすることが必要であると思われる。そこで本研究では、ポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学的検出法を検討しマウスおよび豚卵子での成熟過程におけるc-mos発現を検索した。

材料及び方法

卵子の採取：ICR系マウスを用い、卵核胞期(GV期)と第二成熟分裂中期(M2期)の卵子をそれぞれ卵巣内卵胞とhCG投与12時間後に卵管膨大部から採取した。1細胞期胚(1cell期)は陰栓を確認した日のAM11:00に卵管を灌流して採取した。採卵液として、PBS-PVAを用いた。豚卵子は卵巣内卵胞卵子(GV期)、体外成熟培養開始後42時間(M2期)および体外受精後18時間(IVF卵)の卵子であった。各期の卵子をトリプシンで卵丘細胞を除去し、プロナーゼで透明帯を除去したのち固定した。固定には、Zamboni(picric acid-PFA)固定液を用いた。豚卵子の採取、体外成熟培養および体外受精は既報³⁾に従い行った。

免疫組織化学：固定した卵子をPBS-PVAで十分に洗浄後、0.05%TritonX-100と0.3% H_2O_2 メタノール液でそれぞれ30分間処理した。処理後、ホールスライドガラス上で抗c-mosタンパク質ポリクローナル抗体(久留米大学分子生命科学研究所、佐方功幸教授より供与)を一次抗体としてPAP法により反応させた。反応の強弱を染色性の程度より4段階(-、±、+、++)に分けて判定した。

結果

ホールマウント法で反応させた結果、抗c-mosタンパク質ポリクローナル抗体を用いたPAP法によりマウスおよび豚卵子で反応が認められた。すなわち、マウス卵子では+~++の強い反応の割合はGV期とM2期の卵子でそれぞれ93.3%と76.6%であった。一方、1cell期では++の反応を示す割合が激減し、-~±を示す割合が57.1%であった。他方、豚卵子ではマウス卵子と同様にGV期とM2期の卵子でそれぞれ76.3%と82.7%の割合で+~++の強い反応が見られた。IVF卵ではほとんどの卵子が-~±の反応を示し、その割合は74.2%であった(Table. 1, Fig. 1)。

本研究の結果、マウスおよび豚卵子のいずれでもGV期とM2期にc-mos原癌遺伝子産物が免疫組織化学的に検出された。このことはアフリカツメガエルと異なり、マウスおよび豚では卵核胞崩壊前のGV期の卵子にc-mosが発現していることを示唆している。一方、受精卵ではほとんどの卵子で反応が見られなかったことから、受精によってc-mos産物が分解されることが示唆された。今後、成熟過程におけるc-mos発現の調節メカニズムを解明することが必要であると思われる。

主要文献

- 1) 佐方功幸: CSFとMos: 蛋白質・核酸・酵素 38(6): 991-997(1993)
- 2) Paules, R. S. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 5395-5399(1989)
- 3) 山内伸彦他: 第82回家畜繁殖学会講演要旨集p3(1992)

Table. 1 Immunohistochemical detection of c-mos expression in murine and porcine eggs

Stage of egg	No.of eggs used (No.of trials)	No.(%) of eggs with immunostaining of			
		—	±	+	++
Mouse					
GV	75(3)	0(0.0)	5(6.6)	35(46.7)	35(46.7)
M2	64(3)	4(6.3)	11(17.2)	21(32.8)	28(43.8)
1cell	35(3)	10(28.6)	10(28.6)	11(31.4)	4(11.4)

Pig					
0h(GV)	97(3)	5(5.2)	18(18.6)	43(44.3)	31(32.0)
42h(M2)	75(3)	0(0.0)	13(17.3)	23(30.7)	39(52.0)
IVF(1cell)	62(3)	18(29.0)	28(45.2)	10(16.1)	6(9.7)

Fig. 1 Whole-mount preparations for c-mos expression by immunohistochemistry.

- (A) porcine eggs at GV stage, showing immunostaining of ++.
 (B) porcine eggs after IVF, showing immunostaining of -.

23 マウス初期胚発育に対するEGFおよびTGF- α の効果とEGF受容体mRNAの発現

Stimulatory effect of EGF and TGF- α on the development of mouse embryos and expression of EGF-receptor mRNA

原田 省、吉田壮一、高尾成久、寺川直樹
Tasuku HARADA, Souichi YOSHIDA, Naruhisa TAKAO, Naoki TERAOKA

鳥取大学産科婦人科学教室
Department of Obstetrics and Gynecology, Tottori University, School of Medicine

〔目的〕哺乳動物の胚発生と分化に細胞増殖因子が重要な役割を果たしていることが示唆されている。EGF (Epidermal Growth Factor) が着床前初期胚に対し発育促進効果を持つことが報告されているが、EGFとレセプターを共有するTGF- α (Transforming Growth Factor- α)については明らかでない。そこで、マウス着床前初期胚発育にたいするEGFおよびTGF- α の効果を胚のDNAおよび蛋白合成を指標として検討した。さらに、胚盤胞におけるEGFレセプターの遺伝子発現をRT-PCR法にて検討した。

〔方法〕5-8週令のB6C3F1雌マウスをPMSG 7.5 単位、hCG7.5単位で過排卵誘起し、hCG注射と同時に同系雄マウスと交配させた。2細胞期胚をhCG注射44時間後に卵管より採取した。2細胞期胚は0.1, 1, 10, 50 ng/mlのEGFおよびTGF- α を添加したBWW培養液中で48時間培養し、胚盤胞への発生率を観察した。胚盤胞におけるDNA合成は ^3H -thymidine、蛋白合成は ^3H -leucineの酸不溶性分画への取り込み(incorporation)を測定し評価した¹⁾。

30個の胚盤胞からTotal RNAをGuanidine thiocyanate 法にて回収し、全量からcDNAを合成した。Primer はEGF受容体のcDNA 配列からExon-Intron boundaryを挟んで設計した²⁾。PCR合成産物の特異性は制限酵素部位の確認により行った。 β -actin mRNAの発現をコントロールとした。

〔結果〕0.1から50 ng/mlのEGFおよびTGF- α の添加は、2細胞期胚の胚盤胞への発生率に影響を及ぼさなかった。胚盤胞におけるDNA 合成は、10 ng/ml EGFおよび0.1 ng/ml TGF- α を添加した培養液中で発育した胚盤胞で有意に促進された(図1)。また、蛋白合成も

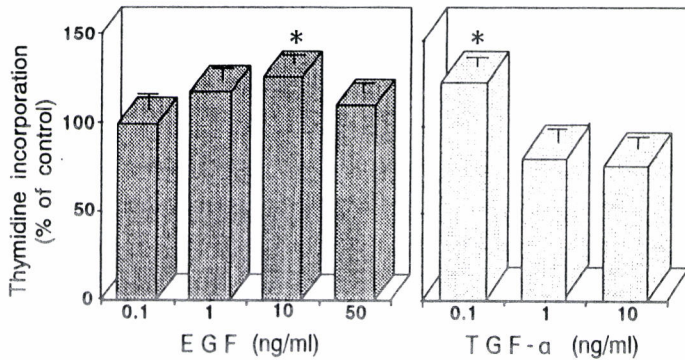


図1 EGFおよびTGF- α のマウス胚 DNA合成に及ぼす影響.

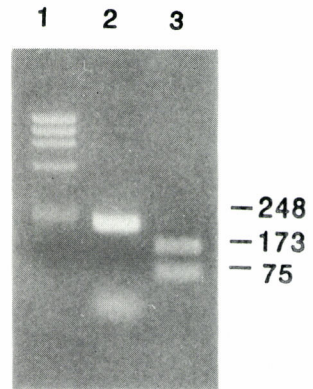


図2 マウス胚盤胞におけるEGF受容体mRNAの発現.

lane 1: Marker, lane 2: EGF受容体mRNAの

RT-PCR産物 (248bp), lane 3: PCR産物の Pst I 消化後

10 ng/ml EGFおよび0.1 ng/ml TGF- α 添加培養液で発育した胚盤胞で、それぞれコントロールに比して $128 \pm 9\%$ 、 $134 \pm 8\%$ と有意に促進された。マウス胚盤胞においてEGF受容体および β -actin mRNAの発現が認められた(図2)。

〔考察〕以上の結果から、EGFおよびTGF- α はマウス着床前初期胚のDNAおよび蛋白合成を刺激すること、マウス胚盤胞においてEGF受容体の遺伝子発現が認められたことからEGFおよびTGF- α はマウス着床前初期胚発生において重要な役割を果たすことが示唆された。

〔文献〕

- 1) Harada T, Tanikawa M, Iwabe T, Onohara M, Mio Y, Terakawa N. (1992) Measurement of uptake and incorporation of nucleic acid precursors by preimplantation mouse embryos after development in vivo and in vitro. J Assist Reprod Genet, 9, 551-556.
- 2) Avivi A, Lax I, Ullrich A, Schlessinger J, Givol D, Morse B. (1991) Comparison of EGF receptor sequences as a guide to study the ligand binding site. Oncogene, 6, 673-676.

24 マウス未受精卵の各種耐凍剤透過性

Permeabilities of mouse oocytes to various cryoprotectants

横山 栄治・吉田 直子・枝重 圭祐・櫻井 孝志・町田 隆彦・葛西 孫三郎

Eiji YOKOYAMA, Naoko YOSHIDA, Keisuke EDASHIGE, Takashi SAKURAI,
Takahiko MACHIDA & Magosaburo KASAI

高知大学農学部 畜産学講座

Laboratory of Animal Science, College of Agriculture, Kochi University

【目的】マウス桑実胚を Ethylene glycol(EG)主体の溶液を用いてガラス化超低温保存すると、生存性は極めて高く維持される¹⁾。ところが、同じ方法で未受精卵を保存すると、ほとんど生存できない²⁾。これは、冷却・加温過程における細胞内氷晶の形成か、あるいは耐凍剤除去過程における浸透圧的膨張による傷害ではないかと推測されるが、いずれの場合も細胞膜の耐凍剤透過性が重要な役割を果たしている。Jackowskiら(1980)³⁾は、1細胞期のマウス卵子を Glycerol(GL) 溶液に浸し、その後の体積変化を数時間にわたって測定することによってGL透過性を調べた。しかし ガラス化法においては、耐凍剤にさらす時間が短いため、浸漬直後の耐凍剤の透過が重要となる。本実験では、マウス未受精卵の種々の耐凍剤に対する透過性を、耐凍剤液導入後10分間の卵子の体積変化を測定することによって比較した。

【方法】過排卵処理した ICR系マウスから排卵卵子を採取し、卵丘細胞を除去した。耐凍剤液として、10%(v/v) の EG, GL, DMSO, Propylene glycol(PG) あるいは 1.5-M Acetamide (AA)を含むPB1液を作成した。一定温度下でPB1液中に卵子を入れ、倒立顕微鏡上のマイクロマニピュレーターのホールディングピペットで保定した。カバーピペットで卵子を覆って各耐凍剤液へ移し、カバーピペットを除去することによって耐凍剤に暴露した。卵子の状態をタイムラプスビデオで録画して経時的に卵子の画像をプリントし、PB1液中の卵子に対する相対的な細胞質断面積の変化を測定した。卵子の細胞質の体積が相似形のまま変化すると仮定して相対的体積の変化を求め、耐凍剤の透過性を比較した。

【結果と考察】PB1液から耐凍剤液へ導入した卵子は直ちに収縮を始め、10秒～2分後に最小体積に到達後、徐々に回復した。20°Cの各耐凍剤液に浸した卵子の10分間の体積変化を Fig. 1 に示した。GL液に浸した卵子の収縮が最も大きく、その後の体積の回復もほとんどみられ

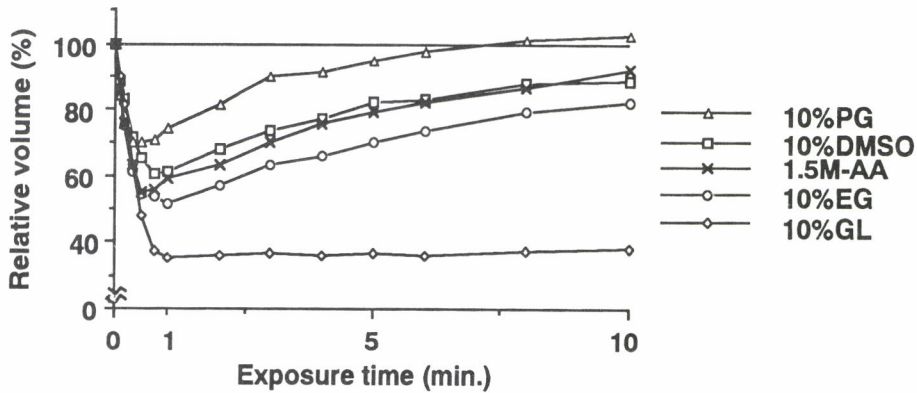


Fig. 1. The volume change of mouse oocytes in various cryoprotectant solutions at 20°C.

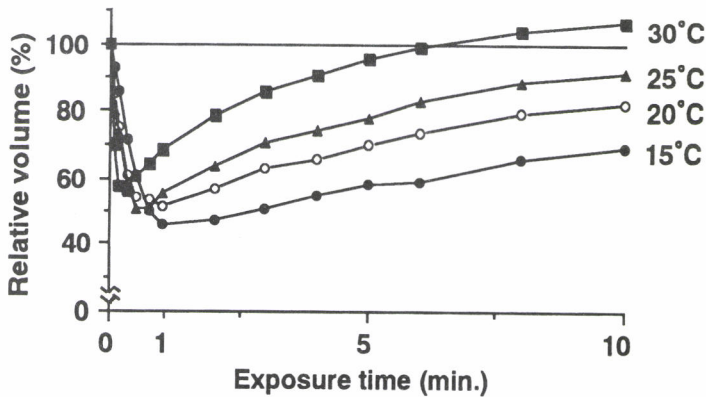


Fig. 2. The volume change of mouse oocytes in 10%EG solution at various temperatures.

なかったことから、GLは極めて透過しにくいと考えられる。次いで卵子の収縮が大きく回復が遅かったのはEG液で、AA、DMSO液の順に回復が早まり、PG液中での回復が最も早かった。用いた各耐凍剤液の浸透圧は、EG液 (2,500 mOsm) を除いてはほぼ同じ (1,950~2,080 mOsm) であったことから、収縮度の違いは、導入直後から耐凍剤の透過量が異なることを示していると考えられる。異なる温度の10%EG液における体積変化を Fig. 2 に示したが、いずれの耐凍剤液においても処理温度の上昇に伴って最小体積に達するまでの時間が短縮し、その後の体積の回復が早まったことから、透過性が増大したと考えられる。

【引用文献】

- 1) Kasai et al. (1990) J. Reprod. Fertil. 89 : 91-97.
- 2) Miyake et al. (1993) Theriogenology 40 : 121-134.
- 3) Jackowski et al. (1980) J. Exp. Zool. 212 : 329-341.

25 血管収縮剤を用いたマウス胚の卵管移植法

Improved embryo transfer into the oviduct by local
application of a vasoconstrictor in mice

鈴木宏志¹⁾・上田乙也¹⁾・鎌田宣夫¹⁾・寺社下浩一¹⁾・
加藤基恵²⁾・紫野正雄³⁾

Hiroshi SUZUKI¹⁾, Otoy UEDA¹⁾, Nobuo KAMADA¹⁾,
Kouichi JISHAGE¹⁾, Motoe KATOH²⁾ and Masao SHINO³⁾

1) 中外製薬株式会社、現所属：(株)CSKリサーチパーク

2) (財)食品薬品安全センター 3) 麻布大学

1) Chugai Pharmaceutical Co, Ltd., Present address: CSK Research Park Inc.,

2) Food and Drug Safety Center 3) Azabu University

目的：胚の卵管移植は、発生工学および生殖工学的技術として最も基本的な技術であるとともに、最も熟練を要する技術のひとつである[1-4]。この技術の困難さは、卵巣嚢が毛細血管に富んでいることおよび卵管采の位置やその形状が個体によって様々であることに起因しているように思われる。卵管移植をより簡便化する試みとして、電気メス[5]あるいは双極電気凝固装置[6]を用いた卵巣嚢の切開や経卵管壁卵管移植[7]が報告されているが、これらはいずれも卵巣嚢からの出血を回避するために考案されてきた方法である。本実験では、卵管移植に際して卵巣嚢に血管収縮剤を塗布し、その有効性について検討した。

方法：移植胚にはヒトIL-6トランスジェニックマウス(背景はC57BL/6J)[8]の体外受精卵を用い、受容雌にはICR系成熟雌マウスを用いた。授精後6時間および24時間のそれぞれ、前核期卵および2細胞期胚を腔栓確認日の受容雌の左右の卵管に8個ずつ、以下の3つの方法で2名(RosおよびOt)の術者が移植し、それぞれの術者が移植に要した時間の計測、着床数および生存産仔数についての観察を行った。卵管移植は、卵巣嚢を2本のピンセットを用いて引き裂く一般的な方法(Conventional法)[3]、経卵管壁卵管移植法(Nakagata法)[7]および卵巣嚢に数 μ lのエピネフリン製剤である血管収縮剤(Bosmin、第一製薬)を塗布後、Conventional法と同様に、卵巣嚢を引き裂く(Vasoconstriction法)方法を比較検討した。移植所要時間の計測は、皮膚の切開から縫合までの合計時間および左右それぞれの卵巣嚢の切開(卵管壁の切開)開始から胚の注入終了までの時間について行った。尚、術者Rosは、Conventional法に熟練しており、術者Otは、専らNakagata法を用いての卵管移植をルーチンワークとしていた。

結果：術者Rosにおいては、平均移植所要時間がConventional法および

Vasoconstriction法で、それぞれ5分55秒であり、両者に差は認められず、また、卵巢囊切開から胚の注入終了までの平均時間も、Vasoconstriction法がわずか1秒短いのみであり、所要時間に及ぼす血管収縮剤の効果は認められなかった。また、術者Otにおいては、平均移植所要時間が最も短かったのは、Nakagata法の10分56秒であり、次いでVasoconstriction法の11分55秒で、この時間はConventional法に比べ1分35秒短い成績であった。この傾向は、卵巢囊の切開あるいは卵管壁の切開開始から胚の注入終了までの時間（注入所要時間）においても認められ、最も短かったのはNakagata法の1分42秒であり、次いでVasoconstriction法の2分7秒、Conventional法の2分58秒の順であった。また、移植所要時間に占める注入所要時間の割合は、RosではConventional法およびVasoconstriction法でそれぞれ、23.7%および22.8%であった。また、Otにおけるこの割合は、Nakagata法で31.1%であったが、Conventional法では44.0%と高い割合を占めていた。しかしながら、Vasoconstriction法では35.5%であり、血管収縮剤の使用によって、移植所要時間に占める注入所要時間の割合を、約10%低下させる効果が認められた。RosのConventional法およびVasoconstriction法による産子への発生率は、それぞれ67% および68%であり、また、OtのConventional法、Nakagata法およびVasoconstriction法による産子への発生率は、それぞれ、50%、52% および64%であった。RosおよびOtいずれの術者においても、Vasoconstriction法が他の方法と比較して産仔への発生率および着床率が高い傾向であった。

考察：卵管移植に際して、血管収縮剤の使用は極めて有効であると考えられた。術者Rosにおいては、血管収縮剤の使用は移植所要時間の成績に反映しなかったが、卵巢囊の血流量の減少により、血管走行に関係なく卵巢囊を切開することができるため、操作性は極めて良好となった。また、移植成績は、血管収縮剤が移植後の妊娠維持に影響を及ぼさないことを示すものであった。さらに、本実験における術者間の移植成績の比較から、卵管移植に関しては、移植操作時間の短縮が、移植後の発生成績の向上を促す要因のひとつと考えられる。

文献

- [1] 館鄰ら(1981)：哺乳動物の初期発生、(妹尾左知丸、加藤淑裕、入谷明、鈴木秋悦、館鄰編) pp257-262, 理工学社、東京
- [2] 福田芳詔(1986)：図説哺乳動物の発生工学実験法、(菅原七郎編) pp127-133, 学会出版センター、東京
- [3] Hogan, B., Costantini, F. and Lacy, E. (1986): Manipulating the Mouse Embryo, pp135-145, Cold Spring Harbor Laboratory
- [4] 横山峯介(1987)：発生工学実験マニュアル、(勝木元也編) pp77-103, 講談社ライフサイエンティフィック、東京
- [5] 鈴木宏志ら(1987)：家畜繁殖誌、33、96-100.
- [6] 中潟直巳(1990)：実験動物、39、593-595.
- [7] 中潟直巳(1992)：実験動物、41、387-388.
- [8] Suematsu, S. et al. (1992): Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89, 232-235.

26 牛卵核胞期卵における染色体凝集への顆粒層細胞の関与

Granulosa cells affect the chromatin condensation of bovine oocyte
at germinal vesicle stage

建本 秀樹・久保 岳志・堀内 俊孝

Hideki TATEMOTO・Takeshi KUBO・Toshitaka HORIUCHI

広島県立大学 生物資源学部 生物資源開発学科

Department of Bioresources, Hiroshima Prefectural University

目的：成熟促進因子 (MPF) の活性化が、哺乳動物卵の減数分裂再開 (GVBD) に関与していることがマウス卵で確認されている [1]。このMPF活性化にマウス卵は蛋白合成を必要としない。しかし、cycloheximide (CYCLO) で蛋白合成を阻害した牛卵はGVBDを抑制され、しかも、牛卵のMPF活性化には成熟培養後の蛋白合成が必要であることを、我々はMPFの特異的活性化剤であるオカダ酸を用いた研究で明らかにした [2]。一方、CYCLOでGVBDを抑制した牛卵において、顆粒層細胞に密に囲まれた卵 (EO) の多くは、卵胞から採取直後と同様な糸状染色体を維持するが、裸化卵 (DO) では凝集染色体が有意に増加する。そのため顆粒層細胞は卵染色体凝集に関与しているものと考えられた。通常、顆粒層細胞の卵減数分裂への影響として、卵細胞質内cAMP濃度の変化が知られている [3]。従って本研究では、蛋白合成阻害下におけるcAMPの卵染色体凝集への影響を検討した。

方法：本実験には小卵胞 (直径 2-8 mm) から吸引法によって得られたEOを用いた。基本培地としてTCM-199 (10% CS, 0.12 IU/ml FSH添加) を用い、培養は39℃, 5% CO₂の気相下で行った。また、DOはEOの顆粒層細胞をピペティングによって除去することで作製した。核相の判定はホールマウント標本を光顕で観察することで行った。**実験Ⅰ**では、25 µg/ml CYCLO存在下におけるFSHの染色体凝集への影響を調べた。**実験Ⅱ**では、25 µg/ml CYCLOと0.1, 1.0, 10.0 mM dibutyl cAMP (dbcAMP) を培地に添加し、DO卵の染色体凝集へのcAMPの関与を検討した。**実験Ⅲ**では、CYCLOとdbcAMPのそれぞれの処理によって得られた卵の核相を糸状染色体と凝集染色体とに蛍光染色で判別した後、卵 (10 個/µl) を常法に従って処理し、SDS-PAGEにかけ、抗p34^{cdc2}抗体によるimmunoblottingを行った。このp34^{cdc2}の移動度の違いによってMPF活性化状態を観察した。

結果：《実験Ⅰ》FSH無添加区では凝集染色体を卵核膜内に有する牛卵 (57%; 32/56) が、FSH添加区 (15%; 8/53) に比べ有意に増加した ($P<0.05$)。《実験Ⅱ》牛卵を10.0 mM dbcAMPだけを添加した培地で24時間培養したところ 95% (85/88) の卵がGVBDを誘起し、dbcAMPによるGVBDに対する有意な抑制効果は全く認められなかった。一方、CYCLOとdbcAMPを培地に添加した場合、凝集染色体卵がdbcAMPの濃度の増加に連れ有意に減少した (68%; 61/89, 40%; 40/101, 26%; 25/95) ($P<0.05$) (図1)。**《実験Ⅲ》**卵胞から採取直後のGV期牛卵は2本のp34^{cdc2}のバンドを示した。CYCLO添加培地で24時

間培養することで得られた糸状染色体卵と凝集染色体卵のそれぞれのp34^{cdc2}の移動度は採取直後の卵のそれと差を示さず、バンドの数が增加することもしなかった。同様に、CYCLOと10.0 mM dbcAMPを添加した培地で得られた糸状染色体卵のp34^{cdc2}のバンドにも変化は認められなかった。

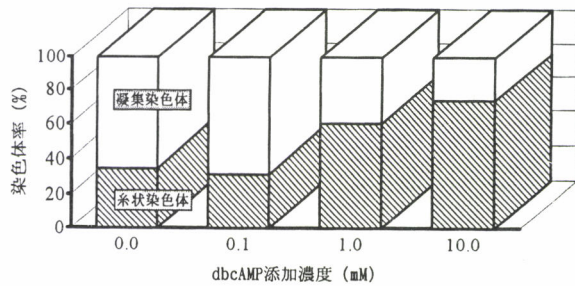


図1. 蛋白合成阻害下でのdbcAMPの牛裸化卵染色体に及ぼす影響。
25 μ g/ml cycloheximide添加培地で24時間培養。

考察：蛋白合成阻害剤によって牛卵のGVBDは完全に抑制されるにも関わらず、DOにおいて染色体凝集がEOに比較して有意に増加することより、顆粒層細胞がGV期牛卵の染色体凝集過程に蛋白合成に依存しない系で関与することが予想される。FSH無添加の培地でEOの蛋白合成を阻害したところ、凝集染色体卵が有意に増加した。FSHは顆粒層細胞のレプターに結合することで卵細胞内のcAMP濃度を増加させることが報告されている [3]。さらに、DO卵の蛋白合成を阻害し、dbcAMPを添加したところ、dbcAMPの添加濃度の上昇に連れて凝集染色体卵が有意に減少した。一般に、ゲッ歯類卵では0.1 mM dbcAMPによってGVBDが阻害されるが、本研究において高濃度 (10 mM) のdbcAMPであってもそれ自体による牛卵GVBDへの阻害効果は認められなかった。このことは、卵細胞質内cAMP濃度の上昇は減数分裂そのものを阻害するのではなく、染色体凝集過程への特異的な影響を及ぼしていることを示している。しかも、マウス卵においてはcAMP依存型 protein kinase (A kinase) の活性化によってMPF活性は抑制されることが報告されているが [1]、牛卵においてはA kinaseとMPF活性との関係がこれまでの報告とは異なるものと考えられ興味深い。一方、我々はこれまでの研究によってマウス卵 [4] において認められていると同様に、3本のp34^{cdc2}のバンドがMPF活性化に伴い出現することを認めている。しかし、本研究において糸状染色体卵と凝集染色体卵のp34^{cdc2}のバンドの数、さらにその移動度に違いはなかった。

以上より、蛋白合成を阻害したGV期牛卵ではdbcAMPが染色体凝集を抑制することを認め、しかも、p34^{cdc2}のSDS-PAGEの結果より、この糸状染色体から凝集染色体への変化にMPFは関与していないことが明らかとなった。今後、牛卵の減数分裂に関わるA kinaseとMPF活性の詳細な検討が必要であるものと思われる。

主要文献：

1. Rime, H. and R. Ozon, 1990, Dev Biol 141: 115-122.
2. 建本秀樹, 堀内俊孝, 織部智宏, 1993, 哺乳動物卵子学会誌 10(1): 84-85.
3. Hubbard, C. J., 1986, Dev Biol 118: 343-351.
4. Choi, T., F. Aoki, M. Mori, M. Yamashita, Y. Nagahama and K. Kohmoto, 1991, Development 113: 789-795.

Enbryo score in relation to incidence of IVF - ET pregnancy

○小林善宗・本田育子・鈴木隆弘・井上正人

Yoshimune KOBAYASHI, Ikuko HONDA,
Takahiro SUZUKI, Masato INOUE

東海大学医学部産婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine Tokai University

目的：IVF-ETを外来ベースで行うようになり、すでに5年以上経過した。多くの件数を行えることで多くの患者の期待にそえるよう努力してきたが、妊娠率は向上するどころか逆に下降気みである。一方で多胎妊娠の回避が声高に叫ばれており、単胎妊娠に限って妊娠率を向上させなければならないという臨床治療としての困難さがますます表面化してきている。そこで今回、IVF-ETにおける移植胚の形態分析と妊娠率、多胎率について、1992年報告のCumulative embryo score (CES) を用いて検討した。

対象・方法：1988年6月からIVF-ETをすべて外来ベースで行っているが、1993年12月までに2050回のIVF-ETを行った(表1)。regular IVF-ETのうち、2日目移植(4細胞期胚)の1149回のIVF-ETでは326妊娠(28.4%)が成立したが(表2)、これを対象に、cumulative embryo scoreによる妊娠率(対周期)、継続妊娠率(対周期)、多胎率(継続妊娠に対する継続多胎の率として計算)を検討した。embryo scoreはMillsおよびSteerの報告によった(図1)。なお、これらの対象のIVF-ETでは移植胚に制限は加えていなかった。

結果：妊娠率(対周期)はCESの上昇とともに高くなり、CES35~42のグループで、40.2%、以後やや下降しCES50+では37.9%であった(表3)。この傾向はMillsらの報告と同様な結果であった。継続妊娠率も、妊娠率とはほぼ同様の傾向を示した。多胎率はCES50+で最も高く、妊娠率および継続妊娠率が最も良好であったCES35~42のグループで14.7%と比較的低い傾向にあり、このCESの範囲が、多胎率が低いにもかかわらず妊娠率が高い、結果となった。

考察：IVF-ET臨床治療では、患者年令の上昇、いわゆるpoor responderの増加など、妊娠率の向上をととても望めそうにない条件が増えつつある。本邦では卵子提供治療は行っておらず、増えつつある高年令患者では数少ない移植胚での妊娠を期待する以外に方法はない。今回の検討で、CESの低点数域でも少数ながら妊娠成立が存在したことは注目すべき点であろう。また着床環境の解明が今後の課題であろう。

移植胚の形態学的な検討と着床率との関係の報告はかなりあるものの、胚の形態学的qualityの絶対的な判

定基準を決めることはかなり困難であり、今回のembryo scoreでも同様であった。多胎妊娠の回避が最重要課題であるなら、課せられたのは100%妊娠可能な1個の卵子をいかに選択するかという究極の解答であらう。

主要文献：

1. 小林善宗、他 (1993)、外来IVF-ET4年間の成績。哺乳卵学誌 10 : 124
2. Steer CV, et al (1992), The cumulative embryo score-a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in vitro fertilization and embryo transfer programme. Hum. Reprod. 7 : 117
3. Mills CL (1992), Factors affecting embryological parameters and embryo selection for IVF-ET, A text book of in vitro fertilization and assisted reproduction (Edited by Brinsden PR and Rainsbury PA) pp187-204, The Parthenon Publishing Group

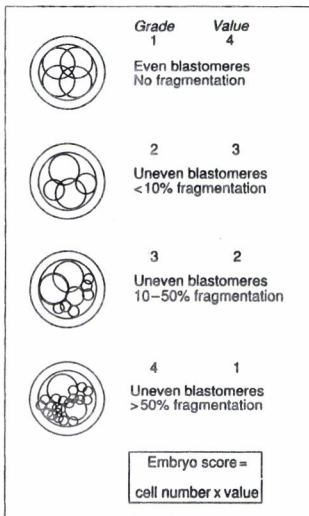


図1. Embryo score calculated from both embryo quality factors

表1. 外来IVF-ET成績 (対周期)

(1988. 6~1993. 12)

	周期	妊娠
regular IVF	2015	530 (26.3%)
assisted IVF	35	3 (8.6%)
計	2050	533 (26.0%)

表2. 移植時期別 regular IVF-ET 妊娠率 (対周期)

(1988. 6~1993. 12)

移植時期	周期	妊娠
1日目移植 (前核期)	556	125 (22.5%)
2日目移植 (4細胞期)	1149	326 (28.4%)
3日目移植 (8-16細胞期)	289	76 (26.3%)
4日目移植 (16~細胞期)	17	2 (11.8%)
前核期+胚	4	1 (25.0%)
計	2015	530 (26.3%)

表3. cumulative embryo score (CES) による IVF-ET 妊娠率、継続妊娠率、多胎率の検討 (2日目移植 regular IVF 1149周期)

cumulative embryo score	0	3	11	19	27	35	43	50 +	計
	2	10	18	26	34	42	50		
妊娠率 (妊娠/周期)	6.8% (4/59)	15.1% (16/106)	19.2% (30/156)	25.4% (30/118)	30% (51/171)	40.2% (43/107)	28.1% (34/121)	37.9% (118/311)	26.3% (326/1149)
継続妊娠率 (継続妊娠/周期)	5.1% (3/59)	10.4% (11/106)	10.3% (16/156)	11.9% (14/118)	17.5% (30/171)	31.8% (34/107)	18.2% (22/121)	24.4% (76/311)	17.9% (206/1149)
多胎率 (継続多胎/継続妊娠)	33.3% (1/3)	9.1% (1/11)	6.3% (1/16)	21.9% (3/14)	23.3% (7/30)	14.7% (5/34)	18.2% (4/22)	30.3% (23/76)	21.8% (45/206)

28 IVF-ET妊娠後（分娩、流産、外妊）の再IVF-ET成績

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

○鈴木隆弘・小林善宗・本田育子・井上正人

Takahiro SUZUKI, Yoshimune KOBAYASHI,
Ikuko HONDA, Masato INOUE

東海大学医学部産婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine Tokai University

目的：本邦でも、不妊治療としての体外受精胚移植が確立しつつあるが、その妊娠率は一向上昇するきざしはみられず、当院でも同様である。形態学的な良好胚移植を理想に種々の工夫、努力を重ねてきたが、それだけで画期的に臨床成績を向上させるのは困難な様である。今回は、当院におけるIVF-ET臨床成績から、妊娠（分娩、流産、外妊）後の再IVF-ET成績を検討することにより、卵子以外の妊娠成立・継続の条件の分析を試みた。

対象・方法：超音波採卵に移行した1985. 12から1993. 12の期間の当院のIVF-ET（表1）のなかで、(1) IVF-ET分娩後の再度IVF-ET治療を行った29名、(2) IVF-ET初回妊娠が流産に終り、再度IVF-ET治療を行った120名、(3) IVF-ET初回妊娠が子宮外妊娠に終り、再度IVF-ET治療を行った21名、を対象にその予後として、再妊娠率（対患者）、最終的に継続した妊娠の率（対患者）を検討した。

結果：(1) IVF-ET分娩後29名の再IVF-ET治療で18名（62.1%）が妊娠した（表2）。妊娠18名で継続12名、流産6名であった。流産6名中4名が再度IVF-ET治療を続行し2名が妊娠し継続した。集計すると計14名が継続妊娠で、対象29名に対しては48.3%であった。(2) IVF-ET流産後120名がIVF-ET治療を続行し、62名（51.7%）に再妊娠が成立した（表3）。再妊娠62名では継続30名、流産29名、外妊3名であった。流産29名中15名がIVF-ET治療を続行し8名に再々妊娠が成立し、継続が5名であった。外妊3名でもIVF-ET治療続行で1名に継続妊娠が成立した。集計すると計36名が継続妊娠で、対象120名に対しては30.0%であった。(3) IVF-ET外妊後21名がIVF-ET治療を続行し、15名（71.4%）が妊娠したがその予後は継続7名、流産5名、外妊3名であった（表4）。その後のIVF-ET治療続行結果を集計すると、計10名に継続妊娠が成立しており、対象21名に対しては47.6%であった。

考察：最近の国外における高年令婦人に対する卵子提供IVF-ET成績は、妊娠成立に最も重要なものは卵子であることを再認識させるものであった。しかし加齢にともなう卵子のqualityの低下に対しては有効な手段は少ない。今回の検討では、IVF-ET分娩後と外妊後の再IVF-ET成績は比較的良好で、その理由は

妊娠成立時と同等な卵子採取が期待できること、妊娠成立後の継続には良い着床環境が存在していることが考えられた。これに比べてIVF-ET流産後の再IVF-ET成績では、再妊娠率、継続妊娠率が有意ではないものの低く、この差が着床環境因子と考えたい。

文献：

鈴木隆弘、他（1993）、IVF-ET分娩後の再IVF-ET成績 哺乳卵学誌 10：126

表1. IVF-ET全体の成績

(1985. 12～1993. 12)

	患者数	妊娠 (%)	回数	妊娠 (%)
regular IVF	1031	471 (45.7 %)	2153	558 (25.9 %)
assisted IVF	27	3 (11.1 %)	35	3 (8.6 %)

表2. IVF-ET分娩後の再IVF-ET成績

対象患者	再妊娠	予後	再再妊娠	予後
29名	(+) 18名 (-) 11名	継続 12名 流産 6名	(+) 2名 (-) 2名	継続 2名
集計	再妊娠率 (対患者)		62.1 % (18/29)	
	最終継続妊娠率 (対患者)		48.3 % (14/29)	

表3. IVF-ET流産後の再IVF-ET成績

対象患者	再妊娠	予後	再再妊娠	予後
120名	(+) 62名 (-) 58名	継続 30名 流産 29名 外妊 3名	(+) 8名 (-) 7名 (+) 2名	継続 5名 流産 1名 外妊 2名 継続 1名 流産 1名
集計	再妊娠率 (対患者)		51.7 % (62/120)	
	最終継続妊娠率 (対患者)		30.0 % (36/120)	

表4. IVF-ET外妊後の再IVF-ET成績

対象患者	再妊娠	予後	再再妊娠	予後
21名	(+) 15名 (-) 6名	継続 7名 流産 5名 外妊 3名	(+) 2名 (-) 1名 (+) 2名	継続 1名 外妊 1名 (さらに外妊、流産) 継続 1名 外妊 1名 (さらに継続)
集計	再妊娠率 (対患者)		51.7 % (62/120)	
	最終継続妊娠率 (対患者)		30.0 % (36/120)	

29 ヒト卵細胞質内精子注入法の臨床成績

Clinical evaluation of intracytoplasmic sperm injection in human oocytes

竹 中 真奈美 ・ 高 橋 克 彦
Manami Takenaka & Katsuhiko Takahashi

広島HARTクリニック
Hiroshima Assisted Reproductive Technology Clinic

堀 内 俊 孝
Toshitaka Horiuchi

広島県立大学・生物資源学部生物資源開発学科
Department of Bioresources, Hiroshima Prefectural University

目的：ヒト卵細胞質内精子注入法(SUZI)によって重度乏精子症でも妊娠が可能となりその安全性も確立した。しかしSUZIの適応症例の約30%は受精に至らず(1)、細胞質内精子注入法(ICSI)の臨床応用が待たれていた。ICSIの問題点は精子調整法、卵活性化法及び高率の卵損傷とされていたが、ベルギーのVan Steirteghem等は、これらの問題を解決して39.2%という高い妊娠率を得ており(2)、その詳細が1993年9月の第8回世界体外受精会議で発表された。我々は1992年10月よりICSIの臨床応用を開始していたが、上記の報告を基に方法を改良することで著しい成功率の向上を見たので報告する。

方法：対象はSUZIを施行しても受精しなかった44組の夫婦である。1992年10月より93年9月迄を第ⅠPhaseとし、この間の精子調整法は、精子頭部細胞膜を破壊する目的で精子凍結・融解を3回繰り返す、無動状態の精子を使用した。卵は採卵後すぐにHyaluronidaseにて顆粒細胞を除き、MetaphaseⅡの卵のみを使用した。3～4時間後にICSIを施行、その後卵を活性化させる目的でCa ionophore 50 μ Mに約10分間浸した。その後HTF培養液に移しICSI後約20時間で受精の確認をし、さらに24時間培養、胚移植を行った。第ⅡPhaseは93年10月より12月迄で、精子調整は基本的にパーコール単層攪拌処置のみでICSIを行ったが、精子総数1万個未満の症例では凍結・融解(1回のみ)を行った。ICSI精子注入用ピペットは第ⅠPhaseよりさらに細く直径約3～4 μ mと改良し、卵を活性化させる手技は行わず培養、第ⅠPhase同様に胚移植を行った。

結果：第Ⅰ Phase で 31 組の夫婦に 40 周期 145 個の卵に、第Ⅱ Phase で 44 組の夫婦に（第Ⅰと重複あり）52 周期、226 個の卵に ICSI を施行し次の結果を得た。

	I Phase	Ⅱ Phase
周 期 数	40	52
ICSI 卵 数	145	226
受 精 数 (率)	49 (33.8%)	100 (44.3%)
分 割 数 (率)	38 (77.6%)	93 (93.0%)
卵 損 傷 数 (率)	72 (49.7%)	27 (12.0%)
妊 娠 数 (率)	2/24 (8.3%)	5/41 (12.2%)
(胚移植あたり)		

考察：ヒト卵を受精させるためには精子先体反応と卵の活性化が必要条件と考えられていたが、今回の研究で必ずしもそれ等は前提条件でないことが明らかとなった。ハムスター卵では、卵細胞を穿刺することで活性化が起こることが報告されているが(3)、ヒト卵でも同様に活性化するのかもしれない。

注入精子が先体反応を起こしていたかどうか判定する方法は無いが、一般 IVF で 正常の精子を 1～4 時間培養して先体反応が生じる率は 10%未満なので、注入時の精子が 先体反応を起こしていたとは考えにくい。

むしろ第Ⅰ Phase の結果が悪かったことより、ヒト ICSI では精子の先体反応や卵の活性化を起こす必要は無く、精子を確実に卵細胞内に注入することで十分受精、妊娠が可能であることが明らかとなった。

主要文献：

- (1) 高橋克彦、竹中真奈美、高橋健太郎、1994, 日産婦誌、46: 21-26.
- (2) Van Steirteghem, A.C., et al. 1993, Hum. Reprod. 8: 1061-1066.
- (3) Uehara, T., and Yanagimachi, R. 1977, J. Exp. Zool. 199: 269-274.

30 マウス成熟卵及び初期胚における phosphofructokinase, hexokinase 遺伝子発現について

Ontogeny of phosphofructokinase and hexokinase gene
activation in mouse embryo

高見雅司 高見毅司 坂元秀樹 佐藤和雄

Masashi Takami Takeshi Takami Hideki Sakamoto Kazuo Satoh

日本大学医学部産科婦人科学教室

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

(目的) マウス成熟卵、初期胚のエネルギー代謝は特異的变化を示し成熟卵から初期受精卵においては pyruvate がエネルギー基質となり 8 細胞期以後はじめて glucose をエネルギー源として利用できると言われている。¹⁾ 今回我々は解糖系の最大の律速酵素 Phosphofructokinase (PFK) および glucose 利用上不可欠な Hexokinase (HK) の成熟卵、初期胚における Ontogeny について検討した。

(方法) 8 週令雌マウスに PMS 5 単位投与後、48 時間後に HCG 5 単位投与し、18 時間後に卵管膨大部より成熟卵を採取した。また、同様に過排卵した雌マウスと 8 週令雄マウスを mating し 12 時間後に雌マウスの膣栓を確認し、卵管灌流法により初期受精卵を採取した。胚盤胞は雌マウスの膣栓を確認した日を第 1 日として第 4 日に子宮内洗浄にて回収した。

成熟卵、受精卵、胚盤胞それぞれ 100 個より RNeasy (Qiagen) にて mRNA を抽出し、その後 First strand cDNA synthesis kit (Pharmacia) にて reverse transcription により cDNA を作成した。異なった時期に調整した cDNA を用いて計 3 回検討を行なった。

RT-PCR 法の反応系は全量 20 μ l とし、組成は 10 \times Taq buffer 2 μ l、2.5 mM dNTP 1.6 μ l、Taq polymerase 5 units/ μ l (TOYOBO) 0.05 μ l、1 mM MgCl₂ 1 μ l、primer 1 μ l、DDW 12.2 μ l、template cDNA 1~2 μ l を加え、denaturation 94 $^{\circ}$ C 1 min、annealing は PFK, HK とともに 58 $^{\circ}$ C 1 min、extension 72 $^{\circ}$ C 2 min を 1 サイクルとして、合計 35 サイクル増幅した。使用した primer は PFK: 5'-TTC GAC CGA ATC CTG AGT AGC 3', 3'-GGT TCC CAG TCC ACG TTC TTC 5'、HK: 5'-GAA CCA CGA GAA GAC TCA GAA 3', 3'-CTG AAC GCC GAT GCT ACT GGT 5' であり、また同時に β -actin (5'-TGT ATT CCC CTC CAT CGT GG 3', 3'-CAA ACT CTG GAA GTT GTG GG 5') も同一条件下で増幅し PCR 効率の指標とした。

(結果) PFKmRNAは顆粒膜細胞では検出されたが成熟卵、初期受精卵、胚盤胞では検出されなかった。HKmRNAは顆粒膜細胞および胚盤胞では検出されたが成熟卵、初期受精卵では検出されなかった。

(考察) 受精前の未熟卵では、その糖代謝はpyruvate 依存型であり、glucoseの利用がない。これに比べ、受精後ではglycogenolysisが完成しglucoseを基質として着床に備えた代謝系が完成する。一方単一の卵を用いた酵素サイクリング法によりPFK、HKの活性を測定した成績では、初期胚から胚盤胞の時期を通じてほぼ一定のPFK活性を認めるのに対し、HK活性は初期胚の時期には低く8細胞期以後の胚で急に上昇する。^{2), 3), 4)} 我々の今回の成績は、このHK活性の上昇が胚自身のHKgeneのtranscription上昇によることを明らかにした。さらに胚からPFKのmRNAが検出されなかったことは、そのtranscriptionが極めて低いか、あるいは抑制をうけており、胚から検出されるPFK活性がmaternalなものとも考えうる。すなわちtranscriptionからみるとembryogenesisの過程でPFK優位からHK優位にshiftする。このことはmitosisを繰り返すembryogenesisの時期にあつて、PFK活性を一定に保ちながら、HK活性のみ上昇することでエネルギー代謝をglucose主体の成熟型に移行させると同時に、5炭糖回路へのバイパスをより効率よく用いることで核酸合成を行なうものと考えられた。

主要文献：

- 1) Biggers, J.D., Whittingham, D.G. and Donahue, R.P.: The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 58:560, 1967.
- 2) Tsutsumi O. et al.: Determination of Enzyme Activities of Energy Metabolism in the Maturing Rat Oocyte. *Mol. Reprod. Dev.* 33:333-337, 1992.
- 3) Tsutsumi O. et al.: Studies of hexokinase activity in human and mouse oocyte. *Am J Obstet - Gynecol* 162:1301-1304, 1990.
- 4) 堤 治、佐藤和雄、木下勝之、中林正雄、岡井 崇、榊原賢一郎、北川浩明、矢野 哲、加藤尚彦.(1984) 日産婦誌 Vol.36, No.9, 1377-1386.

31 マウス卵子成熟過程における *c-mos* mRNA の発現に関する検討

Expression of *c-mos* mRNA during oocyte maturation in the mouse

石田恵理・上谷則子・佐藤嘉兵

Eri ISHIDA, Noriko UETANI and Kahei SATO

日本大学農獣医学部 動物細胞学教室

Department of Cell Biology, College of Agriculture and
Veterinary Medicine, Nihon University

[目的]

癌原遺伝子 *c-mos* は、Molony murine sarcoma virus のウイルス性癌遺伝子 *v-mos* の細胞性遺伝子であり、マウスでは4番目、ヒトでは8番目 (バンド q11) の染色体上に単一コピーとして存在している。1985年には、Propstらによって *c-mos* mRNA が成熟マウスの精巣および卵巣で強く発現することが見出され、そのほかの器官では、副精巣、腎臓、胎盤、乳腺で極わずかな発現が報告されている¹⁾。その後、アフリカツメガエルの卵子成熟過程において *c-mos* 遺伝子産物の関与が報告され、すでに卵細胞分裂抑制因子

(cytostatic factor; CSF) であることが明らかにされている²⁾。一方、マウスにおいても *c-mos* 遺伝子産物が同様な過程に関与することが報告されているが³⁾、その発現時期・生理機能の詳細については不明な点が多い。本実験では、マウス卵子成熟過程及び初期発生における *c-mos* mRNA の発現について *in situ* hybridization 法により解析し、これら諸過程における *c-mos* 遺伝子の役割について考察を加えた。

[方法]

5週齢の ddY 系雌マウスに PMSG 5 IU, 50 時間後に hCG 5 IU を腹腔内投与し、ホルモン投与後一定時間ごとに摘出した卵巣を 4% PFA で固定した。常法に従ってパラフィン包埋した後、厚さ 6 μ m の連続切片にしたものを *in situ* hybridization 法に用いた。

プローブとして用いた *c-mos* cDNA 断片の増幅は以下に行った。*c-mos* cDNA が insert されているプラスミド pSP64 を *E. coli* に形質転換し、アルカリ法および CsCl 密度

勾配遠心法により調整および精製した。制限酵素 (Ava I および Hind III) を用いて plasmid DNA を *c-mos* cDNA 断片と pSP 64 に分離し、低融点 agarose gel 電気泳動法により目的とする *c-mos* cDNA 断片を回収した。この *c-mos* cDNA 断片を digoxigenin 標識 dUTP を用いたランダムプライマー法により標識し、プローブ DNA はとして用いた。

組織切片は脱パラフィン処理の後、0.2N HCl による塩基性蛋白質の除去、proteinase K による標的核酸の露出処理を行い、4% PFA で後固定した。標識した *c-mos* cDNA (10 μ g/ml) を含む hybridization mixture を調製し 37°C で 15~20 時間 hybridization を行い、alkaline phosphatase 標識・抗 digoxigenin 抗体を用いてハイブリダイズした部位を検出した。なお、positive control として β -actin の cDNA、negative control として pSP64 プラスミド DNA を用いて同様の操作を行った。

[結果及び考察]

Hybridization 後反応において *c-mos* mRNA の発現は卵子細胞質中に観察され、PMSG を投与後 47 時間経過したものから徐々にシグナルが強くなり、hCG の投与直後に最も強いシグナルが見られるようになった。さらに、hCG を投与してから 2 時間以上経過したものでは、シグナルの減退が認められた。また、排卵後の卵については、ほとんどシグナルがみられなかった。なお、発生胚についても同様に検討を加えた。

Table 1. Appearance of *c-mos* mRNA in oocytes on the mouse treated with PMSG-hCG

Time after PMSG and hCG injection (hrs)	Stage of oocyte maturation					
	I	II	III	IV	V	Ov.
P 20	-	-	+	+	-	
P 44 (h -6)	-			+	+	
P 47 (h -3)	-	+	+	+	+	
P 49.5 (h -0.5)	-	+	+	+	+	
P 50 + h 0	-	+	+	+	+	
P 50 + h 0.5	-	+	+	+	+	
P 50 + h 1	-	+	+	+		
P 50 + h 2	-	-	+	+	+	
P 50 + h 8	-	-	-	+	-	
P 50 + h 15						-

+ ; positive reaction - ; negative reaction

これらの結果からマウス卵母細胞において、外因性 LH サージ (本実験での hCG の投与) 刺激による *c-mos* mRNA の発現上昇が推測された。また、*c-mos* 遺伝子産物が、この LH サージ以後の卵母細胞の機能的分化のトリガーとして働いていることが示唆された。

[主要文献]

- 1) Propst, F. and Vande Woude, G. F. ; Nature 315, 516-518, 1985
- 2) Sagata N. et al. : Nature, 342:512-518, 1989
- 3) 小瀬村伊久美、木村順平、佐藤嘉兵 ; 哺乳動物卵子学会誌、9, 85-86, 1992

32 キメラマウスにおける導入 Myogenin - LacZ 遺伝子の発現

Expression of Myogenin - LacZ gene in chimera mice.

金 相勇・高橋寿太郎・堤 賢一*・藤沢淳子**・安田泰久

Sang-Yong KIM, Jutaro TAKAHASHI, Ken-ichi TSUTSUMI*,
Atsuko FUJISAWA** and Yasuhisa YASUDA

岩手大学農学部動物機能開発学教室
Laboratory of Animal Breeding and Reproduction,
and * Institute for Cell Biology and Genetics,
Faculty of Agriculture, Iwate University

** Division of Molecular Genetics, National Institute of Neuroscience.

目的：Weintraubらのグループにより中胚葉多能性細胞を筋芽細胞に分化誘導する遺伝子，myoDが分離されて以来（3），筋細胞分化の研究は急速な進歩をみせている。近年、中胚葉由来の線維芽細胞を筋芽細胞に分化誘導する遺伝子として、myoD、myogenin, myf-5, mrf4-herculin-myf-6などが単離され、これらの遺伝子群は、筋分化を支配するものと考えられている。

本研究は胚発生過程における器官形成ならびに細胞の移動を探すため、特に、myogenin 遺伝子の機能について検討する目的で、マウスの myogenin 遺伝子にLacZ遺伝子を結合したpMGNLacZ遺伝子を用い、このリポーター遺伝子を導入したトランスジェニックマウスならびにトランスジェニックキメラマウスを作出し、その発現とキメラの解析を検討した。

方法：注入遺伝子はマウスmyogeninエンハンサー／プロモーターにLacZ遺伝子を結合させたもので、pMGNLacZ（-4 K）をSal 1制限酵素で消化後、精製した。マウスの系統は（C57BL/6 x C3H）のF₁雌マウスを用いた。定法により過排卵誘起を行い、同系統F₁雄マウスと交配して受精卵を採取した。一方の前核内にDNA溶液を注入した。注入用培地は25mM HEPESバッファー（pH7.4）を含むBrinsterの修正培養液で行った。注入した受精卵は0.1mM EDTAを含むBrinsterの修正培養液（1）で4－5日間培養し、胚盤胞期胚まで培養した。

集合キメラ胚の作出は、DNA溶液を注入したF₁受精卵を3日間培養し、その8-16

細胞期胚と、BALB/c系統マウスに過排卵誘起を行い同じ系統の雄と交配させて2.5-2.7日に子宮および卵管より8-16細胞期胚を採取し、以下のMullen & Whittenら(5)の方法に準じてキメラを作出した。胚移植用には、ICR/Slc系統7-9週齢のSPFマウスを使用し、偽妊娠2.5日目の子宮内に移植した。その後、妊娠9.5-12.5日目に帝王切開を行い、X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) 染色を行い、LacZ遺伝子の発現を調べた。

結果：pMGNLacZ遺伝子を導入した366個の受精卵で、形態的に正常な2細胞期胚210個(57.4%)が得られた。さらに、72時間の培養によって胚盤胞期胚までの発生は128個(61.0%)であった。これらの胚をレシピエントマウス13匹に移植した結果、9匹(69.2%)が正常に妊娠した。胎子における遺伝子発現を調べたところ、10.5日胚では30個の体節に発現が見られ、9.5日胚では尾側の体節に弱い発現が、さらに、12.0-12.5日胚では頭側の体節から尾側の体節にかけて筋細胞で強い発現が見られた。

考察：本研究のトランスジェニックマウスにおけるmyogenin遺伝子の発現は、今まで報告されているmyogenin遺伝子の発現パターンとはほぼ同様であった(2.4)。

本研究からmyogenin遺伝子は、胚発生における体節ならびに肢芽(limb buds)の発現誘導に関連しているものと示唆された。また、筋の発生分化と深く関連し、体節ならびに肢芽(limb buds)において発生する筋芽細胞に特異的なマーカー遺伝子の導入が指摘された。

主要文献：

1. Brinster, R. L., 1972. In Growth, Nutrition and Metabolism of Mammalian Cells in Culture eds. Rothblat, G. & Crstofalo, V., Academic, New York, Vol.2, pp. 251-286.
2. Cheng, T-C., M. C. Wallace, J. P. Merlie and E.N. Olson, 1993. Science. 261:215-218.
3. Davis, R.L., H. Weintraub and A.B. Lasser, 1987. Cell. 51: 987-1000.
4. Fujisawa-Sehara, A., K. Hanaoka., M. Hayasaka., T. H. Yagami and Y.I. Nabeshima, 1993. Biochem. Biophys. Res. Comm. 191: 351-356.
5. Mullen, R.J. and W.K. Whitten, 1971. J. Exp. Zool. 178: 165-176.

33 ウシ体外受精卵の発育における Insulin と Insulin-like growth factor-I の影響

Effects of insulin and insulin-like growth factor-I
on the development of bovine embryos

松井基純・高橋芳幸・菱沼 貢・金川弘司
Motozumi MATSUI, Yoshiyuki TAKAHASHI, Mitsugu HISHINUMA,
Hiroshi KANAGAWA

北海道大学獣医学部家畜臨床繁殖学講座
Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine,
Hokkaido University

【目的】 近年、細胞増殖因子がウシ初期胚の体外発育に及ぼす影響について様々な研究が行われている。細胞増殖作用を有する insulin は、マウス¹⁾、ラット²⁾、ブタ³⁾ およびウシ⁴⁾ の初期胚の発育を促進することが報告されている。さらに、マウス胚では Insulin-like growth factor-I (IGF-I) による胚の発育促進効果も確かめられている⁵⁾。本実験では、完全合成培地を用い、ウシ体外受精卵の発育に及ぼす insulin および IGF-I の効果について検討した。

【方法】 と場より得たウシ卵巣の小卵胞から吸引採取した未成熟卵子を常法に従い体外成熟を行った。凍結精液を融解後、パーコール密度勾配遠心法を用いて活力の高い精子を選別し、2.5mM テオフィリンと 3mg/ml BSA を含む Brackett と Oliphant の等張液⁶⁾ を媒精培地として体外受精を行い受精卵を作出した。媒精後約 20 時間で卵丘細胞を剝離除去し、0.1% polyvinylalcohol および 20 種類のアミノ酸を含む修正合成卵管液 (mSOF)⁶⁾ を基礎培地として、5%O₂、5%CO₂、39℃ の条件下で培養を行った。実験 1 では mSOF に 10 μ g/ml insulin、20ng/ml IGF-I を添加した培地を用い、体外受精卵を 4 日間培養し、桑実胚 (≥ 16 -cell) への発育および細胞数を調べた。実験 2 では、mSOF で 4 日間培養して得られた収縮桑実胚を、実験 1 と同様の培地で 2 日間培養を行い、胚盤胞への発育および細胞数を調べた。

【結果および考察】 桑実胚への発育率は、insulin あるいは IGF-I の添加により有意 ($p < 0.01$) に増加した (Table.1)。しかし、insulin と IGF-I の間で差異は認められなかった。また、得られた桑実胚の平均細胞数は、insulin および IGF-I の影響を受けなかった。胚盤胞への発育率において insulin あるいは IGF-I の添加による影響は認められなかった (Table.2)。得られた胚盤胞の平均細胞数は、insulin あるいは IGF-I の添加により有意に増加したが ($p < 0.01$)、insulin と IGF-I の間で差異は認められなかった。

以上の結果より、insulin および IGF-I が、ウシ体外受精卵の桑実胚および胚盤胞への発育を促進することが明らかになった。insulin は、ウシ初期胚の発育を促進することが報告されており⁴⁾、本実験においても同様の結果が得られた。また、マウス胚では、IGF-I も発育促進効果を示し、IGF-I の濃度により、IGF-I 受容体を介する場合と、insulin 受容体との交差反応による場合の、2つの作用機序が確かめられている⁵⁾。ウシ初期胚では、PCR法を用いた実験により、insulin および IGF-I の受容体の mRNA が発現し、それぞれの受容体が存在することが確認されている⁷⁾。本実験の結果は、ウシ初期胚における、insulin および IGF-I の受容体の存在を示唆するものである。今後、insulin および IGF-I の有効濃度を調べ、マウス胚に認められるような交差反応の有無についての検討が必要と思われる。

Table.1 Effects of insulin and IGF-I on the development of one-cell embryos into the morula stage

Treatment	No. of replicates (No. of embryos)	Cleaved at Day 2 (%)	Developed to morulae at Day 5 (%)	No. of cells in morulae (mean)
—	4 (125)	80.0	34.0 a	34.7
insulin	4 (118)	81.3	44.7 b	38.2
IGF-I	4 (120)	82.4	45.4 b	39.1

Day 0 = day of in-vitro insemination.

One-cell embryos were cultured for 4 days mSOF with insulin (10 μ g/ml) or IGF-I (20ng/ml).

a, b : P<0.01

Table.2 Effects of insulin and IGF-I on the development of morulae into the blastocyst stage

Treatment	No. of replicates (No. of morulae)	Developed to blastocysts at Day 7 (%)	No. of cells in blastocysts (mean)
—	4 (44)	70.1	145.1 a
insulin	4 (48)	71.7	166.3 b
IGF-I	4 (40)	75.1	163.9 b

Day 0 = day of in-vitro insemination.

Morula embryos were cultured for 2 days (Day 5 to Day7) in mSOF with insulin (10 μ g/ml) or IGF-I (20ng/ml).

a, b : P<0.01

【主要文献】

1. Harvey MB, Kaye PL (1990): Development 110, 963-967.
2. Zang X, Armstrong DT (1990): Biol. Reprod. 42, 662-668.
3. Saito S, Niemann H (1991): Biol. Reprod. 44, 927-936.
4. Seidel GE, Glass T, Olsen SE (1991): Biol. Reprod. 44, Suppl.1, 155.
5. Harvey MB, Kaye PL (1991): Mol. Reprod. Dev. 29, 253-258.
6. Takahashi Y, First NL (1992): Theriogenology 37, 963-978.
7. Watson AJ, Hogan A, Hahnel A, Wiemer KE, Schultz GA (1992): Mol. Reprod. Dev. 31, 87-95.

34 抗透明帯モノクローナル抗体（5H4）エピトープの 卵胞発育過程における局在について

Localization of the epitope recognized by anti-zone monoclonal antibody
(MAB-5H4) during folliculogenesis

井上みゆき、長谷川昭子、竹村 正、香山浩二

Miyuki Inoue, Akiko Hasegawa, Tadashi Takemura, Koji Koyama

兵庫医科大学 産婦人科

Department of Obstetrics and Gynecology, Hyogo Medical College

目的：哺乳動物の卵をとりまく透明帯は、一連の受精過程において種々の機能をもつ糖蛋白質である。また透明帯には強い抗原性があり、抗透明帯抗体には強い受精阻害作用のあることもすでに明らかにされている。しかし透明帯の合成部位については、従来より議論されているが(1,2)、動物種によるちがいや透明帯構成成分によるちがいが、その結論は未だ得られていない。そこで今回、ブタおよびヒト共通抗原に反応し、エピトープ構造の明かなモノクローナル抗体（MAB-5H4）(3)を用いて、その対応抗原の卵巣内局在性ならびに発現時期を調べた。さらに免疫電顕を用いることにより、透明帯が卵細胞自身によってつくられるのか、それとも顆粒膜細胞に由来するのかについても検討を加えた。

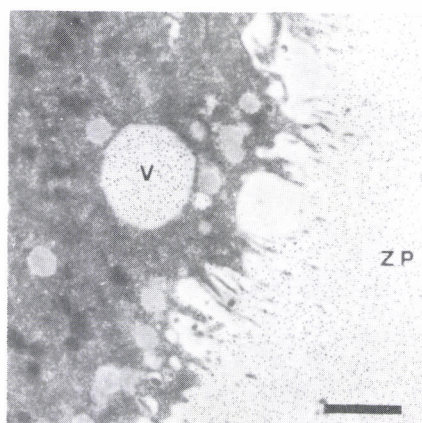
方法：1. 蛍光抗体法（光学顕微鏡観察） まずブタ卵巣をPBSで洗浄し、ドライアイス-エタノール冷却したヘキサランで急速凍結包埋後、6 μ mの凍結切片を作成した。第一反応としてMAB-5H4のハイブリドーマ培養上清を室温で1時間処理した。PBSで洗浄後、第二反応としてFITC標識抗マウスIgG (1:200倍希釈)を同じく室温で1時間処理した。PBSで十分に洗浄後、蛍光顕微鏡にて観察した。これと同一切片または連続切片をヘマトキシリン-エオジン（HE）で対比染色した。

2. 金コロイド法（電子顕微鏡観察） ブタおよびヒト組織を4%パラホルムアルデヒド-0.25%グルタルアルデヒド固定液中で10分間固定後、マイクロスライサーにより300 μ mの切片にした。同固定液でさらに氷温1時間固定し、脱水後切片を1mm角に細切し、ロイクリル樹脂内にUV照射により包埋した。NOVAミクロトームにより超薄切片(100nm)を作成し、ホルムバール支持膜を張ったニッケル単孔メッシュ上に、押し付け法により標本を調製した。第一反応はMAB-5H4のハイブリドーマ培養上清を室温で1時間処理した。PBSで洗浄後、第二反応は金コロイド(粒子径15nm)結合プロテインA (1:10倍希釈)を、室温で1時間処理した。PBSで洗浄後、ウラン-鉛の二重染色を施し、観察は日本電子(JM-1200CX)で行った。

結果：ブタ卵巣凍結切片を用いた蛍光抗体法では、1～2層の顆粒膜細胞層をその周囲にもつ卵母細胞実質に、弱い蛍光が認められた。周囲の顆粒膜細胞層には蛍光は認められず、また卵母細胞の周囲細胞が扁平な原始卵胞においては、全く陽性反応は認められなかった。即ち、MAB-5H4により認識される透明帯抗

原は、発育をはじめた卵母細胞により合成されることが示唆された。その後、卵胞の発育にともない卵母細胞の周囲に強い蛍光を認め、これはHE染色における透明帯の局在と一致した。顆粒膜細胞層が7～8層、さらに胞状卵胞へと発育するに従って透明帯の厚さとその蛍光強度は増加した。ブタ卵巣の電子顕微鏡観察では、2～3層以上の顆粒膜細胞層を伴う発育卵胞および胞状卵胞内の透明帯に一致して、金コロイド粒子の沈着が見られた。金コロイドは顆粒膜細胞の細胞間にも認められ、透明帯と顆粒膜細胞層が密接して存在していることが分った。また、卵母細胞の細胞質内にも、分泌された透明帯と同じ金コロイド粒子を含む直径0.8～1.6 μm の分泌小胞が認められた。ヒト卵母細胞を用いた観察からも同様な分泌小胞が認められた(図)。この分泌小胞は、おそらく合成された透明帯の前駆体を卵母細胞の細胞膜付近に運搬し、分泌する役割をもつと考えられる。しかし、ブタにおいてもヒトにおいても、顆粒膜細胞の細胞質内には全く金コロイドの沈着は認められなかった。

考察：今回の結果から、5H4対応抗原を含む透明帯成分はブタ及びヒトにおいて、周りを取り囲んでいる顆粒膜細胞ではなく卵細胞自身により合成分泌されることが明らかになった。さらにブタにおいて、この成分は一次卵胞卵よりその合成が開始され、卵胞の発育に伴って分泌小胞により運搬され細胞外に分泌・沈着することが明らかになった。Wassarmanらもマウス卵巣を免疫電顕で観察することにより、これと同様な分泌小胞を認めている(4)。



V：分泌小胞
Z P：透明帯

図) 卵細胞質内の透明帯抗原を含む分泌小胞 (Bar : 1 μm)

引用文献：

- 1) Liang, L. and Dean, J. : Vitam. Horm. , 47, 115-159, 1993.
- 2) Lee, V. H. and Dunber, B. S. : Dev. Biol. , 155, 371-382, 1993.
- 3) Koyama, K., Hasegawa, A., Inoue, M. and Isojima, S. : Biol. Reprod., 45, 727-735, 1991.
- 4) Wassarman, P. M. and Steven, M. : Int. Rev. Cytol., 130, 85-110, 1991.

マウス初期胚における RAG-1 遺伝子の発現 — 初期発生における genetic recombination の可能性 —

Expression of RAG-1 in murine preimplantation embryos; possible
genetic recombination during early embryogenesis

早川 智¹⁾, 栃木明人¹⁾, 根本則道²⁾, 千島史尚¹⁾, 白石尚美¹⁾, 鈴木 (唐崎) 美喜¹⁾,
江角真理子³⁾, 桜井 勇²⁾, 佐藤和雄¹⁾

Satoshi Hayakawa, Meijin Tochigi, Norimichi Nemoto, Fumihisa Chishima, Hisami
Shiraishi, Miki-Karasaki-Suzuki, Mariko Esumi, Isamu Sakurai and Kazuo Satoh

1) 日大医学部産婦人科、2) 第二病理、3) 総医研

Department of Obstetrics and Gynecology, 2nd Department of Pathology,
Medical research Institute

(目的) Recombinase activating gene (RAG)-1, 2 遺伝子は未分化な T もしくは B リンパ球において特異的に発現し抗体あるいは TCR 遺伝子の V (D) J recombination に関与するとされている。1) RAG-1, 2 は進化の上で広く保存され、特に RAG-1 はヒト RET 遺伝子や酵母の RAD18 遺伝子とも homology を有することから DNA の複製や免疫系以外の細胞の発生分化における未知の機能を有する可能性がある。2) 演者らは RAG 遺伝子の胚発生における発現の有無とその意義をマウス初期胚を用いて検討した。

(方法) ICR マウスを PMS-hCG によって排卵、交尾後 48 時間に頸椎脱臼によって屠殺し実験に供した。卵管より受精卵を採取し BWW 中で培養した。受精卵より blastocyst までの各段階における初期胚 40 個づつより RNA を抽出し MMTV RTase によって逆転写し cDNA を作成した。マウス RAG-1, 2 特異的な oligonucleotide primer によって 35 cycle の PCR を行ない 2% agarose gel 電気泳動, Nylon membrane に transfer 後, ECL oligonucleotide probe にて hybridization を行なった。また各段階の胚に Biotin 化 oligonucleotide probe による in situ hybridization を行なった。さらに胚細胞培養液中に 3, 10, 30, 100, 300 μ M の RAG-1 sense, antisense oligonucleotide を添加して発生に及ぼす影響を検討した。

(成績) RT-PCR 法により morula より blastocyst の時期に強い RAG-1 の発現を認めた。確認のために異なった領域を認識する primer pair を作成して検討したところ、やはり morula から blastocyst の時期に RAG-1 の発現を認めた。一方、RAG-2 の発現は検討したいずれの時期にも認められなかった。in situ hybridization 法によっても同時期の胚に RAG-1 の局在を認め、blastocyst においては ICM および trophoectoderm 双方に染色を認めた。しかしながら antisense oligonucleotide による実験では検討を行なった各濃度では sense, antisense 間の発生に差を認めなかった。

(結語) マウス初期胚において RAG-1 遺伝子が発現し trophoectoderm と inner cell mass の分化におい

て未知の遺伝子領域のrecombinationが起きている可能性が示唆された。哺乳類においても初期発生における遺伝子の不可逆的変化が生じる可能性がある。

(主要参考文献)

- 1) Oettinger, M. A. 1992. Activation of V (D) J recombination by RAG1 and RAG2. *Trend in Genetics*. 8, 413 - 416
- 2) Chun, J, M., Schatz, D. G., Oettinger, M. A., Jaenisch, R. and Baltimore, D. 1991. The recombination activating gene-1 (RAG-1) Transcript is present in the murine central nervous system. *Cell*, 64, 189 - 200

36 断片化DNA末端標識法を用いた閉鎖卵胞検出の試み

Detection of Atretic Ovarian Follicles using DNA Nick End Labeling Method

高野りや・上谷則子・苫名充・和氣朗・佐藤嘉兵

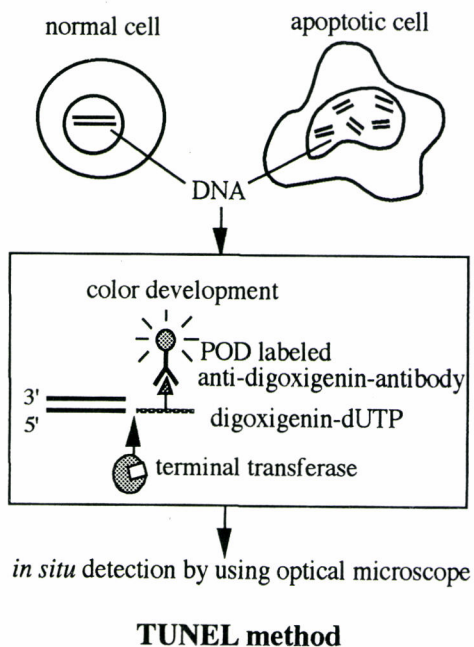
Riya TAKANO, Noriko UETANI, Mitsuru TOMANA, Akira WAKE, Kahei SATO

日本大学農獣医学部 動物細胞学教室

Laboratory of Cell Biology, College of Agriculture and

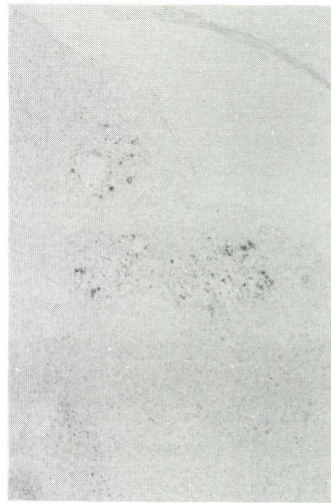
Veterinary Medicine, Nihon University

【目的】 性周期を持ち、排卵を繰り返すことにより生殖活動を行うような動物では、一回に排卵される卵子の数はほぼ一定である。このような動物では繰り返し発現する性周期ごとに、卵巣内に含まれる多数の卵胞細胞の一部が発育を開始する。これら発育を開始した卵胞のうち、少数のものは成熟して卵子を排卵させるが、大多数の卵胞は退行（卵胞閉鎖）することが知られている。このような成熟卵子の選抜過程における、卵胞閉鎖のメカニズムについては未だ不明な点が多い。しかし、大多数の卵母細胞が除去されるにもかかわらず、卵胞閉鎖は非常に速やかに起こることなどから、プログラム細胞死（アポトーシス）による細胞除去機構の関与が報告されている¹⁾²⁾。従来の方法では、卵胞閉鎖の判定はもっぱら形態学的な観察に頼っていたが、卵胞閉鎖の過程におけるアポトーシスの関与が示唆されたことによりDNAレベルでの解析法の応用が待たれている。本実験では、最近開発されたTUNEL（TdT-mediated dUTP nick end labeling）法³⁾を用いてアポトーシスに特徴的なDNAの断片化を検出することにより卵巣内の閉鎖卵胞の局在を明らかにし、卵胞閉鎖のメカニズム解析に対する本法の応用について検討した。



【方法】 過排卵処理を施したICR系成熟雌マウスより卵巣を摘出し、4%PFAによる固定後、常法に従いパラフィン包埋し、厚さ6 μ mの組織切片を作製した。組織切片をProteinase K (20 μ g/ml)で15分処理する事により、タンパク質を除去し、DDWで2分、4回洗浄した。内因性ペルオキシダーゼを不活化するために、切片を2% H_2O_2 で覆い5分間反応させた。DDWで洗浄した後、TdT (0.3 U/ μ l)、DIG (digoxigenin)-dUTPを加え、60分、37℃にて付加反応を行った。切片をTBbufferに15分浸漬することにより反応を停止した。DDWで洗浄後、TBSに5分間浸漬した。その後、Blocking solutionに30分浸漬させ、ペルオキシダーゼ標識anti-DIG-antibody (0.75 U/ml)を滴下し室温にて1時間反応させた。TBSで3回洗浄した後、DAB solutionにて発色させ、DDWで洗浄した。封入後、光学顕微鏡下で観察した。

【結果と考察】 連続切片にて3次元的に断片化DNAの検出を試みた結果、形態的に大きな変化は見られないが、いくつかの卵胞に限って顆粒膜細胞に強い陽性反応を示した(右写真)。これらの卵胞では、卵胞を構成する全ての顆粒膜細胞の核にほぼ均等に陽性反応が検出された。また、幾つかの顆粒膜細胞では核のみならず細胞質中にも非常に強い陽性反応が観察された。形態学的に明らかに卵胞閉鎖を起こしていると考えられる卵胞では、卵胞構成細胞の幾つかにのみ陽性反応が観察された。初期卵胞閉鎖の過程において顆粒膜細胞のDNA断片化が起こることが多数報告されていること、また今回示したように同一卵巣内において特異的に陽性反応を示す卵胞と、ほとんど反応を示さない卵胞とが観察されることから、卵子の退行はアポトーシスによる周囲の卵胞細胞の消失をともないながら進行すること、これにより従来の観察では特定の難しかった初期閉鎖卵胞の局在についてTUNEL法が有用であることが強く示唆された。さらに、ホルモンの過剰投与により卵胞閉鎖を誘導した卵巣におけるDNAラダーパターンの解析およびTUNEL法との比較などの検討を加えた。



<写真説明>hCG投与後1時間のマウス卵巣。
特定の卵胞にのみ陽性反応が見られる。

- 【文献】 1) J.L.Tilly, K.I.Kowalski, D.W.Schombeger and A.J.W.Hsueh, (1992) Apoptosis in Atretic Ovarian Follicles is Associated with Selective Decreases in Messenger Ribonucleic Acid Transcripts for Gonadotropin Receptors and Cytochrome P450 Aromatase. *Endocrinol.* 131:1670-76
- 2) F.M.Hughes and W.C.Gorospe, (1991) Biochemical Identification of Apoptosis (Programmed Cell Death) in Granulosa Cells: Evidence for a Potential Mechanism Underlying Follicular Atresia. *Endocrinol.* 129:2415-22
- 3) Yael G., Yoav S., and Shmuel A.B., (1992) Identification of Programmed Cell Death In Situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation. *J. Cell Biol.* 119:493-501

37 マウス初期卵子における³H-チミジンの取込みに及ぼす β-メルカプトエタノール添加の影響

The effect of β-mercaptoethanol on the incorporation of
³H-thymidine in the early developing mouse embryos.

辻井弘忠 ○佐藤由希子・高田 直・高木優二

Hirotsada Tsujii, Yukiko Sato, Naomi Takata & Yuji Takagi

信州大学 農学部 資源開発学講座

Department of Agriculture Biotechnology, Faculty of Agriculture,
Shinshu University

目的：マウス卵子はin vitro の培養において系統差はあるが、2細胞期に胚発生が停止することが知られている。演者らはマウス“2-cell block”前後におけるメチオニンの取込みを調べた結果、hCG投与後40～45時間後に取込みが急減すること、EDTA添加することによってhCG投与後40～45時間の取込みの急減を防ぐことが可能であることを報告した。また、グルコース・ビルビン酸の取込みとCO₂産出量について検討を行ったところ、グルコースの取込み及びCO₂産出量においてhCG投与後40～45時間目の取込みの減少・EDTA添加による取込みの増加が確認された。しかし、ビルビン酸及びCO₂産出量においては顕著な変化は見られなかった。さらにチミジンの取込みを調べたところhCG投与後40～45時間で取込みが減じることを明らかにしたが、EDTA添加による影響はあまりみられなかった。

一方、ウシ初期胚を体外において培養する際に8細胞期前後で発育を停止してしまう現象が知られており、“8-cell block”と呼ばれウシ胚の体外発生の障害となっている。しかし、β-メルカプトエタノール(β-ME)を添加することにより共培養法を用いることなくウシ胚の胚盤胞への発育が可能であることが報告されている。このβ-MEは強力な還元作用を持ち、生化学分野ではタンパク質の還元剤・抗酸化剤として一般的に用いられ、また細胞培養においてはリンパ球・腫瘍細胞などの培養を行う際に培養液に添加することによって細胞増殖促進効果が知られている。そこで、本実験は2-cell block 前後のマウス卵子における³H-チミジンの取込みに及ぼすβ-ME添加の影響を調べたので報告する。

方法：ICR系未経産マウス（5～8週令）を用いPMSG・hCG48時間間隔でそれぞれ5 i uを腹腔内に注射し、雄と一晩同居させた。採卵及び培養には、一晩インキュベーター内でガス通気させNaOHでpH7.4に調整したM2液もしくはM2+ β -ME液（5 μ M）を用いた。hCGの注射時を0時間とし 20・30・40・45・50・60時間においては卵管内卵子を各培養液中で採卵した。これらの卵子は20・30時間で1細胞期、40・45・50時間で2細胞期、60時間で2～4細胞期が主であった。90・95時間においては子宮内の桑実胚および胚盤胞期の卵子を採取した。各実験区において得られた卵子をマイクロチューブに各々10個ずつ入れ³H-チミジンを0.5 μ ciを含む β -ME添加・無添加の培養液を加えインキュベーター内で2時間培養し取込ませた後、10%TCAで反応を停止させた。その後、ミリポアフィルター上で5%TCAで数回洗浄後、エタノールで洗浄した分画の各取込み量を液体シンチレーションカウンターで測定した。

結果及び考察： β -ME添加・無添加区において、³H-チミジン取込み量は時間の経過とともに増加する傾向が見られ、特に90・95時間（桑実胚・胚盤胞）にかけて急増した。また、40・45・50時間に取込みが有意に低くなった。 β -ME添加区におけるマウス卵子の³H-チミジンの取込み量は40・50時間において無添加区のほうよりやや高くなる傾向が見られたが、統計的な有意差はなかった。

これらのことから、 β -ME添加・無添加区においてhCG投与後40・45・50時間に取込みが低くなる傾向が見られ統計的にも有意差があり、マウス卵子の2-cell block がhCG投与後45時間前後で起こることが確認された。2-cell block 前後における卵子の³H-チミジンの取込みにおいて β -ME添加による影響はあまり見られなかった。しかし、40～50時間で β -ME添加区の方がやや取込み量が高くなったことから β -MEの添加はマウス2-cell block をやや改善するとも考えられる。今後、マウス卵子の培養もあわせて検討する予定である。

主要文献：

1. 辻井弘忠 境久雄 高木優二、in vivo およびin vitroのマウス2細胞期胚への³H-メチオニンの取込みに及ぼすEDTAの影響、第82回家畜繁殖学会講演要旨、1992年 p.14
2. 辻井弘忠 中野国博 高木優二、マウス初期卵子における¹⁴C-グルコース及び¹⁴C-ピルビン酸の取込みに及ぼすEDTA添加の影響、第84回家畜繁殖学会講演要旨 1993年 p.47
3. 辻井弘忠 高田直 佐藤由希子 高木優二、マウス初期胚における³H-チミジンの取込みに及ぼすEDTA添加の影響、第88回 日本畜産学会講演要旨 1994年

38 3次元立体内部構造顕微鏡を用いた卵管の観察

Observation of oviducts by the 3 Dimensional Internal Structure Microscope

○横田秀夫^{*1}, 樋口俊郎^{*1*2}, 工藤謙一^{*1}, 佐藤嘉兵^{*1*3}

Hideo YOKOTA^{*1}, Toshiro HIGUCHI^{*1*2}, Ken-ichi KUDOH^{*1}, Kahei SATO^{*1*3}

*1 (財) 神奈川科学技術アカデミー, *2 東京大学工学部, *3 日本大学農獣医学部

*1 Higuchi Project, Kanagawa Academy of Science and Technology

*2 Faculty of Engineering, Univ. of Tokyo

*3 College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon Univ.

〔目的〕組織や細胞の立体像を観察する方法としては、一般に連続切片を作製し、その断面から全体像を推定している。しかし、この方法では、切片作製に非常に多くの行程が必要であり、全ての切片を標本化することは困難である。また、立体像の解像度を上げるために、切片を薄くした場合や大きな試料の立体像を高い解像度で構築する場合、切片の枚数が多くなる。そのため、試料全体の切片を作製することは、多くの時間と熟練した作業が必要であり、非常に困難である。近年、超音波、X線などを用いたCTスキャナーが開発され、非破壊での断面像の観察や立体像の観察が可能となった。しかし、上記のスキャナーなどによる観察は、色情報を得ることが困難である。また、従来からの切片観察に比べ、分解能が低いために組織中の微細な構造を観察することも困難である。そこで我々は、試料を薄くスライスし、その断面情報を元に立体像を構築する3次元立体内部構造顕微鏡(3 Dimensional Internal Structure Microscope = 3D-i sm)を考案した。本システムは、試料断面を観察するため、切片を作製する手間がなく、試料の全断面を高速に観察することが可能である。また、本システムは、試料全断面の画像情報をレーザーディスクに記録するため、標本自体を保存する必要はなく、いつでも任意の断面を観察することが可能である。さらに、画像処理装置を用いて立体画像を構築する事が可能であり、実際には切断していない面の観察や、任意の視野からの観察がおこなえる。今回、3D-i smを用いて、排卵前後におけるマウス卵管の観察及び立体像構築を行ったので報告する。

〔実験装置〕図1に実験装置の試料切削部を示す。パラフィン又は、OCTコンパウンドにて包埋した試料を、試料送り部により0.1から5 μ mの任意の送りで押し上げる。押し上げられた試料を回転するガラスまたはディスポーザブルナイフで切削する。切削した断面は、CCDカメラ(IKEGAMI ICD-880)を取り付けた顕微鏡で観察し、レーザーディスク(SONY LVR-3000NA)に記録する。記録された断面情報をワークステーション(KUBOTA TITAN2-800/Denali SD80)を用いて、断面を積み重ねるボリュームレンダリング法により立体像を構築した。

〔方法〕ICR系成熟雌マウスにPMSG5IU, 48時間後hCG5IUの過排卵処置を行い, hCG投与16時間後に卵管を摘出した。摘出した卵管は, 過排卵誘起の確認の後, FBSを10%含むPBSにて卵管内を環流し, ブラン固定液にて固定した。固定した卵管は, 5分間の水洗後, 大きさの測定を行い, 1%エオジンで卵管内を環流し, 染色を行った。5分間の染色の後, 水洗し, 1%のズダンブラックを含むOCTコンパウンドで包埋し, -35°C にて凍結した。なお, コントロールとして, 正常マウスの卵管に同様に処理をした物を用いた。以上の処理を施した卵管を3D-i smにセットし, $5\mu\text{m}$ 間隔で切削した。試料全断面の切削終了後, 立体像の構築を行った。

〔結果及び考察〕図2に過排卵処理を行った卵管のスライス断面図を示す。卵管がブラン固定液の黄色に染色され, 卵管内腔がエオジンの赤色に染色されている。管壁は卵管峡部に比べ膨大部が非常に薄くなっていることが観察された。図3に, 断面図より構築した立体像を示す。卵管膨大部, 及び峡部が観察された。また, 視点の位置を変えることにより, 卵管漏斗部, 卵管子宮接合部が観察された。本装置により, 過排卵前後の卵管の状態, および, 実際には切断していない面や, 卵管の立体構造を観察することに成功した。

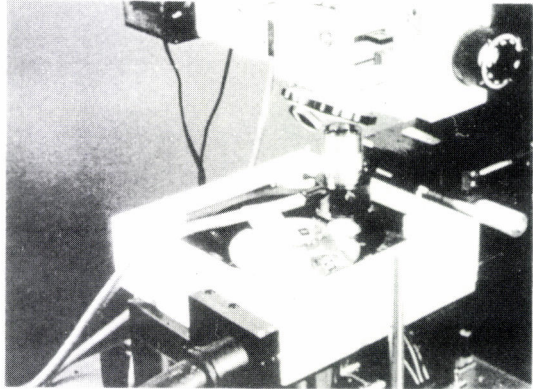


図1 試料スライス部

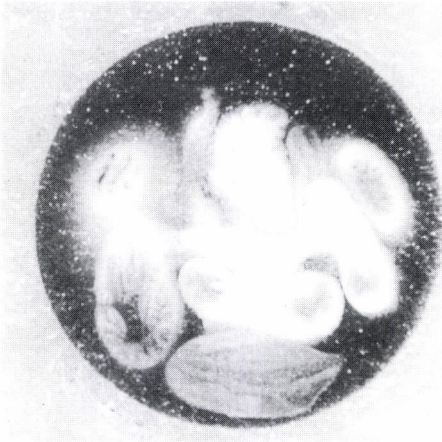


図2 過排卵処理後の卵管の断面像

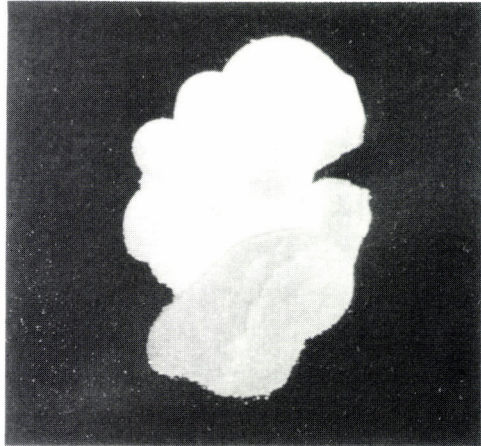


図3 スライス断面より構築した立体像

〔文献〕

1. 小林, 樋口, 青木, 工藤: 1993年度精密工学会春季大会学術講演会講演論文集, pp. 517-518.
2. 樋口, 工藤, 横田, 李(1993): 第52回農業機械学会年次大会講演要旨, pp. 79-80.

39 卵管采の卵捕獲ならびに卵管の卵輸送機能について —特に排卵時の卵管内圧の亢進ならびに収縮性について

Reproductive Physiology of the Fallopian Tube - Fimbrial Capture of the Ovum and Tunal Transport of the Ovum with Emphasis on the Ampullary Construction and Elevation of the Tubal Pressure.

○長田尚夫、角田郁夫、松浦真彦、高木健一郎、吉田孝雄、佐藤和雄
金山喜一*、成相孝一*、遠藤 克*、佐久間勇次*

H. Osada, I. Tsunoda, M. Matuura, K. Takagi, T. Yoshida, K. Satoh
K. Kamayama*, K. Nariai*, T. Endo*, and Y. Sakuma*

日本大学医学部産科婦人科学教室

*日本大学農獣医学部獣医生理学教室

Depart. of Obstet. & Gynecol., Nihon Univ. School of Medicine

*Depart. of Vet. Physiol., College of Agr. and Vet. Med., Nihon Univ.

目的：GIFTや共培養などの補助的生殖技術の進歩とともに胚の発生・発育における卵管の役割や特異性が改めて注目されている。周知のとおり卵管は、精子の輸送、卵の捕獲、受精、受精卵の発育とその輸送など一連の巧妙な機構を営むが、依然その生殖生理については不明の点が多い。排卵については、卵胞壁に存在する平滑筋の収縮が大きく関与し、排卵時には、卵管采が卵巣表面に覆いかぶさるように密着する事が古くから観察されている。この現象は、平滑筋の収縮による反応とされ排卵卵子を確実に卵管内に取込むための機構として必須である。これらから卵管采の運動性が排卵に連動して亢進する現象が推察でき、さらに卵胞期に卵管膨大部の運動性が亢進していることも報告されている。これらの報告からは、卵管膨大部の運動性の亢進が排卵現象に同調しているかについては触れていない。そこで卵管采の卵捕獲ならびに卵管の卵輸送機能について検討するために、テレメトリー自動計測システムを用いて排卵前後の卵管内圧ならびに卵管運動を連続的に測定、興味ある知見を得た。

方法：供試動物は、体重 3.0～3.5 kg の日本白色在来種の家兔を用いた。生理的条件下で家兔卵管内圧ならびに運動性を測定するためにテレメトリー自動計測システムの送信器を静脈麻酔下で家兔腹腔内に装着し、2～4週間の手術侵襲の回復期間を見てから実験に供した。圧センサーにつながるウレタンカテーテルの先端（直径約 2 mm）は、膨大部卵管のほぼ中央に固定した。カテーテルは、耐圧性で液体 noncompressable fluid で満たされ、先端は、加塑性メンブランからなり gel で密封され体液の進入を防ぐ仕掛けになっている。このカテーテル先端で感じた圧信号は、本体である発信器の圧センサーに通ずる。発信器は、センサー、増幅・送信回路、バッテリーからなる 20mmφ×20mm 大の円筒形で皮下に固定した。発信機ならびにウレタンカテーテルは、組織反応が少ないようにコーティングされ、連続して 2(9) 月間発信が可能である。発信器装着は、卵管への侵襲をより少なく癒着を誘発させないようにマイクロサージェリー（9-0 ナイロン）を用いた。排卵誘起は、hCH100～150iu を耳静脈内に投与して行った。卵管内圧ならびに卵管の運動性は、テレメトリー自動計測システムを用いて家兔体内の発信機からのテレメトリーデータを受信、BIOELECTRIC AMPLIFIER(NEC-San Ei 1253A)で増幅、DATA RECORDER(NEC-San Ei 7R41)で記録した。波形分析は、DATA RECORDER で記録した電位を COMPUTER

SYSTEM (NEC-San Ei signal processor 7T18)を用いてA-D変換してからFFT処理した。

結果：hCG投与後から連続して卵管内圧と運動性を観察した。一例をFig 1に紹介する。膨大部卵管内圧ならびに卵管の運動性は、内圧約5mmHg、収縮圧と弛緩圧の差2~3mmHgとほぼ安定性を持続していたが、hCG投与後9時間58分に一過性に下向後、急激に約5分間上昇(約10mmHgと約2倍)、収縮圧と弛緩圧の差異も7~10mmHgと約3倍に増幅した。内圧上昇は、にわたり持続した。その後の卵管内圧は、周期的に軽度上昇しては正常に戻った。この卵管内圧の変動ならびに卵管の運動性の亢進は、約20にわたって数回観察された。

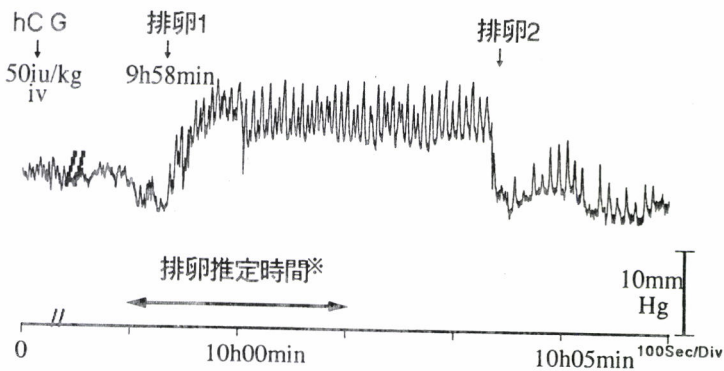


Fig.1 排卵時における卵管内圧の変動(家兔卵管膨大部)

考察：テレメーター方式での卵管内圧ならびに運動性は、排卵時に一致して亢進を認めたが、本研究は、排卵現象に連動した卵管膨大部の収縮性の亢進を証明したものと考えている。排卵に同調して卵管膨大部の収縮性を亢進させる要因は、本研究の結果からのみでは特定することはできないが、PGF2 α が最も有力な要因であろうと推察している。排卵は、卵胞壁に存在する平滑筋の収縮によって発現し、また家兔顆粒膜細胞は、PGF2 α を産生・分泌することも知られ、排卵には卵胞液中のPGF2 α 濃度の上昇が必須条件であると推察される。また卵胞液中のPGF2 α 濃度は、排卵前に急増することがラットや家兔で報告されている。この高濃度のPGF2 α を含む卵胞液が排卵に伴い卵管膨大部に流入することによって卵管膨大部平滑筋の収縮を誘発したと考えられる。排卵とそれに連動した卵管采の運動性の亢進や、本研究で明かとなった排卵に引き続き発現する卵管膨大部の収縮性の亢進は、排卵卵子を卵管内に取り込み受精部位へと運搬するために不可欠な機構であることはいうまでもない。これからの一連の現象が同調して発現することは性殖生理上、合目的な機構であると考えられ実に興味深いといえる。

主要文献：

1. Frederiks, C. hl., Azzam, M. E. A., and Hafes, E. S. E. 1977. of the rabbit utero-ovarian ligament. The moti lity in vitro J. Reprod. Fert. 49: 387.
2. Hafez, E. S. E. 1973. Gamete transport. in: Human Reproduction, Conception and Contraception. pp.85. Hafez, E. S. E. and Evuns, T. N. eds. Harper & Row. New York.
3. Maia, H. S., and Coutinho, E. M. 1970. Peristalsis and antiperistalsis of the human fallopian tube during the menstrual cycle. Biol. Reprod. 2: 305-314.

40 ガラス化法により冷却された幼若ラット卵巢の組織細胞学的観察

Histocytological examination of neonatal rat ovaries cryopreserved by vitrification

杉本実紀・宮本 元

Miki Sugimoto & Hajime Miyamoto

京都大学農学部畜産学科 家畜生体機構学研究室

Laboratory of Functional Anatomy and Physiology,

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Kyoto University

目的：卵巢の超低温保存法の開発は雌性生殖細胞の長期保存を可能にするだけでなく、臓器移植で必要とされる各種の臓器の保存法の開発にも役立つと考えられる。臓器の超低温保存については従来、緩慢凍結法による試みがなされてきたが、高濃度の凍害保護物質の添加と急速な温度変化等の手段によって氷晶を形成させることなく超低温保存を行う、いわゆるガラス化法が有望視されている。我々は今回、ガラス化法により処理した幼若ラット卵巢の組織細胞学的観察を行い、保存処理過程において生じる傷害について検討したので報告する。

方法：7日齢のWistar系ラットを軽度エーテル麻酔下で屠殺、卵巢を摘出し、RallらのVS1(1)を一部修正したガラス化液（以下VS1）に段階的に浸漬した後、少量のVS1と共に液体窒素中に投入し急速冷却した。液体窒素中に30分間以上保持後、氷水中で急速に加熱し段階的希釈法（A1群）またはサッカロース希釈法（A2群、0.5Mサッカロース加リン酸緩衝液（PBS）を使用）で保護物質を除去した。A1およびA2群の卵巢と、対照として無処理の卵巢（C群）と保護物質の添加・除去のみを行った卵巢（B1およびB2群：各々段階的希釈法およびサッカロース希釈法）を常法に従い2.5%グルタルアルデヒドと1%四酸化オスミウムで固定し、エポキシ樹脂に包埋した。準超薄切片をトルイジンブルーで染色し、光学顕微鏡で観察した。また、超薄切片を作成し酢酸ウラニル・クエン酸鉛二重染色を施し、透過型電顕による観察を行った。

結果：A1およびA2群とも、卵巢表層部において明瞭な組織学的・細胞学的損傷の認め

られない卵胞が観察された。C群では大部分の細胞で損傷は認められなかったが、B1、B2群ならびにA1、A2群では卵胞ならびに支質において細胞の収縮、膨張、ならびに細胞質中の空胞形成等の損傷が観察された。空胞形成はA1およびA2群で顕著であり、卵胞においては卵巣の表層部に比べて内部で顕著である傾向が認められた。この空胞形成は電顕観察の結果より、小胞体の槽の拡張等の変化によるものと推察された。またA1およびA2群において顆粒層細胞などに核濃縮の傾向を示す細胞が観察されたが、これは保護物質の添加・除去のみを行ったB1およびB2群でも認められた。A2群ならびにB2群においては支質または卵胞膜において著しく腫脹した細胞が観察されたが、B1群ではこの損傷は比較的軽度であった。

考察：ガラス化法においては、氷晶形成を抑制するために高濃度の保護物質の添加あるいは冷却・加温過程での急速な温度変化等の方法がとられる。そのため臓器保存にガラス化を適用する場合、臓器内への保護物質の浸透と温度変化速度の不足が障害になると考えられる。本実験において、ガラス化冷却・加温後のA1およびA2群の卵巣で、保護物質の添加・除去のみを行ったB1およびB2群と比較して細胞内の空胞形成等が顕著であり、卵巣内部に比べて表層部では損傷が軽度であったことから、冷却・加温過程において卵巣内部で氷晶形成の起こっている可能性が高いと推察される。その原因が保護物質の浸透不足と温度変化速度の不足のいずれによるものか本実験では明らかではなく、今後検討が必要である。また、サッカロース希釈を行ったA2群ならびにB2群において一部の細胞に著しく腫脹したものが観察された。これは希釈時の浸透圧変化に伴う損傷であると推察され、希釈液の浸透圧を現在より高くすることにより解決される可能性がある。しかしマウス胚においては、より高濃度のサッカロース（1M(2)あるいは1.5M(3)）を含む緩衝生理食塩水では、室温で浸漬時間が延長されると生存率が低下すると報告されており、卵巣においても高濃度のサッカロースは生存性に悪影響を及ぼす可能性があるため、大型の組織を処理するために希釈時間を延長する場合、他の浸透圧調節剤の使用も検討する必要がある。

主要文献：

1. Rall, W. F. and G. M. Fahy, 1985. *Nature* 313: 573-575.
2. Széll, A. and J. N. Shelton, 1986. *J. Reprod. Fert.* 76: 401-408.
3. Kono, T., O-Y. Kwon, K. Ichinoe and T. Nakahara, 1989. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 35: 211-216 (in Japanese).

41 培養マウス胚盤胞における収縮運動の タイムラプスビデオによる観察

Time-Lapse Videomicrographic Observations of the Contraction in Cultured Mouse Blastocysts

高橋英太・新村末雄

Eita TAKAHASHI and Sueo NIIMURA

新潟大学農学部農業生産科学科

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Niigata University

目的：培養ウサギ胚盤胞¹⁾が収縮運動を行うことが、1929年に初めてタイムラプスシネマを用いて報告されて以来、ウサギばかりでなく、マウス、ハムスター、ウシおよびブタの培養胚盤胞も収縮運動を行うことがタイムラプスシネマあるいはタイムラプスビデオによって確かめられている。またマウス胚盤胞では、収縮に要する時間と収縮の程度が調べられているが、これらの観察に用いられている胚の数は少なく、収縮の回数については全く調べられていない。一方、収縮運動は胚盤胞ハッチングに関係していると一般に考えられているが²⁾、ウシではハッチングしなかった胚盤胞でのみこの運動が観察されることや、マウスでは収縮をせずにハッチングした胚盤胞がみられることから、収縮運動とハッチングは関係ないと考えている研究者もいる。このように、収縮運動の生理的意義についてはほとんど不明である。そこで本実験では、培養マウス胚盤胞について、胚盤胞形成期からハッチング前、ハッチング中およびハッチング後の各期間における収縮の程度と回数を、タイムラプスビデオを用いて観察し、併せて、胚盤胞ハッチングにはプロスタグランジン (PG) が関与しているといわれているので³⁾、PGの合成阻害剤であるインドメサシンを含む培養液で発生した胚盤胞についても、収縮の程度と回数を観察し、マウス胚盤胞の収縮運動とハッチングとの関係を検討した。

材料および方法：供試動物として、ICR系の成熟雌マウスを使用した。胚盤胞の収縮運動を観察するために、2細胞胚を、PMSGとhCGそれぞれ5IUを48時間間隔で腹腔内に注射して過排卵を誘起し、同系統の成熟雄と交配させた雌の卵管から、hCG注射後48時間に採取してWhittinghamの培養液⁴⁾で培養した。培養は、倒立位相差顕微鏡に装着した培養チャンバーを用いて、37℃でCO₂5%、

空気95%の気相下で行った。観察は、30個の胚について、倒立位相差顕微鏡に取り付けた CCDカメラとタイムラプスビデオカセットレコーダーで4秒間隔で撮影した映像を用いて行った。一方、胚盤胞の収縮運動とハッチングとの関係を調べるために、採取した2細胞胚を100 μ Mのインドメサシンを含むWhittinghamの培養液で培養し、胚盤胞における収縮運動を観察した。なお対照として、0.2%のエタノールのみを含むWhittinghamの培養液で発生した胚盤胞を用いた。観察は、それぞれハッチング中の15個の胚盤胞について、胚盤胞形成後32時間まで行った。

結果：ハッチング前の期間において、30個中5個は収縮を起こさなかったが、ハッチング中およびハッチング後の期間では、すべての胚が収縮運動を行った。また本実験において、収縮を程度によりI型（20%以下の体積の減少）、II型（21%以上50%以下の体積の減少）およびIII型（51%以上の体積の減少）に分けて、各期間における回数を調べたところ、平均収縮回数は、ハッチング前では1.97回（I型：1.90回、II型：0.033回、III型：0.033回）、ハッチング中では8.80回（I型：8.17回、II型：0.53回、III型：0.10回）、ハッチング後では3.47回（I型：2.97回、II型：0.47回、III型：0.033回）であり、ハッチング中で最も多かった。さらに、ハッチング前後の期間では収縮の程度は小さく、ほとんどがI型であったが、ハッチング中ではI型の収縮回数が著しく増加するとともに、II型の収縮を行う胚の数が増加した。なおいずれの期間においても、III型の収縮は1ないし3個の胚盤胞でみられる程度であった。

一方、インドメサシンを含む培養液で発生してハッチングを完了しなかった胚盤胞において、すべての胚が収縮を起こし、平均収縮回数は5.80回（I型：3.53回、II型：1.47回、III型：0.80回）であり、平均収縮回数は対照の胚の6.14回との間に有意な差はなかったが、対照の胚に比べ、I型の収縮回数は有意に少なく（ $P<0.05$ ）、II型とIII型の収縮回数は有意に多かった（ $P<0.01$ ）。

考察：哺乳動物胚盤胞でみられる収縮運動は、ハッチングに関係していると一般に考えられており、本実験においても、マウス胚盤胞の収縮運動はハッチング中で特に活発であった。一方本実験において、PG合成の阻害剤であるインドメサシンを含む培養液で発生したマウス胚盤胞の収縮の程度と回数を調べたところ、平均収縮回数は、対照の胚に比べ、I型のものが有意に少なく、II型とIII型のものが有意に多いことが明らかとなった。従って、胚盤胞の収縮運動はハッチングと密接に関係しており、程度の大きい収縮が多くなると胚盤胞はハッチングを完了できなくなるとともに、軽度の収縮はハッチングを促進することが推察された。なおこの運動は、ハッチング後にも観察されたので、ハッチング以外にも何らかの生理的役割を果たしていることも考えられた。

主要文献：

- 1) Lewis, W.H. and Gregory, P.W. 1929. Science, 69:226-229.
- 2) Cole, R.J. 1967. J. Embryol. exp. Morphol., 17:481-490.
- 3) Biggers, J.D., Leonov, B.V., Baskal, J.F. and Fried, J. 1978. Biol. Reprod., 19:519-533.
- 4) Whittingham, D.G. 1971. J. Reprod. Fert. Suppl., 14:7-21.

Localization of Microfilaments during oocyte nuclear and cytoplasmic maturation

寺田 幸弘

深谷 孝夫

矢嶋 聰

Yukihiro Terada,

Takao Fukaya,

Akira Yajima

東北大学医学部産婦人科教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Tohoku University School of Medicine

目的：哺乳動物未熟卵(GV stage eggs)は体外培養系にても比較的容易に成熟卵(M2 stage eggs)に到達する。¹⁾しかしこれら体外成熟卵の受精率は体内成熟卵に比して非常に低い。このような事実より卵細胞質成熟という概念が存在し種々の研究が為されているが、そのアプローチの難しさから体系的な解析は未だ完成していない。我々は細胞質を構成する細胞骨格の一要素であるmicrofilaments(MF)に注目し、その動態と卵核成熟、卵細胞質成熟との関係を検討した。

方法：(卵の採取および体外培養) 性成熟雌ゴールデンハムスターをPMSG-hCG処理し各成熟段階の卵を卵胞及び卵管より採取した。一部未熟卵は、TALP(Tyrode Albumin Lactate Pyruvate)を用い、5% CO₂ in air 飽和湿度のもとで成熟培養した。²⁾また一部の未熟卵は核成熟阻害剤である hypoxanthine (Hypo),³⁾ およびアクチン重合阻害剤であるcytochalasinD(CCD)⁴⁾ 添加培地で同条件の成熟培養を行なった。これらの卵におけるにおけるMFの局在と、核の状態を蛍光抗体法にて観察した。(MFの蛍光染色) Zona free eggを4% formaldehydeにて60分間固定し0.1% Triton-X100で10分間処理して細胞膜の透過処理を行なったものを、5IU/ml FITC-phalloidinで60分間処理しMFの蛍光染色を行なった。⁵⁾核相は核を2 μ g/ml Hoechst33342で染色して確認した。

(標本の観察) サンプルはpoly-L-lysine処理スライドガラス上に固定し、退色防止剤添加50%グリセリンにて封入して全載標本を作成した。観察には共焦点走査型レーザー顕微鏡OLYMPUS-LSM-GB-200を用いてサンプルの3次元解析を行った。⁶⁾

結果：体内成熟卵では成熟に伴い細胞膜直下にMFが集積してゆき、M2期卵では第一極体放出部に特に強く集積しているのが観察された。体外成熟M2期卵の44%に第一極体放出部以外の細胞膜直下のMFの形成が観察されなかった。0.2mMHypo添加培養による核成熟停止卵に核相がGV stageにも拘わらず細胞膜直下にMFが集積しているのが観察された。CCD添加培養卵ではmetaphase like chromosomeが卵の中心部に観察され、MFは観察されなかった。考察：体内成熟時のMFの動態を明らかにした。体外成熟卵の一部で核相がM2期であるにも拘わらず、細胞膜直下のMFの形成が不十分であるものが観察された。受精におけるMFの役割は未だ不明な点が多いが、この事実が体外成熟卵の低受精率の一因となっている可能性が考えられた。CCD添加培養卵の観察より、MFは核の細胞表層への移動及び極体の放出に関与していると考えられるが、Hypoにて核成熟を停止した卵でも細胞膜直下のMFの形成が観察された。この事実は核とMFの動態にdiscrepancyが存在する事を示し、MFの動態が卵細胞質成熟の一要素となっている可能性が考えられた。

(文献)

- 1) Pincus.G,et al (1935) J.Exp.Med 62 665-675
- 2) Bavister.B.D, (1989) Gamete Res 23 139-158
- 3) Sirado.M.A,et al (1988) Biol of Reprod 39 229-234
- 4) Brown.S.S et al (1979) J of Cell Biol 83 657-662
- 5) Maro.B.et al (1984) J of Embryol exp Morph 81 211-237
- 6) Smith.G.J.et al (1991) J of Electron Microscopy Technique 18 38-49

43 核除去・体外受精により作出されたマウス雄核発生卵 (第1分割期)の染色体解析

Chromosomal analyses of androgenetic mouse eggs at the first cleavage division

吉澤 緑、阿久澤浩*、影山恭子、前田高弘、河野友宏*、中原達夫*、村松晋

Midori YOSHIZAWA, Hiroshi AKUZAWA*, Kyouko KAGEYAMA, Takahiro MAEDA,

Tomohiro KONO*, Tatsuo NAKAHARA* and Susumu MURAMATSU

宇都宮大学農学部、*東京農業大学総合研究所

Utsunomiya University, * NODAI Research Institute

【目的】哺乳類の胚発生における両性ゲノムの役割が、核移植の技術を用いて明らかにされつつある。雌性ゲノムのみで発生した胚は、着床後25体節を形成するまで成長する (Surani & Barton, 1983)。しかし、雄性ゲノムのみで発生した胚は、胎盤外円錐と栄養膜細胞の発達は良好であるが、胎子の発生・成長は劣悪で、雌性ゲノムのみで発生した胚より早い段階で退行することが報告されている (Barton et al., 1984)。この雄核発生胚は胞状奇胎の成因であると考えられている (Kajii & Ohama, 1977)。核移植により作成された雄核発生胚のこれまでの実験では、雌性前核の除去後、他の受精卵から雄性前核を1個移植することによって2親性雄核発生胚を作成しているが、この方法では、雌雄両前核の同定がかなり困難であることから、2親性雄核発生胚である確実性は完全なものではなく、それ以外の胚である可能性も否定できない。また、雌性前核のみ除去した卵の第1分割を抑制し、雄性ゲノムを倍加することによっても雄核発生胚を作成し得るが、この方法ではホモ2倍体雄核発生胚となることから、早期に死滅する可能性を有する性染色体構成YYの胚が約半数になると考えられる。Kono et al. (1993) は、これらの懸念を除外したヘテロ2倍体雄核発生胚の作成を目的として、核除去・体外受精により、効率的にマウス雄核発生胚を作出する方法を報告している。演者らのひとり阿久澤ら (1993) は、胞状奇胎発生の実験的証明の一環として、この方法により作出したマウス雄核発生胚を移植し、その着床状態と胎盤の変化について報告している。

演者らは、Kono et al. (1993) の方法によって、マウス未受精卵を核除去し、体外受精によって2精子を侵入させ、ヘテロ2倍体雄核発生胚を作成し、XX胚、XY胚、YY胚の胚盤胞への発生能および着床後の発生能を明らかにするための実験を行っている。今回、その第一段階としてマウス雄核発生卵の第1分割期の染色体観察を行ったので、その結果を報告する。

【方法】東京農大発生工学研究室で自家繁殖させた (C57BL×CBA) F₁ の6-10週齢の雌マウスおよび8-10週齢の雄マウスを実験に供した。F₁ 雌マウスにPMSG 7IUと hCG 6IUを48時間間隔で腹腔内投与し、過排卵を誘起した。hCG投与14~16時間後に屠殺、開腹し卵管膨大部より未受精卵を採取した。未受精卵は、ヒアルロニダーゼで卵丘細胞を除去した後、Kono et al. (1993) の方法に準じて透明帯切断、核除去、体外受精を行った。4時間媒精後、洗浄し、さらに8時間培養し、この間に受精の確認および前核の観察、前核数の分類を行い、0.1 μg/

m1コルセミド添加培地中で10時間培養した後、洗浄し、4℃に冷却、ストローに封入した。その後、4℃に冷却したまま宇都宮大学に送付し、染色体標本を作製した。染色体標本の作製は、Yoshizawa et al. (1990)の方法に準じて行い、全ての標本にCバンド染色(Yoshizawa et al., 1985)を施した。

【結果および考察】前核観察時に判定した前核の数によって卵子を分類し、それを染色体標本として、ゲノムを分析した結果を表1に示した。

Table 1. Genomic analysis of androgenetic mouse eggs

No. of observed pronucleus	Total eggs	No of eggs with			
		n	2n	3n	4n
1	175	160 (91.4%)	14	1	0
2	126	16	91 (72.2%)	14	5

前核観察時に1前核と判定された卵子175個のうち、ゲノムがnであったものは160個で、2nが14個、3nが1個観察され、前核観察数とゲノム数が一致したのは91.4%であった。

また、2前核と判定された126個のうち、2nであったものは91個であり、nが16個、3nが14個、4nが5個観察

Table 2. Incidence of first-cleavage mitosis in androgenetic mouse eggs

	Total eggs	No of eggs with			
		n	2n	3n	4n
Eggs examined	301	176	105	15	6
in mitosis	244	150	83	8	3
	(81.1%)	(85.2%)	(79.0%)	(53.3%)	
sexed	151	109	41	1	0
	(61.9%)	(72.7%*)	(49.4%*)		

* P<0.05

され、前核観察数とゲノム数の一致は72.2%であった。このことは、前核数の正確な判定が困難なことを示しており、さらに精緻な観察が必要と思われる。これらの卵子の染色体分析の結果を表2に示した。合計301個の卵子のうち57個は前核期で、244個の卵子で分裂中期像が観

Table 3. Analysis of sex-chromosome combination in androgenetic mouse eggs

Genome	No of eggs with					
	X	Y	XX	XY	YY	XXX
n	52	57				
2n			11	22	8	
3n						1

察され、このうち、151個の卵子で性染色体構成が分析された。ゲノムがnであった176個の卵子のうち150個(85.2%)で分裂中期像が観察され、109個(72.7%)において性染色体構成が分析された。また、ゲノムが2nであった卵子では、各々83個(79.0%)、41個(49.4%)であり、2nの卵子で性染色体構成分析率が有意(P<0.05%)に低かった。これは染色体の展開および分染に問題があったものと考えられ、雄核発生胚の標本作製において、さらに技術的改良が必要であると思われる。性染色体構成の分析結果では、nの卵子においてY染色体を有するもの57個、Y染色体が観察されずXを有すると判定されたもの52個であり、2nの卵子においてXXが11個、XYが22個、YYが8個、3nの卵子においてXXXの性染色体構成のものが1個観察された(表3)。この結果は、精子侵入による胚形成の理論値に準じたものであり、本実験で作成された2n卵子がヘテロ2倍体雄核発生胚であることが立証された。

【文献】1) Surani & Barton (1983) Science 222:1034-1036

2) Barton et al. (1984) Nature 311:374-376

3) Kajii & Ohama (1977) Nature 268:633-634

4) Kono et al. (1993) Mol Reprod Dev 34:43-46

5) 阿久澤ら (1993) 第1回日本胎盤研究会講演抄録

6) Yoshizawa et al. (1990) Theriogenology 33:789-797

7) Yoshizawa et al. (1985) Jpn J Anim Reprod 31:78-83

ウシ体外受精由来胚盤胞の凍結保存に
Ethylene glycolを耐凍剤とした場合のSucroseの影響

Effect of sucrose on viability of frozen-thawed bovine IVM-IVF-IVC
blastocysts using ethylene glycol as a cryoprotectant

福島護之

Moriyuki Fukushima

兵庫県立中央農業技術センター 生物工学研究所

Department of Biotechnology, Hyogo Prefectural Agricultural Institute

〔目的〕近年、ウシ胚盤胞の凍結保存では、融解後の耐凍剤除去操作を必要としない Ethylene glycol（以下EGとする）を用いたダイレクト法が利用されるようになってきた(1、2、3)。しかし、本法の基礎的な条件を検討した報告はほとんどない。また、1.4 M EGを耐凍剤として用いた場合の体外受精由来胚盤胞の移植後の受胎率は、1.4 M Glycerol（以下GLとする）を用いた場合の受胎率に比較して低い(4)。そこで、1.4 M EGを耐凍剤として用いた場合のウシ体外受精由来胚盤胞のダイレクト法による凍結時の、凍結媒液に種々の濃度のSucroseを添加した場合の凍結・融解胚の生存性と胚を構成する細胞（内部細胞塊（以下ICMとする）細胞と栄養外胚葉（以下TEとする）細胞）数とその構成比を検討した。

〔方法〕Fukushima et al. (1993)の方法に準じて作出した媒精7日目の体外受精由来胚盤胞を実験に供した。得られた胚盤胞を1.4 MのEGと0～0.3 MのSucroseを添加した33% 子牛血清添加リンゲル氏液に直接導入して10分間浸漬し、耐凍剤に平衡しながら0.25 mlのプラスチックストローに吸引、封入した。予め-7.0℃にしておいた液層式のプログラムフリーザーに胚の入ったストローを浸漬し、2分間保持した後にストローのパウダーで封入した側を液体窒素に漬けておいたピンセットで挟んで植氷した。さらに、8分間-7.0℃に保持した後に-0.5℃/分で-35℃まで冷却した。-35℃で直ちに、液体窒素中にストローを投入してそのまま-196℃の液体窒素中に保存した。

凍結・融解胚の生存性：融解方法は、ストローを液体窒素中から空気中に取り出して5秒間保持した後、37℃の温湯中で氷晶が融解するのを観察し、融解後直ちに空気中に取り出した。そして、予め保温しておいたシャーレ上に胚を取り出して、素早く37℃に保温した新鮮な培養液（1%子牛血清添加TCM-199）で10回洗浄した後、卵丘細胞を単層培養している流動パラフィン下の100 μ l培養液の小滴中で48時間培養を継続した。生存性の判定は、胞胚腔の回復した胚盤胞を生存胚とし、透明帯から脱出した胚盤胞を発育胚とした。

凍結・融解胚の構成細胞数の検査：ICMとTEを分別染色するIwasaki et al. (1990)の

方法を用いて凍結・融解後24時間培養した胚の構成細胞数を計測した。本法の原理は、抗ウシ脾臓細胞家兔血清（以下、抗血清とする）と補体で傷害を受けた胚最外層に位置するTE細胞をヘキスト33342とヨウ化プロピジウムによってピンク色に、一方、抗血清と補体に感作しないICM細胞をヘキスト33342のみで青色に染色することで、両細胞を分別するものである。対照区として、凍結しない媒精8日目の胚を用いて同様の方法で細胞数を計測した。

〔結果〕凍結・融解胚の生存性：Sucroseの添加量は0、0.05、0.1、0.15、0.2、0.25および0.3Mの7区とした。胚の生存性は、各区間に有意差は認められなかった。しかし、胚の発育率は、Sucroseを0.15および0.2M添加した区の69.6および66.0%が0.25および0.3M添加した区の37.5～45.7%に比較して5%水準で有意に高い発育率を示した。0.05および0.1M Sucrose添加区の63.8および61.7%も0.25および0.3M区に比較して5%水準で有意に高い発育率を示した。

凍結・融解胚の構成細胞数：総細胞数、ICM細胞数と総細胞数に対するICM細胞の割合において有意差がみられた。Sucroseを0.15から0.2M添加した区では新鮮胚とほぼ同様の総細胞数であったが、0、0.05と0.1M区で減少傾向を示し、0.25と0.3M区では有意に減少した。ICM細胞数とその総細胞数に対する割合は新鮮胚に比較して凍結・融解胚全区で有意に低く、総細胞数の減少のなかったSucrose0.15から0.2M添加した区でもICMの損傷があることが示唆された。

〔考察〕1.4M EGに0.15～0.2M Sucroseを添加することで凍結・融解後の胚の発育率が有意に改善された。このことは、胚の構成細胞数とも対応していることが本結果から示された。また、Iwasaki et al. (1994)は、凍結・融解胚では凍結・融解過程で傷害を受けたICM細胞もピンク色に染色されることを報告している。今回TE細胞とした細胞の1部は傷害を受けたICM細胞も含んでいるため、ICM細胞の割合が低下したものと考えられた。Sucroseには、凍結保護作用のあることが知られているが、今回の添加効果が、直接的な保護作用によるものであるのか、他の要因によるものであるかは明らかとはならなかったので、今後、検討を要すると考えられた。

〔主要文献〕

1. 堂地修、今井敬、高倉宏輔、1991. 第84回日本畜産学会大会講演要旨. P61.
2. Voelkel, S. A. and Hu, Y. X., 1992. Theriogenology 37:23-38.
3. 大江正人、山本政生、高木光博、鈴木達行、1993. J. Reprod. Develop. j11-j15.
4. 福島護之、富永敬一郎、秦谷豊、内海恭三、入谷明、1992. 第85回日本畜産学会大会講演要旨. P15.
5. Fukushima, M., Tominaga, K., Iwasaki, S. and Utsumi, K. 1993. 8th. World Congress on In Vitro Fertilization and Alternate Assisted Reproduction. OC-125.
6. Iwasaki, S., Yoshida, N., Ushijima, H., Watanabe, S. and Nakahara, T. 1990. J. Reprod. Fertil. 90: 279-284.
7. Iwasaki, S., Yoshitake, Y., Li, X., Watanabe, S and Nakahara, T. 1994. Mol. Reprod. Devel. (in press).

45 ニホンザルの卵胞卵と凍結精子による体外受精

IVF using oocytes collected from the ovarian follicles and
frozen - thawed spermatozoa in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*)

山海 直、清水慶子*、長 文昭、吉川泰弘

Tadashi Sankai, Keiko Shimizu*, Fumiaki Cho and Yasuhiro Yoshikawa

国立予防衛生研究所・筑波医学実験用霊長類センター(TPC)

Tsukuba Primate Center for Medical Science,
the National Institute of Health

*京都大学・霊長類研究所(PRI)

Primate Research Institute, Kyoto University

数種のサル類で、体外受精の成功例が報告されている。マカク属サルではアカゲザル、カニクイザルにおいてその詳細が報告されているが、ニホンザルでは、ニホンザル卵子とカニクイザル精子を用いた体外受精について成功例が報告されているにすぎない(山海ら、実験動物 43,45-50,1994)。今回、ニホンザルの卵胞卵と凍結融解精子を用いて体外受精を試みたので報告する。

【方法】実験に使用したニホンザルは、PRIで飼育されたオス1頭とメス7頭である。体外受精実験に先だって、ニホンザル精子の凍結保存を行った。精子は、10歳齡成熟オスの精巢上体から採取した。ネンプタールの深麻酔下で両側の精巢上体を摘出し、ミネラルオイルを満たした50mlチューブに入れ5℃で一時保存した。この操作は、PRI(愛知県犬山市)で行い、チューブを密閉した状態で5℃を保ちながらTPC(茨城県つくば市)まで運搬した。精巢上体の摘出から約24時間後に37℃まで加温したのち、精巢上体をチューブから取り出し、滅菌した濾紙の上でミネラルオイルを除去した。精巢上体の尾部を切り放しTYH mediumの入ったペトレイ内で細かく切り刻み、約10分間、37℃、5%CO₂条件下で静置した。精子がmedium内に十分に浮遊したことを確認し、90%パーコールを用いて遠心洗浄し活性が良好な精子を回収した。得られた精子は、カニクイザル精子のために開発された凍結保存法(Sankai et al., J.Reprod.Fertil.,印刷中)で凍結した。融解は急速融解法で行い、融解後直ちにパーコール洗浄した。回収した精子は、CaffeineとdBc-AMPを添加したTYH mediumで1-2時間前培養し体外受精に用いた。

卵子を採取するために9-13歳齡の成熟メスを用いて卵胞発育誘起を試みた。卵胞発育誘起および体外受精は、ニホンザルの非繁殖期である7、8月に行った。卵胞発育誘起は、

PMSGとhCGの組み合わせにより行った。PMSGは、投与量200IU/回で6あるいは8回筋肉内投与した。いずれの個体もPMSG最終投与から28時間目にhCG 4,000IUを筋肉内投与し、その翌日に卵子の採取を試みた。まず卵巢を摘出し、卵巢を10%FCSと10IU/mlPMSGを添加したTCM-199で洗浄したのち、同medium内で細かく切り刻み浮遊した卵子を回収した。卵子は、同mediumで十分に洗浄したのち、チューブに入れて密封し37℃のポット内で保温した。これらの操作はPRIで行い、その後、卵子はポット内で保温した状態でTPCまで約10時間かけて運搬した。運搬後直ちに同mediumのドロップ内に卵子を移し、37℃、5%CO₂条件下で培養した。採卵後約24時間目にノマルスキー微分干渉顕微鏡下でGV、第1極体の有無、さらに卵丘細胞の状態について観察し、第1極体の放出を認めたもの、あるいは卵丘細胞が緩んでいるものをWhitten's mediumに移して媒精した。

媒精は、前培養した精子を卵子の入ったドロップ内に注入して行った。精子濃度は、300/ μ lとした。媒精後約18時間目に鏡検し、雄性前核の形成、あるいは第2極体の放出を認めたものを受精卵と判定した。受精卵は、10%FCSを添加したWhitten's mediumに移して培養を続け、経時的に観察した。

【結果】PMSG6回投与群と8回投与群の間で、卵胞発育に顕著な差は認められなかった。発育卵胞数には大きな個体差があったが、供試7頭13個(1個は他の実験に使用)の卵巢のうち4頭8個の卵巢に1mm以上の発育卵胞を、2頭4個の卵巢に1mm以下の小卵胞を多数認めた。残りの1個の卵巢では、卵胞は全く認められなかった。12個(さらに1個は他の実験に使用)の卵巢から卵子の採取を試みた結果、11個の卵巢から合計195個(1-39個/卵巢)の卵子が採取できた。採卵後24時間目、媒精直前の観察で46個に第1極体の放出を認め、21個は卵子のステージは確認できなかったが卵丘細胞が緩慢になっていた。これらの卵子、合計67個を用いて体外受精を試みたところ、29個(43.3%：うち4個は多精子受精)に受精を認め、その後の培養で13個(19.4%)が分割像を示した。

【考察】ニホンザルの体外受精にはじめて成功した。その成功率を向上させるためには、ニホンザルに適した種々の条件を検討する必要がある。ニホンザルは、カニクイザルと同じマカク属であるため、今回の実験はカニクイザルの卵子採取および体外受精の方法に準じて行った。しかし、卵胞発育誘起の過程で大きな個体差を認めた。カニクイザルは周年繁殖動物であるため、ホルモン投与は性周期にあわせて行っている。一方、ニホンザルは季節繁殖動物であるため、ホルモン投与の条件はあらためて詳細に検討する必要がある。また、卵巢を細かく切り刻むという方法で卵子の採取を試み、多数の卵子を回収することができた。今後、回収卵子のうち少しでも多くの卵子が成熟し、体外受精等の実験に使用できるようにニホンザル卵子の培養条件を検討して行きたい。また、本研究は、犬山市からつくば市へ精巣上体と卵子を運搬するという実験過程があった。精巣上体はミネラルオイルに入れて乾燥を防ぐという工夫を、卵子は成熟培養の時間を利用して行うという工夫により、比較的良好な成績が得られたと考えている。

46 マイクロカプセル化した卵胞の凍結保存

Freeze preservation of microencapsulated ovarian follicle in rat

利部 聰・萬場光一・牧田登之

KAGABU Satoshi, MAMBA Kouichi & MAKITA Takashi

山口大学農学部獣医学科家畜解剖学教室

Department of Veterinary Anatomy, Yamaguchi University

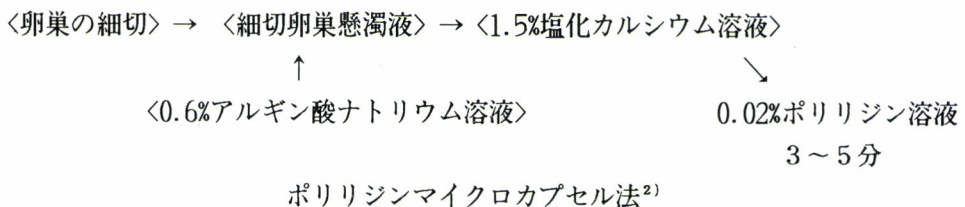
【目的】

ラットの卵巣には膨大な数の卵細胞（3万5000／頭）があるとされているが、演者らは卵細胞の有効利用を目的とした卵巣の凍結保存にある程度の成功を収めている¹⁾。ラット卵巣を概ね1／4に切断して、そのまま凍結保護剤に浸漬したのち、直接液化窒素に投入する方法を取ったが、この方法だと6週齢以上の卵巣に用いることができるが若齢のものには応用が困難である。そこで本実験は、卵巣を細切しても凍結操作が簡単な方法を開発する目的で、細切卵巣をマイクロカプセルに入れたまま凍結・融解・移植操作を行ってみた。

【方法】

I-① ポリリジンマイクロカプセル法²⁾

TCM-199 中で細切したウイスター・今道系3週齢ラット卵巣を0.6%アルギン酸ナトリウムゲル内で固定化し、これをポリカチオンであるポリリジンの0.02%溶液に沈めて、アルギン酸ポリリジン膜を形成する。



II-② コロジオン膜によるカプセル法

同様に細切した卵巣を、コロジオン膜に包み込んでカプセルとした。

III 凍結保存法および融解・凍結保護剤除去法

RallとFahy³⁾の方法によった。0.4%ウシ血清アルブミンを含んだTCM-199 に、凍結保護剤として20.0%DMSO、15.5%アセトアミド、10.0%プロピレングリコール、6.0%ポリエチレン

グリコール（分子量7800~9000）を添加してガラス化液とした（以下VS1と略）。マイクロカプセル化した卵巣をセラムチューブ内に入れ室温下で12.5%VS1、25.0%VS1、さらに氷冷した25.0%VS1、50.0%VS1 75.0%VS1 100.0%VS1にそれぞれ静置して脱水し、ただちに液化窒素に浸漬して凍結した。融解は、37℃温湯中で行い凍結保護剤の除去は75.0%VS1、50.0%VS1、25.0%VS112.5%VS1、12.5%VS1、TCM-199にそれぞれ静置して行った。

Ⅳ 子宮腔内移植法および生着の判定法

レシピエントは偽妊娠5日目のウイスター・今道系成熟ラットを用いた。ペントバルビタール塩で前麻酔、ジエチルエーテルで追麻酔しておいた動物の子宮角を露出して、小孔を開け凍結融解卵巣を挿入して移植を行った。移植7日後に子宮ごと採材し、パラフィン連続切片としてH E染色後検鏡して、非閉鎖卵胞の存在したものを生着とみなした。なお、閉鎖卵胞の判定は、BrawとTsafriri⁴⁾の基準に従った。

【結果と考察】

VS1で脱水・ガラス化後の卵巣カプセルの状態は、ポリリジンカプセルが良く、コロジオンカプセルはもともと完全なカプセルでないこともあって細切卵巣はカプセル外に出てしまった。このような卵巣を凍結融解後子宮腔内へ移植したが、カプセルの種類による生着率には影響を及ぼさなかった。しかし本来の目的から判断して、ポリリジンカプセル法がコロジオンカプセル法よりも優れていると考えられた。

表 マイクロカプセルによる卵巣の凍結保存

	ガラス化後の状態	凍結融解後の状態	移植後の生着
ポリリジン法	○ ~ △	○ ~ △	4 / 10
コロジオン法	×	×	2 / 10

【主要文献】

- 1) 利部 聡・萬場 光一・牧田登之, 哺乳卵学誌, 8, 99, (1991)
- 2) Lim F. & Moss D., J. Pharm. Sci., 70, 351(1981)
- 3) Rall W.F. & Fahy G.M., Nature, 131, 573(1985)
- 4) Braw R.H. & Tsafriri A., J. Reprod. Fert., 56, 267(1980)

膜標識蛍光色素, TMA-DPH, を使った
マウス表層粒分泌動態の新しい評価法

A new method of evaluating exocytosis of mouse cortical granules

○田原正浩・萬本明子・増本伸之・田坂慶一・三宅侃

Masahiro TAHARA, Akiko MAMMOTO, Nobuyuki MASUMOTO,
Keiichi TASAKA, Akira MIYAKE

大阪大学医学部産科婦人科

Department of Obstetrics and Gynecology, Osaka University Medical School

<はじめに>

哺乳動物の受精において、卵子に精子が侵入すると表層粒の開口分泌(exocytosis)が起こり、その内容物が卵黄周囲腔に放出され、透明帯反応や卵黄遮断を引き起こして多受精を防ぐと考えられている。この表層粒の開口分泌の観察法としては、表層粒の複合脂質に結合するレクチンであるLens culinaris agglutinin(LCA)に蛍光色素を標識して、卵子の表層粒の分布と数を調べる方法が報告されている¹⁾。この方法では、透過型電子顕微鏡を用いたものに比べ、細胞質全域にわたって表層粒の分布を観察することが可能であるが、しかし、卵細胞を固定して観察するため、同一卵における受精後の表層粒の開口分泌動態の時間的経過を評価することは困難である。

われわれは、下垂体細胞におけるexocytosisの評価法として、膜標識蛍光プローブTMA-DPH, 1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene、を用い単一生細胞での分泌動態の観察を報告した²⁾。そこで今回、この新しい方法で、マウス卵の表層粒の分泌動態の観察を試みたので報告する。

<方法>

卵は、ICR系8週齢マウスよりPMSG5単位とhCG5単位を48時間間隔で腹腔内に注射して過排卵誘起後、14-16時間後に卵管膨大部より採卵し、ヒアルロニダーゼおよび酸性タイロードにて卵丘細胞と透明帯を除去した。精子は同系マウスの精巣上体より採取した。(実験1)種々の条件下でincubateした精子を、卵に媒精し、30分後に、LCA-FITC蛍光染色法により共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。(実験2)上記の精子を、TMA-DPHを添加した卵に媒精したのち、励起波長350nmに対する430nmの蛍光量の変化を経

時的に測定した。(実験3)上記の精子を、TMA-DPHを添加した卵に媒精したのち、卵細胞の同一断面の蛍光分布の時間的変動を共焦点レーザー顕微鏡にて観察しコンピュータ画像処理することにより評価した。

<結果>

(1) 死滅した精子、及び精巣上体より採取した直後の精子を媒精した場合、卵表面のLCA蛍光は認めなかった。TYH培地で約3時間のincubationをした精子を媒精した卵表面にはLCA蛍光が観察され、表層粒の開口分泌が誘起されていることが確認された。(2) TYH培地で約3時間のincubationをした精子を媒精した卵のTMA-DPH蛍光量は5~10分後より増加し、その増加は約60分後まで続いた。死滅した精子、及び精巣上体より採取した直後の精子を媒精した場合には、蛍光量の増加は認められなかった。

(3) TMA-DPHを添加することにより、卵細胞膜表面が蛍光ラベルされた。TYH培地で約3時間のincubationをした精子を媒精したところ、卵細胞膜表面の蛍光領域が厚くなり蛍光量は増加した。

<考察>

TMA-DPHは、溶液内では蛍光を発せず、intact cellにおいて特異的に膜脂質に取り込まれ蛍光を発する色素で、TMA-DPH蛍光量は細胞の表面積を反映することになるため、細胞内分泌顆粒の細胞膜との融合開口が起これば、その部分に新たにTMA-DPHが取り込まれ蛍光強度が増加することになる。今回の実験結果より、incubation後の精子を媒精することにより卵のTMA-DPH蛍光量が増加することが確認され、同時にLCA染色法においても蛍光を認めたことより、TMA-DPH蛍光量の増加は表層粒の開口分泌によるものと考えられる。さらに、死滅した精子、及び精巣上体より採取した直後の精子による媒精の結果は、このTMA-DPH蛍光量の増加が表層粒の開口分泌によって引き起こされていることを裏付けるものである。また共焦点レーザー顕微鏡での観察結果より、この蛍光量の増加は、新たに蛍光ラベルされた膜領域の増加によるものであることが確認された。

以上より、この膜標識蛍光プローブTMA-DPHにより、表層粒のexocytosisの動態を生きた卵において評価することが可能であった。この方法は、受精後の表層粒分泌にいたる細胞内シグナル伝達機構の解析に有用であると思われる。

<文献>

1) Ducibella, T., Anderson, E., Albertini, D.F., Aalberg, J. and Rangarajan, S. (1988) Dev. Biol., 130, 184-197

2) Masumoto, N., Tasaka, K., Mizuki, J., Tahara, M., Miyake, A., and Tanizawa, O. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun., 197, 207-213

48 ブタの卵丘膨化における卵母細胞と卵丘細胞の役割

Role of oocytes and cumulus cells on the expansion of porcine
oocyte - cumulus complexes in vitro

F. P. ダエン・佐藤英明・内藤邦彦・豊田 裕

Ferdinand P. Daen, Eimei Sato, Kunihiko Naito & Yutaka Toyoda

東京大学医科学研究所 獣医学研究部

Department of Reproductive and Developmental Biology,

The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

【目的】ブタの系では、卵胞液を含む培養液で卵子卵丘複合体を培養すると卵丘膨化が誘起される。私達は、このような卵丘膨化に係わる卵胞液因子の同定を試みてきたが、卵胞液を超速心することにより特定の分画（Top分画）に活性が集中することを明らかにしている。また、高速液体クロマトグラフィーにより精製し、熱に安定な低分子の卵丘膨化因子を分離している。現在、本因子の化学構造決定に係わる予備的な実験を行っているが、あわせて本因子の作用機序についても検討を始めている。今回、卵胞液因子の卵丘膨化に係わる卵母細胞と卵丘細胞の役割を解析したので報告する。

【材料と方法】

卵母細胞の収集：屠殺場で得た卵巣を洗浄した後、直径2-5 mmの卵胞を針で破り、卵丘細胞に囲まれた卵母細胞を集め、4mg/mlのウシ血清アルブミンを含むTYH液で洗浄した。卵胞液の調整：直径2-5 mmの卵胞の内容物を注射器により吸引し、その後遠心(1,000 x g 10分)し、上澄を卵胞液とした。卵胞液を220,000xg(10C)で48時間遠心し、Top、Second、Third、Bottomの4分画を得たが、Topの分画に強い卵丘膨化誘起作用を認めている。卵母細胞の破壊：実体顕微鏡下で注射針を操作し、卵子卵丘複合体を押え、中に位置する卵母細胞を穿刺し破壊した。その後、複合体をTYH液で数回洗浄して培養した。卵丘膨化のアッセイ法：卵母細胞の体外成熟培養はNaitoらの方法(1)を参考にして行った。卵丘細胞に囲まれた卵母細胞を100 μ lのTYH培養液、あるいは卵胞液分画を含むTYH液に入れ、24時間培養し、写真を撮影した。写真上で卵丘と卵母細胞の長径(L)と短径(W)を計測し、 $L \times W \times 0.7854$ の式により、卵子卵丘複合体の占める面積を算出した。

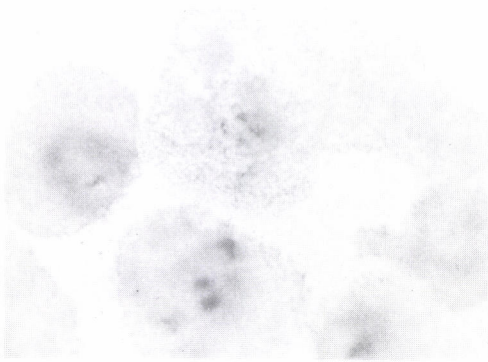


Fig. 1. Photomicrograph of oocyctomized complexes incubated for 24h in Top fraction. All the layers of cumulus oophorus have expanded. Magnification: X100

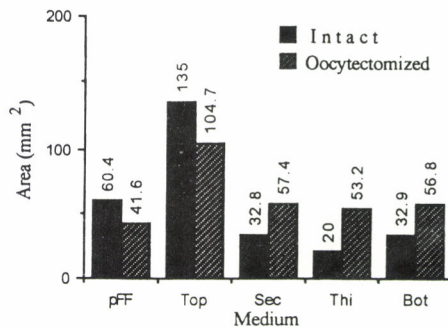


Fig. 2. Cumulus expansion of intact oocytes and oocyctomized complexes. pFF-porcine follicular fluid, Top-Top fraction, Sec-Second fraction, Thi-Third fraction and Bot-Bottom fraction.

【結果と考察】卵母細胞の破壊された卵子卵丘複合体（複合体）をTop分画の添加された培養液で培養したところ、卵母細胞を含む複合体に比べ膨化の程度は劣ったものの、顕著な卵丘膨化を誘起した（Figure 1, 2）。しかしながら、卵胞液そのものを添加した場合にはTop分画を加えたものに比べて卵丘膨化の程度は著しく小さかった。Second, Third, Bottomの分画を添加した培養液では、卵母細胞を含む複合体は有意な卵丘膨化を示さなかったが、卵母細胞を破壊された複合体では、部分的な卵丘膨化を誘起した。Eppigら(2)やVanderhyden(3)は卵母細胞の分泌する卵丘膨化促進因子について報告しているが、今回示した実験結果は、卵胞液にも卵丘膨化に係わるいくつかの因子が存在することを示唆している。また、私達が解析しているTop分画の卵丘膨化作用の発現には卵母細胞のみならず、卵丘細胞も深く関与していることを示唆している。

【引用文献】

- (1)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.
- (2)Eppig, J. J., Peters, A. H. F. M., Telfer, E. E. and Wigglesworth, K. (1993) Production of cumulus expansion enabling factor by mouse oocytes grown in vitro: preliminary characterization of the factor. Mol. Reprod. Dev. 34:450-456.
- (3)Vanderhyden, B. C. (1993) Species differences in the regulation of cumulus expansion by an oocyte-secreted factor(s). J. Reprod. Fert. 98:219-227.

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, 説明は英文とし本文中に挿入する。
 - (4) 外国人の人名, 地名などは原語, 数字は算用数字, 学術用語および単位の略語などは常用されているものを用いる。
 - (5) Key words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, 頁-頁.

 - 1) Bavister, B. and Yanagimachi, R. (1982): The effect of sperm extract and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro. Biol. Reprod., 16, 228-231.
 - 2) 新村末雄・石田一夫(1985): ハムスター顆粒層細胞における 17β -Hydroxysteroid dehydrogenaseの組織化学的研究. 日不妊会誌, 30, 36-46.

単行本の場合: 著者名(年次): 表題. 書名(編集者名), 頁-頁, 発行所, 発行地.
 - 3) Yanagimachi, R. (1981): Mechanisms of fertilization in mammals. In Fertilization and Embryonic Development in Vitro (Mastroianni, L. Jr. and Biggers, J. D., eds.), pp. 81-90, 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(大沢伸昭・江藤一洋・館 鄰・御子柴克彦編), pp. 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部

哺乳動物卵子学会編集委員会

哺乳動物卵子学会会則

第1章 総 則

(名 称)
第1条 本会は、哺乳動物卵子学会と称する。

(事務局)
第2条 本会の事務局は、東京都内または近隣県内に置く。

第2章 目的および事業

(目 的)
第3条 本会は、哺乳動物卵子の研究およびその成果の普及を図ることを目的とする。

(事 業)
第4条 本会は、前条の目的を達成するために、次の事業を行う。
(1) 学術集会の開催
(2) 学会誌の発行
(3) 研究に関する情報の交換
(4) その他本会の目的達成に必要な事業

第3章 会 員

(会 員)
第5条 本会は、次の会員をもって組織する。
(1) 正会員は哺乳動物卵子に関する研究に従事しているか、または関心を有する者。
(2) 賛助会員は本会の主旨に賛同する法人およびこれに準ずる者で理事会が認めたもの。
(3) 本会には名誉会員をおくことができる。
名誉会員は、本会に多大の貢献のあった正会員で理事会で推薦し、総会で承認された者。

(入 会)
第6条 本会に入会しようとする者は、所定の入会申込書に必要事項を記入し、入会金および年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 $\frac{2}{3}$ 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 $\frac{2}{3}$ 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・生物産業）	井上正人（東海大・医）	遠藤 克（日大・農獣医）
小栗紀彦（帯畜大）	金川弘司（北大・獣医）	久保春海（東邦大・医）
香山浩二（兵庫医大）	佐藤和雄（日大・医）	佐藤嘉兵（日大・農獣医）
菅原七郎（東北大・農）	鈴木秋悦（慶応大・医）	武谷雄二（東大・医）
角田幸雄（近畿大・農）	豊田 裕（東大・医科研）	永田行博（鹿児島大・医）
新村末雄（新潟大・農）	丹羽皓二（岡山大・農）	野田洋一（滋賀医大）
花田 章（農水省・畜試）	平尾幸久（和歌山県立医大）	広井正彦（山形大・医）
福田芳詔（北里大・獣医畜産）	星 和彦（福島医大）	安田泰久（岩手大・農）
柳町隆造（ハワイ大・医）		

監事： 入谷 明（近畿大・生物）

堤 義雄（酪農学園大）

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（東農大・生物産業）

副委員長 佐藤英明（東大・医科研）

委員 伊藤雅夫（日大・医） 井上正人（東海大・医） 遠藤 克（日大・農獣医）
北井啓勝（埼玉中央病院） 久保春海（東邦大・医） 香山浩二（兵庫医大）
堤 治（東大・医） 新村末雄（新潟大・農） 星 和彦（福島医大）
横山峯介（三菱化成生命研）

哺乳動物卵子学会評議会議員

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（恵愛病院）
金山喜一（日大・農獣医）	北井啓勝（埼玉中央病院）	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（群馬大・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）	中潟直巳（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・生物資源）
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（三菱生命研）	吉松宜弘（福島県立医大）	吉沢 緑（宇都宮大・農）

アジア学術会議～科学者フォーラム～開催

平成5年12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、10月20日から22日まで開催された第117回総会の概要、同総会で採択された「生物遺伝資源レポジトリ及び細胞・DNAレポジトリの整備について（要望）」等、11月15日から18日まで開催されたアジア学術会議～科学者フォーラム～についてお知らせします。

日本学術会議第117回総会報告

日本学術会議第117回総会（第15期・第6回）が、10月20～22日の3日間にわたって開催されました。

総会の初日（20日）の午前は、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（学術分野における国際貢献、アジア学術会議の開催など214件）が行われました。次いで、今回総会に提案される案件の「生物遺伝資源レポジトリ及び細胞・DNAレポジトリの整備について（要望）」について、提案説明が行われた後、質疑応答が行われました。

午後からは、各部会が開催され、上記提案案件の審議及び各部会個別案件について審議が行われました。

総会2日目（21日）の午前は、同提案案件についての討論・採決が行われ、採択されました。これは、生物遺伝資源レポジトリ整備拡大の必要性の増大に対処するため、現在ある個別系統保存施設の拡充、総合調整機構の設置などを要望するとともに、細胞・DNAレポジトリの整備のため、各省庁傘下の施設のネットワーク体制を構築し全体の活動を総合調整する、チェック機構を付加した細胞・DNAレポジトリセンターの設置など、政府関係機関において取るべき具体的措置を要望するものです。

なお、本件を要望するに当たり会長談話が併せて発表されました。

同案件の採択に引き続き、昼休みを挟んで午後にかけて、現在、常置委員会及び特別委員会で審議されている懸案事項について、自由討議が行われました。この中で、「人の死と医療の在り方」を検討している死と医療特別委員会がまとめた「尊厳死」についての考え方を総会に報告し、それについて活発な議論が展開され、マスコミにも報道されました。

同委員会では、今回の議論を踏まえ、更に検討を深め、来年5月の総会に報告として提案するため準備を進めています。

総会3日目（22日）は、午前は、各常置委員会及び国際対応委員会、午後は各特別委員会がそれぞれ開催されました。

生物遺伝資源レポジトリ及び細胞・DNAレポジトリの整備について（要望）

我が国の生物遺伝資源の保存は、数多くの施設・機関によって個別に行われているが、その充実・強化と、国のレベルでの生物遺伝資源レポジトリの整備が急務となっ

てきている。他方、癌、遺伝病などの疾病の原因究明、ひいては人類の健康・福祉への貢献を目的とする細胞・DNAレポジトリの充実・整備もまた、今日の我が国にとって急務である。

このため、互いに関連はするが、異なる性格、目的をもつこれら二つのレポジトリの整備等について要望する。

1 生物遺伝資源レポジトリの整備について

生物遺伝資源レポジトリの整備拡大の必要性の増大に対処するため、政府関係機関において次の措置をとるよう要望する。

- (1) 生物遺伝資源の保存は、基本的には、従来どおり、その分野の担当研究者の能力、地域性などをいかして、個別の系統保存施設で行うことが望ましいので、そのより一層の拡充を図り、そこに専任の研究者、専門技術をもつ職員を置き、予算を充実し施設の近代化を図る。
- (2) 個別の系統保存施設では、遺伝子工学に基づくトランスジェニック生物、細胞融合によって作出される新種、DNAクローンや細胞及び凍結組織などを加えた新材料の保存を、社会的、法律的及び倫理的側面に配慮しつつ、積極的に推進する。
- (3) 系統保存事業の永続性を保障するため、国のレベルにおいて、研究施設を附置する生物遺伝資源保存センターを設立し、DNAクローンや細胞及び凍結組織のレポジトリもこのセンターに集中する。
- (4) 生物遺伝資源保存センターは、関係機関との対応、保存系統に関する情報の収集・提供、系統の導入・配布・品質管理、海外との情報交換などについて、個別の系統保存施設の活動を総合調整する。
- (5) 国際的視野に立って、海外諸国との連携を深めるため、保存系統に関するデータベースを整備する。

2 細胞・DNAレポジトリの整備について

細胞・DNAレポジトリの重要性と必要性についての認識を新たにし、早急に次の対策を講ずることを、政府関係機関に要望する。

- (1) 現在、各省庁傘下の各研究機関及び大学・研究所の研究室に個別に置かれているレポジトリ又はそれに類する施設に対して予算、人員、スペース等について格段の措置を講ずるべきである。
- (2) それとともに、研究施設を附置した細胞・DNAレポジトリ・センターを新たに設置する。このセンターは、上記の諸施設の活動を総合調整する。

このセンターは、すべての施設と有機的に結合するネ

ットワーク体制を構築し、必要に応じて各研究室に分散保存されている細胞・DNAを受け入れる。また、現在設置されている施設のうち運営困難なものを解消し、このセンターに移管する。

- (3) 新しく設置されるセンターには十分な予算を措置し、自主的な運営ができるようにするとともに、このセンターの運営を支えるための専門職を育成・確保する十分な方策を講ずる。また、海外との協力関係のより一層の促進を図る。

さらに、センターの運営の適正を期するため、ヒトゲノムプロジェクトの推進についての勧告に言及されているようなチェック機構を付加する。

(詳細は、日本学術会議月報11月号を参照して下さい。)

生物遺伝資源レポジトリ及び細胞・DNAレポジトリの整備について(会長談話)

(平成5年10月21日)
日本学術会議
会長 近藤次郎

昨年6月、リオデジャネイロで開催された国連環境開発会議(UNCED)で合意された生物多様性保護条約を受けて、現在、世界中で生態系、生物種や遺伝子などの保存について関心が高まっている。これは本来、人間も含めて生命界全体の命運にかかわる重要な問題である。日本学術会議としても、今後さらに引き続き審議を深めるべきであると考えます。

しかしながら、先進国を中心にしてこの種のプロジェクトは、国家の強力な援助の下に推進されている。将来におけるこの分野の科学の発展を考慮するとき、我が国の状況をこのままに放置すれば学問の進歩に遅れるなど由々しき事態になると憂慮するものである。

今回は「生命科学と社会的諸問題」特別委員会のまとめた提案について、総会で人文社会科学部門も含めて真剣な討議を行った上、とりあえずここに要望するものである。

アジア学術会議～科学者フォーラム～の開催について

- 1 日本学術会議は、アジア地域の各国科学者の代表を東京に招き、本年11月15日(月)から18日(木)までの4日間、三田共用会議所(東京都港区)においてアジア学術会議～科学者フォーラム～を開催しました。
- 2 このアジア学術会議～科学者フォーラム～は、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が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であるとの認識から、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、本年度初めて開催したものです。
- 3 今回の会議には、中国、インド、インドネシア、日本、マレーシア、フィリピン、大韓民国、シンガポール、タイの9か国の学術推進機関(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19名が出席し(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)、「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」をメイン・テーマとして活発な討議を行いました。
- 4 初日の15日には、鳩山内閣官房副長官(内閣総理大臣あいさつ代読)を始め、国会議員、各国大使館、関係学術協会、関係省庁、関係団体などから200名を超える方々をお迎えし、開会式及び歓迎レセプションを開催しまし

た。

翌16日からの自由討議においては(17日は筑波研究学園都市視察(研究交流センター、電子技術総合研究所、農業生物資源研究所を訪問))、それぞれの国籍や専門分野を超えて、アジア地域における学術の振興という共通の目的の下、熱心な討議を行い、議長サマリーをまとめ、18日に無事閉会しました。

開催に当たり御支援・御協力いただきました方々に厚くお礼申し上げます。

(参考)アジア学術会議～科学者フォーラム～議長サマリー(仮訳)

- 1 アジア学術会議～科学者フォーラム～は、日本学術会議の主催により、アジア地域の9か国から、19人の各国の科学界を代表する科学者の参加を得て開催され、それぞれの国籍や専門分野を超えて、アジア地域における学術の振興という共通の目的の下、熱心な議論がなされた。本会合に参加した科学者は、学術の振興を通じた社会への貢献が重要であり、科学者の責務であるということを確認し、学術研究の成果は、人類の共通資産として、文化的、社会的、経済的発展を通じて、世界の平和と人類の福祉に貢献するものであると信じる。また、そのためには、自然科学者と人文・社会科学者の密接な協力も不可欠である。
- 2 本会合に出席した科学者は、アジアの科学者による学術協力についての初の会合を提案し、開催した日本学術会議に感謝し、今後も、このような日本学術会議の努力が続けられることを期待する。
- 3 今日、世界は、環境悪化、人口爆発、資源の枯渇など人類の英知を結集して取り組まねばならない深刻な問題に直面しており、本会合での討議は、そのような問題の解決に向けての将来の国際協力に発展していくものである。
- 4 持続的開発は、アジア地域の各国にとって、21世紀に向けての共通の重要課題である。地理的、歴史的、文化的に密接な関係を持つアジア地域の科学者は、この問題に協力して取り組むことが重要である。
- 5 国際的な研究、技術・資源の共有等に当たっては、地域的な協力が効果的である。今後、そのような領域において、地域の発展のために協力を推進することが必要である。
- 6 学術の発展、社会の発展の基盤となる人材の育成は、科学者が地域的に協力して取り組むべき課題である。次世紀に向けて、人材の育成のため、アジアの科学者も協力することが必要である。
- 7 各科学者及び各国は、研究者の交流、共同研究、シンポジウム、ワークショップ等による情報の交換を促進するよう努力することが必要である。
- 8 学術協力は、対等互恵の原則に基づいて行われねばならない。
- 9 本会合の趣旨、提案を受け継ぎ、より密接な学術交流・協力の基盤となる将来の会合が開かれることを期待する。
- 10 アジア地域の科学者によるこのような会合を毎年開催すること、当面、日本学術会議がその事務局となること、アジア地域の学術動向についてのニュースレターを定期的に発行することを提案する。

「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

平成6年度予算(案)決定

平成6年3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、第16期の会員推薦関係費、アジア学術会議開催経費などを計上した平成6年度予算及び最近公表された「調査報告 我が国における学術団体の現状」等についてお知らせします。

平成6年度日本学術会議予算

平成6年度日本学術会議の予算額は、総額で12億128万7千円で閣議決定されました。前年度と比較して1億546万円の増。率にして9.6%の伸びです。これは、平成6年度が第16期の会員推薦期に当たり、会員の推薦に必要な経費、臨時総会及び臨時部会等の会員推薦関係費が8,048万1千円増額し1億5万5千円になったことが主な事由です。

また、アジア学術会議の開催に必要な経費が、前年度に引き続き2,219万5千円が認められました。

その他、平成6年度予算では、国際分担金の16団体に対する単位額の変更が認められ、国際会議の国内開催については、神経・筋、園芸学、錯体化学、心電学、情報ドキュメンテーション、病態生理学の6国際会議の開催を予定しています。

また、世界各地で開催される学術関係国際会議への代表派遣や二国間交流に必要な経費が計上されています。

平成6年度予算概算決定額表は、下表のとおりです。

(単位：千円)

事 項	前 年 度 予 算 額 A	平成6年度 予 算 額 B	比 較 増 △ 減 額 C = B - A	備 考
日本学術会議の運営に必要な経費	1,095,827	1,201,287	105,460	対前年度比較 109.6%
審 議 関 係 費	265,525	272,534	7,009	○地球圏－生物圏国際協同研究計画 (IGBP)シンポジウム、公開講演会等
国際学術交流関係費	221,254	226,646	5,392	
国際分担金	74,722	67,450	△ 7,272	
国内開催	73,543	86,172	12,629	
代表派遣	44,006	44,006	0	
二国間交流	6,823	6,823	0	○第16期推薦経費 ○臨時総会、臨時部会
アジア学術会議	22,160	22,195	35	
会員推薦関係費	19,574	100,055	80,481	
会員推薦管理会	19,102	21,632	2,643	
推薦経費	472	57,629	57,393	
臨時審議経費	0	21,007	21,007	
一般事務処理費	589,474	602,052	12,578	

第4 常置委員会報告—調査報告

我が国における学術団体の現状(要旨)

平成6年1月26日

学会協会等の学術団体は各専門分野の学術の進展において重要な役割を果たしており、加えて、日本学術会議の会員候補者を推薦し、また、研究連絡委員会に委員を送るなど、日本学術会議の基盤となっています。第4常置委員会は、学術団体の活性化・活動強化等のための支援方策を検討するに当たって、学術全分野における学術団体の現状を知る必要を認め、調査を行いました。調査票は選択肢方式の9項目44設問にわたる詳細なものでありましたが、調査対象とした日本学術会議広報協力学術団体1069団体の70%にあたる750団体から回答を得ました。分析結果を対外報告「調査報告 我が国における学術団体の現状」として今回公表しました。

報告書は、(1)専門分野、(2)会員、(3)設置形態と組織形態、(4)活動状況、(5)国際性、(6)財政状態、(7)学術団体の属性にみる専門分野の類似性、(8)学術団体への支援について、及び「附属資料」よりなっています。報告では、学術団体の諸属性を、全団体平均に加えて、専門分野別と団体規模別に比較しています。63頁にわたる報告書の内容を簡潔に要約することは困難ですが、以下にその一端を紹介します。

学術団体の数は文学系及び医学系の分野で多く、法学系及び経済学系で少ない。2つ以上の専門分野にまたがる団体の割合は文学系及び医学系で少なく、理学及び工学で多い。平均正会員数は全団体平均で約2.5千人、人文科学部門で0.7~1千人、理学及び農学で1.7~2.5千人、工学及び医学系では約4千人である。

全団体の約20%が法人である。法人の割合は団体の規模の増大とともに急速に増加する。工学において特に高く、人文科学部門で低い。フルタイムに換算した事務職員数は正会員数に比例し、全団体平均でみれば正会員千人あたり0.71人である。事務所面積は正会員数に比例し、全団体についてみれば、基本面積が27㎡で、正会員千人あたり1.7㎡である。

会誌の発行は最も普遍的な活動で95%の団体に見られる。人文科学部門ではやや低く、理学及び工学においてやや高い。論文誌の発行は約27%の団体で行われており、経済学系、理学及び工学において割合が高い。書籍の出版は15%の団体で行われており、理学、工学及び農学で高い。その他の活動のうち、社会人教育は19%の団体で行われており、理学及び工学に多く、経済学系及び医学系で少ない。

国際集会を主催した経験をもつ団体は51%である。団体の規模が大きいほどその割合は高い。専門分野別で見れば、文学系及び法学系において低く、理学、工学及び農学で高い。国際集会を開催する上での困難の第1位は「経費の調達」で84%に達している。会誌あるいは論文誌を何らかの意味で国際的に開放しているのは85%の団体にみられる。

団体の財政規模を正会員数で割った額は全団体平均で29千円で、文学系及び経済学系において10~15千円、理学及び工学で高く48~57千円に達する。平成3年度における実質収支(繰り越しを除く)での赤字団体は全体の約3分の1であり、予算規模の10%以上の赤字をもつ団体が7%ある。外部からの支援を必要とする事業は、成果刊行が最大で60%、次が国際活動で30%である。団体の規模が大きくなると、国際活動への支援要求の割合が高まる。具体的な支援方策としては、学術団体の活動が円滑に進むよう制度等を整備する方法、特に、学術団体に対する課税及び学術団体への寄付者への課税を緩和する方策が効果的と考えられる。

終わりに、この調査に御協力を頂いた学術団体の担当者の方々に深く感謝申し上げる次第です。

第16期日本学術会議会員のための 登録学術研究団体の概況

日本学術会議では、現在、第16期(平成6年7月22日~平成9年7月21日)会員(定員210人)選出のための手続が進められていますが、その第1段階として、昨年(平成5年)5月末日を締切期限として、学術研究団体からの登録申請の受付が行われました。これらの登録申請については、日本学術会議会員推薦管理会において審査が行われましたが、その結果は次のとおりでした。

- ・申請団体数……………1110団体
- ・登録団体数……………1069団体

「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

今年の冬は久しぶりに寒さがきびしくなりました。暖冬続きのこのごろでは少し安心感があるので不思議です。気候の変化に象徴されるように、何か落ち着かない不安定な時節に暮らしているようです。卵子研究では、医学への体外受精法の応用、微量代謝物質の定量、遺伝子のレベルでの解析が可能になり、サイトカインや細胞増殖因子が容易に利用できて、基礎から臨床医学まで研究分野が拡大してきました。数が少なく扱いにくいとされてきた哺乳動物の卵にとって、良い時代になったといえます。しかし、多くの技術が利用できるようになった反面、一人の研究者が形態、生化学、生物学のレベルで一貫した実験をすることは難しくなってきました。卵子は独立した細胞として、個体への発生の能力を保ちながら存在しています。この卵子を中心にして研究を総合していくことに価値があると思います。はなはだ微力ではありますが編集のお手伝いをさせていただきますのでよろしくお願い申し上げます。

(北井啓勝)

1978年エドワードとステブトーがヒト体外受精に成功し、ルイズちゃんが帝王切開により出産した。この報道は世界に大きなインパクトを与えた。当時産婦人科の研修を始めたばかりで帝王切開や婦人科手術に明け暮れていた私は遠い世界のこのような気持ちと臨床医として今まで不可能であった患者さんの治療法として憧れる気持ちが混在し、とにかく素晴らしいことだと感じていた。その翌年当時の教室主任坂元教授より卵をテーマに研究を進めるよう指示され、佐藤和雄講師の下で実験を開始した。まったくの素人で減数分裂って何でしたっけ？等研究室に御迷惑をおかけしたが、加藤先生（現横浜市大生化学）よりサイクリング法を伝授頂く機会を得て生化学に目を向けた。それから早いもので15年になろうとしている。この間体外受精を核とした不妊治療の進歩普及は目覚ましく、凍結卵、顕微授精等の技術も夢から現実、そしていつかルーチンの仕事へと取り入れられつつある。それでは15年後はどこまでいくのかと想うとそら恐ろしくさえある。体外受精卵の生存能あるいは代謝異常を含めた着床前診断等に現在の研究が生かされ夢が現実となっていくことを祈るものです。

(堤 治)

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 Journal of Mammalian Ova Research

第 11 卷 第 1 号 Vol. 11 NO. 1
平成 6 年 3 月 25 日 印刷
平成 6 年 4 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 印刷所 誠和印刷株式会社
〒252 藤沢市亀井野1866 住 所 藤沢市城南5丁目2番8号
日本大学農獣医学部獣医生理学教室内 電 話 0466-34-9110(代表)
TEL. 0466-81-6241 (内2125)
郵便振替 横浜 8-20350

メ

モ

日本薬局方 注射用胎盤性性腺刺激ホルモン

動物
専用

プベローゲン[®]

1,500単位
3,000単位
5,000単位
10,000単位

日本薬局方 注射用血清性性腺刺激ホルモン

動物
専用

ピーメックス[®]

1,000単位

販売元



三共株式会社

東京都中央区銀座2-7-12

製造元



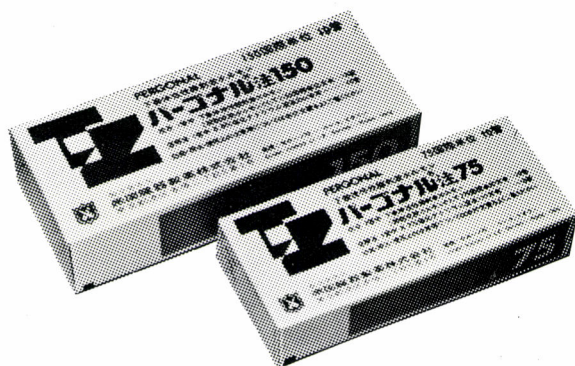
三共ゾキ株式会社

東京都品川区広町1-4-4

健保適用

下垂体性性腺刺激ホルモン パーゴナル[®]注 75・150

- 強力な卵胞成熟ホルモン（FSH）作用により、卵胞の発育と成熟を促し、胎盤性性腺刺激ホルモン（HCG）との組合わせ投与により排卵を誘発します。
- 更年期婦人尿由来の下垂体性性腺刺激ホルモン（HMG）製剤であり、反復投与が可能です。
- FSH活性のほかにLH活性を有し、その活性化（FSH/LH）はほぼ一定です。



【効能・効果】

間脳性（視床下部性）無月経，下垂体性無月経の排卵誘発

【用法・用量】

1日卵胞成熟ホルモンとして75～150国際単位を連続筋肉内投与し、頸管粘液量が約300mm³以上、羊歯状形成（結晶化）が第3度の所見を指標として（4日～20日，通常5日～10日間），胎盤性性腺刺激ホルモンに切り変える。

【包装】

パーゴナル注 75：10管

パーゴナル注 150：10管



帝國臓器製薬株式会社
東京都港区赤坂二丁目5番1号

【使用上の注意】

1. 一般的注意

- 1) 本療法の対象は不妊症患者のうちの、間脳又は下垂体前葉の機能・器質的障害に由来する性腺刺激ホルモン低分泌無月経患者であるので次の点に注意すること。
ア. エストロゲン・プロゲステロンテストで初めて反応する第2度無月経又は抗エストロゲン療法（クエン酸クロミフェン、シクロフェニール等）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ため、その旨をあらかじめ患者に説明すること。
- 4) 妊娠初期の不注意な投与を避けるため、投与前少なくとも1ヵ月間は基礎体温を記録させること。
- 5) 産婦人科・内分泌専門医師の管理のもとに投与すること。

2. 次の場合には投与しないこと

- 1) 卵巣腫瘍及び多くの胎性卵巣症候群を原因としないう卵巣の腫大を有する患者

2) 妊婦

3. 次の患者には投与しないことを原則とするが、やむを得ず投与する場合には、慎重に投与すること。

- 1) 児を望まない第2度無月経患者
- 2) 多くの胎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。

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。

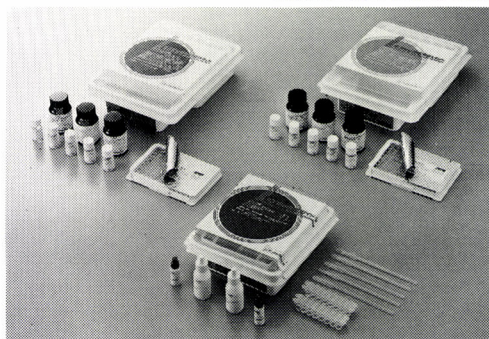
包装96ウェル/キット

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

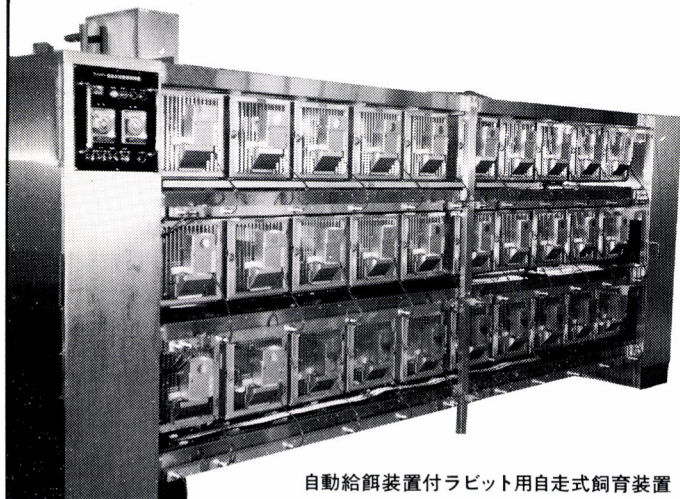


デンカ製薬株式会社

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。

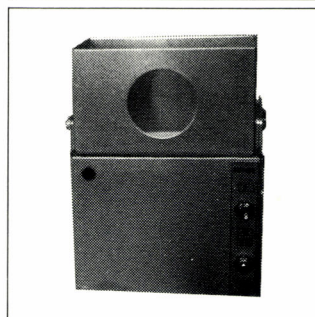


岡崎産業株式会社

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。

