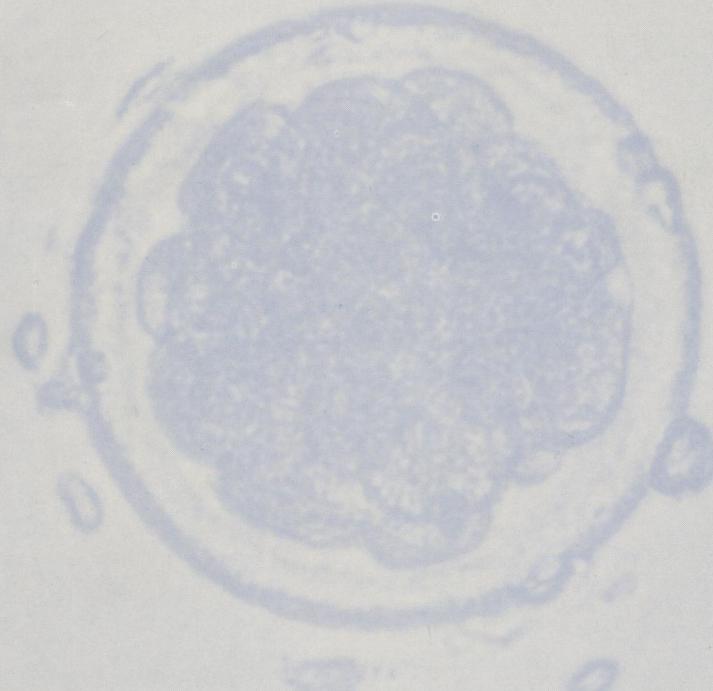


哺乳卵研誌  
J. Mamm. Ova Res.

# 哺乳動物卵子研究会誌

Journal of Mammalian Ova Research



哺乳動物卵子研究会

Japanese Society of  
Mammalian Ova Research

Vol. 1 No. 1

April 1984

健保適用

# 下垂体性性腺刺激ホルモン パーゴナル注<sup>®</sup> 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)との組合せ投与により排卵を誘発します。
- 更年期婦人尿由来の下垂体性性腺刺激ホルモン (HMG) 製剤であり、反復投与が可能です。
- FSH活性のほかに LH活性を有し、その活性化 (FSH/LH) はほぼ一定です。



## 【効能・効果】

間脳性（視床下部性）無月経、下垂体性無月経の排卵誘発

## 【用法・用量】

1日卵胞成熟ホルモンとして75～150国際単位を連続筋肉内投与し、頸管粘液量が約300mm<sup>3</sup>以上、羊歯状形成（結晶化）が第3度の所見を指標として（4日～20日、通常5日～10日間）、胎盤性性腺刺激ホルモンに切りえる。

## 【包装】

パーゴナル注 75：10管  
パーゴナル注150：10管



帝国臓器製薬株式会社  
東京都港区赤坂二丁目5番1号

## 【使用上の注意】

- 一般的注意
  - 本療法の対象は不妊症患者のうち、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。
    - エストロゲン・プロゲステロンテストで初めて反応する第2度無月経又は抗エストロゲン療法（クエン酸クロミフェン、シクロフェニル等）が奏効しない第1度無月経の患者に投与すること。
    - 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。
    - 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。
  - 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。
    - 患者の自覚症状（特に下腹部痛）の有無
    - 卵巣腫大の有無
    - 基礎体温の異常上昇の有無（毎日測定させること）
    - 頸管粘液量とその性状
  - 卵巣過剰刺激の結果としての多胎妊娠の可能性があるので、その旨をあらかじめ患者に説明すること。
  - 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。
  - 産婦人科・内分泌専門医師の管理のもとに投与すること。
  - 次の場合には投与しないこと
    - 卵巣腫瘍及び多くのう胞性卵巣症候群を原因とする卵巣の腫大を有する患者
    - 妊娠
    - 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。
      - 児を望まない第2度無月経患者
      - 多くのう胞性卵巣を有する患者
    - 副作用
      - 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。
      - その他 ときに悪心、頻尿、しづれ感、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。
    - 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。

## 研究会の発足と会誌の刊行を祝して

佐久間 勇 次

本研究会は、昭和35年に発足した哺乳動物卵子談話会が、25年に亘る歳月を経て、こゝに名称を哺乳動物卵子研究会と改称して再発足した会であり、この機会に機関誌として研究会誌を刊行することになりました。

哺乳動物卵子談話会は、その設立の経緯から研究会に移行するまでの24年間に亘る会の歩みを、代表世話をの大槻清彦先生に寄稿いたゞき、また、年一回、開催されてきた24回分の演題、演者を本誌に再録したのでお分り頂けるものと思います。談話会が研究会として発足するまでの歩みは、実験動物、家畜、人における卵子研究者の集いであり、生命科学を共通の目的にした、農学、医学、生物学の広汎な学際領域に亘る卵子研究者によって支えられ発展してきた会であります。談話会では、それぞれの専攻分野で、それぞれの所属学会、研究会で、すでに発表した研究成果をまとめて、あるいは未発表のものも追加し、成功例、失敗経験を含めて本会に話題として提供し、充分な時間をかけた自由討論によって知識、技術の交流をはかり、新知見、技法を紹介しあう勉強会として発展してきました。しかし、最近、10余年の歩みは、卵子研究が急速に進展するのに伴って話題提供者が急増し、止むなく、演題、講演時間を制限しながら、学会、研究会の発表形式をとつて開催して参りました。また、本会の発表を研究業績にという要望が強くなつたこともあり、準備委員会として慎重に検討を重ねた結果、愈々、本会も機が熟して、研究会に改称しても、将来、充分に存続、発展できるものと判断して、25周年を契機に、研究会として、さらに、研究会誌を刊行することになった次第であります。この度、開催される総会ならびに研究発表会は、研究会として第一回の催しではありますが、談話会から継続した会として第25回研究会とし、また、会誌は第1巻として刊行することにしました。なお、研究発表会における講演内容を学術論文としてタイプ原稿にして投稿いたゞくようにお願いしたのは初めての試みでもあり、演題が少いのではないかと危惧しておりますが、25編の御投稿を頂き、事務局は印刷経費の捻出に頭を悩ましておりますが、立派な会誌を刊行して研究会を開催できますことを会員の皆様と共にお慶び申し上げる次第であります。

卵子の研究は、精子の研究と同様に、その基礎と応用に亘るものであり、卵子の生物学的研究、排卵、受精、着床の生殖生理学的研究、さらに家畜の改良増殖を目的とした「腹は借りもの」としての受精卵子、胚移植の研究であり、人における体外受精、胚移植の研究であつて、卵子に関する広汎な生物学的基礎研究から、臨床、応用の領域に及ぶ各種の研究が行われております。特に、最近では、動物発生学研究者による下等脊椎動物卵子における多くの手法が、哺乳動物卵子研究にも応用されて、全く予想もしなかった手法による研究が進展し、あるものは、胚分断、胚融合、キメラ、クローンであり、あるいは異種動物遺伝子の胚注入などが試みられております。やがて、これらの新しい手法は、人類の重要な栄養源である乳、肉供給家畜の経済的生産性を飛躍的に増大させることになり、また、人においても、厳しい社会的、人道的制約のなかで、最終的治療手段としての卵管性不妊を含む不妊症解決の臨床医学として、人類社会に大きな貢献をもたらす学問研究として発展していくものと確信しております。

従来、卵子に関する研究発表は、多くの関連学会がありますが、この度、卵子研究の急速な進展に伴い会員の強い要望によって、卵子に限られた研究会として発足することになったのであります。発足した以上、今後は学術誌としての内容を高め、談話会の趣旨を生かし会員相互の知識、技術の交流を計る会として、会員各位の御指導、御協力により、本会が益々充実した会として発展できますよう皆様と共に願うものであります。

最後に、談話会の設立以来、会の発展に多大の御尽力を頂いた多くの先生方の中で、特に、農学関係では、故 山根甚信先生、現在、御高齢ながらお元気の加藤 浩先生、学長として元気に活躍されている西川義正先生、医学関係では、故 林 基之先生を始め、農学、医学、生物学に亘る多くの先生方に心から感謝申し上げると共に、今後も本会の発展を暖かく見守って頂きたいと願うものであります。

# 哺乳動物卵子研究会誌

第1巻 第1号

昭和59年4月

## 目 次

### 哺乳動物卵子談話会の歩み

大槻清彦 ..... 1

哺乳動物卵子談話会演題集記録集(第1回～第24回) ..... 7

### 第25回哺乳動物卵子研究会講演要旨集

#### マウスの反復過排卵誘起に関する研究

##### — 排卵反応低下の改善に関する検討 —

金山喜一・速藤 克・佐久間勇次 ..... 29

#### 成熟ラットにおける過排卵処理後の排卵数におよぼすペントバルビタール・ソディウムの影響

##### — GTH量と排卵数について —

利部 聰 ..... 33

#### 雄ラットの下垂体抽出液によるラットの過排卵誘起

伊藤 敦・高橋寿太郎・安田泰久 ..... 35

#### FSHによる牛の過排卵処理時の卵巣反応と胚の品質の関係

塩谷康生・W.C.D.HARE ..... 37

#### 灌流卵巣による排卵機序の研究

北井啓勝・鈴木秋悦・Edward E. Wallach・飯塚理八 ..... 41

#### ラットの子宮内卵の非外科的採取

石島芳郎・富樫 守・前田 晋・大庭康貴 ..... 43

#### サイクリング法による哺乳動物卵子の代謝動態解析

堤 治・矢野 哲・石原 理・石川真木・木下勝之・佐藤和雄・水野正彦・坂元正一 ..... 45

#### 哺乳動物卵子によるステロイド代謝

佐藤和雄・堤 治・綾部琢哉・北川浩明・高木耕一郎・木下勝之・水野正彦・坂元正一 ..... 51

#### マウスおよびラット卵巣卵の成熟過程における顆粒膜細胞と卵の連関についての電顕的検討

加賀山哲夫・五味淵秀人・香山文美・森田良子・佐藤孝道・水野正彦・坂元正一 ..... 53

#### SEM observation on bovine ova, I. Egg-sperm interaction on

bovine oocytes matured in vitro. SUGAWARA, S., K. HAMANO,

K, KAMEYAMA, A. MIYAMOTO & J. MASAKI. ..... 55

#### ヒト体外受精卵の電子顕微鏡による観察

小林善宗・井上正人・金子みつ恵・藤井明和 ..... 61

マウス卵母細胞の体外受精におよぼす培養時間の影響	藤井好孝・吉岡 保	65
マウスおよびラット初期胚の体外発育におよぼす浸透圧の影響	橋詰良一・伊藤雅夫	69
ハムスター培養成熟卵の受精能に関する検討	三浦麗子・窪川優子・倉沢滋明・遠藤芳広・鈴木秋悦・飯塚理八	71
Evaluation for acrosome reaction of goat spermatozoa HAMANO, K., H-SASADA, S. SUGAWARA & J.MASAKI		73
精子の透明帯結合と先体反応について	井上正人・小林善宗・金子みつ恵・藤井明和	77
カルモデュリン阻害剤W-7処理ヒト精子先体反応の微細構造	永江 肇・岩城 章・木下 佐・村上邦夫・黒田 優	81
ラット前核期卵の核移植：とくに紫外線照射による非外科的核除去について	昇 公一・舟橋弘晃・内海恭三・湯原正高	85
Mouse Preimplantation Embryoの性質	上原茂樹・千田 智・八日市谷隆・星 和彦・星合 翔	91
凍結・融解マウス胚の生存性におよぼす胚の発生段階の影響	宮本 元・石橋武彦	95
超低温冷凍庫を用いた牛胚の凍結とその成績	後藤太一・清水 明・三角久雄・安田 出・萱野裕是	99
牛凍結受精卵による受胎例	早川俊司・遠藤敏明・石田和昭・山口 亮・西村 実	103
モノクロナール抗体作製の試み	角田幸生・中井 裕・田中義夫・杉江 信	105
H-Yモノクローナル抗体によるラット胚の性判別（予報）	佐藤英介・内海恭三・山田雅保・湯原正高	107
ヒト血中抗卵透明帯抗体様因子の分析	武田守弘・繁田 実・香山浩二・磯島晋三	111

Journal of Mammalian Ova Research

Vol. 1 No. 1

April 1984

Contents

History of the Association of Mammalian Ova.	OTSUKI, K.	-----	1
Annals of the Association of Mammalian Ova.		-----	7
Studies on repeated superovulation in mice, Improvement on the lowered ovulation response.	KANAYAMA, K., T. ENDO & Y. SAKUMA.	-----	29
Effect of sodium pentobarbital on the number of ova shed in superovulation treated adult rat, Relationship between dose of GTHs and number of ova shed.	KAGABU, S.	-----	33
Induction of superovulation in female rats by pituitary extract of male rats.	ITOH, A., J. TAKAHASHI & Y. YASUDA	-----	35
Superovulation following FSH stimulation in cattle.	SHIOYA, Y. & W. C. D. HARE	-----	37
Studies on the ovulatory process using the perfused rabbit ovary.	KITAI, H., S. SUZUKI, EDWAD E. WALLACH & R. IIZUKA	-----	41
Non-surgical collection of uterine eggs in the rat.	ISHIJIMA, Y., M. TOGASHI, S. MAEDA & Y. OKUBO	-----	43
Analysis of metabolism in the mammalian oocyte and preimplantation embryos by enzymatic cycling.	TSUTSUMI, O., T. YANO, O. ISHIHARA, K. KINOSHITA, K. SATOH, M. ISHIKAWA, M. MIZUNO & S. SAKAMOTO	-----	45
Steroidogenesis in the mammalian oocyte.	SATOH, K., O. TSUTSUMI, T. AYABE, H. KITAGAWA, K. TAKAGI, K. KINOSHITA, M. MIZUNO & S. SAKAMOTO	-----	51
Electron microscopic studies on ovarian oocytes during antral follicle development in the mouse and rat.	KAGAYAMA, T., H. GOMIBUCHI, F. KAYAMA, Y. MORITA, K. SATO, M. MIZUNO & S. SAKAMOTO	-----	53
SEM observation on bovine ova, I. Sperm-egg interaction in bovine oocytes matured in vitro.	SUGAWARA, S., K. HAMANO, K. KAMEYAMA, A. MIYAMOTO & J. MASAKI	-----	55
Ultrastructure of human ova fertilized in vitro; The diagnostic value.	KOBAYASHI, Y., M. INOUYE, M. KANEKO & A. FUJII	-----	61

Effect of culture time of mouse follicular oocytes on fertilization in vitro.	FUJII, Y. & T. YOSHIOKA	----- 65
Effect of osmotic pressure on development of rat, hamster and mouse ova in the in vitro cultivation.	HASHIZUME, R. & M. ITOU	----- 69
Fertilizability in vitro matured oocytes from golden hamsters.	MIURA, R., Y. KUBOKAWA, S. KURASAWA, Y. ENDO, S. SUZUKI & R. IIZUKA	----- 71
Evaluation for acrosome reaction of goat spermatozoa.	HAMANO, K., H. SASADA, S. SUGAWARA & J. MASAKI	----- 73
Sperm-zona interaction in the mouse, --- Special reference to the time of acrosome reaction.	INOUE, M., Y. KOBAYASHI, M. KANEKO & A. FUJII	----- 77
Ultrastural observations of the acrosome reaction in human spermatozoa treated with calmodulin antagonist, W-&.	NAGAE, T., A. IWAKI, T. KINOSHITA, K. MURAKAMI &	
M. KURODA	----- 81	
Nuclear transplantation into pronuclear-stage rat eggs: Enucleation of eggs by UV-irradiation.	NOBORI, K., H. FUNABASHI, K. UTSUMI & M. YUHARA	----- 85
The charactor of mouse preimplantation embryo.	UEHARA, S., S. CHIDA, T. YOHKAICHIYA, K. HOSHI &	
H. HOSHIAI	----- 91	
Effects of embryonic stages on survival of frozen-thawed mouse embryos.	MIYAMOTO, H. & T. ISHIBASHI	----- 95
Freezing of bovine embryos in the ultra low temperature refrigerator.	GOTO, T., A. SHIMIZU, H. MISUMI, I. YASUDA & H. KAYANO	----- 99
Pregnancies by frozen embryos in cattle.	HAYAKAWA, S., T. ENDO, K. ISHIDA, A. YAMAGUCHI &	
M. NISHIMURA	----- 103	
A trial to produce monoclonal antibodies against H-Y antigen.	TSUNODA, Y., H. NAKAI, Y. TANAKA & T. SUGIE	----- 105
Sex identification of rat embryos by H-Y monoclonal anti-body [Preliminary].	SATO, E., K. UTSUMI, M. YAMADA & M. YUHARA	----- 107
Analysis of an antibody like factor to porcine zona pellucida found in human sera.	TAKEDA, M., M. SHIGETA, K. KOYAMA & S. ISOJIMA	----- 111

## 哺乳動物卵子談話会の歩み

大 槻 清 彦

このたび、哺乳動物卵子談話会が発展的に解消して研究会として再発足するに当たり、新しい会員も増えたので、24年も続いてきた談話会の歩み、流れを記録に留めて紹介しておきたい。5年前に「20年を顧みて」という一文をすでに書いたので、屋上屋を重ねるようになるが、談話会の成立以来、会の運営の裏方、代表幹事として関与してきた関係で、四分の一世紀、一くぎりということになるので前文を母体に記憶をたどりながら、できるだけ詳細に筆をとることとした。

### 1. 昭和30年代初期の談話会発足当時の背景

わが国の獣医、畜産分野における哺乳動物卵子の研究は、故・山根基信先生（台北帝国大学理農学部、広島大学水畜産学部）によって最初家兎について手がけられた。30年当時、千葉大学園芸学部畜産担当の加藤浩先生は、台北帝大在任当時、山根先生のもとで家兎の卵子研究にとりくんでおられたので、引き続いて石橋功先生（千葉大学から現・山口大学）へと卵子研究が受けつがれて基礎的研究が始められた。東北大学では、昭和28年に家兎の受精卵子移植の成功を畜産学会で発表しており、この受精卵移植をわが国で始めて成功した研究グループは佐久間勇次先生（現・日大農獸医学部）たちであり、これに続いて同じく東北大の菅原七郎先生は卵子の代謝、石田一夫先生（現・新潟大農学部）は卵子の組織化学の分野にとりくまれていた。農林省農業技術研究所（現・畜産試験場）家畜部繁殖科では、当時、昭和30年の始め頃までに、牛の人工授精の凍結精液の実用普及化に関する研究は殆んど完了したので、西川義正科長（現・帯広畜産大学学長）は、受精卵移植は、将来、牛の改良増殖における重要な技術として発展してゆくであろうと考えられ、私、堀江薰久先生（現・秋田県立短大）、杉江佑先生、相馬正先生、大沼秀男先生（現・北里大学獣医畜産学部）らが、家兎、山羊などを使って、加藤浩先生の技術指導を受けて卵子の基礎的技術開発にとりくむことになった。その他の大学、研究機関ではまだ卵子に関する研究は殆んど試みられていなかった。

このような背景のもとに、昭和34年4月の畜産学会の折、卵子に関する研究発表を行った仲間が雑談のうちに、お互いに技術的な取りくみ方、目的は若干異っていても、まだ、卵子研究は初期の段階であり、また、ようやく海外文献が入手できるようになった時期でもあり、お互いに意見、技術交換、文献紹介などをしながら、卵子研究を推進していくこうということになった。それでは皆で近いうちに集ろうということになり、当時、人員も多い農技研が集りの面倒をみましょうということになった。

### 2. 談話会の歩みと発展動向

有志の集りは、昭和35年5月9日（月）の午後、青山の獣医師会館の座敷に、農技研、千葉大、東北大から9名が出席し、大槻が「山羊の人工妊娠」、菅原が「ラット卵子の代謝」、石田が「卵子の組織化学検査」、石橋が「ラット卵の刺激による分割」についての研究の現況を報告し、質疑応答をかわしたのが、卵子の勉強会最初の船出であった。この席で長老格の千葉大の加藤浩先生から、年1回、畜産学会の前後に皆が集って気軽に研究、技術交流をする会として続けたらどうかということになった。集るための名称も、そのようないき

さつから、研究会にはしないで、談話会として発足することにした。従って、会員は卵子研究を行っている先生、卵子の研究に実際に取り組んでいる研究者だけに限ろうということになり、名称も、家畜だけではなく、人も実験動物も含めてということになるので、哺乳動物卵子談話会という名称に決った。あえて研究会にしなかったのは、研究会では、誰でも参加できる会になり会員が多くなり過ぎて、お互いに肝胆相照らした失敗例まで話しあうことがむずかしくなってしまうことが、他の研究会の実情から痛感されられていたからである。また、会の世話役については当分の間、私が担当することになり、会の運営経費は会費制をとらないで、当日の出席者に実費負担をして頂く方法をとることにした。以上が第一回の談話会の経過である。

当時、西川義正先生が農技研から京都大学農学部教授として転出されたので、日本不妊学会関東支部会の幹事を私が引き継ぐことになった。この会が縁になって日本不妊学会の設立者の一人である東邦大学医学部産婦人科の、故・林 基之教授とお近づきになることができた。林先生は産婦人科領域では、わが国では最初に卵子の研究に取り組まれた先生であり、早速、木下佐、岩城章先生を始め同門の先生方をさそって談話会のメンバーとして入会された。医学部関係では最初のメンバーであり、その後も林先生の紹介で医学関係の先生方が多数入会されるようになり、農学、医学の先生方が一堂に会して、第2回の談話会を開催することになった。東邦大からは卵子の組織、代謝関係の研究が始まっていた。また、会を代表する先生として、卵子研究の草分けである加藤 浩先生にまとめ役としての会長をお願いすることになった。集会の運営は、若い研究者が自由に気楽にディスカッションができるように、互いに額を寄せ合わせられるように会場を「コ」の字型にしてきた。会場は恵比寿駅近くのハム・ソーセージ会館を借用し、その後も数会使用している。農林省家畜衛生試験場でも卵子の研究が始まり、また、東邦大医学部からも話題が出されるようになった。第3回には広島大学の中村經紀先生（現・麻布大学）も参加された。この時は、高輪のプリンスホテルで開催した。古風なシャンデリアの下で古風で落ちついた風格のある会議室を使用したせいか、皆さんが堅くなつて、くだけた話し合いが始まるのに時間がかかったが、討論のあと、会として始めての親睦会パーティーを開いてから、ようやく打ちとけたにぎやかなムードになり、農学と医学の先生方の意志疎通をはかる楽しい集りになった。この時に、林先生から私に依頼されていた会則案を持参して皆さんの御意見を伺ったところ、当分の間は、卵子研究に関係する同好有志の集りということで良いのではないかという意見が多かったので会則はできなかった。林先生も会則を作らないでこのままでも良いなあと納得して下さった。その後も会則を作らないまま会を運営してきたが、大先輩の先生方の入会希望について、何となしに趣旨を理解して頂いて入会をお断りするのに都合のよいこともあったが、時折、皮肉まじりの声も聞えることがあった。この第3回には家衛試から国崎球子さんが話題を出され会を盛り上げて下さった。国崎さんはその後、日本最初の防疫官となられた才媛であった。第4回には、東北大農学部から日大農獸医学部に移られた佐久間勇次先生と石島芳郎先生（現・農業大学）の発表があった。この時には、排卵誘起、受精卵移植、体外受精、卵子の形態などに関する発表が中心であった。

第5回は、（昭和39年）4題で、出席者は23名であり、まずはまずの会である。それだけに1題に1時間ぐらいかけて討論が行なわれた。東邦大学では木下佐先生が林先生と交代しながら活発な討論をして下さった。

第6回は信州大学の登内徳一郎先生と名古屋大学の若杉昇先生が機関として初めて話題を提供されたが、現

在御両人とも仕事の方向が変わられた。

第7回にはお元気だった山根甚信先生に「初期卵子試験技術についての追想」を話して頂いた。実に楽しそうに昔を思い出されていたのが印象的であった。録音テープ、速記録をとってなかったのは残念でならない。また、現在、ハワイ大学で国際的に活躍されている柳町隆造先生が北海道大学理学部から話題をさげて上京された。先生の紹介で苫小牧駒沢短期大学の佐藤晶子先生の発表もあった。柳町先生が海外へ行かれてからは佐藤先生も会から遠ざかってしまった。石島先生は東京農業大学へ移られ独立したのもこのころだった。話題の最初の1, 2はいつも熱心な質疑があり、長くなってしまって40~50分もかかることが多かったが、結局夕方5時頃には終るようにうまくコントロールして終らせたのは面白かった。

第8回には30名ほどの参加があった。民間として、中外製薬の信永利馬先生(現・東北大医学部)、帝国臓器の鈴木稔先生がそれぞれ話題を提供されたのが印象的であった。このころからは加藤先生御一人の座長ではお気の毒なので、私や佐久間、石橋、木下、岩城先生らが交代した。

第9回では岩城章先生(東邦大)の御活躍が目立ち、東北大でも家畜育種の岡田美夜子先生の発表があった。話題も8題、参加者35名であった。1日1会場では話題も10題まで、参加人員も40名ぐらいまでが対話方式の談話会の限界ではないかと思われるほど、年を追うごとに盛会になってきた。

第10回(昭和44年 大学紛争中)からは会場を広い森永本社の会議室へと移した。これまで医学関係者のお力添えで、日独薬品、帝国臓器、森永乳業さんらのいろいろな形の御援助があったが、このころから森永さんが主体になった。森永から森永製品を会場に提供していただき、疲れをとらせて頂いたことは感謝にたえない。慶應大学の鈴木秋悦先生の話題はこのときが最初であった。これまで実験動物はマウス、ラット、ハムスター、家兎と小動物が主体であったが、9回の山羊、10回の猿と哺乳動物卵子談話会らしい会になってきた。

第11回には東北大学から北里大学へ移られた豊田裕先生がラット卵の体外受精で話題を、また、人材の多い東邦大学と東北大学の話題が目立った。

第12回では遂に話題が15題と多くなり、一日で終わるのかなと思われた。東邦大学からシネ・サイエンスへ出られた日大農獣医出身の野沢あき子先生(現・東邦大医)の独立話題、日大医学部へ出られた農獣医出身の遠藤 克先生(現・日大農獣医)、京都大学から角田幸生先生(現・畜試)が話題を、北海道大から小栗紀彦先生(現・畜試)が馬卵子の研究とユニークな話題をそれぞれ初参加で発表された。

同じ傾向の話題を2~3まとめ討議して頂き、時間内にうまくおさめたような記憶が座長をつとめた私の頭の中を通りすぎた。また、会場の机とイスを「コ」の字型にするため開会の1時間前に有志の方に来て頂いて一汗かきながら会場の机を整理したり、終了と同時に元気な方は一寸手伝って下さいとアナウンスして机を元通りに戻して頂いたりしたので、手造り会という印象に驚いた方が多いようであった。どうも私はワンマン振りを示した世話役として、うらまれたのではないかと思っている。改めてお詫びします。

第13回は鈴木秋悦先生の御好意で、慶應大の講堂をお借りしたが、この頃から演題が急に多くなって、一般的の学会方式をとらざるを得なくなった。話題15、参加者53名であった。

第14回は東邦大学の御好意で蒲田駅ビルの広いホールで行われ、62名の参加者があった。その頃になると、会員の主な方々が、交互に海外留学されるようになり、姿を見せない光景がみられのも印象的であった。次回は15周年、何か記念になる特別な企画をという声が上がったので、これからは世話役を協議制とすることにして、杉江信、佐久間勇次、岩城章、鈴木秋悦の諸先生と私の5人で会を運営していくことになり、事務局は私が相変わらず引きうけることになった。私はすでに千葉の畜試を離れ、栃木県西那須野町の草地試験場に移っていたが、5人の世話役が15回の記念行事について協議の結果、新らしい若い会員のため、採卵技術の紹介をすることになり、日大の佐久間先生を中心になって演題、演者をお願いすることになった。

第15回は、(昭和49年)一般話題が6題に対し、採卵技術の紹介は、馬、牛、めん羊、豚、猿、犬、猫、ウサギ、ハムスター、モルモット、ラット、マウスと11部門に亘って行われたのでなかなかの盛会ではあったが、盛沢山になり過ぎて説明時間、質問時間が足りなくなった。しかし、採卵の方法はこの時期の卵子研究における大事な基礎技術として一つの決算であり、それ自体有意義な技術紹介の15回を記念する会になった。

第16回には私が北海道農試に移って1年になり、不妊学会支部に関係することになったのを機会に、北海道大学医学部産婦人科の藤本桓一郎先生とお知り合いになり、卵子の研究を始められていた先生に談話会を紹介したのでこの回から参加発表された。一方、岡山大学農学部では内海恭三、湯原正高先生らが異色の研究をさせて話題提供された。畜試の花田 章先生は、M. C. Chang のもとに留学された時の仕事をもって始めて参加された。この回から、申し込み演題が多くなってきたので、各機関の話題は止むを得ず1~2題にしぼって頂くことにしたので、ようやく本来の討論ができる余裕をもつことができた。

第17回は東北大から新潟大学農学部に移られた石田一夫先生が、岩手大学農学部の安田泰久先生らの話題が目についた。しかし、また演題が多くなり、17題になってしまったが、皆さま方の勉強意欲を抑えるわけにはいかなかった。恐らくこの頃から爆発的に卵子研究の意欲がもり上り、日本における卵子研究の底上げを意味する時期になり、わが国の卵子研究の動向も海外の研究と対等なレベルアップも間近いものと考えられた。

第18回では実験動物中央研究所へ移られた横山峯介先生の独立参加がみられた。

第19回では永年のカナダ留学より帰国された北海道大学の金川弘司先生が、牛卵子の凍結保存例の話題と京都大学から農林省畜試へ移られた角田幸生先生の発表があった。

第20回(昭和54年)では、また一区切りと云うことで、慶應大学から東海大学医学部へ移られた井上正人先生と慶應大学医学部の藤原達司先生のマイクロマニピュレーション分野の技術、研究紹介を中心に、20周年にふさわしい卵子の体外受精と凍結保存の話題を集めての試みは一応成功したといえよう。尾川昭三先生(明治大学農学部)の切断胚は興味をもたれた初参加であった。この時点で、56機関から81名の参加があり、もはや以前のように顔をつき合わせて討論する「コ」の字の会場で発表会を行うことは無理になってきて、研究会方式へと徐々に変っていくきさしがみえ始めてきた。私自身は農水省を去り、第一線から退いたので、今日、ここまで研究層が広く厚くなり、しかも会の動きは研究者の環境条件から、レポートの公認を求める声も上り、いつ談話会から研究会か、学会へと脱皮するかはわからぬ程、機運が熟してきた。私自身、卵子の研

究のための第一期の仕事は終り任務を果したものと考え、今後は事務局を日大農獸医学部の佐久間先生を中心に農業大学の石島先生の協力グループにバトンタッチをすることにした。この際に 20 年を顧みての一文を 20 周年記念号にのせて頂いた。その後も本会の運営は相変わらず 5 人の世話役会で当分は進めることになった。

第 21 回～22 回では各機関とも充実した話題を出され、第 22 回には久し振りにハワイ大学の柳町隆造先生の特別講演が行なわれた。話題の都合で夕食後の 19:00～20:00 に行なわれたのが特色である。

第 23 回では一般話題に受精卵移植の集中話題をシンポジウム風にとり入れ、実用化の第一線の先生方を中心とした。一般話題では帯広畜産大学の小野 齊先生らの初話題があり、受精卵移植の集中話題では、農水省新冠・日高両種畜牧場、埼玉・静岡各県畜試、福島家畜共済、北海道開発公社、雪印乳業別海工場 小岩井農場、開業獣医師などの国、公、民間のバラエティに富んだ移植の実用技術が公開披露された。いよいよ日本でもここまで受精卵移植が実用的、現実的な技術として開発されてきたものと思うと同時に、これまでに 20 年有余もの長くもあり短くも感じられる年月が流れたのかなとの思いを深く感じさせられた。これらの話題は 20 周年特集号として、一冊の資料に再度集録したことは本会としては最初の企画でもあり、今後の利用者のためにも理解し易い参考になるテキストとして良い資料を残すことがきたと自負している。さきに第 15 回の採卵技術のシンポジュームもこのように、特集号にする計画があったが、主に資金面などの都合で発行できなかつたことが思い浮かばれて残念でならない。

第 24 回は、21 の話題と体外受精 3 題のシンポジウムが行われたので夜おそくなるまで熱気をおびた発表討論が続けられた。もはや学会なみになり、きびしい時間制限の発表会になり質疑応答は廊下でということが多くなり、卵子研究の大きな進歩発展の喜びとその反面、充分な討論時間がとれないという淋しさはかくしかれなかった。

体外受精のシンポジウムの計画は、まだ東北大学で日本で最初の体外受精、胚移植の成功が発表される前に演題、演者を決めていたが、マスコミをにぎわした 3 月の成功発表後の談話会になったので、参加者も多く、マスコミの参加もあって談話会が始って以来の盛会であった。東北大学からはシンポジウムの演者の星合先生の他に鈴木雅洲先生を始め、多数の研究員も参加された。鈴木先生から特に今回の体外受精・胚移植の成功について追加として話題を提供して頂くことができた。鈴木先生は、東北大学で体外受精、胚移植を開始した動機から、患者の選択、体外受精・胚移植の方法などについていろいろと苦心されたお話をあり、たまたま今回はうまく成功しただけであって、まだまだ今後もいろいろな検討をしなければならないことが多いこと、また、動物の成功例はウサギで東北大学で 30 年前に佐久間先生が日本の第一号を作り、ヒトでも東北大学が第一号に成功することができたことなど、静かな口調で謙虚にお話しをして下さった。

### 3. 談話会の脱皮と研究会の発足

第 24 回の集りの前に、5 名の世話役が集って今後の運営について検討することになった。毎年、演題の申し込みが多くなってきて、一日一會場のまゝで談話会を続けていくことはできなくなってきた。特に 6 年前イギリスで体外受精児の誕生以降、産婦人科領域の会員が急増し、また、牛の受精卵移植が日本でも実用普及化され始めたので、会員も演題も急激に多くなって、もはや談話会の形式では運営不可能になってきた。そこ

で今後は研究会としての衣替えを検討しなければならなくなり、準備委員を増やして具体的な研究会の発足について話し合いを始めることになった。この研究会または学会としての要望は、20周年頃から強くなっていた。そして最終的に委員会で、談話会を発展的に解消して、学会ではなく研究会として発足させることが決定し、名称は哺乳動物卵子研究会とすることになった。会員は、会員推薦による入会を公開し、会則を作成し、年会費を徴収することを決めて、事務局は日本大学農獸医学部におき、佐久間先生らが当分、面倒をみると決った。今回、研究会にした主な理由の一つに、この会で発表した演題を研究業績にしたいという要望が強く寄せられていこもあり、また、産婦人科の若い先生方からは、外来診療を休んで出席するためには談話会より研究会、学会にしてほしいという要望もあった。談話会というお互いの勉強会から、学術的研究報告会への移りかわりについて、私は時代の大きな流れを痛感させられている。何人かの若い世代の研究者たちから、研究業績を重視することはよくわかるが、研究会になって存分に語り合える今までの談話会のムードが消えてゆくのではないかという危機感を訴えられた時に、私には改めて若い世代の研究者にもこのような考えをもつている先生方がおられるのかと、しばし迷いが通りすぎた。

今後、名称が、談話会から研究会に変っても、他の研究会とは一味ちがう、談話会、勉強会の良きムードだけは残した研究会として大きく発展してゆくよう、今後も見守ってゆきたいと思っている。

#### 4. あとがき

24年もの長い年月に亘った24回の談話会の歩みを振り返ってみると、私の記憶のコンピューターがあちこち故障だらけで、一人よがりな回想になったり、誇張した部分が多くたり、大事なことを失念していたりお世話になった沢山の先生方のお名前と功績を思い出せなかったりしていることが多いと思います。ひらに御容赦を願います。この会も、人々のふれあいで順調に発展してきたことはタモリ氏の“友達の輪”に似たところがあるなあと自ら苦笑しております。

この談話会の雑務をずっと続けてお世話下さった畜試の杉江、相馬先生、農学部の佐久間、石島、遠藤先生、医学部の木下、岩城、鈴木先生に厚く御礼を申し上げます。また、森永、帝国臓器などいくつかの会社関係からなにかと御援助を頂いてきました。これからも引続いて御援助下さるようお礼をかねてお願い申し上げます。

尚、この談話会を育て下さった、故・山根基信先生、農学・医学・生物学の領域に亘る本会の発展に情熱をかたむけて尽力して下さった東邦大の故・林 基之先生、期待されながら若くして亡くなられた畜産試験場の福光 進君の御冥福を皆様と共に心からお祈り致します。

最後に、新しく発足した研究会が農学・医学・生物学等の各分野に亘る先生方が楽しく存分に語り合える談話会の良さを残した勉強会の場として永続し、大きく発展されてゆくことを心から祈って筆をおくことに致します。

# 哺乳動物卵子談話会演題記録集

第1回 昭和35年5月9日(月)(1960年) 獣医師会館(青山) 出席者 9名

1. 山羊の人工妊娠に関する研究 ..... 大槻 清彦(農技研)
2. ラット卵の代謝に関する研究 ..... 菅原 七郎(東北大・農)
3. 沢胞内卵子、輸卵管内卵子の組織化学的検査 ..... 石田 一夫(東北大・農)
4. ラット卵の刺戟による分割について ..... 石橋 功(千葉大・園芸)

第2回 昭和36年4月13日(金)(1961年)

ハムソーセージ会館(エビス) 出席者 15名

1. ラット卵子の第2極体形成後の受精と発育について ..... 石橋 功(千葉大・園芸)
2. 血様沢胞の組織化学 ..... 石田 一夫(東北大・農)
3. 初期発生時におけるラット卵子の酵素消費能に対する基質の影響 ..... 菅原 七郎(東北大・農)
4. 家兔卵のオートラジオグラフィ ..... 岩城 章(東邦大・医)
5. 家兔受精卵の着床に関する研究 ..... 須川 章夫(家衛試)
6. 哺乳動物における直視下排卵現象の研究(16ミリ映画) ..... 林 基之(東邦大・医)

第3回 昭和37年4月9日(月)(1962年)

高輪プリンスホテル(品川) 出席者 22名

1. 頸管を通しての家兔受精卵の移植について ..... 大槻 清彦(畜試・繁殖)
2. 家兔受精卵の着床に及ぼすEstrogenの影響 ..... 国崎 球子(家衛試)
3. シロネズミの受精卵培養 ..... 保条 朝郎(東邦大・医)

4. 家兔卵のラジオアイソトープ ..... 岩城 章(東邦大・医)
5. ヒト卵の体外受精 ..... 揚 文勲(東邦大・医)
6. 多卵性卵胞と性ホルモン ..... 中村 経紀(広大・水畜産)
7. 卵子の染色性と呼吸能の関係について ..... 菅原 七郎(東北大・農)

第4回 昭和38年4月10日(水) (1963年) 獣医師会館(青山) 出席者 20名

1. 各pHにおけるラット卵子の形態反応について ..... ○菅原 七郎・竹内 三郎(東北大・農)
2. ラット卵子の移植について ..... ○菅原 七郎・豊田 裕・竹内 三郎(東北大・農)
3. 家兔受精卵の子宮内移植 ..... ○木下 佐・岩城 章・西平 守之(東邦大・医)
4. 卵子のデヒドロゲナーゼについて ..... ○石田 一夫・菅原 七郎(東北大・農)
5. 受精卵の着床に及ぼすエストロゲンの影響 ..... ○須川 章夫・本間 惣太・国崎 球子(家衛試)
6. 馬および綿羊下垂体前葉抽出物及び製剤による家兔の過排卵誘起に関する研究 ..... 佐久間勇次・○石島 芳郎(日大・農獣医)
7. ヒトとウサギの体外受精 ..... ○揚 文勲(東邦大・医)

第5回 昭和39年4月8日(水) (1964年)

ハムソーセージ会館(エビス) 出席者 23名

1. 卵管液の組織化学的考察 ..... ○石田 一夫・菅原 七郎(東北大・農)
2. 去勢家兔の受精卵移植 ..... ○木下 佐・西平 守之(東邦大・医)
3. 兔卵胞卵の体外受精 ..... ○揚 文勲・天野 悅男(東邦大・医)
4. 各機関現況報告

第6回 昭和40年4月5日(月) (1965年)  
ハムソーセージ会館(エビス) 出席者 30名

1. 卵着床までの家兎子宮運動について .....  
登内徳一郎(信州大・農)
2. ラット・マウスの過排卵および過剰妊娠の研究 .....  
佐久間勇次(日大・農獣医)  
○石島 芳郎(東農大)
3. 卵巣の組織培養 .....  
本田 昭博(東邦大・医)
4. 家兎卵管卵の体外受精 .....  
林 基之(東邦大・医)
5. 近交系マウスDDK、KK、NCの系統内および系統間支配における繁殖能力の差異 .....  
若杉 昇(名大・農)

第7回 昭和41年4月8日(火) (1966年)  
ハムソーセージ会館(エビス) 出席者 25名

1. ラット・マウスの過排卵と産子数の増加に関する研究 .....  
佐久間勇次・○遠藤 克(日大・農獣医)  
○石島 芳郎(東農大)
2. 家兎の過排卵誘起におよぼす Estrogen 前処置の効果 .....  
○石島 芳郎(東農大)  
佐久間勇次(日大・農獣医)
3. ハツカネズミ (Mus musculus)における初期発生卵子の染色体観察方法について  
佐藤 晶子(苫小牧駒沢短大)
4. 口経的に与えたエチニール・エストラダイオールのマウス卵子に及ぼす影響 .....  
○柳町 隆造(北大・教養)  
佐藤 晶子(苫小牧駒沢短大)
5. 卵管卵の組織化学 .....  
比嘉 国郎(東邦大・医)
6. 初期卵子試験技術について追想 ..... 山根 甚信

第8回 昭和42年4月7日(金) (1967年)  
ハムソーセージ会館(エビス) 出席者 28名

1. 過排卵ラット卵子の形態的研究
- II 性腺刺激ホルモン投与後の卵子の成熟と排卵について .....  
石橋 功・○高橋紀代志(千葉大・園芸)

2. ラット・マウスの過排卵と産子数の増加に関する研究(続報)
  - PMS 単用によるマウスの過剰妊娠誘起 — ..... ○遠藤 克・佐久間勇次(日大・農獣医)
3. マウスの自然排卵による卵の下降について
 

第1報 自然周期における卵および交配後の卵に対する Estradiol および Progesterone の効果 ..... ○信永 利馬・中村 勝美・高橋 和明・岡本 道生(中外製薬綜合研)
4. ラット受精卵子の子宮内移行の研究(予報) ..... 石島 芳郎(東農大)
5. 過排卵処置家兎における卵子の生殖器道下降速度および卵分割進行程度 ..... 石島 芳郎・○伊藤 雅夫(東農大)  
佐久間勇次(日大・農獣医)
6. 家兎 Blastocyst の Autoradiography ..... ○岩城 章・間壁さよ子・平川 舜(東邦大・医)
7. Estradiol と Progesterone による受精卵の誘起着床に及ぼす ACTH 投与の影響 ..... 本間 惣太(農林省・家衛試)
8. 同 上(追加) ..... 信永 利馬(中外製薬綜研)
9. 妊娠中期における Estrogen 投与の影響 ..... 鈴木 稔(帝国臓器)

第9回 昭和43年4月6日(土)(1968年)

ハムソーセージ会館(エビス) 出席者 35名

1. 家兎の過排卵誘起における Estrogen 併用の効果 ..... ○石島 芳郎(東農大)
2. 過排卵処置家兎の排卵時期の検討(予報) ..... ○伊藤 雅夫・石島 芳郎(東農大)  
佐久間勇次(日大・農獣医)
3. ラット・マウスの過排卵と産子数の増加に関する研究(三報)
  - PMS の投与とラットの排卵・妊娠・分娩との関係 — ..... 佐久間勇次・○遠藤 克(日大・農獣医)
4. 家兎胞胚の電子顕微鏡的観察 ..... ○林 基之・西脇 俊幸(東邦大・医)
5. Blastocyst の  $^3\text{H}$ -Thymidine Autoradiograph. ..... ○岩城 章・間壁さよ子・平川 舜(東邦大・医)
6. 家兎胞胚(Embryonic - disc)の体外培養による心臓原基の発生について ..... ○岩城 章・平川 舜・間壁さよ子(東邦大・医)
7. 母体環境の変更がマウスの成長に及ぼす影響
  - RB集団より選抜された体重大系・小系及び無選抜系を用いて — ..... 岡田美夜子(東北大・農)

8. 山羊の人工受胎に関する研究・とくに異品種間の受精卵交換移植について …  
○杉江 信・相馬 正・大槻 清彦(農林省・畜試)

第10回 昭和44年4月12日(土)(1969年)  
森永本社5階A会議室(田町) 出席者 32名

1. 雌ラットの性成熟到来の機構について  
— PMS注射による下垂体排卵ホルモン含量の変化 — .....  
○梅津 元昭・菅原 七郎・竹内 三郎(東北大・農)
2. ラット・マウスの過排卵の産子数の増加に関する研究(四報)  
— PMSとHCGの投与量およびProlactin併用投与と妊娠、着床、生存胎児との関係  
佐久間勇次・○遠藤 克(日大・農獣医)
3. 子兎の過排卵誘起 .....  
石島 芳郎(東農大)
4. ハムスターの卵分割の過程における分化8細胞期の出現について .....  
石田 一夫(新潟大・農)
5. ラット卵子における透明帯の消失について .....  
○菅原 七郎・辻井 弘忠・竹内 三郎(東北大・農)
6. ラット卵子における<sup>14</sup>C-L-Leucineの取込について  
○辻井 弘忠・菅原 七郎・竹内 三郎(東北大・農)
7. 猿卵子について .....  
飯塚 理八・○鈴木 秋悦・今井 敏郎・近藤 慶明・浜田 康生(慶応大・医)
8. 着床機構の組織化学的検索  
I 偽妊娠および脱落膜形成時における脱水素酵素の変化について .....  
○高橋寿太郎・星野 忠彦・竹内 三郎(東北大・農)
9. 家兔卵の分割(映画) .....  
林 基之(東邦大・医)

第11回 昭和45年4月6日(月)(1970年)  
森永本社5階B会議室(田町) 出席者 34名

1. ラット・マウスの過排卵と産子数の増加に関する研究(五報)  
— Prolactinの投与時期と妊娠、着床との関係 — .....  
佐久間勇次・○伊藤 雅夫(日大・農獣医)  
遠藤 克(日大・医)
2. ラットの排卵および受精に及ぼすエタノール経口投与の影響 .....  
○福田 芳詔・豊田 裕(北里大・獣医畜産)
3. ラットの排卵と卵子の移動に対するアクチノマイシンDの作用について .....  
○菅原 七郎・竹内 三郎(東北大・農)

4. Rat における Delayd Ovulation と卵の生物学的特性について ..... 飯塚理八, 他(慶應大・医)
5. 家兎卵管卵の体外受精と受精経過について ..... 岩城 章・沖永 洋子(東邦大・医)
6. マウス卵子の体外受精 ..... 豊田 裕・横山 峰介(北里大・獣医畜産)
7. 着床前家兎胞胚におけるトロホプラスト細胞の動態 ..... 林 基之・岩城 章・平川 舜(東邦大・医)
8. 受精卵におけるセックス・クロマチンに関する研究
  - I 家兎胞胚におけるセックス・クロマチンの存在部位について ..... 利部 聰・星野 忠彦・菅原 七郎・竹内 三郎(東北大・農)
9. ラット子宮の脱落膜腫形成反応に対する卵巣ホルモンの影響について ..... 高橋寿太郎・竹内 三郎(東北大・農)
10. ラット子宮液中の遊離アミノ酸について ..... 辻井 弘忠・菅原 七郎・竹内 三郎(東北大・農)

第12回 昭和46年4月5日(月) (1971年)

ハムソーセージ会館(エピス) 出席者 40名

1. 過排卵処理によって誘起された家兎血胞の消失時期について ..... ○石島 芳郎(東農大)  
石田 一夫(新潟大・農)
2. 人卵胞液に存在するD-型リブロースを含む物質について ..... ○林 晴男・長岡 貞雄(東邦大・医)
3. 哺乳動物卵子の染色体について(一報)
  - マウス卵胞卵子の染色体について — ..... 野沢あき子(シネ・サイエンス研究部)
4. 体外におけるマウス精子の受精能獲得について ..... ○横山 峰介・豊田 裕(北里大・獣医畜産)
5. 体外受精によるマウス卵子の受精能力保持時間の検討 ..... ○福田 芳詔・豊田 裕(北里大・獣医畜産)
6. ラット卵子の培養について ..... ○辻井 弘忠・菅原 七郎・竹内 三郎(東北大・農)
7. ラット卵子の凍結保存の試み ..... ○菅原 七郎・辻井 弘忠・竹内 三郎(東北大・農)
8. 胚スマニア中にみられたヒト卵 ..... ○岩城 章・平川 舜(東邦大・医)
9. ラット2細胞卵の家兎結紮卵管および結紮子宮内における生存性 ..... ○角田 幸生・入谷 明・西川 義正(京大・農)
10. 馬卵子に関する研究 ..... ○小栗 紀彦・堤 義雄(北大・農)

11. 過排卵処置による着床マウス卵の発生学的变化 ..... ○遠藤 克(日大・医)  
石田 一夫(新潟大・農)  
佐久間勇次(日大・農獣医)
12. ラットにおける着床遅延胚盤胞のSDH活性に対するエストロジエン単一投与の影響 ..... ○高橋寿太郎・竹内 三郎(東北大・農)
13. 家兔卵によるセクスコントロールの研究 ..... ○戸津川 清・菅原 七郎・竹内 三郎(東北大・農)
14. ラット子宮液の研究 ..... ○長谷川喜久・菅原 七郎・竹内 三郎(東北大・農)
15. 偽妊娠ラットにおける子宮除去の卵胞の発育に及ぼす影響について ..... ○小林 博史・梅津 元昭・竹内 三郎(東北大・農)

第13回 昭和47年4月6日(木) (1972年)

慶應大学医学部本館臨床講堂(信濃町) 出席者 53名

1. 家兔の過剰排卵誘起と採卵成績について ..... ○福光 進・相馬 正・杉江 信(農林省・畜試)
2. マウスの反復過排卵誘起 ..... ○石島 芳郎・桜井 誠一(東農大)
3. ラットにおける分娩後の卵胞発育と排卵について ..... ○橋爪 一善・菅原 七郎・竹内 三郎(東北大・農)
4. Gonadotrophin による誘起排卵ネコの卵子検出成績 ..... ○信永 利馬(中外製薬総合研)  
高橋 和明(残留農薬研)
5. 哺乳動物卵子の染色体について  
—マウス卵管卵とPentobarbital麻酔後の卵胞卵の染色体について(二報)  
野沢あき子(シネ・サイエンス研究部)
6. ラット卵子におけるアミノ酸の $^{14}\text{CO}_2$ 発生量 ..... ○辻井 弘忠・菅原 七郎・竹内 三郎(東北大・農)
7. ラット卵子における炭素固定について ..... ○菅原 七郎・辻井 弘忠・竹内 三郎(東北大・農)
8. 卵子の老化と、その超微細構造について ..... ○鈴木 秋悦・井上 正人・水本 弘・浜田 康正  
三谷 仁・杉山 修(慶應大・医)
9. 着床前期胞胚の染色体分析 ..... ○鈴木 秋悦・井上 正人・水本 弘・浜田 康正・杉山 修(慶應大・医)
10. Embryonic diskの $^3\text{H}$ -Thymidine Autoradiograph ..... ○岩城 章・平川 舜・田宮 親(東邦大・医)
11. 裸化マウス卵子の体外受精について ..... ○岡田 修・福田 芳詔・豊田 裕(北里大・獣医畜産)

12. マウス体外受精における血清アルブミンの効果 ..... ○横山 峰介・豊田 裕(北里大・獣医畜産)
13. ラット受精卵の家兎生殖器管内における生存性、特に着床の可能性の検討—Ⅱ  
○角田 幸生・入谷 明・西川 義正(京大・農)
14. 家兎受精卵のラット子宮内における生存性、特に性周期との関係 ..... ○角田 幸生・入谷 明・西川 義正(京大・農)
15. 着床遅延ラットの子宮における<sup>3</sup>H-Estradiolの取り込みについて ..... ○高橋寿太郎・竹内 三郎(東北大・農)

第14回 昭和48年4月6日(金) (1973年)  
蒲田駅ビルホール(蒲田) 出席者 62名

1. マウスの反復過排卵誘起(続報) ..... ○石島 芳郎・金谷 義明・堀川 千秋(東農大)
2. ラットの発情休止期におけるHCGによる排卵の誘起 ..... ○橋爪 一善・菅原 七郎・竹内 三郎(東北大・農)
3. 高令Wistar - Imamichi ラットの陰嚢周期、HCGによる排卵誘起および雄許容について  
○杉山 修(中外製薬総合研)  
鈴木 秋悦(慶應大・医)
4. 家兎の過排卵並びに反復過排卵誘起 ..... 角田 幸生・○三宅 正史・入谷 明・西川 義正(京大・農)
5. ラット受精卵移植試験、とくに注入液量と採卵時期について ..... ○福光 進・杉江 信(農林省・畜試)
6. 哺乳動物卵子の走査型電顕(SEM)について ..... 菅原 七郎(東北大・農)
7. ラット卵子の下降速度における性腺刺激ホルモンの影響  
I 未受精卵子の下降におけるHCGの影響 ..... ○利部 聰・石橋 功(千葉大・園芸)
8. 家兎受精卵のラット生殖器管内における生存限界 ..... ○角田 幸生・入谷 明・西川 義正(京大・農)
9. 馬受精卵子の卵管下降と未受精卵子の運命について(予報) ..... ○小栗 紀彦・堤 義雄(北大・農)
10. マウスの体外受精における培養液量の意義 ..... 岡田 修(北里大・獣医畜産)
11. ラット卵子の体外受精 ..... 豊田 裕(北里大・獣医畜産)
12. 射精精液を用いた家兎卵管卵の体外受精<その1> ..... ○岩城 章・平川 舜・小泉 義博・久保 春海  
室井 克夫・野沢あき子(東邦大・医)
13. 家兎胚盤胞の透明帯処理の影響について ..... ○戸津川 清・三浦源三郎・菅原 七郎・竹内 三郎(東北大・農)

14. 家兔胚腔へのアミノ酸取込みについて .....  
○黒沢 忠彦(東邦大・医)  
D·Dabich·E.S.E. Hafez(ウェイン大)

第15回 昭和49年4月5日(金) (1974年) 友愛会館(芝) 出席者 62名

1. ハムスターの過排卵 .....  
○橋詰 良一・石島 芳郎(東農大)  
伊藤 雅夫(日大・医)
2. 卵胞内の卵核胞崩壊抑制因子について .....  
○佐藤 英明・入谷 明・西川 義正(京大・農)
3. マウスの体外受精におけるグルコースとピルビン酸ナトリウムの効果 .....  
○岡本 正則・岡田 修・豊田 裕(北里大・獣医畜産)
4. 家兔胚盤胞の *in vitro* における処理がSDH活性に及ぼす影響について ...  
○戸津川 清・竹内 三郎(東北大・農)
5. 走査型電子顕微鏡による卵子表面構造の観察 .....  
○浜田 光磨・鈴木 秋悦・藤原 達司・関 賢一・伊藤 武夫(慶応大・医)
6. ネコの採卵 .....  
村杉 栄治(日大・農獣医)
7. 採卵テクニックの要領  
1. 馬 .....  
小栗 紀彦(北大・農)  
2. 牛、めん山羊 .....  
杉江 信(畜試)  
3. 豚 .....  
角田 幸生(京大・農)  
4. 猿 .....  
鈴木 秋悦(慶応大・医)  
5. 犬 .....  
武石 昌敬(日大・農獣医)  
6. 猫 .....  
村杉 栄治(日大・農獣医)  
7. ウサギ .....  
石島 芳郎(東農大)  
8. ハムスター .....  
伊藤 雅夫(日大・医)  
9. モルモット .....  
石島 芳郎(東農大)  
10. ラット .....  
信永 利馬

11. マウス .....

遠藤 克(日大・医)

第16回 昭和50年4月5日(土) (1975年) 友愛会館(芝) 出席者 56名

1. 卵母細胞の成熟に要する時間の決定機構に関する研究。とくにブタ、ウシ間における時間的相違の由来について .....  
○佐藤 英明・入谷 明・西川 義正(京大・農)
2. Atresia に関する 2・3 の考察 .....  
○大山 俊雄・藤原 達司・鈴木 秋悦(慶大・医)
3. 過排卵処理ハムスターの排卵時間と卵分割 .....  
○橋詰 良一・石島 芳郎(東農大)
4. 家兔初期胞胚被膜の電顕像 .....  
○野沢あき子・岩城 章(東邦大・医)
5. Superovulation の家兔着床前受精卵に対する細胞遺伝学的影響について ...  
○和氣 徳夫・有賀 敏・藤本征一郎(北大・医)
6. 家兔着床前胞胚液中の L. H. 様活性ならびにプログステロン濃度について ...  
○藤本征一郎・田中 俊誠(北大・医)
7. 顆粒膜細胞の培養 .....  
○東条竜太郎・浜田 光磨・藤原 達司・鈴木 秋悦(慶大・医)
8. ハムスター卵子の培養の試み .....  
○石島 芳郎・橋詰 良一・新村 末雄(東農大)
9. 体外における透明帯除去卵への異種精子侵入例ならびにその精子 Capacitationとの関係について .....  
○花田 章(農林省・畜試)  
M. C. Chang (米国ウースター研)
10. 制限給餌下で排卵されたマウス卵子の受精能 .....  
○福田 芳詔・豊田 裕(北里大・獣医畜産)
11. マウス卵子の体外受精法に関する一つの試み .....  
○豊田 裕・岡本 正則(北里大・獣医畜産)
12. 哺乳動物胚の超低温傷害に関する研究 .....  
○内海 恭三・湯原 正高(岡山大・農)

第17回 昭和51年4月4日(日) (1976年)

東京薬業健康保険組合会議室(永田町) 出席者 72名

1. 哺乳類卵巣の抗原性 .....  
○角田 幸生(農林省・畜試)
2. ブタ卵胞卵子のエネルギー基質要求型と pH およびステロイドホルモンとの相関 ...  
○佐藤 英明・石橋 武彦(京大・農)

3. 閉鎖卵胞の形態 .....  
 ○大山 俊雄・依田 和彦・藤原 達司・鈴木 秋悦(慶大・医)
4. 卵胞液の生化学的分析に関する2、3の知見 .....  
 ○小林 善宗・鈴木 秋悦(慶大・医)
5. 培養顆粒膜細胞の微細構造とホルモン産生機能 .....  
 ○東条竜太郎・藤原 達司・鈴木 秋悦(慶大・医)
6. ハムスター卵子におけるステロイド脱水素酵素について .....  
 ○新村 末雄・石田 一夫(新潟大・農)
7. 成熟ラットにおける卵子の成熟と排卵に及ぼす性腺刺激ホルモンの影響  
 II 排卵時期についての細胞学的観察 .....  
 ○石橋 功・青木ひかる(千葉大・園芸)
8. モルモットの過排卵誘起の失敗例 .....  
 ○石島 芳郎・広瀬 美晴(東農大)
9. マウス卵子への精子侵入に及ぼす卵丘細胞層の影響について .....  
 ○東 善行・岡本 正則・豊田 裕(北里大・獣医畜産)
10. ラット卵子の体外受精における多精子受精 .....  
 ○三宅 正史・丹羽 眞二・入谷 明・西川 義正(京大・農)
11. マウス精巣上体分泌液の精子 Capacitation への影響 .....  
 ○井上 正人・鈴木 秋悦(慶大・医)
12. アンプル法によるマウスの受精卵の培養について .....  
 ○笠井 健吉・福田 芳詔・豊田 裕(北里大・獣医畜産)
13. 家兔胚の凍結保存に関する研究 .....  
 ○内海 恭三・湯原 正高(岡大・農)
14. 着床前受精卵の染色体分析 .....  
 ○鎌田 紘八(北里大・薬学)  
 杉山 修(中外製薬中央研)  
 鈴木 秋悦(慶大・医)
15. 高令ラット卵における2、3の知見 染色体観察と移植実験 .....  
 ○岩城 章・清水 工経・野沢あき子(東邦大・医)
16. DDI系マウスの繁殖能力低下に関する研究  
 2. 着床に関する検討 .....  
 ○大和田一雄・長橋 武(山形大・医)  
 信永 利馬(東北大・医)
17. ラットの初期受精現象に関する形態的研究 .....  
 ○安田 泰久・渡辺 章(岩手大・農)
18. ハムスター卵子の培養 .....  
 ○橋詰 良一・伊藤 雅夫(日大・医)  
 石島 芳郎(東農大)
19. 哺乳動物胚の凍結保存に関する研究 .....  
 ○尾川 昭三・竹島 勉・平塚 伴通・大滝 洋嗣・成瀬美恵子(明大・農)

第18回 昭和52年4月5日(火) (1977年) 友愛会館(芝) 出席者 62名

1. 卵胞液の蛋白組成成分に関する知見 .....  
○小林 善宗・鈴木 秋悦(慶大・医)
2. 成熟ラットの過排卵および卵胞発育に及ぼすPMSの投与時期の影響 .....  
○石橋 功・荒戸 宏(千葉大・園芸)
3. ハムスター卵子における Prostaglandin dehydrogenase の組織化学的証明と Prostaglandin が卵子中の Steroid dehydrogenase 活性に及ぼす影響 .....  
○新村 末雄・石田 一夫(新潟大・農)
4. リスザルにおける、腹腔鏡による着床前妊娠の採取法について .....  
○有賀 敏・藤本征一郎(北大・医)
5. 母体高年令の初期妊娠における細胞遺伝学的影響について .....  
○藤本征一郎・有賀 敏・荒井 英子・山上由紀子(北大・医)
6. ラット胚の単為発生誘起に関する研究 .....  
○山田 雅保・内海 恒三・湯原 正高(岡大・農)
7. 誘発排卵マウス胚の培養成績について .....  
○湊 芳明・笠井 健吉・豊田 裕(北里大・獣医畜産)
8. 透明帯除去ラットおよびハムスター卵子への家畜精子の侵入について .....  
○今井 裕・丹羽 眞二・入谷 明(京大・農)
9. 高令ラット卵の多精子侵入と多倍体について .....  
○野沢あき子・岩城 章(東邦大・医)  
毛利 浩子・中沢 道子(日大・農獣医)
10. マウスにおける近交系内および近交系間の体外受精について .....  
○横山 峰介・谷岡 功邦(実中研)
11. ハムスター卵子の体外培養  
— Modified Brinster 液を用いた培養の試み — .....  
○橋詰 良一・後藤 信男(家衛試)  
伊藤 雅夫(日大・医)  
石島 芳郎(東農大)

第19回 昭和53年4月7日(金) (1978年) 友愛会館(芝) 出席者 69名

1. HMGによるモルモットの過排卵誘起の試み .....  
○石島 芳郎・大庭有美子(東農大)
2. 透明帯抗体の測定法 .....  
○角田 幸生・杉江 信・森 純一(農林省・畜試)
3. 異種卵子のもつ顆粒膜細胞への形態的、機能的影響 .....  
○守谷 修而・菊池 徳博・田中 俊誠・岡田 雄一・桜木 範明・  
藤本征一郎・一戸喜兵衛(北大・医)
4. 発生初期におけるスナネズミ卵子の組織化学的研究 .....  
○新村 末雄・石田 一夫(新潟大・農)

5. ディーアマウス卵子受精とマウス卵子へのディーアマウス精子の侵入について  
○福田 芳詔(北里大・獣医畜産)  
M. B. Maddock • M. C. Chang (ウースター実験生物研)
6. (哺乳動物)卵子研究へのE P M Aの利用について .....  
岡田 詔子(東邦大・医)
7. ラット初期受精卵子の形態学的研究 — とくに、スチレン樹脂包埋法の走査型電子顕微鏡への応用 — .....  
○安田 泰久・佐藤 茂(岩手大・農)
8. ラット単為発生誘起に関する研究  
—活性化法とその発育性— .....  
○山田 雅保・内海 恭三・湯原 正高(岡大・農)
9. ラット胚の凍結融解過程における生存性維持の要因について .....  
○内海 恭三・湯原 正高(岡大・農)
10. 牛凍結保存卵成功の1例報告 .....  
金川 弘司(北大・獣医)

第20回 昭和54年4月7日(土) (1979年) 友愛会館(芝) 出席者 81名

1. 卵子の体外受精  
1) ディアマウス卵の体外受精とマウス卵へのディアマウス精子の侵入 ...  
○福田 芳詔(北里大・獣医畜産)  
M. B. Maddock • M. C. Chang (ウースター実験生物研)
- 2) ラットにおける子宮液の体外受精への影響 .....  
三宅 正史・○細井 美彦・丹羽 眞二・入谷 明(京大・農)
- 3) 精子の体外受精、とくに薬物処理精子の受精能について .....  
○山田 雅保・内海 恭三・湯原 正高(岡大・農)  
山田 雅保・星野 崇詔(重井医学研)
- 4) 走査電顕によるマウス体外受精初期過程の観察 .....  
○木村 晶次・豊田 裕(北里大・獣医畜産)
- 5) 人卵の体外受精の現状(特別講演) .....  
岩城 章(東邦大・医)
- 6) 討 論
2. 卵子の凍結保存  
1) ハムスター受精卵の凍結保存の試み .....  
○角田 幸生・相馬 正・杉江 信(農林省・畜試)
- 2) 自然排卵および誘起排卵由来マウス2細胞期胚の凍結保存 .....  
○中瀧 直己・豊田 裕(北里大・獣医畜産)
- 3) 卵子の凍結保存、薬物処理による耐凍性の変化について .....  
○内海 恭三・湯原 正高(岡大・農)
- 4) ラット、家兎桑実期胚の切断(二分離)方法、および切断分離胚の *invitro* 発達、融合、凍結保存に関する研究 .....

○尾川 昭三・長嶋比呂志・関根 保男・榎本 伸・水野 博晶・  
市川 雅一・都築紀代子・林 美智子(明大・農)

### 3. 特別講演

- 1) マイクロサージリーについて ..... 井上 正人(東海大・医)  
2) 卵子の電顕技術について ..... 藤原 達司(慶應大・医)

第21回 昭和55年4月2日(水) (1980年)

全共連ビル

1. 実験動物卵子の腔からの採取について ..... ○矢部 勝弘・小谷 嘉宏・金山 喜一・福井 豊・佐久間勇次(日大・農獣医)
2. ラット子宮内胚の非外科的採取 ..... ○石島 芳郎・富樫 守(東農大)
3. マウス卵子の凍結保存に用いられる耐凍剤の比較 ..... ○葛西孫三郎・丹羽 眞二・入谷 明(京大・農)
4. マウス、ラット、家兎胚(2細胞期、桑実期)の切断分離割球の発達、凍結保存および融合  
(キメラ胚の形成)について ..... ○尾川 昭三・長嶋比呂志・関根 保男・藤倉 朗・  
矢野川正和・山内 篤(明大・農)
5. ラット人工キメラ胚の作成法とその発育法について ..... ○内海 恭三・田渕 肇・守永太賀彦・湯原 正高(岡大・農)
6. PHA-低温処理ラット単為発生胚の着床後の発育について ..... ○山田 雅保(重井医学研)  
内海 恭三・湯原 正高(岡大・農)
7. ハムスター卵子の体外培養に関する検討 ..... ○佐藤 嘉兵・宮重 裕子(日大・農獣医)
8. 発育・発生過程のハムスター卵子におけるCyclic AMPの合成と代謝に関する組織化学的研究 ..... ○新村 末雄・石田 一夫(新潟大・農)
9. 走査電子顕微鏡による豚卵子透明帯の観察 ..... ○本村 昌次・柴田 徳美・田島 淳史・湊 芳明・豊田 裕(北里大・獣医畜産)
10. 牛、豚精子の透明帶除去ハムスター卵子への侵入、とくに摘出したウサギ子宮内における精子の前培養の効果について ..... ○花田 章・永瀬 弘(農水省・畜試)
11. Guinea pig 精子の抗IgG、抗Fabが精子及び体外受精に及ぼす影響 ...  
○岡田 詔子(東邦大・医)  
K. M. Tung (ニューメキシコ大)  
柳町 隆造(ハワイ大)
12. ヒト精子受精能に及ぼす抗精子抗体の影響 ..... ○長谷川昭子・香山 浩二・礒島 善三(兵庫医大)

13. ヒトの体外受精研究の現状と今後の問題について ..... 鈴木 秋悦(慶大・医)  
 14. アメリカ不妊学会に出席して ..... 鈴木 秋悦(慶大・医)

第22回 昭和56年4月25日(土) (1981年) 全共連ビル

1. マーモセット (Common marmoset) 卵胞卵を体外で成熟させる試み ..... ○足達 雅之・横山 峰介(実中研)
2. マウス卵子の成熟に及ぼすイオンの影響 ..... ○岡田 詔子・加藤 守男(東邦大・医)  
佐久間 勇次(日大・農獣医)
3. マウス卵母細胞の活性化に対する  $Ca^{++}$  の関与について ..... ○砂場 一昭・内海 恭三・湯原 正高(岡大・農)  
○山田 雅保(重井医学研)
4. 受精卵の発育性と雌雄性の関係について ..... ○内海 恭三・秋山 靖・湯原 正高(岡大・農)
5. マウス一価透明帯抗体の受精に及ぼす影響 ..... ○角田 幸生・杉江 信(農水省・畜試)  
香山 浩二・磯島 普三(兵庫医大)
6. Ionophore A23187で処理された精子による豚卵子の体外受精について ..... ○豊田 裕・湊 芳明・板垣 佳明・星 雅樹(北里大・獣医畜産)
7. 成熟雌ラットへの LH-RHアナログ投与による誘起排卵卵子の前核形成について ..... ○高橋寿太郎・小野 健一・堀内 俊孝・菅原 七郎・正木 淳二(東北大・農)
8. 穿刺によるハムスター卵とマウス卵の活性化誘起について ..... ○福田 芳詔・高杉 真・豊田 裕(北里大・獣医畜産)
9. ハムスター卵子の成熟と受精卵にみられる卵表層の粘性の変化 ..... ○平尾 幸久(和歌山医大)  
柳町 隆造(ハワイ大・医)
10. 凍結保存マウス卵子の形態学的研究 ..... ○新村 末雄・白石 哲也・石田 一夫(新潟大・農)
11. Zona-free ハムスター卵子を用いた不妊患者精子の受精能力の検討 ..... ○井上 正人・根岸 則武・藤井 明和(東海大・医)
12. 抗精子抗体の初期胚分化に与える影響 ..... ○長谷川昭子・香山 浩二・磯島 普三(兵庫医大)
13. ネコの交尾排卵誘起に関する研究 ..... 山田 均・○矢部 勝弘・金山 喜一・佐藤 嘉兵・佐久間勇次(日大・農獣医)
14. 馬における胚保存の試み ..... ○山本 裕介・小栗 紀彦・堤 義雄・八戸 芳夫(北大・農)
15. ラット子宮内胚の非外科的採取(続報) ..... ○石島 芳郎・前田 普・富樫 守(東農大)

## 特別講演

最近における卵子研究の動向 .....

柳町 隆造(ハワイ大学医学部)

第23回 昭和57年4月1日(木) (1982年)

全共連ビル

1. マウス卵胞卵の成熟に及ぼすCa-ionophoreの効果.....  
○岡田 詔子・加藤 守男(東邦大・医)  
佐久間勇次(日大・農獣医)
2. 透明帯抗原に対するモノクローナル抗体の作製とその応用 .....
- 長谷川昭子・辻 芳之・香山 浩二・磯島 晋三(兵庫医大)
3. 受精の初期過程に関する研究  
—マウス体外受精卵の走査型電子顕微鏡による観察— .....
- 根岸 則武・井上 正人(東海大・医)
4. ナキウサギ(*Ochotona rufescens*)の卵子に関する2、3の観察 .....
- 豊田 裕・大井 善臣(北里大・獣医畜産)
5. 体外培養後の牛卵胞卵子の受精能に関する研究 .....
- 福井 豊・福島 譲之・小野 齊(帯畜大)

## 集中話題

6. 北海道における牛受精卵移植の現状 .....
- 井上 忠恕・金川 弘司(北大・獣医)
7. 新冠種畜牧場における受精卵移植技術の現況 .....
- 斎藤 則夫(農水省新冠種畜牧場)
8. 日高種畜牧場におけるウシ受精卵移植の非手術的移植法と受精卵の培養・保存  
○高橋 芳幸・鈴木 達行(農水省日高種畜牧場)
9. 北海道東部における受精卵移植の現況について .....
- 清家 昇(雪印乳業別海工場)
10. 十勝(乳牛)および襟裳(肉牛)牧場における受精卵移植の現況と問題点について  
○山科 秀也(北海道農業開発公社)
11. 牛の受精卵移植成績および供試後の繁殖成績 .....
- 後藤 太一・清水 明・三角 久雄・萱野 裕是・高橋 徳行・  
野沢日出夫・安藤 三郎・主浜 幸俊(小岩井農牧)
12. ヒツジおよびウシの受精卵移植 .....
- 大竹 通男・吉羽 宣明・渡辺 文男(埼玉畜試)
13. 牛受精卵の凍結保存に関する研究 .....
- 加藤雅通・白井健康・黒田博道・知久幹夫・森 啓明・加藤三郎・入江達彦(静岡畜試)
14. 牛凍結受精卵の頸管経由移植に関する研究、とくにオートフリーザーによる牛胚の耐凍性について .....
- 内海 恒三・藤井 好孝・湯原 正高(岡大・農)  
富永敬一郎・道後 泰治・猪八重 悟(兵庫畜試)  
西村 和彦(大阪農技センター)  
大西 悅男・松山 謙二(大阪酸素工業)

15. 神奈川における受精卵移植の現状 ..... 河田 孝司(神奈川県開業)
16. 脣部切開法による和牛の胚(受精卵)移植 ..... 小林軍次郎(クインズランド大)  
太田 実・菅原 七郎・三浦源三郎(東北大・農)  
○三浦 照生(福島家畜共済)  
金山 喜一・佐久間勇次(日大・農獣医)
- 特別講演
- 卵子のマニプレーション ..... 加藤 淑裕(三菱生命科学研究所)

第24回 昭和58年4月1日(金)(1983年) 全共連ビル

1. PMSGの静脈内投与による家兔およびネコの過排卵誘起の検討 ..... ○遠藤 克・百瀬 正人・高橋 敬一・金山 喜一・佐久間勇次(日大・農獣医)
2. ラット過排卵処理後の排卵数におよぼすペントバルビタールの影響、とくに投与時期について ..... ○利部 聰(山口大・農)
3. スンクス(*suncus murinus*)における排卵、受精ならびに卵の初期発生について ..... ○横山 峰介(実中研)
4. 家兔のカテーテルによる経腔的子宮灌流採卵法およびマウスにおける腔排出胚の綿栓吸着による採取の検討 ..... ○金山 喜一・遠藤 克・佐久間勇次(日大・農獣医)  
矢部 勝弘(埼玉医大)
5. ヒトIVFのための卵採取の経験 ..... ○可世木辰夫(可世木病院)
6. マウス卵巣卵の成熟及び受精能獲得に及ぼすHCG、Estradiol、Progesteroneの影響 ..... ○香山 文美・森田 良子・佐藤 孝道・水野 正彦・坂元 正一(東大・医)
7. マウス受精過程とカルシウムイオン ..... ○佐藤 孝道・香山 文美・森田 良子・水野 正彦・坂元 正一(東大・医)
8. 透明帯除去ハムスター卵子へのヒト精子の侵入機序、走査型電子顕微鏡による経時的観察 ..... ○対木 章・星 和彦・齊藤 晃・桃野耕太郎・京野 広一・  
星合 晃・鈴木 雅洲(東北大・医)  
堀内 俊孝(東北大・農)
9. In Vitroにおける家兎射出精子のcapacitation誘起についての検討 ..... ○渡辺 芳久・木村まどか・佐藤 嘉兵(日大・農獣医)
10. ウサギまたはウシ卵管内におけるウシ卵胞卵子の受精能に関する研究、特に精子処理法の検討 ..... ○福井 豊・福島 譲之・小野 斎(帯畜大)
11. マウス卵の体外受精過程 ..... ○佐藤 孝道・香山 文美・森田 良子・水野 正彦・坂元 正一(東大・医)
12. ハムスター体外受精卵の2細胞期への発生について .....

- 福田 芳詔・大滝 真子・豊田 裕( 北里大・獣医畜産 )
13. マウス卵管へ移植されたハムスター 2細胞期胚の発生成績について .....  
 ○笠井 健吉・茶山 和敏・橋本 肇・佐々木淳寿( 明学大 )
14. ウシとヤギの体外受精 .....  
 ○浜野 光市・堀内 俊孝・宮本 明夫・亀山 賢次・佐々田比呂志・  
     菅原 七郎・正木 淳二( 東北大・農 )  
     情野 正道( 仙台市衛生局 )  
     風間 辰也( 家畜改良事業団盛岡種雄牛センター )
15. ブタ・ヒト透明帯共通抗原に対するモノクローナル抗体によるヒト卵の受精阻害実験  
 ○長谷川昭子・香山 浩二・磯島 晋三( 兵庫医大 )
16. プリッキング法によるマウス胚盤胞へのプラスミドDNA( PBR322 )の導入  
 ○長嶋比呂志( 東大・農牧場 )  
     野村 信夫( 日獸大 )  
     原沢 亮( 理化学研 )
17. キメララットの作成 .....  
 ○亀山 賢次・浜野 光市・堀内 俊孝・菅原 七郎・正木 淳二( 東北大・農 )
18. ゲッ歯類胎盤の血管構築像の検討 特に鋳型SEMの手技について .....  
 ○高橋寿太郎・佐久間 薫・細工藤真理・安田 泰久( 岩手大・農 )
19. 家兔桑実胚の凍結融解後の生存性に及ぼす耐凍剤の影響 .....  
 ○小島 敏之・角田 幸生・小栗 紀彦・相馬 正・杉江 信( 農水省・畜試 )
20. ウシ受精卵の凍結保存法に関する 2、3 の実験 .....  
 ○高橋 芳幸・高倉 宏輔( 農水省・日高種畜場 )
21. 牛胚の凍結保存に関する研究：とくにオートフリーザーによる 0.5 cc ストロー内の植氷について .....  
 ○内海 恒三・保地 真一・湯原 正高( 岡大・農 )  
     富永敬一郎( 兵庫県・畜試 )  
     大竹 通夫・吉羽 宜明( 埼玉県・畜試 )  
     西村 和彦( 大阪府農板センター )  
     松山 謙二( 大阪酸素工業 )  
     鄭 吉生( 韓国・建国大学 )

#### シンポジウム

体外受精 司会 鈴木秋悦

1. 家畜における体外受精 — とくに生体反応 — .....  
 ○今井 裕・入谷 明( 京大・農 )
2. 体外受精の臨床応用 .....  
 星合 昊( 東北大・医 )
3. ヒト精子受精能について .....  
 久保 春海( 東邦大・医 )

## 第25回哺乳動物卵子研究会プログラム

昭和59年4月5日(木) 9:30 ~ 18:00

日本大学会館大講堂 東京都千代田区九段南4-8-24 Tel 03-262-2271

### 一般演題(9:30~12:00)

座長 石島 芳郎(東農大)

#### 1. マウスの反復過排卵誘起に関する研究

— 排卵反応低下の改善に関する検討 — .....

○金山喜一・遠藤 克・佐久間勇次(日大・農獣医)

#### 2. 成熟ラットにおける過排卵処理後の排卵数におよぼすペントバルビタール・ソディウムの影響

— GTH量と排卵数について — .....

利部 聰(山口大・農)

#### 3. 雄ラットの下垂体抽出液によるラットの過排卵誘起 .....

○伊藤 敦・高橋寿太郎・安田泰久(岩手大・農)

座長 石橋 功(山口大・農)

#### 4. FSHによる牛の過排卵処理時の卵巣反応と胚の品質の関係 .....

○塩谷康生 W. C. D. HARE\*(農水省・畜試, カナダ農務省\*)

#### 5. 灌流卵巣による排卵機序の研究 .....

○北井啓勝・鈴木秋悦・Edward E. Wallach・飯塚理八(慶應大・医)

#### 6. ラットの子宮内卵の非外科的採取 .....

○石島芳郎・富樫 守・前田 晋・大庭康貴(東農大)

座長 普原七郎(東北大・農)

#### 7. サイクリング法による哺乳動物卵子の代謝動態解析 .....

○堤 治・矢野 哲・石原 理・石川真木・木下勝之・佐藤和雄・水野正彦・坂元正一(東大・医)

#### 8. 哺乳動物卵子によるステロイド代謝 .....

○佐藤和雄・堤 治・綾部琢哉・北川浩明・高木耕一郎・木下勝之・水野正彦・坂元正一(東大・医)

昭和59年度哺乳動物卵子研究会総会 13:00~13:30

### 一般演題(13:30~18:00)

座長 鈴木秋悦(慶應大・医)

#### 9. マウスおよびラット卵巣卵の成熟過程における顆粒膜細胞と卵の連関についての

電顕的検討 .....

○加賀山哲夫・五味淵秀人・香山文美・森田良子・佐藤孝道・水野正彦・坂元正一(東大・医)

10. ウシ卵子の走査電顕による観察  
 I. 体外成熟卵子への精子の侵入過程 .....  
 ○菅原七郎・浜野光市・亀山賢次・宮本明夫・正木淳二(東北大・農)
11. ヒト体外受精卵の電子顕微鏡による観察.....  
 ○小林善宗・井上正人・金子みつ恵・藤井明和(東海大・医)  
 座長 星 和彦(東北大・医)
12. マウス卵母細胞の体外受精におよぼす培養時間の影響 .....  
 ○藤井好孝・吉岡 保(倉敷成人病センター・医科研)
13. ラット, ハムスター及びマウス初期胚の体外発育におよぼす浸透圧の影響 .....  
 ○橋詰良一・伊藤雅夫(畜産安全研・日大・医)\*
14. ハムスター培養成熟卵の受精能に関する検討 .....  
 ○三浦麗子・窪川優子・倉沢滋明・遠藤芳広・鈴木秋悦・飯塚理八(慶應大・医)  
 座長 豊田 裕(北里大・獣医畜産)
15. ヤギ精子の先体反応の検査について .....  
 ○浜野光市・佐々田比呂志・菅原七郎・正木淳二(東北大・農)
16. 精子の透明帯結合と先体反応について .....  
 ○井上正人・小林善宗・金子みつ恵・藤井明和(東海大・医)
17. カルモデュリン阻害剤W-7 処理ヒト精子先体反応の微細構造 .....  
 ○永江 肇・岩城 章・木下 佐・村上邦夫・黒田 優(東邦大・医)  
 座長 岩城 章(東邦大・医)
18. ラット前核期卵の核移植: とくに紫外線照射による非外科的核除去について .....  
 ○昇 公一・舟橋弘晃・内海恭三・湯原正高(岡山大・農)
19. Mouse Preimplantation Embryoの性質 .....  
 ○上原茂樹・千田 智・八日市谷隆・星合 夏・星 和彦(東北大・医)  
 座長 花田 章(農水省・畜試)
20. 凍結・融解マウス胚の生存性におよぼす胚の発生段階の影響 .....  
 ○宮本 元・石橋武彦(京大・農)
21. 超低温冷凍庫を用いた牛胚の凍結とその成績 .....  
 ○後藤太一・清水 明・三角久雄・安田 出・萱野裕是(小岩井農牧・技術センター)
22. 牛凍結受精卵による受胎例 .....  
 ○早川俊司・遠藤敏明・石田和昭・山口 亮・西村 実(千葉県畜産センター)  
 座長 香山浩二(兵庫医大)
23. モノクロナール抗体作製の試み .....  
 ○角田幸生・中井 裕・田中義夫・杉江 佶(農水省・畜試, 茨城大・農, 農水省・家衛試)\*\*
24. H-Y モノクロナール 抗体によるラット胚の性判定(予報) .....  
 ○佐藤英介・内海恭三・山田雅保\*・湯原正高(岡山大・農, 重井医学研)\*
25. ヒト血中抗卵透明帯抗体様因子の分析 .....  
 ○武田守弘・繁田 実・香山浩二・磯島晋三(兵庫医大)

Proceeding of the 25th Annual Meeting of Japan Society  
for Mammalian Ova Resarch

April 5 1984  
Tokyo Japan

Free Communication

1. Studies on repeated superovulation in mice, --- Improvement on the lowered ovulation response. ---  
KANAYAMA, K., T. ENDO & Y. SAKUMA
2. Effect of sodium pentobarbital on the number of ova shed in superovulation treated adult rat, --- Relationship between dose of GTHs and number of ova shed. --- KAGABU, S.
3. Induction of superovulation in female rats by pituitary extract of male rats. --- ITOH, A., J. TAKAHASHI & Y. YASUDA
4. Superovulation following FSH stimulation in cattle. ---  
SHIOYA, Y. & W. C. D. HARE
5. Studies on the ovulatory process using the perfused rabbit ovary. --- KITAI, H., S. SUZUKI, EDWARD E. WALLACH & R. IIZUKA
6. Non-surgical collection of uterine eggs in the rat. ---  
ISHIJIMA, Y., M. TOGASHI, S. MAEDA & Y. OKUBO
7. Analysis of metabolism in the mammalian oocyte and preimplantation embryos by enzymatic cycling. ---  
TSUTSUMI, O., T. YANO, O. ISHIHARA, K. KINOSHITA, K. SATOH, M. ISHIKAWA, M. MIZUNO & S. SAKAMOTO
8. Steroidogenesis in the mammalian oocyte. --- SATOH, K., O. TSUTSUMI, T. AYABE, H. KITAGAWA, K. TAKAGI, K. KINOSHITA, M. MIZUNO & S. SAKAMOTO
9. Electron microscopic studies on ovarian oocytes during antral follicle development in the mouse and rat. ---  
KAGAYAMA, T., H. GOMIBUCHI, F. KAYAMA, Y. MORITA, K. SATO, M. MIZUNO & S. SAKAMOTO
10. SEM observation on bovine ova, I. Sperm-egg interaction in bovine oocytes matured in vitro. --- SUGAWARA, S., K. HAMANO, K. KAMEYAMA, A. MIYAMOTO & J. MASAKI
11. Ultrastructure of human ova fertilized in vitro: the diagnostic value. --- KOBAYASHI, Y., M. INOUE, M. KANEKO & A. FUJII

12. Effect of culture time of mouse follicular oocytes on fertilization in vitro. --- FUJII, Y. & T. YOSHIOKA
13. Effect of osmotic pressure on development of rat, hamster and mouse ova in the in vitro cultivation. --- HASHIZUME, R. & M. ITOU
14. Fertilizability in vitro matured oocytes from golden hamsters. --- MIURA, R., Y. KUBOKAWA, S. KURASAWA, Y. ENDO, S. SUZUKI & R. IIZUKA
15. Evaluation for acrosome reaction of goat spermatozoa. --- HAMANO, K., H. SASADA, S. SUGAWARA & J. MASAKI
16. Sperm-zona interaction in the mouse, --- Special reference to the time of acrosome reaction. --- INOUE, M., Y. KOBAYASHI, M. KANEKO & A. FUJII
17. Ultrastructural observations of the acrosome reaction in human spermatozoa treated with calmodulin antagonist, W-&. --- NAGAE, T., A. IWAKI, T. KINOSHITA, K. MURAKAMI & M. KURODA
18. Nuclear transplantation into pronuclear-stage rat eggs: Enucleation of eggs by UV-irradiation. --- NOBORI, K., H. FUNABASHI, K. UTSUMI & M. YUHARA
19. The character of mouse preimplantation embryo. --- UEHARA, S. S. CHIDA, T. YOHKAICHIYA, K. HOSHI & H. HOSHIAI
20. Effects of embryonic stages on survival of frozen-thawed mouse embryos. --- MIYAMOTO, H. & T. ISHIBASHI
21. Freezing of bovine embryos in the ultra low temperature refrigerator. --- GOTO, T., A. SHIMIZU, H. MISUMI, I. YASUDA & H. KAYANO
22. Pregnancies by frozen embryos in cattle. --- HAYAKAWA, S., T. ENDO, K. ISHIDA, A. YAMAGUCHI & M. NISHIMURA
23. A trial to produce monoclonal antibodies against H-Y antigen. --- TSUNODA, Y., H. NAKAI, Y. TANAKA & T. SUGIE
24. Sex identification of rat embryos by H-Y monoclonal anti-body [Preliminary]. --- SATO, E., K. UTSUMI, M. YAMADA & M. YUHARA
25. Analysis of an antibody like factor to porcine zona pellucida found in human sera. --- TAKEDA, M., M. SHIGETA, K. KOYAMA & S. ISOJIMA

# マウスの反復過排卵誘起に関する研究

—排卵反応低下の改善に関する検討—

## Studies on Repeated Superovulation in Mice

—Improvement on Lowered Ovulation Response—

金山喜一，遠藤克，佐久間勇次

Kiichi KANAYAMA, Tuyoshi ENDO and

Yuzi SAKUMA

日本大学農獣医学部獣医学科生理学教室

Department of Veterinary Physiology, College of  
Agriculture & Veterinary Medicine, Nihon University,  
Fujisawa 252 Japan

As part of our attempt to counteract the lowered ovulation response in repeated superovulation induced by PMSG-HCG, FSH was used instead of HCG on ddY mice.

Superovulation was induced by subcutaneous injection of 5iu PMSG followed the same unit of HCG or 0.025AU FSH.

In PMSG-HCG group, the ovulation response was found to decrease remarkably at the third induction but in PMSG-FSH group, the Ave. No. of ovulated ova was maintained superovulation level. FSH was effective to induce ovulation for follicle grown by PMSG.

In repeated superovulation with PMSG-HCG, using FSH instead of HCG once or twice improved ovulation response to a certain degree.

**緒言：**過排卵誘起は、性腺刺激ホルモンなどの投与によって人為的に一回の排卵数を増加させる試みであり、実験動物においては研究用卵子を採取するための重要な処置方法である。

しかしながら同一個体に、性腺刺激ホルモンを用いて過排卵処理を反復すると処理回数の増加とともに排卵反応の低下が明らかにされている。著者らは、これまで反復過排卵誘起における排卵反応の低下要因の解析ならびに排卵反応の改善について検討を試みてきた<sup>1)</sup>。

従来、マウスの過排卵誘起は、PMSG の投与によって卵胞を発育させ、ついでHCG を投与することによって排卵を誘起する方法が試みられている。しかし、この処理方法では、過排卵誘起を反復することによって排卵反応の著しい低下が認められる。そこで著者らは、卵胞発育系のホルモンであるFSH の排卵誘起作用に着目し、発育卵胞をFSH によって排卵させる方法で過排卵誘起を反復した結果、排卵反応の低下を改善することができたので報告する。

**方法：**供試動物は、ddY系の未経産マウスで実験開始時に8週齢のものを用いた。過排卵誘起は、マウスの性周期を特に考慮しないで17時にPMSGを皮下投与し、ついで48時間後にHCGあるいはFSHを皮下に投与した。投与量は、PMSGおよびHCGは5iu, FSHは、今道ら<sup>2)</sup>の知見を参考に0.025AUとした。なお、反復処理の間隔は10日間隔とした。排卵検査は、HCGあるいは、FSH投与後24時間目にマウスを開腹し、顕微鏡下で卵管膨大部内の卵子を算定し、これを排卵数とした。

**結果：**PMSG-HCGおよびPMSG-FSHで過排卵処理を一回行なった成績はTable 1に示したとおりである。その結果、両試験区とも30個程度の排卵数が得られた。さらに、この処理方法で過排卵誘起を2回反復した場合においても平均排卵数の著しい低下は認められず、PMSG-FSH処理区における排卵数は1回目と同程度であった(Table 2)。しかし、PMSG-HCGによる過排卵処理を3回反復した試験区においては排卵数は激減し、2回処理区の1/3程度の平均排卵数しか得られず、正常排卵数のレベルであった。一方、PMSG-FSHで過排卵処理を3回反復すると、2回処理区における成績の約半分程度に減少するが、平均20個以上の排卵数が得られた(Table 3)。

次に排卵誘起系ホルモンにHCGとFSHを組み合わせて、過排卵誘起を3回反復した成績はTable 3の第3・4試験区である。第1回目と2回目の過排卵処理にHCGを用い、3回目の処理にFSHを用いることによって、平均排卵数は20個以上となり、HCGを3回用いた試験区の2倍以上の成績であった。また、1回目の処理をHCGで2回目と3回目をFSHで処理すると平均排卵数は28.6個と良好であり、1回目および2回目の排卵数と同等の成績であった。

以上のように、マウスに過排卵誘起を反復する場合、排卵数の低下を防止する一要因として排卵誘起系ホルモンにFSHを用いることが有効であり、3回目までの反復においては、HCGと組み合わせてFSHを用いることにより、平均排卵数の低下を改善できることが示唆された。

**考察：**性腺刺激ホルモンによる過排卵処理を同一個体に反復すると排卵反応が低下することに対する要因は、何人かの研究者によって推察されているが、明確な結論を得るにはいたっていない。PMSG-HCGによる過排卵誘起を反復した場合、これによってもたらされる排卵反応の低下はHCGの反復投与が主要因であるという推察がウサギ<sup>3)</sup>、マウス<sup>4)</sup>を用いた実験でなされている。

また著者らは、マウスを用いてHCGによる誘起排卵を5日間隔で反復した結果、平均排卵数、排卵陽性個体とも3回目から減少を示した。すなわち、マウスの正常性周期とほぼ同じ5日間隔で、しかも正常排卵数の範囲で排卵を誘起する誘起排卵の反復においても排卵反応は低下することが示されている。

このようにHCGの反復投与は卵巣機能に大きな障害をもたらすものと考えられる。

そこで本実験では、HCGに代わる排卵誘起ホルモンにFSHを組み合わせて用いることにより、少なくとも3回目までの反復において排卵反応の低下を、ほぼ完全に防止することができた。3回の過排卵誘起処理において排卵誘起系ホルモンに用いたHCGの使用回数が3回、2回、1回と少なくなるほど、平均排卵数は良好な成績であった。

FSHは、雌性動物においては、卵胞の発育を促進するホルモンであると考えられているが、排卵誘起作用お

Table 1 Ovulation response on superovulation treatment in mice

Treatment	No. of mice examined	No. of mice ovulated (%)	Ave. No. of ova per mice ovulating $\pm$ S.D.	Ave. weight of ovaries $\pm$ S.D. (mg)	Ave. weight of uteri $\pm$ S.D. (mg)
PMSG - HCG	10	10(100)	33.4 $\pm$ 10.0	27.3 $\pm$ 3.8	95.3 $\pm$ 19.4
PMSG - FSH	8	8(100)	28.4 $\pm$ 12.2	20.8 $\pm$ 3.8	101.9 $\pm$ 17.9

Table 2 Ovulation response on repeated superovulation treatment (twice)

Treatment	No. of mice examined	No. of mice ovulated (%)	Ave. No. of ova per mice ovulating $\pm$ S.D.	Ave. weight of ovaries $\pm$ S.D. (mg)	Ave. weight of uteri $\pm$ S.D. (mg)
1	2				
PMSG-HCG, PMSG-HCG	12	11(92)	27.0 $\pm$ 11.0	29.5 $\pm$ 4.9	106.8 $\pm$ 29.5
PMSG-FSH, PMSG-FSH	7	7(100)	28.6 $\pm$ 11.6	27.3 $\pm$ 6.8	117.0 $\pm$ 13.4

Table 3 Ovulation response on repeated superovulation treatment (3 times)

Treatment	No. of mice examined	No. of mice ovulated (%)	Ave. No. of ova per mice ovulating $\pm$ S.D.	Ave. weight of ovaries $\pm$ S.D. (mg)	Ave. weight of uteri $\pm$ S.D. (mg)
1	2	3			
PMSG-HCG, PMSG-HCG, PMSG-HCG	9	4(44)	9.3 $\pm$ 3.1	22.3 $\pm$ 2.4	84.8 $\pm$ 17.5
PMSG-FSH, PMSG-FSH, PMSG-FSH	7	7(100)	20.9 $\pm$ 13.9	28.0 $\pm$ 8.3	114.4 $\pm$ 27.2
PMSG-HCG, PMSG-HCG, PMSG-FSH	7	7(100)	21.9 $\pm$ 11.9	28.3 $\pm$ 6.0	124.6 $\pm$ 23.8
PMSG-HCG, PMSG-FSH, PMSG-FSH	7	7(100)	28.6 $\pm$ 11.6	27.3 $\pm$ 6.8	117.0 $\pm$ 13.4

よび、黄体化作用をも具有していることが報告されている。本実験においても、その排卵誘起能を再確認し、マウスにおいて PMSG 投与により発育した卵胞を排卵に導く、過排卵誘起の排卵誘起系ホルモンとして用いるとのできることが示された。また、過排卵誘起処理における排卵誘起系ホルモンとして、HCG に比べて、その反復性に関してはるかに優れないと結論することができる。

過排卵誘起では1度に多数の卵子が排卵されるので、これを反復すると卵巣内に性腺刺激ホルモンに反応する卵胞が減少するため、排卵反応が低下するという推察<sup>5)</sup>もなされている。しかし、本実験の成績は、過排卵誘起の反復による排卵反応低下の要因は、主としてHCGの反復投与に原因がある<sup>3),4)</sup>とする推察を支持するものといえよう。

本実験によって、マウスの過排卵誘起は、少なくとも3回までの反復では排卵反応が低下しないことが示された。同一個体から、研究用卵子を多數採取する方法として、先に著者らが報告した、経膣的採卵法<sup>6)</sup>を用いれば、マウスを殺さないで卵子の反復回収が可能であると考えられる。

また、さらに、マウスの反復過排卵誘起における卵胞発育系ホルモンにLH-RH, HMG、排卵誘起系ホルモンにLH-RH、などを用いた試験も進行中であり、いずれ報告したい。

#### 主要文献

1. 金山喜一、遠藤 克、佐久間勇次：反復過排卵誘起による排卵反応低下要因の解析—I. マウスの反復誘起排卵における排卵反応、日大農獸報、40, 45~49, 1983
2. 今道友則、江藤禎一：FSHが排卵誘起作用を有する可能性について、家畜繁殖誌、7(4), 159~162, 1962
3. MAURER, P. R., HUNT, W. L. and FOOTE, R. H. : Repeated superovulation following administration of exogenous gonadotrophins in dutch-belted rabbits. J. Reprod. Fert., 15, 93~102, 1968
4. 石島芳郎、小松博道、伊藤雅夫、青山 澄：マウスの過排卵に及ぼすPMSまたはHCGの反復前処理の影響、日不妊会誌、26, 263~266, 1981
5. 杉江 信、相馬 正、福光 進：牛の人工受胎に関する研究、反復多排卵誘起処置について（続報）、日本畜産学会第62回大会要旨、49, 1973
6. 矢部勝弘、金山喜一、浜田光磨、遠藤 克、佐久間勇次：マウスの膣採卵に関する研究、2. エストロジエンとプロスタグランディンF<sub>2α</sub>(PGF<sub>2α</sub>)の併用投与の効果、東京獸畜誌、31(1), 47~52, 1983

成熟ラットにおける過排卵処理後の排卵数におよぼす  
ペントバルビタール・ソディウムの影響  
— GTH量と排卵数について—

Effect of Sodium Pentobarbital on the Number of Ova Shed  
in Superovulation Treated Adult Rat — Relationship  
between Dose of GTHs and Number of Ova Shed

利 部 聰  
KAGABU Satosi

山口大学農学部獣医学科家畜臨床繁殖学教室

Laboratory of Veterinary Reproduction, Faculty  
of Agriculture, Yamaguchi University

New method of superovulation treatment using sodium pentobarbital were examined. All rats employed in this study were of the virgin Wistar-Imamichi strain only 11 weeks of age. They were kept under 14 hour illumination in 24 hour (light on 07:00).

New method of superovulation is PMSG(metestrus)+pentobarbital(proestrus= "critical period")+hCG(estrus), former one is PMSG(metestrus)+hCG(proestrus).

The maximum number of ova shed, about 100, observed in the rats 40 iu PMSG and hCG in new method. While in former one, maximum number were about 43, when injected 50 iu PMSG and hCG.

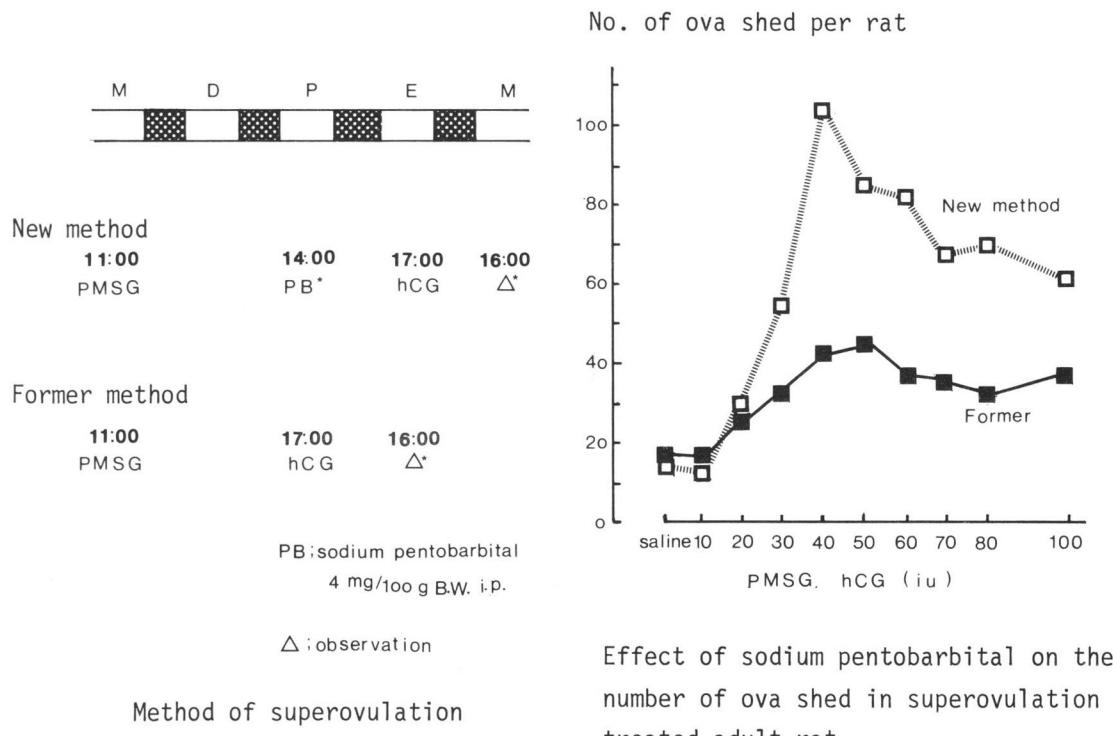
These results suggested that pentobarbital is effective to increase the number of ova shed in PMSG/hCG treated adult rats.

緒論：過排卵処理はGTHの投与によって行われているが、ペントバルビタール・ソディウム(PB)を併用すると排卵数が飛躍的に増加することを明らかにした[1]。1回の処理で出来るだけ多くの卵を得ること、および動物を反復して利用するばあいGTH量は少量であることがのぞましい。本実験ではPBを併用した方法を確立するために、GTH量と排卵数との関連をしらべた。

方法：実験にはWistar-Imamichi系ラットを使用し、人工昼夜(07:00~21:00 照明)下で飼育し正常な4日型発情周期を2回以上繰かえしたものを用いた。過排卵処理後の排卵数は、成熟後でも週齢によって異なるし、変異の大きい時期があるので11週齢のものだけを供試した。過排卵処理法を図に示した。排卵数は卵管膨大部から得た卵をあてた。PMSGはセロトロピン(帝嚢)，hCGはゴナトロピン(帝嚢)を用いた。対照実験としてGTH・PBのかわりに生理食塩液を投与した。実験成績の有意差検定はF-検定によった。

結果：PBを併用した新しい過排卵処理法と、従来の方法との間にはGTHが10~20iuの範囲では差はない

いが、30iu以上になると前者の排卵数が多い ( $P < 0.01 \sim 0.05$ )。PB併用法での排卵数は40iu投与における $101.3 \pm 10.7$  (M±SEM) で最大となり、GTHの増加により減少した ( $P < 0.05$ )。一方従来法における最大値は50iu投与群の $42.7 \pm 6.1$  であった。



考察：PB投与によって排卵数が増加したのは、PMSGによって卵胞発育上の“臨界点”を通過した排卵に至ると考えられる卵胞数は、従来法におけるhCG投与時期（発情前期予定日）に最大となるのではなく、発情予定日に最大となる。しかし最大の時点にhCGを投与してもLH放出後なので、卵胞のLH受容体が減少していると考えられるため排卵数は増加しないと推察した。一方PBでLH放出を抑制すると、卵胞のLH受容体が減少せずに発情予定日までhCGに対する反応性を持続する結果増加したと考えることができる。HUSAIN [2]は、エストラジオール $17-\beta$ を7日間前処理すると2倍の排卵数を得ると報告した。外因性ホルモンに対する脱感作・抗体産生を最少限に抑えるためには、投与量を少くすべきだと考える所以、この点に関しては本法がすぐれている。

#### 主要文献

- 利部聰：成熟ラットにおけるPMSG投与後の大型卵胞の消長ならびに過排卵処理後の排卵数におよぼすペントバルビタールの影響、家畜繁殖誌、29、20～23、1983
- HUSAIN, S. M. : Facilitation of gonadotrophin-induced ovulation in adult rats by estrogens, Rev. Can. Biol., 18, 137～138, 1969

雄ラットの下垂体抽出液による  
ラットの過排卵誘起

Induction of superovulation in female rats  
by pituitary extract of male rats

伊藤 敦・高橋寿太郎・安田泰久

ATSUSHI ITOH, JUTARO TAKAHASHI  
AND YASUHISA YASUDA

岩手大学農学部動物育種学教室

Laboratory of Animal Breeding, Iwate University.

As part of the studies to research the possibility of superpregnancy, the induction of superovulation by administration of the pituitary extract was attempted. Pituitary glands removed from 3-12 months old male rats were homogenized and centrifuged. The supernates were administered to female rats of 28 days old, 3-6 months old and older than 7 months.

1. In all immature rats treated, the age at vaginal opening was advanced. But the timing of the first ovulation was not affected by administration of pituitary extract.

2. In most of 3-6 months old rats ovulated, the number of ova ovulated was more than 20 and the average of them was  $23.9 \pm 12.2$ . On the other hand, in most of rats older than 7 months, the number of ova ovulated was less than 20 and the average of them was  $12.5 \pm 5.5$ .

The pituitary extract acted on ovaries of all rats and promoted the growth of follicles. Especially, in 3-6 months old rats, administration of pituitary extract frequently induced superovulation. But, in older than 7 months and immature rats, superovulation was not induced.

緒言： PMSG や HCG の投与によってラットに過排卵を誘起する研究は、これまで数多く行なわれてきた。しかし、実際に過剰妊娠を引き起こすまでには至っていない。過剰妊娠を誘起する可能性を探るために、下垂体抽出液による過排卵誘発実験を行なった。

方法： 使用したラットは、当研究室で繁殖、育成した Wistar 系ラットで、照明時間を 6 時～18 時とし、 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$  で飼育した。下垂体は、3～12ヶ月齢の雄ラットから採取し、0.5 ml の生理食塩水 (0.85% NaCl) と一緒に試験管に入れて、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。解凍後、ホモゲナイズし、遠心分離 (2500 r. p. m 15 分間) をした上清を下垂体抽出液とした。一個の下垂体から得た抽出液を一匹の雌に投与した。投与する雌ラットは、未成熟、3～6月齢および7ヶ月齢以上の3群に分類した。未成熟ラットには、28日齢の12時～13時に、他の2群のラットには、腔スメラーが発情後期像 (Metestrus) を示した日の同時刻に、下垂体抽出液を頸部皮下に注射

した。未成熟ラットは、毎日腔開口を調べ、開口後は毎日腔スメアーを観察した。未成熟ラットは、投与3～12日後および初めて発情期像 (Estrus) を示した日に、他の2群は、投与3日後の発情期の日にエーテル麻酔後、頸動脈切断によって放血し、と殺した。実体顕微鏡下で、卵管膨大部の卵子数を数えた。さらに子宮と卵巢も摘出して、その重量を測定した。

結果： 下垂体抽出液を投与した未成熟ラットのほとんどで、投与3～4日後 (31～32日齢) に腔開口が認められた。しかし、初回排卵が、早められることはなく、投与12日後でも排卵しない例もあった。また、排卵の確認できた未成熟ラットの初回排卵日齢は、40～52日齢で、排卵数の平均は、 $9.0 \pm 1.2$  であった。排卵をした3～6ヶ月齢ラット (7/12例) のほとんどが、20個以上の排卵数を示し、その平均は、 $23.9 \pm 12.2$  であった。これに対し、排卵をした7ヶ月齢以上のラット (8/13例) では20個以上の排卵数となる例は、ほとんどなく、平均は、 $12.5 \pm 5.5$  と少なかった。3～6ヶ月齢および7ヶ月齢以上のラットで、投与3日後に排卵しない例がかなりの率でみられた。これらのスメアー像はすべて発情期像を示していたが、発情前期に雄と同居させても、交尾することはなかった。また、遅れて投与4日後に排卵をする例もみられた。排卵しなかったラットの卵巢には、多數の卵胞の存在が確認され、子宮に、透明な貯留液がみうけられた。

Table 1. Effect of pituitary extraction administration on superovulatory responses in immature, 3-6 months old and older than 7 months rats.

	Immature	3-6 months old	older than 7 months	
No. of rats examined	14	12		13
No. of rats ovulated	3	7		8
Ave. No. of ova per rat ovulated+S.D.	$9.0 \pm 1.2$	$23.9 \pm 12.2$		$12.5 \pm 5.5$
		not ovulated	ovulated	not ovulated
Ave. weight of ovaries $\pm$ S.D.(mg)	$9.2 \pm *$ 1.9	$28.0 \pm$ 4.3	$30.8 \pm$ 3.8	$30.1 \pm$ 6.1
Ave. weight of uteri $\pm$ S.D.(mg)	$33.7 \pm *$ 17.5	$262.2 \pm$ 50.7	$216.7 \pm$ 78.8	$344.1 \pm$ 59.4
* Data of rats that were sacrificed on 31 days old.				

考察： 本実験において3～6ヶ月齢ラットの排卵数が、通常のラットの排卵数よりも多いことから判断して、下垂体抽出液の投与がPMSGやHCGの投与でみられるように、過排卵を誘起することができるるのは確かである。しかし、排卵数の少ない例や排卵しない例も多く、その効果は確実なものではない。また、卵胞の発育がみられるにもかかわらず排卵しないのは、LHサージの不足や遅延が原因であると思われる。特に、投与4日後まで排卵が遅れた例のあったことから、下垂体抽出液がLHサージの量や時期になんらかの影響を与えていると推測できる。7ヶ月齢以上および未成熟ラットで、あまり過排卵が誘起されないのは、卵巢機能やホルモンに対する感受性などに3～6ヶ月齢ラットと差があると考えられる。Tayaら<sup>1)</sup>は下垂体を未成熟ラットの腎臓近くに移植し、初回排卵時期を早め、過排卵を誘発しているが、今回の実験で、腔開口時期だけが早まり、初回排卵時期や排卵数に影響がみられなかつた原因について、より詳細な検討が必要である。

主要文献 : 1. Taya,K., Mizokawa,T., Matsui,T, and Sasamoto,S : Induction of superovulation in prepubertal female rats by anterior pituitary transplants. J.Reprod.Fert, 69, 265-270, 1983

FSHによる牛の過排卵処理時の卵巣反応と  
胚の品質の関係

Superovulation following FSH stimulation in cattle

塩谷康生\*・W.C.D.HARE

Yasuo SHIOYA and W. C. D. HARE

カナダ農務省家畜疾病研究所

Animal Diseases Research Institute, Agriculture Canada

Sixty two dairy cattle were superovulated using 36mg of FSH beginning on day 10 or 11 of the estrus cycle. Ova were recovered from excised tract 6 or 7 days after estrus. Means of 12.0 ova and 19.8 CL per donor were obtained. A mean of collection rate was 56.2%.

Twenty four heifers were observed the quality of ova and numbers of CL and large follicles on the ovaries. There was a clear-cut trend that the number of follicles remaining on the ovaries badly affected the number and quality of ova recovered.

**緒言：**牛の過排卵誘起には妊馬血清性性腺刺激ホルモン(PMSG)あるいは下垂体性卵胞刺激ホルモン(FSH)が用いられている。一般に過排卵を誘起すると、卵巣反応やその結果生産される胚の品質に大きな変動があることが知られている。牛の受精卵移植では供卵牛あたりの良質胚の少ないことがひとつの大きな制限因子になっている。<sup>1)</sup>

PMSGの筋肉内注射による方法は注射回数が1回で良く、薬品の入手が容易で安価なことから広く応用されている。最近コロラド大学の研究者たちはFSHを漸減的に筋肉注射する方法は反応が安定でかつ得られた胚の品質もすぐれていることから、FSHの使用をすすめている<sup>2)</sup>。PMSGによる方法は手術的な採卵と同時期に行われたために、卵巣の肉眼観察成績と採取胚の品質との関係については多くの報告がある<sup>3)</sup>。一般に発情後6~7日の胚回収時にみられる大きな卵胞は胚の品質に悪い影響を及ぼしていると信じられている。一方FSHによる方法は非手術的な採卵技術とともに利用がすすんできたために、採取胚と肉眼的に観察した卵巣反応の関係についての報告は少ない。

注) \*農林水産省畜産試験場

本報告ではFSHにより過排卵を誘起した後、発情6～7日後に牛をと殺して胚を回収し、胚の数および品質、ならびに卵巢所見とくに黄体や残存卵胞数を明らかにして、これらの関係について調べた成績を報告する。

方法：供試牛は乳用種系の2～4才の雌牛62頭で、これらは過去に過排卵処置を受けたものである。過排卵のためにFSH(Schering Canada Inc. FSH-P)36mgを4日間にわたり、6, 5, 4, 3mgと減少させながら1日2回ずつ筋肉内注射した。投与開始はプロスタグランジンF<sub>2α</sub>(PGF<sub>2α</sub>)類縁物質(ICI Estrumate)を10日間隔で2mlづつ(cloprostenol 500μg)2回投与して発情時期をそろえ、2回目の発情後10日あるいは11日目であった。FSH投与第3日目にPGF<sub>2α</sub>類縁物質を2mlづつ午前と午後に投与して発情を誘起した。交配には人工授精と自然交配を併用した。

62頭中8頭は発情日を0日として7日に、残り54頭は6日にと殺した。と殺後ただちに生殖器全体を摘出し、実験室に持ち帰り、採卵を行った。

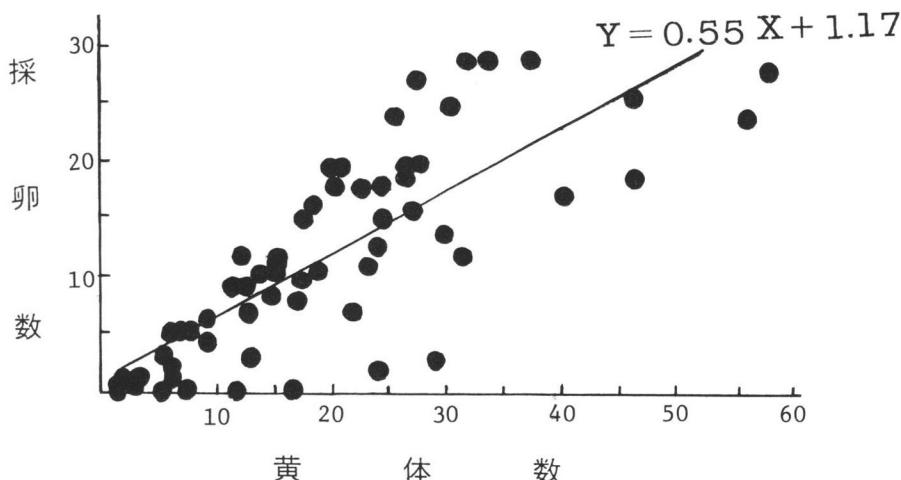
採卵に際しては人体用導尿バルーンカテーテルを子宮角中央部にあけた小孔より挿入し、約10mlの空気でバルーンをふくらませた。洗浄にはリン酸緩衝液(PBS)に子牛血清を2%加えて使用した。最初にPBS 30mlで卵管采方向から卵管と子宮を洗浄後、ついで子宮角先端から子宮をPBS30mlで洗浄した。それぞれの洗浄液は時計皿に集め検査した。

38例では黄体数と採卵数を記録し(Exp.I), 24例では黄体数、直径1cm以上の卵胞数、採卵数及び受精卵数を記録した(Exp. II)。

採卵率は黄体数と採卵数の比率で、受精率は採卵数と受精卵数の比率で示した。Exp. IとExp. IIの62例については黄体数、採卵数及び採卵率との間の相互関係を、データのそろっている24例については各測定値間の相関及び重相関係数を求めた。

結果及び考察：卵巣反応と採卵成績：Exp. Iでは38頭中10頭、Exp. IIでは24頭中2頭が過排卵時許容発情を示

### 黄 体 数 と 採 卵 数 の 関 係



さす、良好な発情を示したものは全体の81%であった。

牛1頭あたりの卵巢上の肉眼的な黄体数は平均19.8個（範囲1～58）、採卵数は12.0個（範囲0～29）であり、採卵率は平均で56.2%であった。黄体数が6個以上の牛の比率は全体の80%であったが、6個以上採卵できた例は全体の13%であった。なお、採卵成績の良好であった例は、31あるいは37個の黄体に対し、採卵数が29個、黄体数58個に対し採卵数28個などの例であった（図1）。

黄体数が1～5個の牛では採卵率が18.7%，6～10個の牛では52.2%と低く、黄体数が11～15あるいは16～20個の牛ではそれぞれ64.1%，70.1%と高い採卵率であった。21個以上の黄体を持っていた牛の採卵率は平均60.2%であった。回収卵数が黄体数より小さいことはよく知られているが、非手術的な採卵の可能な7日あるいは8日よりも早い時期の6日が多数を占める今回の摘出子宮からの採卵率が56%ということは、非手術的採卵の際の1つの指標になるであろう。

卵巢反応と受精率の関係：Exp. IIの卵胞数、黄体数、採卵数及び受精卵数を記録した24例についてみると、卵胞数、採卵数及び受精卵数はそれぞれ黄体数によって区分した群によって差がみられた。黄体数が1～5個と少ない牛において、残存卵胞数も多く、採卵率や受精率も低かった（表1）。

表1 採卵成績に及ぼす黄体数の影響

	黄体数				
	1～5	6～10	11～15	16～20	≥21
雌牛頭数	7	3	4	4	6
1頭あたりの残存卵胞数	5.7	4.7	0.8	1.3	3.5
1頭あたりの採卵数	0.9	3.3	10.8	15.3	20.8
1頭あたりの受精卵数	0.4	1.3	6.0	14.8	10.7
採卵率 (%)	21.4	48.1	80.3	84.0	72.1
受精率 (%)	28.6	58.3	56.6	97.2	51.4

非手術的な採卵の場合でも卵巢反応が良好な牛の場合、採卵率が高いとされ、11個以上の黄体を持っている牛で採卵率が高かったことと一致した。また排卵数が特に多い場合でも胚の品質が低下することはないと思われるが、最大の受精率は黄体数16～20個の群で得られ、黄体数が21個をこえると受精率は低下する傾向を示した。

表2 卵巢反応と採卵成績の相関関係

	平均	残存卵胞数	採卵数	受精卵数	採卵率	受精率
黄体数 (A)	14.7	-0.02	0.88**	0.51**	0.43*	0.16
残存卵胞数	3.5		-0.32	-0.55**	-0.56**	-0.42*
採卵数 (B)	10.2			0.76**	0.72**	0.26
受精卵数 (C)	6.4				0.65**	0.65**
採卵率 (B/A × 100)	57.7%					0.38
受精率 (C/B × 100)	54.1%					

\*\* 1%水準で有意

\* 5%水準で有意

卵巣反応と胚の品質との関係を数量的に把握するために各項目間の相関係数を求めた(表2)。黄体数は受精率を除いて他の胚に関する項目すなわち採卵数、採卵率と有意な正の相関を示した。一方卵胞数は受精卵数、採卵率及び受精率に有意な負の関係であった。

PMSGによる過排卵時に排卵されずに残っている大きな卵胞は採卵率や良い品質胚の数には影響しないという報告もみられるが、本報告の結果は残存卵胞数の増加によって受精率が低下していることを示している。

黄体数及び卵胞数による受精卵数の推定：黄体数、残存卵胞数と採卵数や受精卵数との間の関係を重回帰式にてはめ、以下の式が得られた。

$$Y_1 = 1.17 + 0.55 [CL] \quad r = 0.80 \quad R^2 = 0.64$$

$$Y_1 = 3.63 + 0.63 [CL] - 0.67 [FL] \quad R = 0.93 \quad R^2 = 0.87$$

$$Y_2 = 5.63 + 0.28 [CL] - 0.95 [FL] \quad R = 0.75 \quad R^2 = 0.56$$

$Y_1$  : 採卵数  $Y_2$  : 受精卵数

CL : 黄体数 FL : 残存卵胞数

上の二式は黄体数のみでは採卵数の変動の64%を説明できるにすぎないが、これに卵胞数を加えると、その変動の87%が説明できることを示している。このことは黄体数のみでなく、残存卵胞数も採卵数に大きく関与していることを示している。一方、受精卵数は黄体数と卵胞数を考慮に入れてもその変動の56%しか説明できず、他の要因が大きく関与していることが推察される。

### 主要文献

1. Gordon, I. Synchronization of estrus and superovulation in cattle. In Mammalian Egg Transfer. Ed. C. E. Adams. 1st ed. CRC Press Inc. Florida. pp. 63-80 (1982)
2. Elsden, R. P., Nelson, L.D. and Seidel, G. E. Jr. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotropin. Theriogenology 9:17-26 (1978)
3. Monniaux, D., Chupin, D. and Saumande, J. Superovulatory responses of cattle. Theriogenology 19:13-22 (1981)

Studies on the ovulatory process using the  
perfused rabbit ovary

北井 啓勝、鈴木 秋悦、E.E. Wallach\*、飯塚 理八

Hirokatsu KITAI, Shuetu SUZUKI,  
Edward E. Wallach\* and Rihachi IIZUKA

慶應大学医学部産婦人科学教室  
ペンシルベニア大学医学部産婦人科学教室\*

Dept. of Ob. & Gyn., Keio Univ. Sch. of Med.  
Dept. of Ob. & Gyn., Univ. of Pennsylvania Sch. of Med.\*

Rabbit ovaries were perfused by the tissue culture medium 199 after cannulation into ovarian arteries. The apparatus consists of a roller pump, a perfusion chamber, a reservoir and an oxygenator. The medium was oxygenated with a mixture of 5% CO<sub>2</sub> and 95% O<sub>2</sub> passing through teflon tubing. Relationship between roles of prostaglandin and histamine in the ovulatory process was examined by the perfusion system. Addition of prostaglandin F<sub>2</sub> (100ng/ml) into perfusate caused follicular rupture of perfused ovaries and release of immature ova. Hourly injection of cimetidine(10ug/ml) did not inhibit rupture by prostaglandin. Perfusion of six ovaries with hourly injection of histamine resulted in follicular rupture of five ovaries and release of immature ova. Follicular rupture by histamine was not inhibited by indomethacin(0.5ug/ml). These results suggest that there are separate pathways of prostaglandin and histamine leading to ovulation.

緒言：排卵過程にみられるステロイド合成、卵成熟、卵胞破裂などの現象には、Prostaglandin (PG) Histamine, Norepinephrineなどの関与が報告されているが、これらの相互作用については未知の点が多い。ウサギの卵巣灌流法では、human chorionic gonadotropin 投与後、ステロイド産生、卵成熟、排卵が直接観察でき、また体外排卵を培養後卵管に移植し胎仔への発育も確認されている。

今回の実験では、排卵過程における PG と Histamine の役割の関連について、灌流卵巣を用いて検討を加えた。

方法：New Zealand 系成熟雌ウサギを、最低 3 週間隔離後に用いた。装置はローラー・ポンプ、テフロン小管製の酸素化装置、卵巣容器より成り、Insulin (200IU/l), Heparin (20IU/l), Strepto-

mycin (50mg/1), Penicillin (75mg/1) を加えた組織培養液199を循環させた。流速は 1.5ml/minで、5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub> 混合ガスにて酸素化した。各器具は37°Cに保たれた室内に置かれた。

各ウサギの片側卵巣を control, 対側を実験群とし、6匹で1組の実験とした。第1の実験では、PGF<sub>2α</sub> 100ng/ml を片側卵巣に投与、対側には PGF<sub>2α</sub> に加えて Cimetidine 10μg/ml を PG 投与 30 分前より毎時間投与した。第2の実験では、Histamine 100ng/ml を片側卵巣に投与、対側には、Indomethacin 0.5μg/ml を Histamine 投与前 30 分に加えた。

卵巣は連続的に観察し、PGF<sub>2α</sub> または Histamine 投与時よりの排卵時刻を記録した。12時間の灌流終了後、直径 1.5mm 以上の卵胞を穿刺して卵胞卵を採取した。排卵数と卵胞数の合計を成熟卵胞数とし、排卵数と成熟卵胞数の比を排卵効率 (ovulatory efficiency) とした。

結果：PGF<sub>2α</sub> 100ng/ml の control 群では灌流卵巣はすべて排卵し、排卵効率は 66.2%，排卵卵は卵核胞崩壊 (GVBD) したもの 10.5% で未熟卵が多かった。Cimetidine を加えた実験群では、排卵の抑制、卵の成熟の変化は見られず、排卵時間の延長が観察されたが、有意差は認められなかった。

Histamine 100ng/ml/hour を投与した control 群では、6個中 5 個の卵巣が排卵し、排卵効率は 54.0% であった。Indomethacin を加えると排卵の抑制はないが排卵時間が延長した。

	PG F <sub>2α</sub> (100ng/ml)		Histamine (100ng/ml/hour)	
	control	+Cimetidine (10μg/ml/hour)	control	+Indomethacin (0.5μg/ml)
排卵卵巣／灌流卵巣	6/6	6/6	5/6	4/6
排卵効率 (%)	66.2 ± 13.9	67.2 ± 13.7	54.0 ± 13.7	51.6 ± 20.1
排卵時刻 (時間)	4.88 ± 0.80	6.26 ± 0.83	6.09 ± 0.63	8.09 ± 1.18
排卵卵 GVBD率 (%)	10.5	16.7	36.8	66.7
変性率 (%)	26.3	27.8	42.1	44.4
卵胞卵 GVBD率 (%)	72.7	88.9	76.9	92.3
変性率 (%)	63.6	100	100	92.3
卵巣水分含有率 (%)	84.9 ± 0.78	85.2 ± 0.88	83.4 ± 0.88	81.8 ± 1.41

考察：ゴナドトロピン刺激後卵胞破裂に到る過程において、Histamine が PG を誘導し破裂に到る、PG が Histamine を誘導する、両者が別々に働くという 3 つの可能性が考えられる。H<sub>2</sub> blocker である Cimetidine は PG による排卵を抑制せず、また PG 合成阻害剤である Indomethacin は Histamine による排卵を抑制しなかった。各抑制剤の濃度としては、Histamine または HCG 誘発排卵を抑制する濃度を選択した。以上の結果より PGF<sub>2α</sub> と Histamine が別個の経路で卵胞破裂を起こすことが示唆された。

#### 主要文献

- Lambertsen, C.J., Greenbaum, D.F., Wright, K.H. and Wallach, E.E. : In vitro studies of ovulation in the perfused rabbit ovary. *Fertil. Steril.* 27, 178, 1976.
- Kobayashi, Y., Wright, K.H., Santulli, R., Kitai, H. and Wallach, E.E. Effect of histamine and histamine blockers on the ovulatory process in the in vitro perfused rabbit ovary. *Biol. Reprod.* 28, 385, 1983.

Non-surgical Collection of Uterine Eggs  
in the Rat

石島芳郎・富樫守・前田晋・大塚康貴

Yoshiro ISHIJIMA, Mamoru TOGASHI, Susumu MAEDA  
and Yasutaka OKUBO

東京農業大学家畜繁殖学研究室

Lab. of Animal Reprod., Tokyo University of Agriculture

The non-surgical collection of uterine eggs in rats were examined. The apparatus and methods for uterine flushing was designed as shown A, B and C of Fig.1. Egg recovery was made on 5 days after mating.

By A, B and C of non-surgical techniques, the recovery rates were 34.4, 54.2 and 47.4%, resp., as estimated the number of corpora lutea counted by slaughter after non-surgical collection, rate of remained eggs in the uterus in A, B and C methods were, resp., 43.0, 2.7 and 12.5%.

**緒言：**ラット、マウス、ハムスターなどの実験動物の卵子の採取は、一般には動物をそのつど殺し、摘出した卵管。子宮をかん流する方法が用いられているが、この方法では同一個体の卵子を何度も使用することができない。したがつて、実験動物においても家畜で開発されているような子宮内卵の非外科的採取法があれば便利である。そこで本実験では、ラットの子宮内卵の非外科的採取法について二、三の検討を行なつた。

**方法：**ラットは性周期の規則正しいものを選び、スメアによりⅠ期の夕方5時に雄と同居させ、翌朝スメア中に精子を確認したものののみ、交配後5日目の午前に子宮内卵の回収を行なつた。非外科的採卵にはFig. 1 - A,B,Cに示す3通りの方法を用いた。これらの方法はいずれも両子宮角に実施した。非外科的採卵のあと、雌はと殺し、黄体数を検査すると共に、子宮をかん流し残留卵の回収を試みた。なお、A法とC法の一部は、採卵後そのまま飼育を続け、交配後15日

に開腹検査を行ない妊娠の有無をしらべた。

結果: Table 1 に示すように、大小2本のガラス管を用いたA法の場合は、採卵率34.4%、子宮残留率43.0%で、かなりの率で子宮内に卵が留まっていた。一方、カテーテルを子宮角先端まで入れたB法およびC法の採卵率が54.2%および47.7%とA法より高く、また子宮残留率が2.7%および12.5%とA法よりあきらかに低率を示していた。次にA法とC法において採卵後の子宮残留卵による妊娠の状況をしらべたところ、A法では19例中4例(21.1%)、C法では16例中2例(12.5%)が平均2匹の生存胎児

を有していた。このことは、非外科的採卵をくりかえすためには、子宮内からすべての卵が回収できる方

法が必要なことが示唆された。

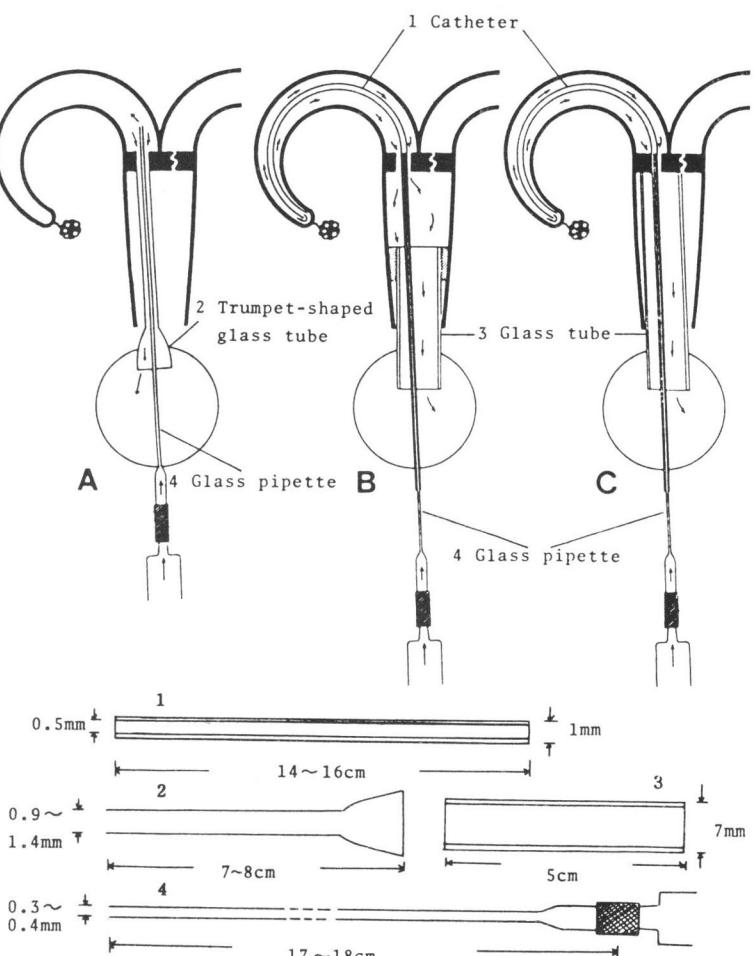


Table 1. The recovery rate of uterine eggs by non-surgery in the rat

Methods	No. of animals	No. of corpora lutea attempted	No. of eggs recovered	%	No. of eggs remained in uterus	%	No. of un-recovery eggs	%
A	15	151	52	34.4	65	43.0	34	22.5
B	31	334	181	54.2	9	2.7	144	43.1
C	18	192	91	47.4	24	12.5	77	40.0

#### 主要文献

- 石島芳郎、富樫守、北島省吾：ラット子宮内卵子の非外科的採取、実験動物、29、355～357、1980

代謝動態解析

Analysis of Metabolism in the Mammalian Oocyte and  
Preimplantation Embryos by Enzymatic Cycling

堤 治, 矢野哲, 石原理, 石川真木, 木下勝之  
佐藤和雄, 水野正彦, 坂元正一

Osamu TSUTSUMI, Tetsu YANO, Osamu ISHIHARA,  
Maki ISHIKAWA, Katsuyuki KINOSHITA, Kazuo SATOH,  
Masahiko MIZUNO and Shoichi SAKAMOTO

東京大学医学部産婦人科教室  
Department of Obstetrics & Gynecology Faculty of Medicine, University of Tokyo

A microassay method sensitive enough to analyse an oocyte was developed using enzymatic cycling for amplifying the reaction product to 10,000-fold. An oil-well technique was applied in the assay for achieving the reaction in the medium as little as 1.0µl.

Oocytes with intact germinal vesicle were obtained by follicular puncture and preimplantation embryos at various stages of development were obtained by reproductive tract flushing. They were freeze-dried and weighed on a quartzfiber fishpole balance (about 24 ng per oocyte).

Hexokinase activity was quite low at the early stages but showed remarkable increase after morulla stage. Oocytes contained high activities of lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase. The activity of LDH decreased during early development while that of MDH remained unchanged.

**緒論：**近年哺乳動物卵子に対する研究の進歩には目ざましいものがあり、体外受精・胚移植の技術はヒトにも応用され不妊症治療の一手段として考えられるに至った。<sup>1)</sup>しかしその成績はまだ自然のものには及ばない。これは培養法の改良あるいは形態学的観察などは進みながら、卵子の内部でおこっている物質代謝の変化については未知であったことにもよると考えられる。エネルギー代謝についてみれば<sup>2)3)</sup>未成熟卵あるいは受精卵でも4細胞期まではglucoseを利用できず、主にpyruvateに依存している。ところが8細胞期以降では活発にglucoseを利用しエネルギー源としている。このように初期発生の過程で代謝動態に大きな変化がおこることは示唆されていたが、卵子が超微量試料であるという方法論的制約により、卵子を直接生化学的に分析することは困難であった。我々は、超微量定量法である酵素的サイクリング<sup>4)</sup>を応用して卵一個を試料とする測定法を開発したのでそれを紹介し、初期胚のエネルギー代謝に関する成績の一部を報告する。

## 方法：

### 1. 実験試料

#### 1) 卵胞卵および受精卵の採取

実験動物にはICR系成熟マウスを用いた。スメアにて発情期像を示す日をday 0とし、オス、メスの同居により交配をおこない、早朝墮胎を確認した日をday 1とした。卵胞卵は、day 0の卵巢をhyaluronidase 0.03%を含むphosphate buffered saline 中で穿刺し、マイクロピペット操作により卵丘細胞を剥離除去して採取した。受精卵はday 1よりday 4までの各日の午後に卵管ないし子宮腔をPBSにてflushingし回収した。

#### 2) 凍結乾燥試料

採取した卵は、PBSで洗滌後実体顕微鏡で観察し、ただちにガラス板上に移し凍結した。このガラス板を耐圧ガラス管内にて-30°C, 0.01mm Hg以下の真空状態に一晩保ち、凍結乾燥をおこなった。

個々の卵は、ミクロ天秤<sup>5)</sup>を用いて乾燥重量の測定をおこなった。ミクロ天秤とは、径約1ミクロンの水晶糸をシリンダー内に固定したもので、自由端に卵をのせ重量によるたわみを実体顕微鏡で観測し測定するものである。感度0.1ngのものを使用したが、必要に応じてさらに高感度のものを作製可能である。

### 2. 実験方法

#### 1) 酵素反応

サイクリングによる測定法の概略を図1左に示した。生化学的反応によって生じた微量の物質をサイクリングによって增幅定量するわけである。

今回測定した、hexokinase, lactate dehydrogenase(LDH), malate dehydrogenase(MDH)の酵素反応液組成はすでに報告した方法によった。<sup>6)</sup>反応液量は1~5μlと微量であるため、oil-well法(図2)を用いた。

図1 サイクリング法による測定とその原理

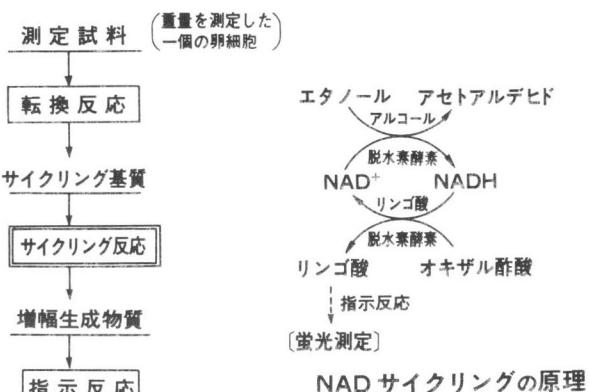
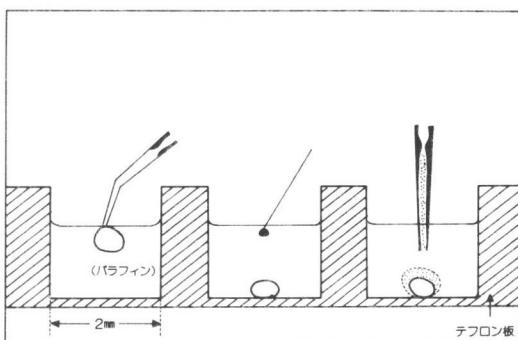


図2 oil-well 法



左：1~5μlの反応液をoil-well中にとる

中：卵細胞を加え反応を開始する

右：NaOH(またはHCl)を加え、反応を停止する

Oil-well とはテフロン板に直径 2 mm 深さ 2 mm の小さな井戸(well)を堀ったもので、その中にパラフィンオイルを満たし反応液をオイル中の小水滴として蒸発を防ぎつつ反応をすすめる一種の試験管である。Oil-well中に投下した卵細胞が反応液に到達することをもって反応開始とし、反応の停止は NaOH または HCl を加え pH を変化されることによっておこなった。

## 2) 酵素的サイクリング

酵素的サイクリングとは、二つの酵素反応を組合わせて  $10^{-15}$  モル以下の物質を測定する方法であり、単一細胞の分析を可能にする超微量分析法である。図 1 右に示した NAD サイクリング<sup>7)</sup> を例に、サイクリング反応の原理を簡単に説明する。過剰量のエタノールとオキザロ酢酸の存在下で NAD<sup>+</sup> (nicotinamide-adenine dinucleotide) はアルコール脱水素酵素により環元され NADH になる。この NADH はリンゴ酸脱水素酵素により酸化されて再び NAD<sup>+</sup> にもどる。このサイクリックな反応 1 回で NAD と等量のリンゴ酸が生成される。従ってこの反応を 10,000 回繰りかえせば、元の NAD の化学量論的に 10,000 倍のリンゴ酸が蓄積される。反応停止後、リンゴ酸を定量し NAD<sup>+</sup> の正確な増幅値を測定する。増幅されたサイクリング反応生成をもう一度サイクリング、すなわち二重サイクリングを行なえば  $10^{-20}$  モル程度まで感度をあげることも可能である。

## 結果：

### 1. 卵の状態と乾燥重量

卵胞卵 (day 0) は germinal vesicle の存在をもって未成熟と判定したが、乾燥重量は  $23.9 \pm 1.4$  ng (mean  $\pm$  S.D. n= 5 以下同様) であった。day 1 および day 2 では、実精卵は卵管より回収され、それぞれ 1 細胞期および 2 細胞期で、乾燥重量は、 $24.1 \pm 1.9$  ng と  $23.6 \pm 1.9$  ng であった。day 3 では卵管および子宮卵管角の部分より 8 ないし 16 細胞の桑実胚が回収され、重量は  $24.3 \pm 2.3$  ng であった。day 4 では

図 3 Hexokinase 活性変化

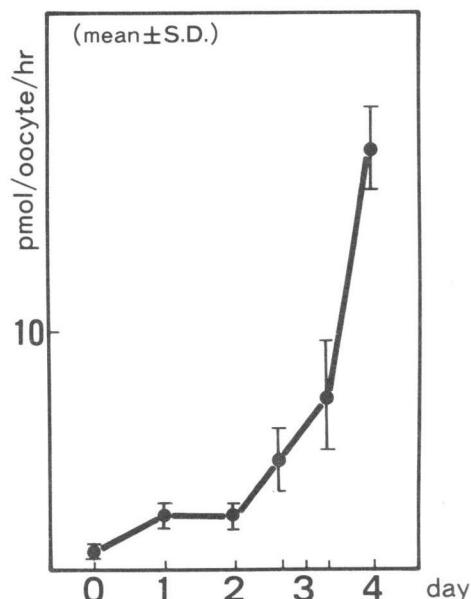
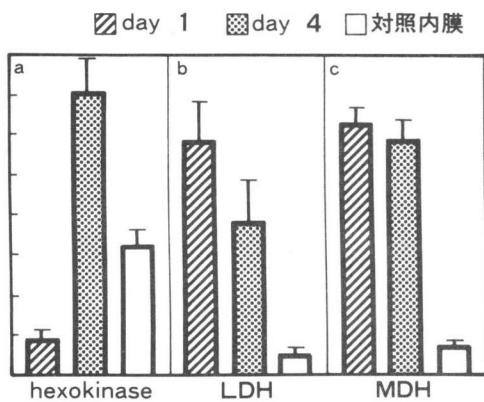


図 4 酶活性の比較 (mean  $\pm$  S.D.)



子宮腔内より胞胚が回収された。この胞胚はすべてハッチング前の状態で、乾燥重量は  $25.2 \pm 3.3$  ng であった。day 2 で最小値を示し以後増加傾向を示したが、各群の間に有意の差は認められなかった。

## 2. 酵素活性

### 1) hexokinase 活性

day 0 卵胞卵の hexokinase 活性は、 $0.52 \times 10^{-12}$  mol/oocyte/hr すなわち  $21.7 \pm 10.8 \times 10^{-9}$  mol/mg dry weight/hr (mean  $\pm$  S.D. 以下同様) であり同一条件で測定した増殖期子宮内膜の活性 ( $327 \pm 33.0 \times 10^{-9}$ ) 10%以下の値であった。day 1 の受精卵では day 0 に比較して有意の活性上昇 (t検定にて  $P < 0.01$ ) を示し、 $86.5 \pm 23.9 \times 10^{-9}$  となった。day 2 の 2 細胞は、day 1 と変化なく、 $93.1 \pm 24.4 \times 10^{-9}$  であった。day 3 の 8~16 細胞では上昇 ( $P < 0.01$ ) し、 $246 \pm 106 \times 10^{-9}$  で、他の組織と同じレベルになった。day 4 の blastocyst ではさらに高い活性を示し、 $709 \pm 88 \times 10^{-9}$  となった。この活性上昇は day 3 に比較し有意 ( $P < 0.01$ ) である。また day 3 で、8 細胞と 16 細胞を比較すると、それぞれ、 $191 \pm 92$ ,  $301 \pm 105$  でこの時期での活性増加が著明であった。図 3 には卵 1 個あたりの活性を示し、図 4a には乾燥重量あたりの活性を示した。

### 2) LDH および MDH 活性

LDH 活性 ( $10^{-6}$  mol/mg dry weight/min) は day 1 の受精卵で  $2.36 \pm 0.23$  (mean  $\pm$  S.D. 以下同様) であるが、day 4 の胞胚では  $1.54 \pm 0.38$  と低下を示す。しかし両者ともに対照子宮内膜 ( $166 \pm 20$ ) に比べると活性は極めて大である (図 4b)。MDH 活性 ( $10^{-9}$  mol/mg dry weight/min) は day 1 受精卵で  $915 \pm 45$  に対して day 4 の胞胚では  $848 \pm 65$  と変化を認めなかった。対照内膜の活性  $132 \pm 11$  に比べて大である (図 4c)。

**考察：**マウス卵は初期発生の過程で約 24 ng で著明な重量変化は示さなかった。これは、卵割がすすむたびに卵の 1 個 1 個の大きさが半減していくことを示して興味深い。いづれにしても、1 mg の試料を得るには 4 万個以上の卵を必要とし、サイクリング法による增幅定量が必須であると理解される。また、乾燥重量の測定は代謝活性測定にあたり specific activity の算出に必要であり、これにより各時期あるいは、他組織、他種の卵との比較が可能である。

先に述べたように、早い時期の卵は、glucose をエネルギー源として利用できない。glucose をリン酸化して解糖系へとりこむ役割をもつ hexokinase 活性が他組織における活性の 10% 以下と極めて低いことは、その原因を生化学的に究明したことになる。

活性変化をみると、day 0 と day 1 および day 2 から day 3, day 4 にかけて活性上昇がみられる。前の活性上昇の要因としては、LH 刺激、排卵受精等が考えられるが、我々のラット卵の成績では、in vivo に hCG を投与したところ hexokinase 活性が上昇した<sup>5)</sup>こと、受精前後で  $O_2$  消費率が変わらないこと<sup>8)</sup>より、LH 刺激により卵が成熟することに関連しているものと考えられる。しかし、day 1, day 2 の hexokinase 活性は組織レベルに達せず、glucose はまだ十分に利用されないと理解される。

day 3 以降 hexokinase 活性は急激に上昇し day 4 で peak に達する。day 3 の 8 細胞卵は、培養実験からも glucose 依存性になる時期であり、hexokinase 活性が他組織同様に glucose 利用の域値に達したためと解釈できる。blastocyst は他組織レベルの 2~3 倍、卵胞卵の 30 倍以上の活性を有することになる。酸素消費率から

見ても、blastocystは高い呼吸能があることが報告されており、着床前の胚は極めて活発にglucoseを利用できる。合目的的に理解すれば、着床における細胞接着に備えて胚が高いエネルギーを蓄えていると考えられる。

LDHは解糖系の末端に位置し、酸素供給が不十分な嫌気的条件下でpyruvateを還元しエネルギーを供給する。MDHはTCA cycle (Krebs回路) の酵素であり、糖はTCA cycleを通り好気的条件下で大きなエネルギーを产生し、H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>までに代謝される。これら酵素活性が高いことは、卵自身がpyruvate等の基質を活発に利用して、自力でエネルギー產生をおこなっていることを示すものであろう。初期発生がすすむにつれて、LDHの活性は低下していくが、これは相対的に好気的代謝が活発になっていくものと考えられる。

このように卵は初期発生の過程で生化学的に著明な変化がおこることがわかった。たった24 ng位の卵を舞台に様々なanabolic, catabolicなprocessが進行しているわけである。卵は受精をへて着床に至るまで母体血行との直接的接触はなく、いわゆる“free-living”の状態でreproductive tract内を浮遊する。そこで、卵の中でおこる変化を制御するものは何かという問題が興味をそそる。我々はその1つとしてステロイドホルモンの関与を考え、それを究明する手段として、サイクリング法によるステロイド代謝動能解析法を考案し<sup>9)</sup>、マウス卵にもステロイド産生能があることを証明している。<sup>10)</sup>これらを含めて、卵子そのものの内分泌代謝活動の解明をさらにすすめなければならないと考えている。

#### 文献：

- 1) Steptoe, P.C. and Edwards, R.G.: Birth after the reimplantation of a human embryo. Lancet, 2: 366, 1978
- 2) 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.
- 3) 堤 治, 佐藤和雄, 木下勝之, 坂元正一: エネルギー代謝からみた卵細胞の物質代謝, 臨婦産, 36: 627, 1982
- 4) 堤 治, 佐藤和雄, 坂元正一, 加藤尚彦: 酵素的サイクリングによる超微量分析法の産婦人科領域における応用, 臨婦産, 34: 653, 1980
- 5) Lowry, O.H. and Passoneau, J.V. : A flexible system of enzymatic analysis. Academic Press, New York 1972
- 6) 堤 治, 佐藤和雄, 坂元正一: サイクリング法による卵細胞エネルギー代謝動態に関する研究 日産婦誌, 34: 1755, 1982
- 7) Kato, T. and Lowry, O.H.: An enzymatic cycling method for nicotinamide-adenine dinucleotide with malic and alcohol dehydrogenase. Anal. Biochem. 53: 86, 1973
- 8) Mills, R. and Brinster, R.L.: Oxygen consumption of preimplantation mouse embryos. Expl. Cell Res. 47: 337, 1967.
- 9) 堤 治, 佐藤和雄, 坂元正一: 卵細胞のステロイド代謝動態に関する研究, 日内分泌会誌, 58: 1321, 1982
- 10) Tsutsumi, O., Satoh, K., Kinoshita, K., Ishihara, O., Yano, T., Mizuno, M. and Sakamoto, S.: Quantitative analysis of steroidogenesis in the single oocyte and the embryo. Proceedings of 11th Congress of Fertility and Sterility (in press)



# 強いおなかが 育つのはじまり。

森永BFドライミルクは乳児栄養の理想である母乳の優れた点を追究し、各種栄養素の量・質・バランスの改善ばかりでなく、乳児の感染防御に關係の深い腸内菌叢の改良をはかりビフィズス菌を増殖させた点でより一層母乳に近づいたミルクです。

## ●ビフィズス菌が増えやすく母乳栄養児の腸内

### 菌叢に更に近づきました。

- ラクチュロースを始めビフィズス菌増殖因子を増強  
ビフィズス菌の腸内での増殖にきわめて有効なラクチュロースを調乳液100mlあたり65mg配合した他、ムチン・ノントテン酸・シスチン・マルトリオースなどの増殖因子を配合してあります。
- ビフィズス菌が増殖しやすいよう腸内環境を整備  
腸内菌叢の形成と関係の深い緩衝能・pH・浸透圧を母乳に近づけるため、たんぱく質濃度やリン含量を減少し、ミネラルバランスを調整しました。  
これらの改良の結果、従来よりも更にビフィズス菌が増えやすくなり、腸内のpHを下げると共に高いリゾチーム活性を維持して病原菌や有害菌の増殖を抑制します。

## ●各栄養素間のバランスを母乳に近づけました。

- たんぱく質の改善  
カゼインと乳清たんぱく質の比を40:60と母乳と同じにしました。
- 必須脂肪酸の増強  
リノール酸だけでなく、リノレン酸も増強し必須脂肪酸のエネルギー比を母乳に近づけました。
- 腎溶質負荷の軽減  
たんぱく質濃度の減少、およびミネラルバランスの調整により腎臓にかかる負担を減らしました。
- ビタミンKの増強  
FAO/WHO規格値(100kcalあたり4μg)を満たすようビタミンK含量を増強しました。

## ●消化吸収性も改善されました。

- たんぱく質  
乳清たんぱく質の増強と含量の調整により胃の中でやわらかい微細なカードを形成し消化吸収されやすくなっています。
- 脂肪  
消化吸収されにくいパルミチン酸とステアリン酸の比率を減少しました。

## ●便性もさらに母乳栄養児に近づきました。

- 森永BFドライミルクではビフィズス菌優位の菌叢が形成されやすいので、色もにおいも母乳便に近いほどよいやわらかさの便性です。また排便回数も母乳栄養児とほぼ同じになりました。

新製品

森永BFドライミルク

森永BFドライミルクのBFはBifidus Factor(ビフィズス菌を増やす因子)の意味です。



## Steroidogenesis in the Mammalian Oocyte

佐藤和雄・堤 治・綾部琢哉・北川浩明・高木耕一郎・木下勝之・  
水野正彦・坂元正一

Kazuo SATOH, Osamu TSUTSUMI, Takuya AYABE, Hiroaki KITAGAWA,  
Kouichiro TAKAGI, Katsuyuki KINOSHITA, Masahiko MIZUNO and Shoichi SAKAMOTO

東京大学医学部産科婦人科学教室

Department of Obstetrics & Gynecology Faculty of Medicine, University of Tokyo

In order to investigate steroidogenesis in the mammalian oocytes, rat oocytes superovulated with PMS-hCG were cultured in mBWW medium with  $^3\text{H}$ -pregnenolone at 37°C for 24 hrs. The radioactive metabolites were extracted and purified by three successive TLCs. Tritiated progesterone ( $\text{P}_4$ ) (conversion rate 62.9%) and  $20\alpha\text{OHP}_4$  (6.5%) were identified using the reverse isotope dilution method. The present study confirmed our previous report that  $3\beta\text{HSD}$  was present in the rat oocyte and the significance of  $\text{P}_4$  in oocyte maturation.

**緒言：**ステロイドホルモンは卵の成熟分化および受精着床に必要とされており、着床前の家兎胚にはステロイド産生能のあることが報告されている。<sup>1)</sup>しかし受精前の卵にその代謝活性があるか否かは必ずしも明確に証明されていない。本研究では  $^3\text{H}$ -pregnenolone ( $\text{P}_5$ ) を用い progesterone ( $\text{P}_4$ ) への転換を reverse isotope dilution 法で明らかにした。

**方法：**Wistar 系ラット (25日齢) に PMS (10iu), 48時間後に hCG (30iu) を皮下注入過排卵を起した。hCG 投与 16 時間後に卵管膨大部より卵を採取、卵丘細胞を除去し試料とした。卵 (140個) を mBWW 100  $\mu\ell$  中に入れ、基質として  $7-^3\text{H}-\text{P}_5$  ( $3.14 \times 10^6$  DPM, S.A. 19.3 Ci / mmol) を添加した。5% CO<sub>2</sub> + 95% air, 37°C, 24 時間培養し、卵と培養液を分離し、それぞれに 2倍量のジクロルメタンを加え反応を終了させた。反応生成物をジクロルメタン 2 ml で 3回抽出し、TLC にて分離精製した。分離溶媒系は I. イソプロピルエーテル : 石油エーテル : 酢酸 (70 : 30 : 2), II. ベンゼン : アセトン (1 : 1), III. クロロホルム : エタノール (9 : 1)

IV. 酢酸エチル：シクロヘキサン(1:1)を順次4回用い、それぞれの放射能ピークを純化した。P<sub>4</sub>の同定には reverse isotope dilution 法を用い<sup>14</sup>C-P<sub>4</sub>を添加し各TLCの段階での<sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C比が一定になることで行った。

**結果：**抽出回収された放射能は培養液  $2.45 \times 10^6$  DPM(回収率 78.0%), 卵  $2.0 \times 10^3$  DPM(0.64%)で99.2%が培養液中にあり、0.8%が卵に取り込まれていた。培養液より抽出された放射能をTLCで分離すると3つのピークがえられ、中間の極性をも代謝物がP<sub>4</sub>として同定され(表1)，その転換率は6.2%であった。

表1 Reverse isotope dilution 法によるP<sub>4</sub>の同定(<sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C比)

TLC	II	III	IV
培養液	0.293	0.284	0.279

極性の小さいピークは基質のP<sub>5</sub>に一致し、極性の大きいピークは $20\alpha$ OHP<sub>4</sub>(転換率6.5%)と一致した。

卵より抽出された放射能は培養液と同様に分離純化され、P<sub>4</sub>(転換率46.2%),  $20\alpha$ OHP<sub>4</sub>(12.8%)と同定された。

**考察：**本研究によって卵細胞がP<sub>5</sub>を取り込みP<sub>4</sub>に転換し培養液中に放出することが明らかにされた。既に我々は酵素的サイクリング法を用いてP<sub>5</sub>を基質として働く $3\beta$ OH steroid dehydrogenase( $3\beta$ HSD)<sup>2)</sup>活性が未受精卵にもあることを報告しているが、本成績はそれを確認するとともにその酵素がin situで働いていることを証明したことになる。これまでステロイド産生は卵巣、精巣、副腎皮質、胎盤に限られると考えられていたが、卵もステロイド産生臓器に入れられるべきであることを示した。P<sub>4</sub>は両生類卵では成熟分化の誘導物質であり<sup>3)</sup>、哺乳類卵でのそのような作用を指摘する報告もある。また卵の $3\beta$ HSDはLH刺激後活性が上昇するとの我々の成績を考慮すると卵自身がP<sub>4</sub>を産生するとの成績は卵の成熟分化におけるP<sub>4</sub>の意義をより明らかにしたといえる。

## 文 献

- 1) Dickmann, Z., Dey, S. K. & Gupta : Steroidogenesis in rabbit preimplantation embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72 : 298-300, 1975
- 2) 堤治, 佐藤和雄, 坂元正一: 卵細胞のステロイド代謝動態に関する研究。日内誌 58 : 1321-1332, 1982
- 3) Maller, J. L. : Interaction of steroids with cyclic nucleotide system in amphibian oocytes. Adv. in Cyclic Nucleotide Research 15 : 295-336, 1983

マウス及びラット卵巣卵の成熟過程における顆粒膜

細胞と卵の連関についての電顕的検討

Electron microscopic studies on ovarian oocytes during antral follicle development in the mouse and rat

加賀山哲夫, 五味淵秀人, 香山文美, 森田良子, 佐藤孝道, 水野正彦, 坂元正一

Tetsuo KAGAYAMA, Hideto GOMIBUCHI, Fumiyoishi KAYAMA,  
Yoshiko MORITA, Kodo SATO, Masahiko MIZUNO, Shoichi SAKAMOTO

東京大学医学部産婦人科学教室

Department of Obstetrics & Gynecology, University of Tokyo.

Abstract: Two experiments were carried out to study the maturation process of ovarian oocytes during antral follicle development.

(1) Ovarian oocytes of immature mice administered PMS and HCG at 40 hours interval were observed under an electron microscope every 2 hours after HCG injection.

At the time of HCG injection, numerous processes from cumulus cells were observed to extend into zona pellucida and to make contact with vitelline surface.

The number of processes from cumulus cells started to reduce between 2 and 4 hours after the injection of HCG. Perivitelline space was formed in 4 hours, the number of microvilli at the vitelline surface reduced in 8 hours, and the number of cortical granules increased in 10 hours after the HCG injection.

(2) Ovarian oocytes of Wister rats with regular 4-day cycle were observed under an electron microscope every 2 hours starting at 2 p.m. on the day of proestrus.

Reduction of the number of processes from cumulus cells in the zona pellucida started at 10 p.m. on the day of proestrus. The number of microvilli at vitelline surface started to reduce at 6 p.m., perivitelline space started to be formed at 8 p.m., and the number of cortical granules was increased at 10 p.m. on the day of proestrus.

緒言：卵と卵丘細胞は密接に関連して卵・卵胞の成熟に重要な役割を果すと考えられているが、LH surge 後の変化については、未解明の点が多い。そこで、マウス及びラットを用い、卵と卵丘細胞

の関連を透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて観察した。

方法：(実験 I ) PMS 及び HCG 各 5 IUを40時間間隔で投与した 24-27日令の ICR 幼若マウスから HCG 投与前、及び HCG 投与後 2 時間毎に 10 時間までの卵胞および排卵後の卵管卵を採取し、TEM にて観察した。

(実験 II ) 規則的に 4 日性周期を持つことを確認したウィスター系成熟雌ラットの卵胞を proestrus の午後 2 時から翌日の午前 2 時まで 2 時間毎に採取し、TEM により観察した。

結果：(実験 II ) HCG 投与前及び HCG 投与 2 時間の成熟卵胞では、卵丘細胞は、透明層周囲に間隙なく配列し、相互に密に接觸している。卵丘細胞からのびた突起は、透明層を貫いて卵表面と接觸している。この突起には、微細器官を含むものと含まないものがあり、細いもので幅 0.1 μ 程度である。また卵腔は存在せず、無数の微絨毛が透明層の中に伸びている。HCG 投与 4 時間目には、卵腔が形成されると同時に卵丘細胞と透明層の間にも部分的な間隙が生じはじめ、透明層を貫く卵丘細胞の突起は減少する。この突起数は HCG 投与 6 時間後には著明に減少し、光頭では、卵丘細胞が水滴状に離散するのが観察される。8 時間后になると、卵表面の微絨毛は減少し、表面は波状となる。10 時間にすると 0.3 μ 程度の表層顆粒が卵表面に多数認められる。

(実験 II ) Diestrus 及び第一極体形成前の成熟卵胞では、卵丘細胞からのびた突起が、透明層を貫いて卵表面と接觸しているのが観察される。Proestrus の日の午後 6 時から卵の微絨毛は減少しはじめ、午後 8 時には、卵腔が形成されはじめ、卵丘細胞間に間隙が見られるようになる。又卵微絨毛は、さらに減少するのが観察される。午後 10 時-12 時頃には、第一極体が形成されるが、ほぼ一致して卵腔はさらに広がり、卵丘細胞どうしはさらに離れ、光頭レベルでは、卵丘細胞が水滴状に離散するのが観察される。卵丘細胞からの突起が減少するのが観察されるのは、ラットではこの時間になってからであった。又表層顆粒の増加も第一極体の放出される時間にはほぼ一致して観察された。

考察：卵丘細胞と卵の形態的連関を経時的に観察し、マウスの実験では、減数分裂の再開する HCG 投与 2-4 時間目にはほぼ一致して卵丘細胞からの突起が減少しはじめることを、ラットの実験では、第一極体放出の時期に卵丘細胞突起が減少することを明らかにした。又、マウス、ラットともに表層顆粒の増加は卵が受精能を獲得する第一極体放出の時期に一致していることを明らかにした。

1. Louse Odor. D. Electron microscopic studies on ovarian oocytes and unfertilized tubal ova in the rat. J. Biophysic. and Biochem. Cytol. 7, 3: 567, 1960.
2. L. Zamboni. Fine Morphology of the Follicle Wall and Follicle Cell-Oocyte Association. Biology of reproduction. 10: 125, 1974.
3. L. Zamboni, R.S. Thompson, D. Moore Smith. Fine morphology of human oocyte maturation in vitro. Biology of reproduction 7: 425, 1972.
4. L. Zamboni. Ultrastructure of mammalian oocyte and ova. Biology of reproduction supplement. 2: 44, 1970.
5. L. Zamboni, L. Mastrianni. Electron microscopic studies on rabbit ova. J. ultrastructure research. 14: 95, 1966.
6. M. Baca, L. Zamboni. The fine structure of human follicular oocytes. J. ultrastructure research 19: 354, 1967.

SFM observation on bovine ova  
I. Sperm-egg interaction in  
oocytes matured in vitro.

ウシ卵子の走査電顕による観察

I. 体外成熟卵子への精子の侵入過程

Sugawara, S., Hamano, K., Kameyama, K., Miyamoto, A. & J. Masaki

菅原七郎, 浜野光市, 亀山賢次, 宮本明夫, 正木淳二

Laboratory of Animal Reproduction, Department of Animal Science,  
Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai, Japan

東北大学農学部家畜繁殖学教室

要約

体外成熟させたウシ卵胞内卵子に体外受精を行ない受精過程における精子の侵入過程を走査電顕により観察した。ウシ精子の透明帯への侵入はウサギの場合と同じ過程をとること, および精子侵入後の卵細胞膜の変化が観察された。

Abstracts. Sperm-egg interaction during fertilization was investigated by the electron microscopic procedure(SEM) in bovine oocytes matured and fertilized in vitro. The electron micrograms showed a important features for fertilization in bovine ova and suggested a possible mechanisms for sperm penetration into the zona.

In mammals, sperm penetration through zona pellucida during fertilization involves three major events: that is (a) sperm capacitation and site of acrosome reaction, (b) sperm-egg interaction, i.e. attachment and binding of sperm to the zona pellucida and (c) spermatozoon passing through the zona.

These events have been intensively studied by many investigators using a variety of the techniques, and the reports demonstrated that a number of important features for fertilization had been disclosed<sup>1)</sup>.

However, information on site of acrosome reaction of capacitated sperm, interaction of the spermatozoon with the zona and a mode of sperm penetration is still not clear.

Also, there is no information by scanning electron microscope(SEM) on ultrastructure of bovine oocytes before and after the sperm penetration and the sperm-egg interaction during fertilization, although transmission electron microscopy has been applied in studies on follicular oocytes<sup>2,3,4)</sup>, fertilization and early development of cow ova<sup>5)</sup>.

We had reported by SEM observation in mammals that an initiation of sperm-egg interaction concerning especially with attachment and binding of sperm to the zona and a mode of spermatozoon passing through the zona were different from species to species, and it was suggested that the difference in a penetrating mode of the spermatozoon depended on the shape of sperm head<sup>6)</sup>.

The present experiment was undertaken to elucidate the sperm-egg interaction in bovine oocytes matured in vitro, using technique of fertilization in vitro and SEM procedure.

Materials and Methods

Preparation for oocytes and spermatozoa. Oocytes collection and preculture

for maturation were conducted by the method reported by authors<sup>7)</sup>. Sperm capacitation and in vitro fertilization were performed with the procedures used for our studies on the fertilization in vitro of bovine oocytes.

Estimation of spermatozoa bound to zona pellucida. At 1 hour after co-culture, oocytes-sperm complexes were transferred to saline and cumulus-sperm complexes were removed from ova with treatment of 0.2% Na-citrate solution for 3 minutes. The ova were rinsed twice with saline and prepared to examine for binding of spermatozoon remained attached even after treatment of Na-citrate and twice washings.

Preparation for SEM examination. Bovine oocytes were picked up from the droplet of the incubation medium containing sperm-egg complexes at 3, 5 and 20 hrs after insemination and cumulus oophorus-sperm complex was removed with mechanical or 0.2M Na-citrate treatment, and cumuli-free ova were immediately fixed for 12 to 24 hours in 2.5% glutaraldehyde buffered with 0.2M phosphate (pH=7.2) at 4°C.

Fixed ova were washed twice with 0.2M phosphate buffer and stored in the buffer at 4°C until critical-point drying was performed.

Dehydration and critical-point drying for ova were performed with the special container described by us<sup>8)</sup>. The ova were washed several times by distilled water, and then transferred into the container and dehydrated through a graded series of ethanol to isoamyl acetate.

The container with ova was transferred to apparatus for drying and critical point dried with CO<sub>2</sub> in a Hitachi HCP-I critical point drying apparatus.

The dried ova were mounted on nickel stub and coated with gold in a Hummer sputtering coater, and examined for sperm-egg interaction with Hitachi S-700 scanning electron microscope operated at 20KV.

### Results

Structure of bovine oocytes. Cumulus oocyte complexes observed immediately after isolation from the follicles of 2 to 6 mm in diameter were compact(plate 1-1) and expanded extensively follicular cells during pre-culture for oocyte maturation(plate 1-2). Cumulus oophorus-sperm complexes had condensed around oocytes when they were inseminated with the capacitated sperm and co-cultured for 12 to 18 hours(plate 1-3). Cumulus oophorus complexes examined by SEM were spherical in shape.

No intercellular substance was observed between the cells, but filiform intercellular processes that should be tighted to cells to cells were present between the peripheral cumulus cells as well as between the inner cells.

The fibrous projection from corona radiata cells was tighted with crypt of zona pellucida(plate 1-4,5). Spherical cells were observed in two types, i.e. some of them covered with blebs occasionally protruded through amorphous materials(plate 2-4 FC arrow) and others with smooth surface(plate 2-2 SFC).

Sperm cumulus complexes interaction. It was observed that capacitated spermatozoa had reached to the zona by threading through cumulus oophorus complexes(plate 2-1) and that some of spermatozoon presented into cumulus-oophorus matrixes was trapped by a cell of cumulus(plate 2-3).

Tip of spermatozoon head attached and bound to site of the receptor presented on the surface of the zona(plate 2-5,6).

There was the trace formed in a shape of sperm head tip on the surface of the zona at the site where bound with the spermatozoon(plate 2-7 arrow).

Most of spermatozoon had attached and bound at an angle of 60° to 90° to the surface of the zona. All of the spermatozoa attached and bound to on the surface of the zona had no acrosome cap.

On the other hand, spermatozoa with entire or partial acrosome cap did not attach or bind and just only lay on the surface of the zona.

Sperm penetration. When bovine frozen spermatozoa, capacitated in vitro by

treatment of Ca-ionophore, were co-cultured with oocytes matured by pre-culture in synthetic medium, the spermatozoa bound with the surface of the zona and passed through the zona within 3 to 5 hours after the incubation. Ten of 35 oocytes was penetrated by spermatozoon and three of them had spermatozoon within perivitelline space. It was observed that head region of the fertilizing spermatozoon bound mostly in rectangular to the zona(plate 3,1,2 arrow) and passed through the zona at the site where was solved by proteolitic enzymes released from inner acrosome membrane of the cell, and then the cell including the tail entirely had penetrated(plate 3-3,4, star, 5 arrow).

Electron micrograph also showed the penetrated hole with shape that was formed by vibrating of sperm head to upside down(plate 3-6). A generally similar appearance was observed by us in rabbit sperm penetration.

Changes in surface of vitelline membrane after sperm penetration. It was observed that a morphological change in the surfaces of the oocytes was associated with the process of fertilization. The surface of vitelline membrane in unfertilized oocytes was characterized by wave like projection and sparse small microvilli.

The surface of zygotes in both pronuclear stage was some of the mound like elevation and unformless somewhat larger microvilli. The zygotes approaching of first cleavage stage lacked mound-like elevations, but covered with many microvilli elongated.

#### Discussion

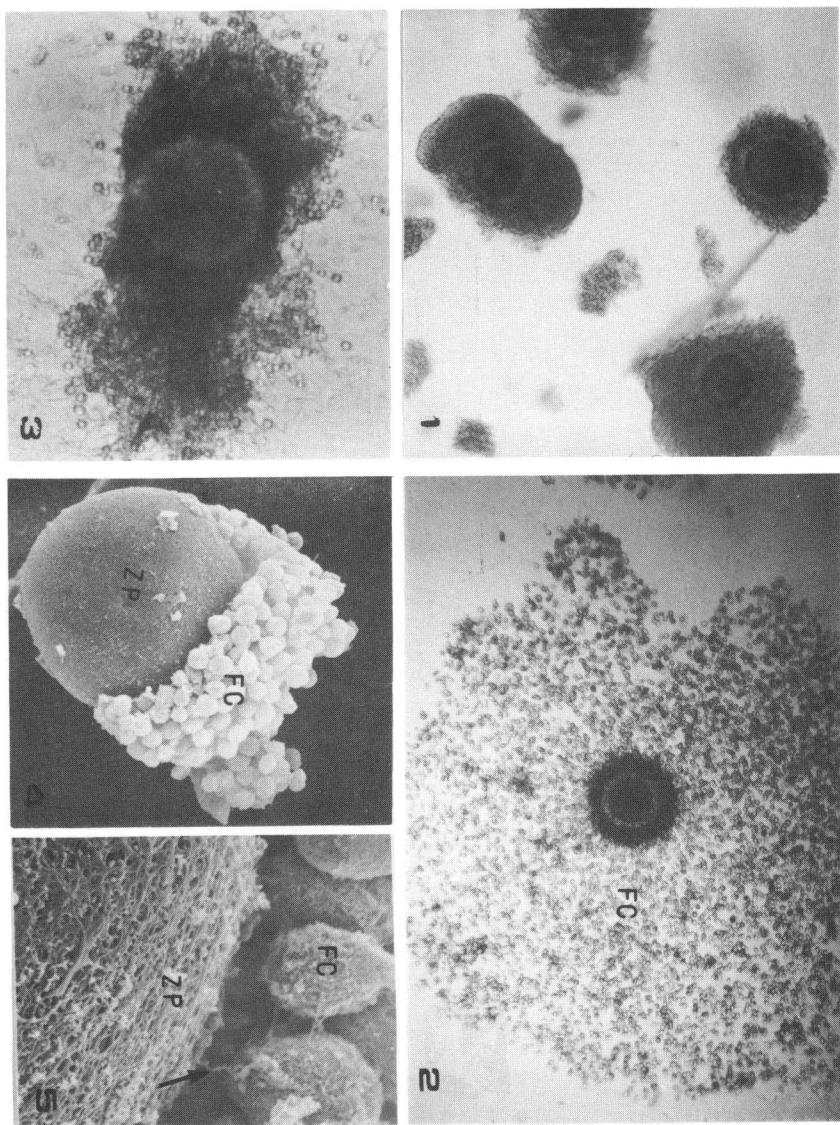
SEM structure of bovine cumulus cells was almost similar to that of swine and horse ova described by us<sup>6)</sup>. Cumulus cells in these animals were losely connected to the zona pellucida and matrix between cumulus cells was fewer than that of rabbit and rat. The trapping of bovine spermatozoon with cumulus cell was observed in our study. A similar feature has been described by Gwatin et al<sup>9)</sup> in hamster. According to the site of attachment and bind of fertilizing spermatozoa to the zona, there seems to be differences among species such as mouse, rat, hamster, rabbit and pig. It has been reported that mouse zona pellucida is made up of three glycoproteins and one of them is endowed with sperm receptor activity<sup>10)</sup>. In the present study, SEM micrographs showed that the surface of the zona bound only with the spermatozoa dissociated from acrosome cap. This features suggests that fertilizing spermatozoa were ready to acrosome reaction before reaching to the surface of the zona, i.e. during thread through cumulus-oophorous complexes and that dissociation of the acrosome cap and hence exposure of the inner acrosomal membrane resulted from the interaction of the fertilizable spermatozoon with the surface of the zona.

Bovine spermatozoon passed through the zona in same manner as observed in rabbit fertilization. The results suggests that mechanics for sperm penetration into the zona should be different from species to species.

#### References

- 1) Monroy, A. & Rosati, F. (1983) Gamate Res., 7:85
- 2) Fleming, W.N. & R G.Saacke (1972) J.Reprod.Fert., 29:203
- 3) Senger, P.L. & Saacke, R.G. (1970) J.Cell Biol., 46:405
- 4) Kruip, T.A.M. et al. (1983) Gamate Res., 8:29
- 5) Brackett, et al (1980) Biol.Reprod., 23:189
- 6) Sugawara, S. & T.Horiuchi (1981) In Atlas of histology in reproductive function(in Japanese). Eds. Sugawara et al. Rikogakusha, Tokyo, Japan
- 7) Sugawara, S. et al (1984) 10th Int.Cong.Animal Reprod. and AI, Champaign, Ill. U.S.A.
- 8) Sugawara, S. et al (1980) Tohoku J.Agric.Res., 31:21
- 9) Gwatin, R. (1976) SEM. part VI:379. SEM in Reproductive Biology.
- 10) Blecd, J.D. & Wassermann, P.M. (1980) Cell 20:873

Plate 1



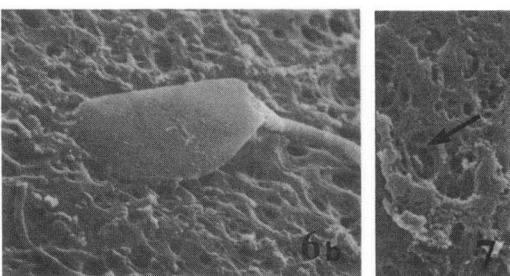
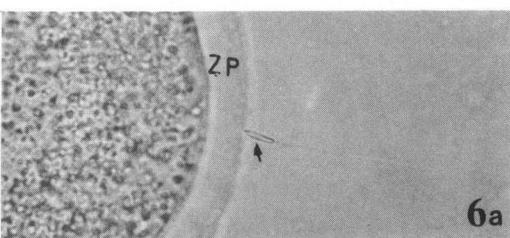
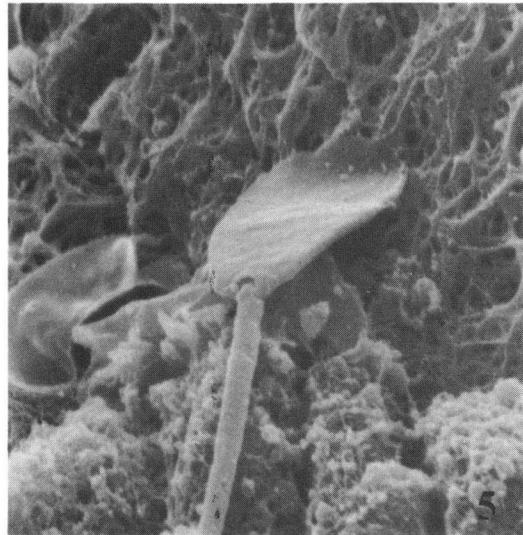
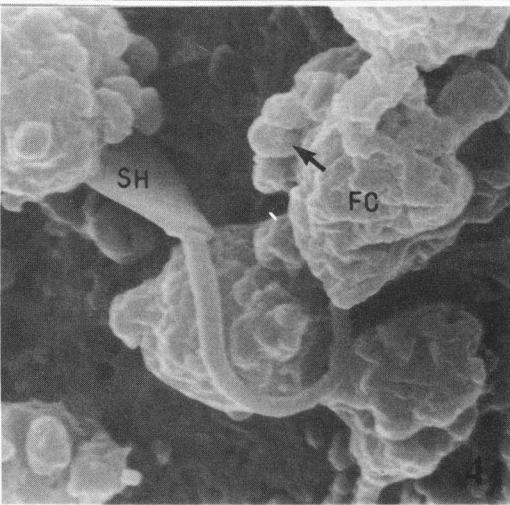
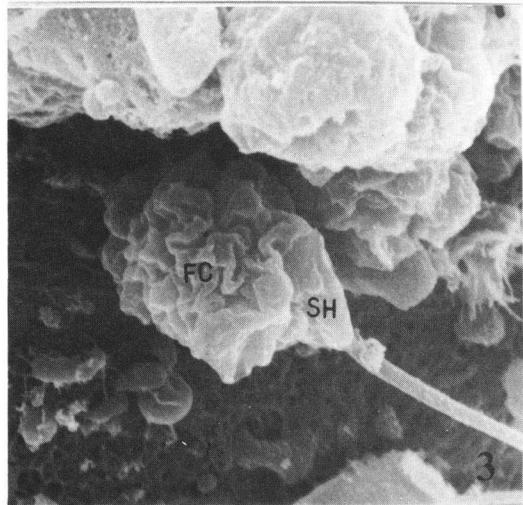
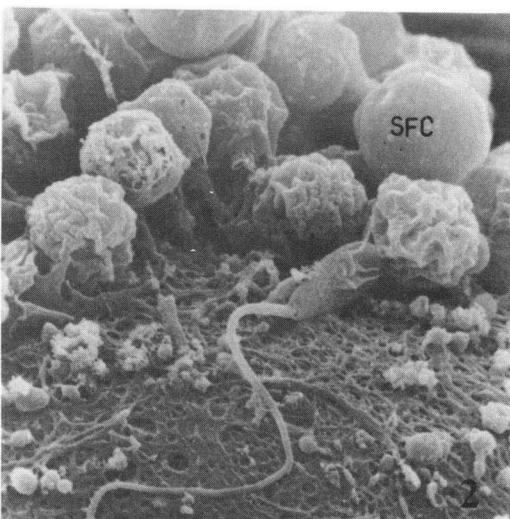
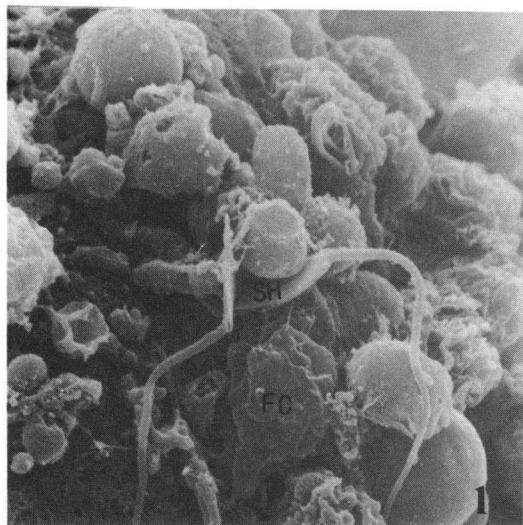
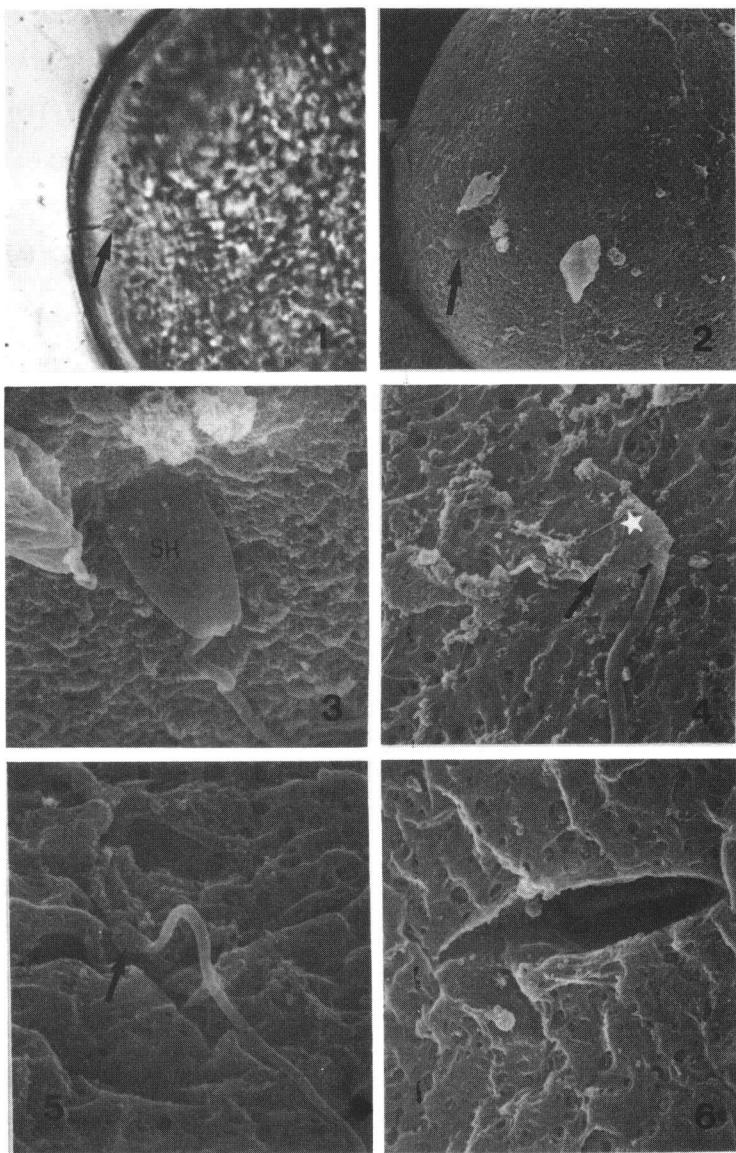


Plate 3



## Ultrastructure of Human Ova fertilized in Vitro: The Diagnostic Value

小林善宗・井上正人・金子みつ恵・藤井明和

Yoshimune KOBAYASHI, Masato INOUE,  
Mitsue KANEKO and Akikazu FUJII

東海大学医学部産婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, school of medicine, Tokai University

Electron microscopic examinations of human ova fertilized in vitro were performed as a possible diagnostic approach in human infertility. Oocytes were recovered laparoscopically after stimulation with clomiphene and hCG, inseminated in vitro, and processed 12 hours later for scanning (SEM) and transmission (TEM) electron microscopy.

1. Observation by SEM: At the outer surface of the zona pellucida, many acrosome-reacted spermatozoa were in the process of penetration. They were penetrating the zona either at an angle or tangentially to the surface.

2. Observation by TEM: Fertilization was confirmed by the presence of sperm tail in the vicinity of pronuclei. No eggs were polyspermic.

Ultrastructural study of human sperm-egg interaction in vitro may be useful for the diagnosis of selected infertile patients.

緒言：体外受精の進歩は目ざましく、不妊症の治療として、臨床的にも応用の段階をむかえた。また体外受精法を用いた配偶子レベルでの妊娠性の検索が不妊症の新たな検査法として注目されている。しかし、受精のメカニズムについてはまだ不明の点が多く、精子-透明帯の相互作用についても、ほとんど分っていない。特にヒトの受精については、倫理的、技術的の制約から、研究自体が困難であり、その数は極めて少なかった。一方、臨床応用にともない、内視鏡あるいは超音波断層法を用いた経腹壁卵胞穿刺による卵子採取法の確立により、安全確実に卵子採取が行える様になった事から、配偶子間の受精能力についての検索が可能となった。我々も、不妊原因を機能障害の観点から受精障害に対する検索を行っている。精子側因子については、すでに機能検査であるヒト精子受精能力検査(Zona-free ハムスター卵子を用いたヒト精子進入試験)の臨床応用を行っている。一方卵子側因子については、排卵直前の卵胞卵子の状態の検索と、配偶子間の受精を証明して、その受精能力について検査を行っている。不妊症に対する腹腔鏡検査時に卵胞穿刺を行い、得られた卵子に対して体外媒精を行い、配

偶子間の初期受精能力について、走査型電顕 (SEM) を用いて、精子側の透明層侵入能力について検索し、透過型電顕 (TEM) にて初期受精を証明し、妊娠性の検索を行った。

方法：腹腔鏡予定の不妊患者に対して、月経5日目より、clomiphene-citrate 100mgを5日間投与し、超音波断層法による卵胞計測により卵胞最大径が20mm以上になった時点で、hCG 5000I.U. 筋注を行った。hCG投与後、約24~28時間にて腹腔鏡検査を施行し、諸観察と同時に卵子の採取を行った。同意を得た夫婦に対して、その採取卵子を用いて体外媒精を行った。卵子は、ヒト臍帯血清を付加したHAM-F10培養液にて、4~24時間前培養を行い、夫の洗滌精子（最終濃度 $2\sim5\times10^5/ml$ ）を加えてさらに12時間培養してから、受精卵子を固定し、0.1% hyaluronidaseにて顆粒膜細胞を除去し、定法に従って、日本電子JEM-100C型透過電顕及びJSM-35型走査電顕にて観察した。SEMに供した卵子は、比較的未熟と観察されたものに対して操作を行い、精子進入の初期像を観察して、精子の進入能力を検討した。一方、成熟卵子と観察されたものに対しては、TEMを用いて、受精と断定しうる所見を検索した。固定した受精卵子をtoluidine blue染色を行い、光顕上TEM観察の最適部位を決定し、超薄切片を作製した。

結果：SEMによる観察では、先体反応の完了した精子はやや斜に透明層へ侵入する。侵入孔はほぼ円形で、精子頭部はキリモミ状に侵入するものと思われる。この方式がヒト精子侵入の初期の主な形態学的特徴を示していると考えられる。（写真1.）ヒトに特徴的な精子侵入所見としては、表在性に頭部を埋没

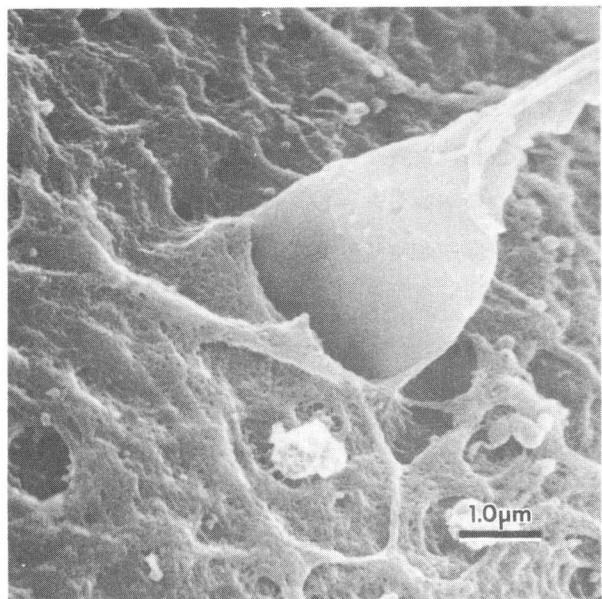


写真1 透明層へ進入しつつある精子頭部。  
先体反応は完了している。  
(×12200)

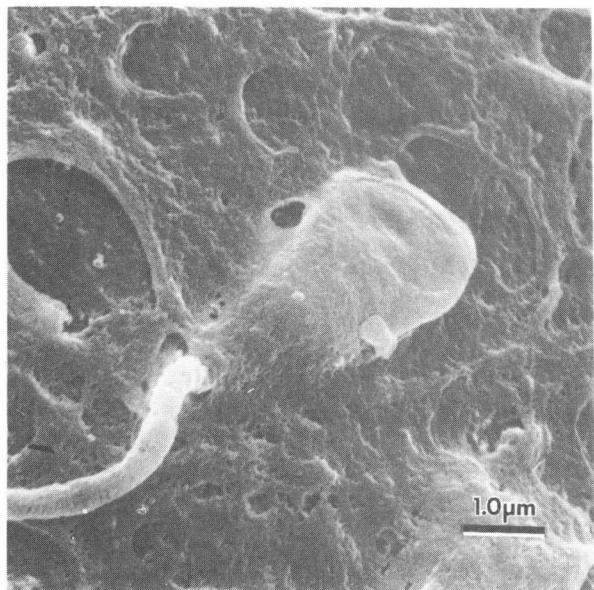


写真2 透明層へ進入しつつある精子頭部、  
写真1と異り、極端に鋭角的に侵入  
している。(×10500)

した精子が多数観察された。透明層表面に對して極端に鋭角的に侵入している。(写真2) 精子頭部先端が透明層表面に再び表われている侵入像もしばしば観察された。先体反応が完了している。(写真3) その他に、この様な精子侵入あるいは付着、結合の跡と思われる溝が受精卵子の透明層表面に多数観察され、写真2.3の状態が精子付着、結合の様式である可能性も十分考えられる。TEMによる観察により、初期受精の証明を行った。第2極体の放出は重要な所見であるが、団卵腔内に2つの極体が存在している。(写真4) 下方の卵子細胞質表層には、表層顆粒の放出が見られ、2つの極体のうち、左方のものは表層顆粒が豊富であり、右方の極体はすでに表層顆粒の放出が見られることから、左方が第1極体、右方が第2極体と考えられる。この前核期の受精卵子の細胞質内を観察すると、2つの前核が存在し(写真5)，右方前核内に核小体が存在し、左方前核の右下方に精子尾部(小核内)が存在した。左上方の核内に拡大像を示したが、軸フィラメント複合体である。従って精子尾部に近い左方の前核が雄性、右方が雌性前核と考えられる。

前核期における雄性・  
雌性前核の存在及び卵  
子細胞質内の精子部分  
(中片ないし尾部)の  
存在を確認することは、  
初期受精の証明として  
は重要な点である。こ  
れらの初期受精卵子に  
は、多精子受精は1例  
もなく、透明層深く侵  
入した精子も非常に少  
なかつた。多精子防禦  
は透明層の表層下で極

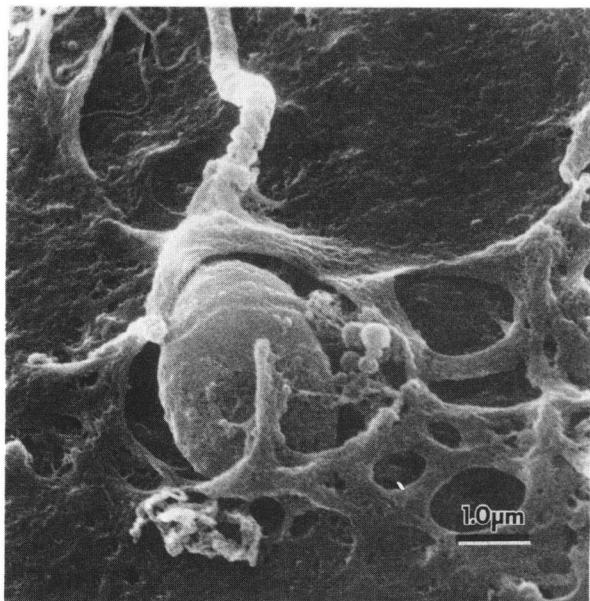


写真3 透明層表面に再び頭部先端が表われている。(×10500)



写真4 前核期の受精卵子。団卵腔内の2つの極体のうち左方が第1極体、右方が第2極体と考えられる。(×4200)

めて有効に作用するこ  
とが示唆された。

考察：一般には、精  
子先体反応は、顆粒膜  
細胞中あるいはその近  
接で起こるとされ、モ  
ルモットなどでは、こ  
の形式をとることが解  
明されている。一方、  
マウスやハムスターな  
どでは、精子は透明層  
に付着してから先体反  
応が起こる様で、我々  
もマウスの体外媒精卵  
子をごく初期に固定し、

SEMにて確認した。ヒトの場合、Edwardsら<sup>1</sup>は、体外媒精後7.5時間で卵胞腔に精子を確認し、Lopata  
ら<sup>2</sup>は、3~4時間で精子進入を観察した。さらに、Mc Masterら<sup>3</sup>は、体外媒精後すでに2時間で卵胞腔に  
精子を確認し、TEMにて、透明層外方では精子先体反応が起っていないが、侵入精子では、すべて先体反応が  
完了していたことを観察した。我々の観察でも、ヒトの場合透明層に対して精子付着を起こしてから、先体反応  
が起こることが推察された。ヒト精子は、透明層に対して45度程度の鈍角的に侵入し、マウスの精子侵入様式  
に似ていた。透明層に対する精子付着・結合とも考えられる鋭角的な精子侵入様式も特徴的にみられた。この様  
な初期侵入精子の観察から、先体反応完了の有無、進入能力などの精子側の受精能力についての検討を加えるこ  
とが可能であった。一方、TEMによる受精の証明は、Zamboniら<sup>4</sup>による性交後24時間の前核期ヒト体内受  
精卵子の観察があるが、体外媒精による観察は、Soupartらが、ヒト未熟卵子を48時間前培養、体外媒精後  
24時間にて前核期の観察を行い、Lopataら<sup>2</sup>は、やはり媒精後6時間すでに前核期の確認を行った。我々  
は、体外媒精後12時間にて観察を行ったが、これまで報告された動物の受精卵子と同じ様な形態学的な微細構  
造を確認した。第2極体の確認、雌性・雄性前核の確認、卵子細胞質中の精子尾部の確認を行い、受精を形態学  
的に証明することにより、受精能力の検査として不妊原因解明の臨床応用を行った。

- 主要文献：
1. Edwards, R.G., Bavister, B.D. & Steptoe, P.C.: Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature Lond.* : 221, 632, 1969.
  2. Lopata, A., McMaster, R., McBain, J.C. & Johnston, W.I.H.: In-vitro fertilization of preovulatory human egg. *J. Reprod. Fert.* 52: 339, 1978.
  3. McMaster, R., Yanagimachi, R. & Lopata, A.: Penetration of human eggs by human Spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* 19:212, 1978.
  4. Zamboni L., Mishell, D.R., Bell, J.H. JR. & Baca, M.: Fine structure of the human ovum in the pronuclear stage. *J. Cell Biol.* 30:579, 1966.

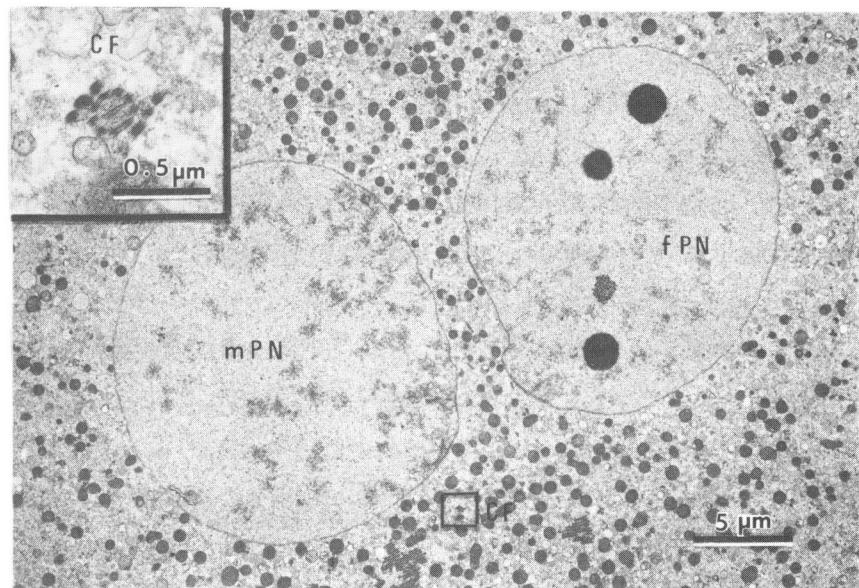


写真5 前核期の受精卵子。中央2つの前核のうち左方が雄性、右方が雌性にて、雄性前核の右下方に精子尾部（小核内）がみられる。（×3100）

マウス卵母細胞の体外受精に及ぼす  
培養時間の影響

Effect of Culture Time of Mouse Follicular  
Oocytes on Fertilization in vitro

藤井好孝・吉岡保

Yoshitaka FUJII, Tamotsu YOSHIOKA

倉敷成人病センター附属医科学研究所

Medical Science Laboratory, Center for Adult Diseases, Kurashiki

For fertilization in vitro, the optimal culture time of follicular oocytes according to their maturation stages was examined using mouse eggs. The highest fertilization percentage was obtained at the condition that the oocytes collected from follicles 3, 7 and 12 hours after HCG injection and incubated 12, 6 and 6 hours respectively were inseminated. Considering a time in culture of immature oocytes, successful fertilization was observed when sperm was added to oocytes 13-18 hours after HCG injection. In the case of oocytes matured in vitro, optimum fertilization time is equivalent to natural fertilization time. It is well known that the ovulation occurs about 16 hours after HCG injection. It is very interesting phenomenon that the optimal fertilization time is same in vitro as in vivo.

緒言：近年、人の体外受精の報告が増加しているが、人の場合は卵胞から得た卵を体外受精に供しなくてはならない。体外受精の場合、HCG注射により卵胞成熟をはかり、最適時間に受精を試みる必要がある。しかし実験動物においても卵胞卵の成熟段階に応じた最適培養時間に関する報告はみあたらない。そこで我々は凍らの培養液を用い、HCG注射後、各成熟段階のマウス卵胞卵をさまざまな時間培養した後、体外受精し、受精率に及ぼす培養時間の影響を調べた。

方法：実験にはJCL/ICR系マウスを用いた。さまざまな成熟段階の卵胞卵を得るために、雌マウスに5IU PMSと5IU HCGを48時間間隔で腹腔内注射し(午後6時)、HCG注射後3, 7あるいは12

時間で屠殺し、卵巣を取り出した。滅菌ろ紙上で血液を除き、2 mlの培地に入れた後、卵巣の卵胞壁を解剖針で破った。出てきた卵胞卵を卵丘細胞と共にガラスピペット（内径300～500 μm）を用いて滅菌流動パラフィン（メルク、Art 7162）下の0.4 mlの成熟用培地に移し、培養器（37°C、5% CO<sub>2</sub>、95% 空気）内で培養した。精子添加は採卵直後の卵子（0時間 incubation）または6あるいは12時間 incubation した卵子を、流動パラフィン下の0.4 ml受精用培地に移して行なった。対照としてはHCG注射後16時間に卵管膨大部から回収した排卵卵を用いた。精子は豊田等の方法に従い、精巢上体尾部から得た精子塊を精子用培地で1.5時間培養した後、最終濃度0.6～1.0×10<sup>6</sup>精子/mlになるように受精用培地に添加した。精子が卵子に侵入しようとする時間を限定するため、精子添加後1時間で卵を別の新鮮な0.4 mlの受精用培地に移しかえ、内径約200μmのガラスピペットで、卵透明帯に軽く付着していた精子を除いた後、更に別の新鮮な0.4 mlの受精用培地に移し incubation した。精子添加後12時間で卵を2.5%グルタルアルデヒド（pH 7.0）のホールマウント標本にし、精子が透明帯を通過しているかどうか顕微鏡下（×400）で判定した。精子頭部の膨化、前核形成、卵子染色体については、卵を更に4%中性ホルマリンで固定後45%酢酸-0.2%ラクモイドで染色し、同様に顕微鏡下で検査した。

培地は湊らの方法に従い、精子培養用にはTYH (TOYODA, YOKOYAMA, HOSHI) を用い、卵成熟用培地にはTYHに5%牛胎児血清と10 IU/ml PMSを添加した培地を用い、受精用培地にはTYHに5%牛胎児血清を添加した培地を用いた。全ての培地は一週間に一度作製し、0.22μmのポアサイズのミリボアフィルターでろ過滅菌し、培養器内で一昼夜以上平衡させた後、実験に供した。

結果：対照の排卵卵の精子透明帯通過率は98.1%であった。HCG注射後の一定時間における各成熟段階の卵子に対する体外受精の成果は表1に示す通りである。退行変性卵は調査卵子数に数えなかったが、

Metaphase IIに達していない未成熟卵子は含めた。精子の透明帯通過はHCG注射後3時間で得られた卵子の内、ひき続き培養しなかった場合には20.0%と低率でしか認められなかつたが、それらの卵子を6時間 incubation することにより74.1%の高率となり、12時間では100%に達した。またHCG注射後12時間の卵子は incubation しなくとも、精子の透明帯通過は88.1%と高率を示した。

受精卵に関しては、対照の排卵卵では85.2%であった。HCG注射後3時間で得られた卵子の内、ひき続き incubation しなかつた場合には17.8%と低率でしか認められなかつたが、それらの卵子を12時間 incubation することにより、87.3%の高率となった。またHCG注射後12時間の卵子は、ひき続き incubation しなかつた場合でも52.5%が受精していたが、6時間の incubation により94.7%と高率を示した。しかし、12時間の incubation では75.5%と少し受精率は低下した。

考察：岩松らはマウスを用いてHCG注射後一定時間で採卵し、incubationなしに受精を試みた。その結果、精子の透明帯通過率は、2、4、6そして8時間後、それぞれ35、12、69そして53%であった。本実験と比較すると、HCG注射後7時間の卵子では28.2%と岩松らの報告の約50%の値を示したが、3時間後の卵子はほぼ同じ%を示した。HCG注射後3時間と7時間の卵子では、incubationによって透明帯が変化し、精子が透明帯を通過できるようになった。HCG注射後12時間の卵子の88.1%は精子透明帯通過卵であり、この

Table 1. Effect of culture time of mouse follicular oocytes on sperm penetration into zona pellucida and fertilization in vitro

Time after HCG injection(h)	Time in culture (h)	No.of oocytes examined	No.of oocytes penetrated(%)	No.of oocytes fertilized@ (%)		
				Total	With pronucleus	With more than 3 pronucleus
3	0	45	9(20.0)¢	8(17.8)¢	0(0.0)¢	0(-)§
	6	54	40(74.1)	16(29.6)	2(3.7)	0(0.0)
	12	55	55(100.0)	48(87.3)	48(87.3)	17(35.4)
7	0	71	20(28.2)	17(23.9)	10(14.1)	0(0.0)
	6	32	30(93.8)	29(90.6)	16(50.0)	7(43.8)
	12	66	39(59.1)	21(31.8)	19(28.8)	5(26.3)
12	0	59	52(88.1)	31(52.5)	26(42.4)	14(53.8)
	6	38	38(100.0)	36(94.7)	36(94.7)	12(33.3)
	12	49	43(87.8)	37(75.5)	35(71.4)	7(20.0)
Control#	16	0	54	53(98.1)	46(85.2)	46(85.2)
						16(34.8)

@ : Fertilized embryos include ova with transformed sperm head(s)  
or with pronucleus.

¢ : % of the number of oocytes examined.

§ : % of the number of oocytes with pronucleus.

# : Ovulated oocytes.

時期の透明帯は受精の受備をほとんど完了しているように思われる。in vivoにおいては卵丘細胞はHCG注射後の時間経過に伴って大きく、柔らかく、離散した状態に発達していたが、in vitroにおいても同様に柔らかく、離散した状態に発達した。卵胞卵の成熟において卵丘は重要な役割をはたすことが報告されており、卵丘細胞の発達も卵子の成熟に一助を成しているのだろう。

卵丘内未成熟卵は incubationにより成熟を助長され、HCG注射後3時間の卵子は12時間、HCG注射後7、12時間の卵子は6時間の incubation 後の受精によって、それぞれ最高の受精率が認められた。これらの時間はHCG注射後の時間と incubation の時間を合わせると、HCG注射後13～18時間が最もよい値を示した。今まで、HCG注射後16時間前後に排卵されることが報告されている。本実験の結果は、1) in vitroにおいても卵丘と卵子の成熟が in vivo とほぼ同じ速度で進行する。2) 精子添加時期は自然に行なわれる受精時期と考えられる13～18時間が最適時期であるということを示している。

本実験の開始に当り御指導、御提案を承りました北里大学の豊田 裕教授、ならびに同研究室の院生、学生の皆様に深甚の謝意を表します。

### 主要文献

- Niwa K. and Chang, M.C.: Fertilization of rat eggs in vitro at various times before and after ovulation with special reference to fertilization of ovarian oocytes matured in culture. J. Reprod. Fert., 43, 435 - 451, 1975

2. 渕 芳明、豊田 裕：体外成熟－体外受精マウス卵子の正常産子への発生について。日畜会報、54、387－391、1983
3. 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、II。精子侵入時期に及ぼす精子体外培養の効果。家畜繁殖誌、16、152－159、1971
4. Iwamatsu, T. and Chang, M.C.: Sperm penetration in vitro of mouse oocytes at various times during maturation., J. Reprod. Fert., 31, 237-247, 1972
5. Tsafiriri, A., Dekel, N. and Bar-Ami, S.: The role of oocytes maturation inhibitor in follicular regulation of oocytes maturation. J. Reprod. Fert., 64, 541-551, 1982

ラット、ハムスター及びマウス初期胚の  
体外発育におよぼす浸透圧の影響

Effect of Osmotic Pressure on Development of Rat,  
Hamster and Mouse Ova in the in vitro Cultivation

橋 詰 良 一\*, 伊 藤 雅 夫\*\*  
Ryoichi HASHIZUME and Masao ITOU

\* 畜産生物科学安全研究所

Research Institute for Animal Science in Biochemistry  
and Toxicology

\*\* 日本大学医学部衛生学教室

Department of Hygiene School of Medicine Nihon University

The amount of NaCl in the medium was adjusted to give gradient osmotic pressures of 150 to 308 m-osmols to ova of rats, hamsters and mice in order to study the species differences in optimum osmotic pressure. In rats, an osmotic pressure of 190 m-osmols yielded the highest growth rate for 4-cell and 8-cell ova, and more than 80% of the 8-cell ova grew into blastocysts. As for hamsters, 8-cell ova could grow best under 190 m-osmols as in the case of rat ova, but the maximum growth rate into blastocysts was obtained under 170 m-osmols. It was found that more than 90% of mouse 2-cell ova grew under 270 m-osmols but their growth was limited to less than 50% under 170 or 190 m-osmols which had yielded satisfactory results in rats and hamsters. Thus definite species differences were demonstrated in the optimum osmotic pressure for in vitro cultivation of the ova. However, it was also shown that the required osmotic pressure varied according to the developmental stage of the ova: undifferentiated ova required a lower osmotic pressure while those at a more advanced stage of differentiation displayed a wider tolerance to osmotic pressure.

緒言：受精卵子の初期発生過程における種特異性の問題に関する詳細な検討は少なく、比較発生学や生理学的興味からも解明が待たれる課題と考える。かかる観点から、著者らは、培養液に含有されるNaClの量を加減して150～308 m-osmolsの段階的浸透圧下で、ラット・ハムスターおよびマウス卵子を培養し、至適浸透圧に関する種差を検討した。

方法：実験に供試した動物は、当教室で継代繁殖を続けているゴールデンハムスターであり、70～90日令の成熟した未経産雌である。実験にさいしては、腔粘液および腔スメア検査を行い、正しく4日の性周期を示す動物を抽出して供試した。なお、一部ICR系マウスを用いて同様の試験を行い、ラット・ハムスターの成績と比較した。

培養に供した受精卵子は、ハムスターの場合は過排卵誘起由来の卵子であり、ラットの場合は自然排卵由来の卵子を用いた。

ハムスターの過排卵誘起の方法は、腔粘液の分泌が認められた日（排卵の当日）をday 1とし、この日にPMSを30IU皮下注射し、day 4に雄を交配する方法を採用した。交配の翌朝（day 5）に腔スメア検査を行

い、精子の存在の有無によって交尾を確認した。なお、ラットの場合は、day4 の夕方雄と交配し、翌朝 (day5)に交尾を確認して採卵に供試した。卵子の採取は、目的の時刻に卵管および子宮を実体顕微鏡下で灌流して行った。使用した培養液は、修正KRB液であり、NaClの量を加減して浸透圧を段階的に調節した。

培養条件は、気相CO<sub>2</sub>5%，Air95%，湿度100%，温度37°Cである。

結果：ハムスター8 cell卵子の培養においては、230, 210, 190, 170 および 150 m-osmolsの各区で、それぞれ39.1, 38.4, 52.7, 42.7 および 24.6%の卵子が分化8-cell以上に発育したが、270 m-osmols以上での発育はみられなかった。また、発育卵子のうち、胚盤胞に発育した割合は、それぞれ9.8, 17.9, 15.8, 27.9 および 20.0%であった。すなわち、卵子の発育率は 190 m-osmols区において良好な成績を示し、退行卵子の割合も少なかったが、胚盤胞に発育する割合は、170m-osmols区が優っていた。以上の結果はハムスター卵子の体外培養における至適浸透圧が血清と等張を示す310m-osmolsと比較してかなり低いところにあることを示唆している。ラット2 cell卵子の培養では、190m-osmols区で若干の卵子が発育を示すものの、胚盤胞までの発育は全くみられなかった。4 cell卵子では、190m-osmols以上の浸透圧下で50%の卵子が発育したが、胚盤胞まで発育する割合は、190m-osmols区の40%が最高であった。早期8 cell卵子では190 m-osmols区で100%の発育を示したが、浸透圧の上昇に伴って発育率は低下した。8 cell以降の卵子はいずれの浸透圧下においても容易に胚盤胞に発育した。マウス2 cell卵子の場合は270 m-osmolsで90%以上が胚盤胞まで発育したがラット・ハムスターで良好な成績を示した、170, 190 m-osmolsにおいては50%以下の低値を示している。また、マウス1 cell卵子の培養における胚盤胞への発育率は低いが、230m-osmolsで若干良好な成績を示した。

考察：哺乳動物卵子の体外培養における至適浸透圧の値に関しては、Brinsterによるマウス2 cell卵で270 m-osmols, Whittenによるマウス1 cell卵で250m-osmols, NagleeらおよびMaurerらによるウサギ2～4 cell卵で269m-osmolsなどの報告にみられるおり、いずれも血清と等張を示す315m-osmolsより低値であることが指摘されているが、本実験で得られたハムスターおよびラット卵子の最適浸透圧は、マウスに代表される他種動物の報告に比べて際立って低く、特異的な存在といえる。特にラット4 cell卵子の場合、浸透圧を190m-osmolsまで低くすることによってはじめて胚盤胞に発育しており、種特異的に要求される浸透圧条件が満たされた時、高率に胚盤胞まで発育し得ることが示された。しかし一方で、要求される浸透圧条件は卵の発生stageによって異なっていることも事実であり、分化が進んだ段階においては浸透圧に対して広いcapacityを持っているようである。この現象はマウス卵子においても認められており、1cell卵子の至適浸透圧は、容易に胚盤胞まで培養できる2cell以降の卵子に比べて低いことが特徴的に示されている。このように、発生段階によって至適浸透圧が異なっていること、特に未分化の卵子ほど低浸透圧であり、しかもその閾値には種差があるという事実はこれまで報告されておらず、新しい知見といえる。しかし、その発生学的機序は不明であり、今後の詳細な検討をまたねばならない。特に本実験における浸透圧の調節は、NaClの増減によって行っている。しかし、この方法では培養液中のイオン組成の比率が各実験区ごとに変わり、それが卵子の発育に影響を及ぼした結果とも考えられ、卵発生に及ぼす培養液中のイオン比の影響についても合わせて検討する必要があろう。

ハムスター 培養成熟卵の受精能  
に関する検討

Fertilizability of In Vitro Matured Oocytes  
From Golden Hamsters

三浦麗子, 崎川優子, 倉沢滋明, 遠藤芳広, 鈴木秋悦, 飯塚理八

Reiko MIURA, Yuko KUBOKAWA, Shigeaki KURASAWA,  
Yoshihiro ENDO, Shuetu SUZUKI, Rihachi IIZUKA

慶應大学医学部産婦人科学教室

Dept. of Ob. & Gyn., Keio Univ. Sch. of Med.

Fertilizability of the in vitro matured oocytes isolated from hamster follicles was compared to that of the tubal oocytes (control).

1. After culture of the isolated follicular oocytes, 90.1% of them developed to the Metaphase II 14-15 hr after culture.
2. The rate of fertilization of the in vitro matured follicular oocytes was lower than that of tubal oocytes.
3. 3.5% of the control oocytes 4 hr after fertilization were achieved pro-nuclear development normally. On the other hand, the rate of normal fertilization of in vitro matured oocytes were 2.0% 4 hr after culture and 25.0% 6 hr after culture, and there was a higher tendency of polyspermic fertilization.
4. Formation of male & female pronuclei were less frequent in in vitro matured oocytes (5.6% 4 hr, 63.6% 6 hr) than in control (96.8% 4 hr).

緒言：培養成熟卵の受精率が低いことは従来からも報告されてきているが、われわれは、さらに、培養成熟卵への進入精子の動態を検討して、その本態を解明することを目的としてこの実験を行った。

方法：実験は、雌80～120 g、雄100～140 gの成熟ゴールデンハムスターを用いた。性周期第1日目10:00にPMS(pregnant mare serum)25 IUを投与し、第3日目21:00に卵胞卵を採取、G H - 2にて培養した。14～15時間後に第一極体の有無を確認し、卵をm-TAPL液中に移し、あらかじめ4時間前培養した精巣上体精子にて授精を行い、4および6時間後に、ノマルスキーマイクロ干渉レンズにて観察した。対照群は、第3日目22:00にhCG(human chorionic gonadotropin)25 IUを投与し、14～15時間後に卵管膨大部より排卵卵を採取、0.1%ヒアルロニダーゼにて顆粒膜細胞を除去し、同様に授精を行い、4時間後に観察した。

結果：卵胞卵をin vitroで14～15時間培養した結果、その90.1%が第2減数分裂中期(Metaphase

Ⅱ)に達した。

MⅡに達した卵を培養成熟卵とし、体外受精を行った結果、培養成熟卵は、排卵卵に比し、受精率は若干低い傾向を示した。正常2前核形成率は、排卵卵では授精後4時間で73.5%であるのに対し、培養成熟卵は4時間で2.0%，6時間で25.0%と、正常2前核形成率の低下が認められた。多精子受精率は、排卵卵に比し、若干高い傾向を示した。

単精子受精卵に関して、その前核形成をみると、排卵卵は授精後4時間でその96.8%が両性前核を形成するのに対し、培養成熟卵では4時間で両性前核を形成しているものは5.6%しか認められず、72.2%は未だ精子頭部が卵実質に貫入したままの状態にとどまっていた。しかし、6時間では63.6%に両性前核が認められた。

**考察：**卵胞卵を *in vitro* で培養すると、核レベルでの成熟は完了するが、それらの卵に体外受精を行うと、受精率、正常2前核形成率の低下、および多精子受精の増加傾向がみられた。

また、多精子受精防御機構が正常に働いたと考えられる単精子受精卵にかんして検討すると、精子透明層通過の遅延、もしくは両性前核形成の遅延が認められ、細胞質の未成熟などの可能性が考えられた。しかし、両性前核形成能にかんしては、ハムスターの培養成熟卵で、とくに雄性前核が形成されないという報告があるが、われわれの実験では63.6%に両性前核形成が認められた。

#### 主要文献

1. Leibtreid, M.L., and B.D. Bavister : Fertilizability of *in vitro* matured oocytes from golden hamsters. *J. Exp. Zool.* 226, 481, 1983.
2. Yanagimachi, R. : *In vitro* sperm capacitation and fertilization of golden-hamster eggs in chemically defined medium. IN *In vitro* fertilization and embryo transfer, Edited by E.S.E, Hafez and K. Semm, MTP Press, Lancaster, England, 1982.

#### 培養成熟卵 (MⅡ) の体外受精

精子／卵子 培養時間(h)	総卵子数	受精卵(%)	正常2前核 形成卵(%)	多精子 受精卵(%)
排卵卵	4	83	73(88.0)	61(73.5)
	4	51	30(58.8)	1(2.0)
	6	56	36(64.3)	14(25.0)

## ヤギ精子における先体反応の検査について

Koichi Hamano, Hiroshi Sasada, Shichiro Sugawara and  
Junji Masaki

浜野光市, 佐々田比呂志, 菅原七郎, 正木淳二

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture,  
Tohoku University, Sendai, Japan

東北大学農学部家畜繁殖学教室

**Abstract.** Application of triple stain method to goat spermatozoa was investigated to evaluate acrosome reaction. Ejaculated sperm treated with or without IA(Ionophore A23187) were incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, 95% air for 0 to 4 hours. Then, sperm was examined for motility. An aliquot of the sperm was further incubated in trypan blue at 37°C for 15 minutes and the rest was stained with Giemsa. Subsequent stain was made with Bismark brown Y and Rose Bengal for trypan blue-treated sperm. In the IA treated sperm, percentage of acrosome reaction was maximum at 1 hour incubation. Goat sperm showed a different reaction in the triple stain from human sperm and optimum condition of stain was developed for the former. Score of the acrosome reaction by triple stain was lower than that by Giemsa stain.

### Introduction

Acrosome reaction is thought to be one of the essential changes to fertilization of mammalian spermatozoa, and is observed as the complete or partial loss of acrosome by light microscope<sup>1)</sup> in laboratory animals. In farm animals, however, the results of the acrosome reaction is not satisfactory, since 1) sperm head is not large enough to estimate the reaction and 2) "false or degenerative acrosome reaction"<sup>2,3)</sup> in dead or dying sperm is not excluded.

Recently, Talbott and Chacon<sup>3)</sup> have developed the rapid procedure to score the acrosome reaction in human sperm. By this method, the acrosome reaction is clearly distinguished between the normal and degenerative ones.

In this study, we tried to develop the method for estimating the acrosome reaction of goat sperm and to compare the Giemsa stain with the triple stain.

### Materials and Methods

**Sperm preparation.** Semen was collected by the artificial vagina from two mature male goats of Japanese native breed during breeding season. After collection, semen was diluted 1:2 with BSA free BO(Brackett and Oliphant 1975)<sup>4)</sup> medium containing 2mM caffeine and was centrifuged at 1,200 rpm for 5 minutes. After washing twice, the sperm suspension( $0.1\text{--}1.0 \times 10^8$  sperm/ml) was treated with 1 µM in final concentration of IA(Ionophore A23187) for 2 minutes and transferred

to 0.3 ml drops of BO medium including 3 mg/ml BSA under paraffin oil. Final sperm concentration in each drop was  $0.1\text{--}1.0 \times 10^5/\text{ml}$ . Incubation was done under 5% CO<sub>2</sub>, 95% air at 37°C for 0 to 4 hours.

Giems stain. After the incubation for 0 to 4 hours, an aliquot of sperm suspension was centrifuged at 1,000 rpm for 3 minutes. After examination of motility, sperm was smeared onto glass slides, and stained in buffered Giemsa solution for 1.5 hours after Orth's fluid for 30 minutes<sup>5,6)</sup>. Percentage of acrosome-lost one in 500 sperm was expressed as AL(acrosome lost sperm percentage). MAL was the value multiplied AL by M(sperm motility percentage). VAL was the value multiplied AL by V(sperm viability percentage).

Staining condition of triple stain. The condition of triple stain by Talbott and Chacon<sup>7)</sup>(1981) was investigated to determine the optimum treatment of TB(Trypan blue), BBY(Bismark brown Y) and RB(Rose Bengal). For this purpose, the following solutions were used. (1) 0.2, 1.0 and 2.0% TB in BO medium, (2) 0.1, 0.4 and 0.8% BBY in distilled water(pH 1.8), (3) 0.4 and 0.8% RB in Tris buffer (pH 5.3). To determine the optimum concentration of TB, sperm suspension was diluted with an equal volume of 0.2 to 2.0% TB. After incubation at 37°C for 15 minutes, sperm was examined motility and smeared onto glass slides. After washing by BO medium, these specimens were fixed by 3% glutaraldehyde. To determine the optimum treatment by BBY and RB, sperm treated with glutaraldehyde and fresh ejaculated sperm, which were stained with TB, were stained with 0.1 to 0.8% BBY for 1,3 and 5 minutes and subsequently with 0.4 or 0.8% RB for 5, 15 and 30 minutes. These specimens were examined at  $\times 1,000$  under light microscope.

Triple stain. After the incubation for 0-4 hours, IA treated or non-treated sperm were diluted with an equal volume of 1.0% TB and further incubated at 37°C for 15 minutes. Then, sperm were smeared onto glass slides and fixed after washing. These specimens were stained with 0.1% BBY for 3 minutes and with 0.8% RB for 15 minutes. Evaluation was made for 500 sperm at  $\times 1,000$  under light microscope. The percentage of acrosome-lost live sperm was expressed as ALL. These processes were repeated four times.

### Results

Triple stain. To determine the optimum condition of triple stain, sperm treated with glutaraldehyde or fresh ejaculated sperm was examined. In the treatment of 0.1% TB, where the motility of fresh sperm was not affected, dead sperm was not stained blue. Sperm motility was inhibited by 1.0% TB. The treatment of 0.4 or 0.8% BBY for 3 or 5 minutes discolored blue at postacrosomal region of the sperm treated with glutaraldehyde. In the non-treatment or 0.1% BBY treatment for 1 minute, the postacrosomal region was overstained pink by RB. The acrosome treated with 0.4% RB for 5 and 15 minutes and with 0.8% RB for 5 minutes disappeared pink. The postacrosomal region was overstained pink with 0.4 or 0.8% RB for 30 minutes. As a result, the treatment with 0.5% TB for 15 minutes, 0.1% BBY for 3 minutes and with 0.8% RB for 15 minutes enabled to stain pink distinctively for intact acrosome of live and dead sperm and blue for post-acrosomal region of dead sperm.

Motility and viability of sperm. By the treatment of TB, sperm motility could be compared with viability(Fig. 1A and B). During incubation for 0 to 1 hour, the changing pattern of sperm motility was similar to that of sperm viability. After 2 to 4 hours incubation, motility showed a marked decrease. The difference in score between motility and viability was about 20% during 0 to 2 hours incubation and was about 30% during 2 to 4 hours.

Acrosome reaction. The percentage of acrosome-lost sperm treated with triple stain was compared with that of Giemsa stain(Fig. 2A, B and C). ALL was lower than MAL and VAL. ALL of IA treated sperm was maximum at 1 hour. The changing pattern of ALL was similar to that of VAL. MAL decreased during 2 to 4 hours incubation, although during 0 to 2 hours incubation its changing pattern was similar to that of VAL.

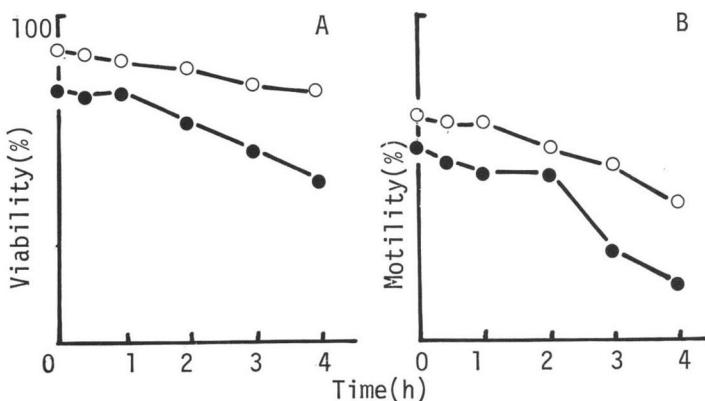


Fig. 1. Percentages of viability(A) and percentages of motility(B) during incubation in medium. Fig. shows (○) nontreatment and (●) IA treatment.

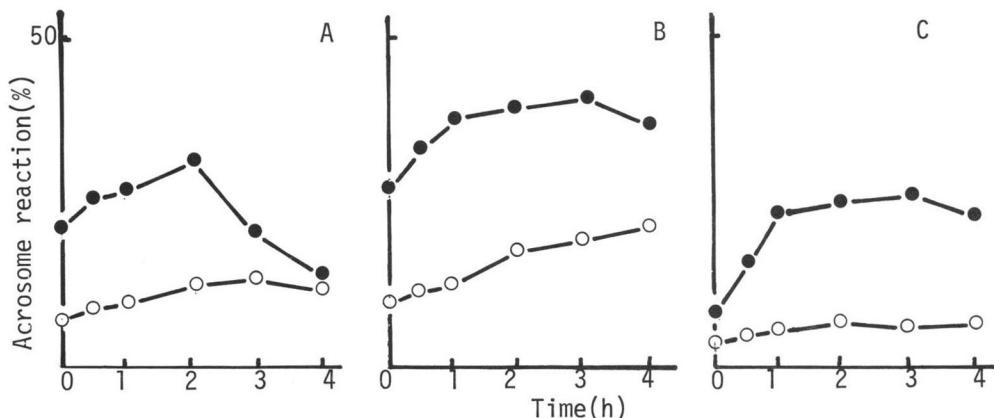


Fig. 2. Percentages of acrosome-lost sperm(AL) estimated by Giemsa stain (A,B) and triple stain(C). In Fig. 2.A, percentage(MAL) was multiplied AL by motility(M). In Fig. 2.B, percentage(VAL) was multiplied AL by viability(V). In Fig. 2.C, ALL was the percentage of acrosome-lost live sperm estimated by triple stain. Fig. shows (○) nontreatment and (●) IA treatment.

#### Discussion

In this study, differences in the reaction for stainings were recognized between goat and human sperm; TB concentration used for human sperm inhibited motility of goat sperm during TB incubation. BBY treatment used for human sperm could not be applied to goat sperm. These differences may depend on the specificity of membrane properties between of the two species.

Giemsa stain has been used for evaluating the acrosomic system for sperm of farm animals<sup>6)</sup> and for examining the presence of acrosome, but the sperm motility showed a different result from viability by TB stain and the results of MAL was not accorded with VAL and ALL. If the acrosome reaction is examined, the motility or viability of sperm must be important. Austin<sup>1)</sup> has demonstrated that "the normal acrosome reaction" occurred in strongly motile sperm and Meizel<sup>7)</sup> defined "true acrosome reaction" as the loss of acrosome in motile sperm.

Accordingly, in Giemsa stain, false or degenerative reaction might be included, since the sperm motility in the same sample could not be examined simultaneously.

By contrast, in the triple stain, vital stain including TB stain enabled the objective estimation of sperm viability and by BBY and RB stain, normal acrosome reaction was easily distinguished. Talbolt and Chacon<sup>3)</sup> reported that "the normal acrosome reaction" was observed as the loss of acrosome in live sperm. Triple stain scarcely included false or degenerative acrosome reaction, for simultaneous estimation for sperm motility and acrosome reaction appeared to be possible.

In conclusion, triple stain is reliable technique for evaluating acrosome reaction in comparison with Giemsa stain and available for estimation of goat sperm by modification of the original method for human sperm.

#### References

- 1) Austin, C.R.: J.Reprod.Fert., 44, 155 (1975)
- 2) Bedford, J.M.: Biol.Reprod., Suppl. 2, 128 (1970)
- 3) Talbolt, P., and R.S.Chacon,: J.Exp.Zool., 215, 201 (1981)
- 4) Brackett, B.G., and G.Oliphant,: Biol.Reprod., 12, 260 (1975)
- 5) Hancock, J.L.: J.exp.Biol., 29, 445 (1952)
- 6) Onuma, H.: Bull.Nat.Inst.Anim.Ind., 3, 105 (1963)(in Japanese)
- 7) Meizel, S.: In Development in Mammals. MH Johnson, ed. Vol.3. p.1. North-Holland, Amsterdam, (1978)

#### 要約

先体反応を検査するために、triple stain 法のヤギ精子への応用を検討した。射出精子あるいはIA(Ionophore A23187)で処理した精子を 37°C, CO<sub>2</sub> 5%, air 95% で 4 時間インキュベーションした。精子の活力検査ののち、一部の精子は trypan blue で 37°C 15 分間インキュベーションし、残りの精子はギムザ染色を行なった。trypan blue 処理精子は次に Bismark brown Y と Rose Bengal で染色した。ヤギ精子はヒト精子の triple stain とは異なった反応を示し、ヤギ精子についての至適条件を見いだした。triple stain でしらべた先体反応の割合は、ギムザ染色のそれより低かった。

## Sperm-Zona Interaction in the Mouse—Special Reference to the Time of Acrosome Reaction

井上正人・小林善宗・金子みつ恵・藤井明和

Masato INOUE, Yoshimune KOBAYASHI,  
Mitsue KANEKO and Akikazu FUJII

東海大学医学部産婦人科学教室

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

Mouse oocytes were examined by scanning electron microscope within 15 minutes of insemination to clarify where and when does the acrosome reaction occur.

The spermatozoa which had passed through cumulus oophorus were first associated with the zona pellucida by the anterior tip of the dorsal curvature of the sperm head. At this time, spermatozoa fixed on the zona had intact acrosomes. After firmly bound, they began to plow their furrows into the zona by a mechanical shearing with a sharp edge of the dorsal curvature which were often surrounded by softened, sticky zona material, suggesting lysis of the zona by a sperm-born protease(s) playes an important role for sperm penetration.

The spermatozoa in the process of penetration had undergone acrosome reaction and a cluster of small perteicles, presumably acrosomal remnants, were not infrequently found on the sperm head or in the vicinity of the penetration hole.

These results indicate that first, capacitated acrosome-intact spermatozoa bind to the zona surface, then undergo acrosome reaction and acrosome-reacted spermatozoa begin to penetrate mechanically the zona by means of a sharp edge of the dorsal curvature, dissolving the zona material with a zona lysin(s).

緒言：精子が透明帯を貫通するためには先体反応は必要条件であると考えられている。しかし精子がどの時点で先体反応を誘起するのか、精子の透明帯結合に先体反応が必要であるのか、といった点についてはまだよく分っていない。*in vivo*における精子の透明帯通過は極めて速く、2~3分以内

と推定されており、受精精子を見つけてこれを観察するのが非常に困難なためである。Flormanら (1982)<sup>1</sup>は裸化卵子を用いた実験により、マウスでは capacitation した精子がまず原形質膜で透明帯に結合し、その後先体反応を誘起して、侵入していくことを明らかにした。一方 Huang ら (1981)<sup>2</sup>は、モルモットでは先体反応は精子の透明帯結合にとって必要条件であり、先体反応を誘起した精子だけが透明帯に結合して、侵入することができると報告している。われわれはこれまでマウス体外受精卵を用いて受精に伴う透明帯の変化、精子の透明帯通過様式を走査型電子顕微鏡 (SEM) にて観察してきた。今回は精子の透明帯結合と先体反応の関係を明らかにする目的で、媒精後 5 ~ 15 分で、すなわちまだ卵丘がほぼ intact な状態で卵子を固定し、SEM を用いて観察した。

方法：供試動物は ddY 系の未経産マウスで、実験開始時に 7 ~ 8 週令のものを用いた。PMSG 7.5 iu, HCG 7.5 iu を 48 時間間隔で腹腔内に注射し、HCG 投与後 16 ~ 17 時間で採卵した。精子は ddY 系の成熟雄マウスの精巣上体尾部より採取し、1 時間培養して採精能力を付与してから媒精に供した。培養液は修正 Krebs-Ringer 液に 0.3% の牛血清アルブミンを加えて使用した。定法に従って媒精し、5 ~ 15 分後に 10% ホルマリン液を 1 滴加え、精子の活動を停止させてから 0.1% hyaluronidase で顆粒膜細胞を除去した。裸化卵子は培養液で数回洗滌後、2% glutaraldehyde -0.025 M phosphate buffer で 20 ~ 40 時間固定した。0.2% poly-L-lysine であらかじめ処理したカバーグラス上に卵子を接着させてから、上昇アセトン系列で脱水した。酢酸イソアミールで置換し、臨界点乾燥、金蒸着を行ない、日本電子 JSM-35 型 SEM にて観察した。

結果：顆粒膜細胞層を通過した精子は頭部大彎側を下向きにして、その先端部で透明帯に結合する

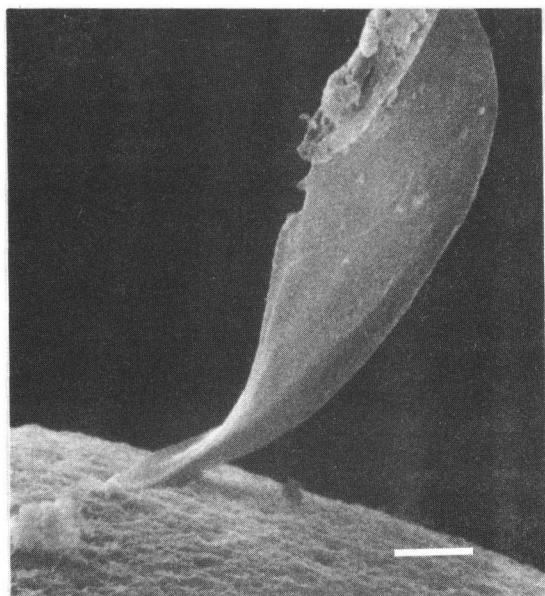


図 1 媒精後 5 分で固定

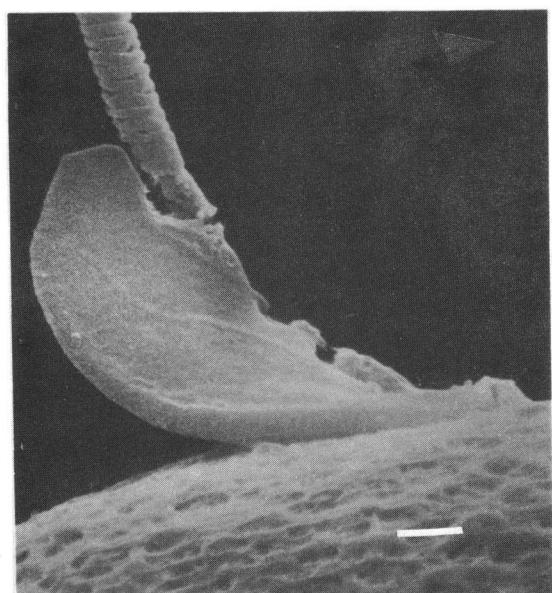


図 2 媒精後 15 分で固定

(図1)。精子は透明帯に結合してからも活発に運動するため、やや横向きになった精子頭部や大彎側がかなり広く透明帯に接着している像がしばしば観察された(図2)。この時点では先体は intactであり、放射冠に沿って卵子表面に到達した精子はまず頭部先端の原形質膜で透明帯上の精子結合部位を認識するものと思われる。透明帯に結合した精子はまもなく先体反応を誘起し、原形質膜と外先体膜の胞状化 vesiculation が認められるようになる(図3)。しかしこの時点でも精子頭部先端はなお透明帯上に結合したままの状態であった。胞状化した先体はバラバラになって離脱し、精子頭部は先端よりやや内側の所で、透明帯への侵入を開始する(図4)。透明帯に侵入中の精子はすべて先体反応を完了しており、胞状化した先体の一部が内先体膜上に残っているのが時に見られるだけであった(図4.5.6)。精子頭部には軟化した透明帯の表層があたかも微絨毛のように付着している像が認められ(図5.6)，先体内酵素による透明帯の溶解が、精子侵入に重要な役割を担っていることが推察され、また透明帯が精子侵入に active 関与している可能性が示唆された。侵入を開始した精子は、先体内酵素により軟化した透明帯を鋭角になっている頭部大彎部で後方に切開するような形で、進んでいくものと思われる(図6)。精子侵入口の付近には胞状化した先体の遺残物と思われる顆粒がしばしば観察された(図6)。

考察：受精精子を経時的にしかも多数観察することはむずかしく、また精子-透明帯の相互関係を SEM で観察するためには顆粒膜細胞を除去することが必要である。このため、精子の透明帯結合と先体反応に関する研究は、その大部分が裸化卵子を使って行なわれてきた。Story グループは、マウス裸化卵子を用いた一連の実験から、① capacitation した精子は先体の原形質膜で透明帯に結合し、

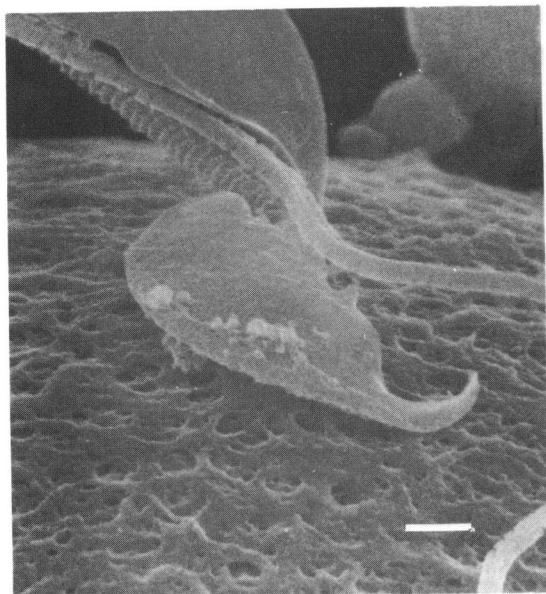


図3 媒精後15分で固定

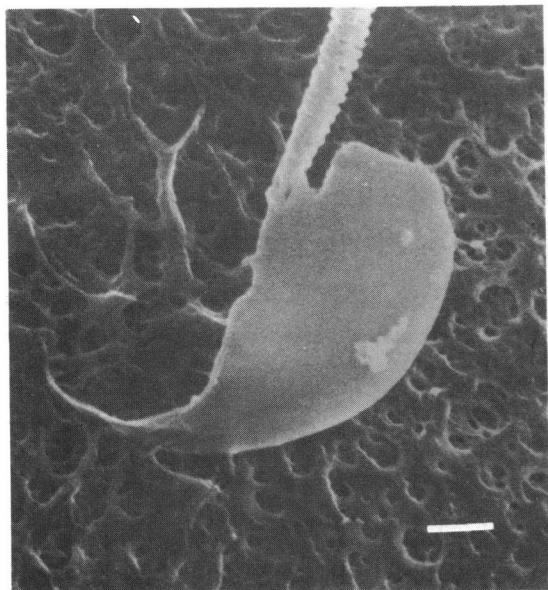


図4 媒精後15分で固定

②結合した精子は透明帯上で先体反応を誘起し、侵入を開始する、③培養液中で誘起される先体反応は、透明帯に結合してから起こる先体反応とは異なり、受精には結びつかない、ことを明らかにした。ハムスターでも先体反応は精子の透明帯結合後に起こると報告されている。これに対して Yanagimachi グループは<sup>2</sup>、モルモットを用いて培養液中で先体反応を誘起した精子だけが、透明帯に結合して、この組織を通過できる、と主張している。このような全く相反した実験結果が、種特異性によるものであるか否かは現在の所不明である。われわれはなるべく *in vivo* に近い状態で、精子 - 透明帯の相互関係を観察する目的で、マウスの正常卵子と媒精後 5 ~ 15 分で固定した。この方法は 10 % ホルマリンを 1 滴加え、精子の活動を停止させてから hyaluronidase で顆粘膜細胞を除去するため、媒精後の時間を正確に設定することができるという利点がある。また精子濃度を下げるこことにより、*in vivo* に非常に近い状態で、受精精子だけを見ることが可能である。今回のわれわれの実験結果は、Story グループ<sup>1</sup>の主張を裏付けるものであり、マウスでは、①まず精子は頭部先端の原形質膜で透明帯に結合し、その後先体反応を誘起する、②先体反応を完了した精子だけが透明帯に侵入する、③最初に侵入するのは頭部先端からやや内側の大彎部である、ことが確認された。また先体内酵素により、軟化した透明帯の表層が精子頭を取り巻くように付着している像が観察され、透明帯が精子の侵入に active に関与している可能性が示唆された。マウスでは *in vivo* においてもほぼ同じようなプロセスで、精子の透明帯結合、先体反応、精子侵入が起こるものと思われる。

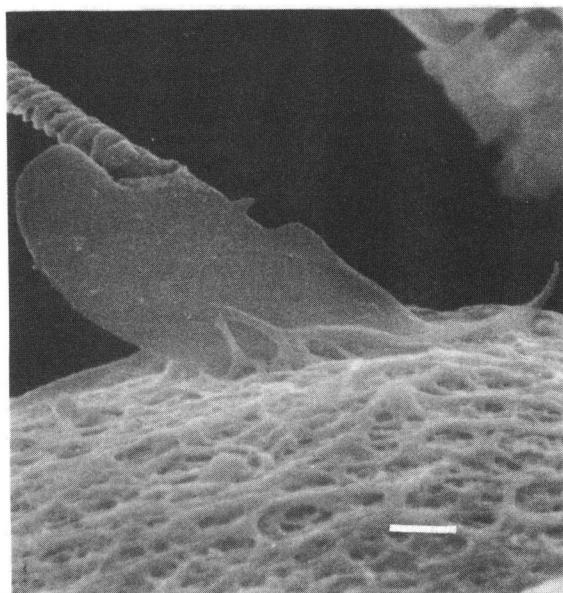


図 5 媒精後 15 分で固定

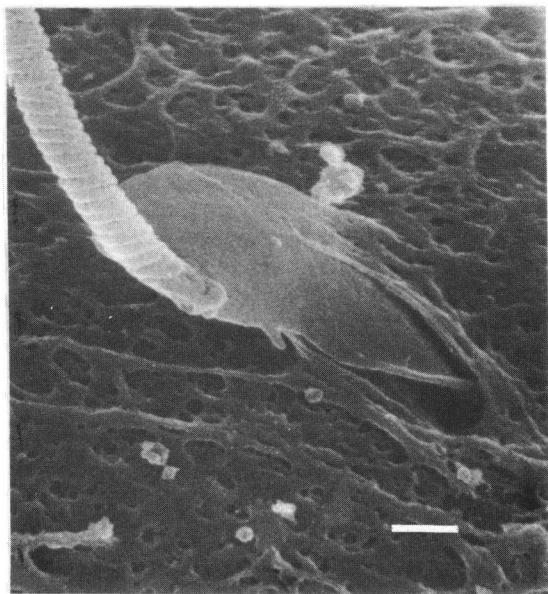


図 6 媒精後 15 分で固定

- 主要文献： 1. Florman, H.M., and Story, B.T.: Mouse gamete interactions: The zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization *in vitro*. *Devel. Biol.* 91:121, 1982.  
 2. Huang, T.T.F., Fleming, A.D. and Yanagimachi R.: Only acrosome-reacted spermatozoa can bind to and penetrate zona pellucida: A study using the guinea pig. *J. Exp. Zool.* 217:287, 1981.

先体反応の微細構造

Ultrastructural observations of the acrosome reaction in human spermatozoa treated with calmodulin antagonist, W-7.

永江 肇・岩城 章・木下 佐・村上邦夫\*・黒田 優\*  
Takeshi Nagae, Akira Iwaki, Tasuku Kinoshita,  
Kunio Murakami\*, Masaru Kuroda\*.

東邦大学医学部第2産婦人科学教室  
2nd Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Toho University.

\* 東邦大学医学部第1解剖学教室  
1st Department of Anatomy School of Medicine, Toho University.

Abstract.

There are many reports in which the mammalian spermatozoa acrosome reaction was observed in vitro and in vivo, but not in human. It has been known that the calmodulin antagonist, W-7, stimulates the acrosome reaction in human spermatozoa. This study shows the observation of the acrosome reaction in human spermatozoa treated with W-7 in mBWW medium. The results are as follows:

1. There was no morphological difference between the W-7 treated and the non treated human spermatozoa.
2. In the early stage of the human spermatozoa acrosome, the elongation of the outer acrosome membrane and the swelling of acrosome were observed.
3. In the middle stage, the ring formation into the acrosome and the improvement of the acrosome swelling were observed. There weren't any vesiculations in other species.
4. In the latter stage, the ring formation along the inner acrosome membrane was observed and it resembled vesiculations in other species.

From the results mentioned above, there seem to be some differences between human and other species in the process of the acrosome reaction.

**緒言：**ヒト以外の哺乳動物精子先体反応の過程については、in vitro, in vivoともに多くの報告がされており、plasma membranとouter acrosome membranの融合(Vesiculation)という形態学的变化を起こすことが知られている。しかし、ヒト精子については、この様な变化が生じるものかどうか疑問視する報告もあり、詳細なことについては充分解明されていない。そこで我々は、Calmodulin阻害剤であるW-7がヒト精子先体反応を著しく促進することに注目し、この方法を用いて透過電顕下に観察を行い若干の知見を得たので報告する。

**方法：** 50 μM・W-7 添加mBWW液中で1時間精液静置法を行ったのち、さらに50 μM・W-7 添加mBWW液中で3時間 incubation した群 (W-7群)、50 μM・W-7 添加mBWW液中で2時間 preincubation したあとW-7を除きmBWW液中でさらに1時間 incubation した群 (W-7<sup>\*</sup>群)、およびmBWW液中で精液静置法を行い、引き続いてmBWW液中で3時間 incubation した群 (mBWW群) の3群の精子について観察した。

それぞれの incubation 終了後、0.1Mリン酸緩衝液中 2.5% glutaraldehyde で90分間固定し、glutaraldehyde 洗浄後、上記緩衝液中 1.5% osmium tetroxide で後固定を行い、3%アガロースに包埋した。この資料を脱水系列で脱水後、Epon 812 に包埋し、ポータブルーム MT-2 型ウルトラミクロトームで超薄切片を作製し、酢酸ウラニール、クエン酸鉛で2重染色を施した。観察は、Hitachi-H600型およびJEM-100B型電子顕微鏡で行った。また、先体反応の過程を大きく次の3群に分類した。(1)未先体反応精子 (Non-AR)。(2)先体反応進行精子(V)。(3)先体反応完了精子 (AR)。この中で、今回の観察に特に重要と思われたV精子については、さらに初期、中期、後期にわけて詳細に観察を行った。

**結果：**今回観察した3群のヒト精子先体反応を進行期別に分類した結果をTable-1.に示す。これから明らかのように、W-7群およびW-7<sup>\*</sup>群において、V精子・AR精子共に著しく増加しており ( $P < 0.001$ )、先体反応が促進されていることがわかった。また、両者間に有意差は認められないことから考えて、Calmodulin 阻害剤W-7の直接作用により先体反応が促進したものであることもわかった。そこでmBWW群と他の2群における先体反応発現の過程を形態学的に検討したところ、両者間には全く異なるところは認められず、W-7で処理したヒト精子先体反応は生理学的変化であることが確認された。

以下、ヒト精子先体反応の過程について示す。

#### (1)初期の変化として、

先体部の膨化・

outer acrosome

membraneの延長

が認められる。

#### (2)中期の変化として、

膨化した先体内に

膜様輪状構造が認められ、膨化もよ

り一層著明となる。

また、一部の outer

acrosome membr-

Table 1. Observation of Human spermatozoa Acrosome Reaction by TEM

	mBWW		W-7		W-7 <sup>*</sup>	
NON-AR	89		44.5		40	
AR	V	4.6	32.7	55.5	60	33.8
	AR	11	6.4	22.8		26.2
					(n=4)	

NON-AR: NON Acrosome Reaction

V : Vesiculation

AR : Acrosome Reaction

\* : Preincubation in W-7 for 2hs before incubation in mBWW for 1hs.

Fertilization rate is 40% at 30min. after insemination

ane と plasma membrane の膜構造は不鮮明となり、この部から先体内基質の流出が認められる。  
(3)後期の変化として、先体内に認められた膜様輪状構造が inner acrosome membrane に沿って存在し、他の哺乳動物精子先体反応で観察される Vesiculation に類似している。

なお、今回観察したヒト精子 600 匹中、他の哺乳動物精子先体反応で認められるような outer acrosome membrane と plasma membrane との明らかな融合 - Vesiculation - は認められなかったが、equatorial segment の部位においては、この 2 つの膜は連続していた。

また、この実験で用いた精子の一部 (W-7 \* 群) を透明帯除去ハムスター卵に媒精したところ、媒精 30 分で 40 % の受精率が確認された。

考察 : Russell<sup>1)</sup> らは、ionophore A23187 を用いたヒト精子先体反応が他の哺乳動物精子と異なることを報告しているが、特に彼らの報告した Vesiculation は、inner acrosome membrane に沿って存在しており、今回我々が観察した膜様輪状構造と酷似しているものであった。しかし、彼らはその Vesiculation が、他の哺乳動物精子先体反応で認められるような plasma membrane と outer acrosome membrane の融合により生じたものと考えているが、他の哺乳動物精子先体反応を ionophore A23187 で促進させた場合<sup>2)</sup>、Vesiculation の存在する位置は膨化した先体の外側、すなわち outer acrosome membrane と plasma membrane の部位に認められ、Russell らおよび今回我々が観察したような inner acrosome membrane に近接した位置ではない。このようなことから、Russell らの報告した Vesiculation は、我々が観察した膜様輪状構造である可能性が極めて高いものと考えられる。

一方、柳町ら<sup>3)</sup> は、モルモット精子先体反応を観察し、先体内への  $\text{Ca}^{2+}$  の流入による先体の膨化現象を報告しているが、これは、今回我々が観察したヒト精子先体反応の初期においても認められ、同様な機序によるものであると考えられた。しかし、その後の過程において、先体内の膜様輪状構造の存在する点、plasma membrane と outer acrosome membrane の融合が確認できなかった点など、全く異なる変化が観察され、ヒト精子先体反応が他の哺乳動物精子とは異なる形態学的变化をするものと推測された。また、Calmodulin 阻害剤である W-7 のヒト精子先体反応への作用は、生理学的形態変化を促す点であることが判明し、このことは、今後この薬剤が不妊症治療に応用できる可能性を示唆するものであった。

1) Russell, L., Peterson, R. N., and Freund, M.:

Morphologic characteristics of the chemically induced acrosome reaction in human spermatozoa

Fertil, Steril. 32:87, 1979.

2) Peterson, R. N., Russell, L., Bundman, D., and Freund, M.:

Presence of microfilaments and tubular structures in boar spermatozoa after chemically inducing the acrosome reaction.

Biol. Reprod. 19:459 (1978)

3) Yanagimachi, R., and Usui, N.,

Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa.

Exp. Cell Res. 89: 161 (1974).

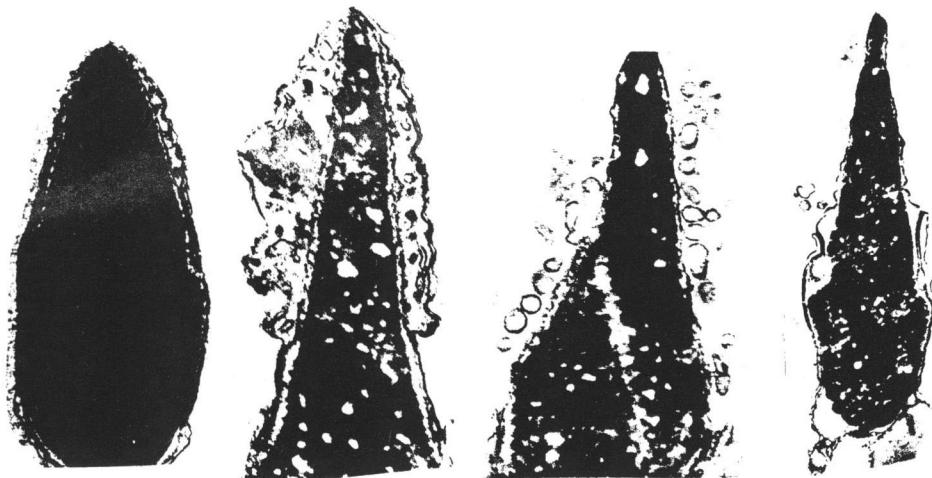


Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

Fig.1; This is the early stage of the acrosome reaction in human spermatozoa. The elongation of the outer acrosome membrane with plasma membrane have been recognized. (25,000)

Fig.2; This is the middle stage of the acrosome reaction. The ring formation into the acrosome and the improvement of the acrosome swelling have been recognized. (30,000)

Fig.3; This is the latter stage of the acrosome reaction. The ring formation along the inner acrosome membrane has been recognized. (30,000)

Fig.4; This is an acrosome reacted human spermatozoa. The membrane fusion has been recognized at the equatorial segment. (15,000)

による非外科的核除去について

Nuclear Transplantation into Pronuclear-stage  
Rat Eggs : Enucleation of Eggs by UV-irradiation

昇 公一・舟橋弘晃・内海恭三・湯原正高

Koichi NOBORI, Hiroaki FUNAHASHI, Kyozo UTSUMI,  
and Masataka YUHARA

岡山大学農学部家畜繁殖学教室

Laboratory of Animal Reproduction, Schl. of Agri. Okayama Univ.

This study was designed to establish the fundamental principle for nuclear transplantation in rat pronuclear eggs.

Single cell of rat ICM which was injected into the ICM cells in recipient blastocyst could differentiate into several organs, judged by coat color, retina pigmentation and the identification of 6-phospho gluconate dehydrogenase isozyme in the young.

Haploid female pronuclear eggs which was non-surgically enucleated by micro-spot irradiation of ultra-violet were duplicated the chromosomes by cytokinetic-B and then were *in vivo* developed into blastocyst. Therefore, these irradiation onto pronucleus of eggs was more effective for the subsequent egg development and differentiation than whole egg irradiation. But, the injected ICM cell could only partially developed in the pronuclear eggs enucleated both pronucleus by micro spot irradiation and so, further device on microinjective technique was remained to be resolved.

Thus, these results showed the possibility that micro-spot irradiation on nucleus makes use of non-surgical enucleation in egg nuclear transplantation techniques.

緒言：胚性ガン細胞の核が正常な受精胚と融合させられた時、形質発現を転換して宿主胚の正常な分化発達に参加することなどから、核にある遺伝子の発現は細胞質の働きによって調節されていることが発生工学的にも明らかにされるようになった。Hoppe & Illmensee (1981)<sup>1)</sup> はマウスの胚盤胞期胚の ICM核をマウス前核期卵に注入して、ICM由来のマウスの作出に成功したことは胚の核移植に理論的基礎を与え、技術的問題を大きく前進させただけではなく、クローン動物作出への道を開くものと思われた。しかし、胚の核除去や核の再注入などの顕微外科的技術を中心として、核移植には解決されねばならない問題が残されている。

本研究ではラット単離 ICM細胞をラット胚盤胞へ注入してキメラ動物を作出し、ラット胚盤胞の ICMの分

化多能性を調べるとともに、被核注入細胞の核を紫外線によって非外科的に除核する方法を検討し、その卵細胞質での注入移植核の発育能も検討した。

**方法：注入核の分化能の検定：**D A系胚盤胞の I C Mを免疫外科的手法により単離した。抗ラット脾臓家兎血清(抗体)にさらし、続いて新鮮正常家兎血清(補体)にさらして、細胞溶解法によって栄養膜細胞のみを除いて、 I C M細胞塊を得た。 I C M細胞塊は 0.1 %プロテアーゼに軽くさらした後、ピペッティングによって個々の単離細胞とした。単離 I C M細胞をWistar系胚盤胞の I C M細胞塊に、顕微注入法によって栄養膜細胞を介して、物理的に押し付けて凝集させた。注入キメラ胚から得られた産仔の色覚的検査を毛色と眼球の網膜細胞の色素分布で行ない、各臓器の 6-リングルコン酸脱水素酵素(6 P G D)のアイソザイムを電気泳動法により検定し、さらにはWistar系との交配による産仔の毛色から生殖系列のキメラ性を調べることによって注入された I C M由来の遺伝子の寄与率を判定した。

**宿主前核期卵の紫外線照射による除核：**非外科的に前核を除核するために種々の紫外線照射による核の不活性化法を検討した。流動パラフィン下の媒液(K R P)中に静置された前核期卵に紫外線殺菌灯を 20～40分間照射した。各時間の照射卵を偽妊娠1日目の卵管へ移植し、3日後に子宮卵を回収することによって照射卵の発育性を検定した。一部の照射卵に単離 I C Mを顕微注入し、その後同様にして注入卵子の発育性を調べた。続いて、紫外線の全卵照射による細胞質D N Aへの障害を考慮して、核のみへの紫外線のスポット照射を試みた。流動パラフィン下で点滴培養中の前核期卵に対して、顕微分光測光装置(D M S P - II, オリンパス光学)によってキセノンランプの 253.7 nm 波長の紫外線の  $5.3 \mu\text{m}^2$  のスポットをその前核にのみ照射されたようにした。雄性前核にのみ30分のスポット照射を施し、卵管移植によって、in vivo の発育性を3日後の子宮卵を回収して検定した。対照として、細胞質にのみスポット照射を行なった。さらに、雄性前核のみをスポット照射で不活性化した前核期卵をサイトカラシンB処理( $5 \mu\text{l}/\text{ml}$ , 12時間)によって、残された活性のある雌性前核を2倍体化した後、同様にして in vivo での発育能を検定することによって紫外線照射法の是非を検索した。さいごに、雌雄の両前核を同核のスポット照射で不活性化し、その卵細胞質へ注入された I C M核の発育分化能を同様にして調べた。

**結果と考察：実験 I，注入核の分化能の検定：**D A系(有色)単離 I C Mを注入されたWistar系(アルビノ)胚盤胞から発育したキメラ産仔は背線を中心に両側へD A系のアゴウチの毛色配列を示し、網膜細胞にも色素細胞がランダムに分布し、視覚的には注入 I C M由来の遺伝子が宿主細胞中で分化し、発現していることを示した。さらに 6-P G Dのアイソザイムの検定から、肝臓と血液細胞にD A系由来のタイプが検出された。しかし、この雄個体をWistar系雌ラットと交配して得られた産仔には有色の個体が得られなかつたので生殖系列にはD A系由来の細胞が関与していないかったものと思われる。

Hoppe & Illmensee (1981)<sup>1)</sup>やその他によって、マウスの I C M細胞が分化多能性や分化全能性を持つことが実証されていたが、本実験の結果から、ラット I C M細胞も少くとも分化多能性を持つことが示された。

**実験 II，紫外線照射による前核の除核と I C Mの顕微注入：**紫外線殺菌灯によって全卵照射された前核期卵は30分の照射で正常発育卵も得られたものの、かなりの増殖死を起こし、40分の照射では増殖死に加えて、非

増殖死を生じ、正常発育卵は得られなかった(表-1)。

Table-1 The effect of UV irradiation on the survival of rat pronuclear eggs and the developmental performance of transplanted ICM-cell nucleus in such enucleated eggs

UV irrad (min.)	Nuclear transp.	No. of exp.	No. of embryos transp.	Total (%)	Embryos recovered				% of abnor
					Normal Blast	Deg-Moru	2-4cell	1cell	
0	-	21	82	41(50)	37*	3	1	1	10
20	-	4	23	12(53)	8*	1	3	0	33
30	-	15	73	33(45)	10*	8	7	8	70
30	+	12	26	8(31)	3	0	5	0	63
40	-	11	37	21(56)	0	0	9	12	100
40	+	4	6	5(83)	0	0	3	2	100

\*) containing newborn young

非照射や20分の照射では全て胚盤胞への発育を示し、30分照射によって始めてその内いくらかは分裂の途上で退行(いわゆる増殖死)しているものが認められた。40分照射になると、分裂死のみならず未分割のまま退行している(非増殖死)卵子も多く認められ、正常発育卵は得られなかった。以上の結果から、照射効果の臨界時間は30分であろうと推定し、30分照射卵か40分照射卵にICMを注入してその発育性を調べた。30分照射卵ではICM細胞核の注入によって、わずかな発育性の改善がみられ、死滅卵もほとんど増殖死による発育途上卵が認められた。40分照射卵ではICM核注入によっても卵子の発育は認められなかった。Eibl & Spilman (1977)<sup>2)</sup>はマウスの前核期卵から桑実胚に対して253.7 nm 紫外線に対する感受性を比較した結果、前核期受精卵の感受性が高いことを示し、これをゲノムDNAのUV傷害の修復機構が阻害されるためとした。そして高線量の場合にはさらにこの修復能が抑えられることから、UVによる細胞内構造物の傷害を示唆した。さらにKu & Voytek (1976)<sup>3)</sup>は遺伝的にDNAのUV傷害修復機構を欠いた色素性乾皮症の皮膚の細胞でさえもマウス受精卵の発育を4細胞期までに完全に停止させたUV線量(0.5 J/m<sup>2</sup>)において5割の生存があったことから、受精卵において、核DNA以外にも紫外線の標的になり得るもののが存在する可能性を示唆した。従って本実験での比較的高線量と思われる40分照射卵にICM核の注入された後にも卵子の発育性の回復が認められなかったのは、細胞質中の核酸(とくにミトコンドリアDNA)を含めた細胞質の損傷による可能性も充分に考えられる。

紫外線による細胞質の損傷を避けるために、紫外線の核のみへのスポット照射法が検討された(表-2)。30分間紫外線を前核期卵の雄性前核か細胞質にスポット照射した時のその後の発育能が調べられた。雄性前核のスポット照射卵子ではほとんどの場合、分裂能を失ない1細胞卵のままか、発育途上で退行した。一方、細胞質へのスポット照射では全ての卵子が胚盤胞へと発育した。ラットの単為発生胚での発育検定において半数体胚は2細胞期までしか発育せず、2倍体胚になって始めて胚盤胞かそれ以上に発育することが著者らの研究<sup>4)</sup>で証明されていることから、本研究での雌性前核のみの半数体胚の発育停止は紫外線照射によって雄性前核のみが首尾よく不活性化していることを示している。

損傷を受けた核の残遺物が細胞質に残存した場合、他の正常核の分裂に関与して発育障害を引き起こすとい

Table-2 The effect of UV micro-spot irradiation on the survival of rat pronuclear eggs and the developmental performance of diploid female pronucleus or of transplanted ICM-cell nucleus in such enucleated eggs

Object of UV irrad*	Nuclear transp/ Cytka-B	No. of exp	No. of embryos transp.	Embryos recovered				% of abnor
				Total(%)	Normal Blast.	Abnormal Deg-Moru	2-7cell 1cell	
M-pron	-	5	16	11(69)	1	0	6	4 91
Cytpla	-	4	7	4(57)	4	0	0	0 0
M-pron	Cytka-B	2	10	2(20)	1	1	0	0 50
M&F-Pr	Nuc.tra.	3	9	6(67)	0	0	2	4 100
M&F-pr	-	2	2	2(100)	0	0	1	1 100
2-cyto	-	1	3	3(100)	3	0	0	0 0

\*) 30 minutes' micro-spot irradiation

う報告<sup>5)</sup>もあることから、雄性前核を不活性化し、雌性前核のみ正常と思われるハプロイド胚をサイトカラシンで2倍体にして胚盤胞への発育を観察した。雌性発性2倍体胚は胚盤胞期にまで発育するものが認められた。これらの結果から、細胞質に障害を与えることなしに、スポット照射によって核のみを不活性化した場合、その卵細胞質は正常な核の遺伝子発現を誘導し、発育分化能を保持させ得る可能性が示唆された。さらにこのスポット照射法によって障害を受けた核が他の正常核の発育分化能を阻害しないことからスポット照射法が非外科的な核除去法の有効な手段となり得ることが示された。

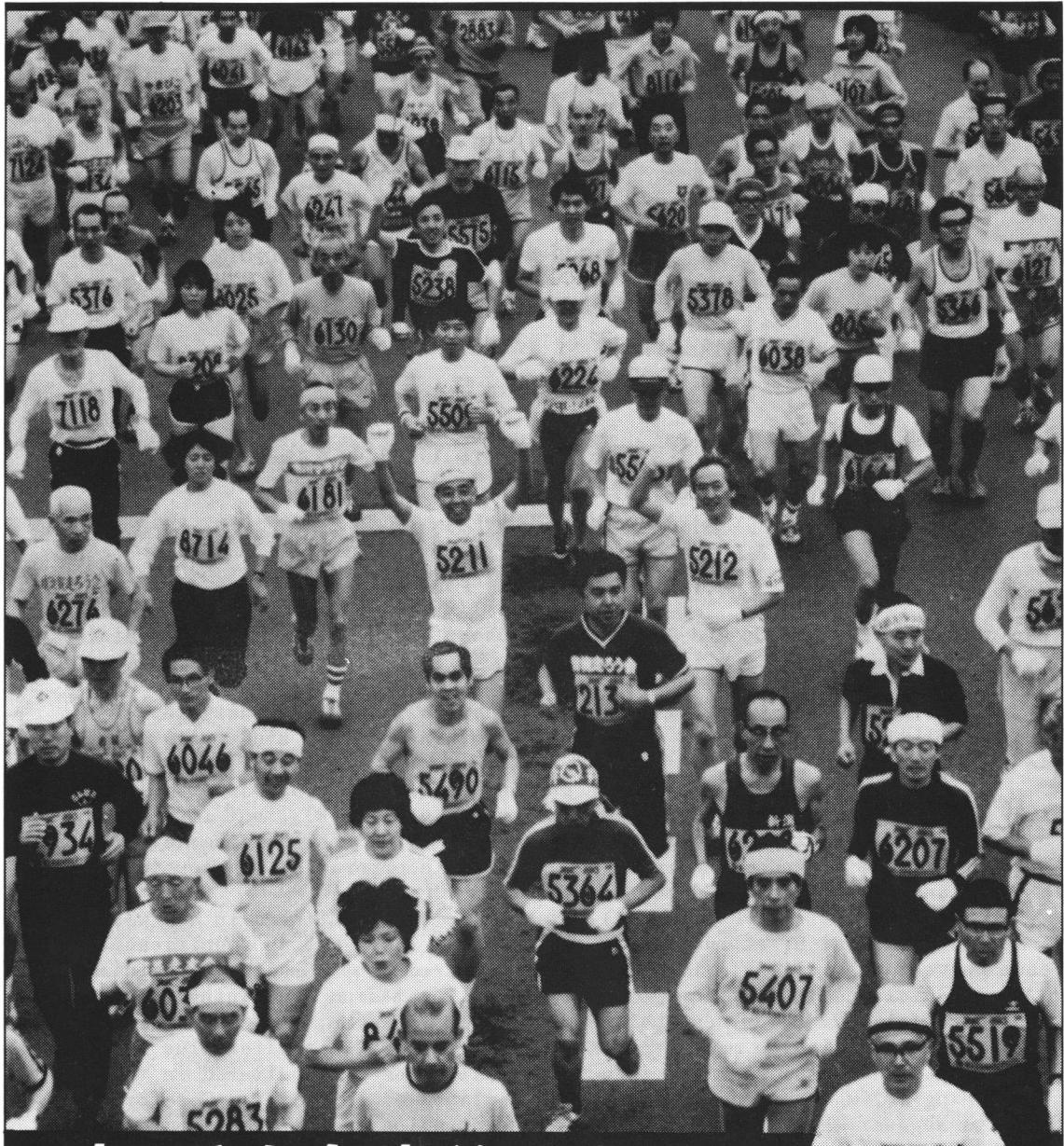
雌雄の両前核に紫外線をスポット照射した卵細胞質にICM細胞の単離核が注入されて、その卵子の発育分化能が検定された。両前核を不活性化された卵子は全て分裂停止を示したが、核移植された卵子は4日間のin vivo培養で6~8細胞期まで発育した。しかし、この分割卵子はその後のin vitro培養でそれ以上の発育を示さなかった。このように、核の顕微注入胚の低い発育能は、ラットICM核の分化多能性が前もって検定されていることから、顕微注入操作の技術的問題に帰因するかも知れない。顕微注入卵子は注入後、数時間のin vitroの培養によって形態的正常性の検定後に卵管移植に供されているが、著者らの顕微注入技術では検定培養中に退行変性する卵子が多いことから、注入成功率の低さが低い発育率と関連しているように思われる。そのようなことから、Mc Grath & Solter (1983)<sup>6)</sup>が示したような細胞融合法による核の注入法も検討しているが未だ確実な成果を得ていない。

以上のようにラット胚盤胞のICM核は分化多能性を持つことが示され、1細胞受精卵細胞質のドナー核として供用し得ることが示唆された。雄性前核を不活性化され、2倍体化された雌性前核期胚が胚盤胞期にまで発育したことから、紫外線のスポット照射によってラット前核期胚の核を非外科的に不活性化することが有効な除核法となり得ることが本実験から明らかにされた。しかし、紫外線で核不活性化された卵細胞質での注入核の分化全能性が今後の研究において証明されねばならない。

#### 主要文献

- 1) Hoppe, P. C. and Illmensee, K.: Nuclear transplantation in *Mus musculus*: Developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell*, 23, 9-18, 1981

- 2) Ebis, H. C. and Speelman, H.: Differential sensitivity of preimplantation mouse embryos to UV irradiation in vitro and evidence for postimplantation repair. *Rad. Res.*, 71, 367-376, 1977.
- 3) Ku, K. Y. and Voytek, P.: The effects of U.V.-light, ionizing radiation and the carcinogen N-acetoxy-2-fluorenylacetamide on the development in vitro of one- and two-cell mouse embryos. *Int. J. Radiat. Biol.*, 30, 401-408, 1976
- 4) 山田雅保, 内海恭三, 湯原正高: 哺乳動物単為発生誘起に関する研究, とくに幼若ラット過排卵胞の in vitro 活性化について, *岡大農学報* 48, 23-29, 1976
- 5) Gurdon, J. B., :The effects of ultraviolet irradiation on uncleaved eggs of *Xenopus laevis*. *Quart. J. micr. Sci.*, 101, 299-311, 1960
- 6) McGrath, J. and Solter, D. :Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*, 220, 1300-1302, 1983



## すこやかな老後のために

脂質代謝異常と血行障害を改善する

微小循環系賦活剤

# ユベラニコチネート

\*ご使用にあたっては添付文書をご参照下さい。

#### 適応症

- 高脂質血症
- 下記に伴う随伴症状  
高血圧症、脳動脈硬化症、脳卒中後遺症
- 下記に伴う末梢循環障害  
閉塞性動脈硬化症

#### 使用上の注意

##### 副作用

- 1)消化器:ときに食欲不振、下痢、便秘などの症状があらわれることがある。
- 2)皮膚:ときに発疹等の症状があらわれることがある。
- 3)その他:ときに温感、心窓部痛があらわれることがある。

  
エーザイ  
東京都文京区小石川4-6-10



の性質

The Charactor of Mouse Preimplantation Embryo

上原茂樹・千田 智・八日市谷 隆・星 和彦・星合 夏

Shigeki UEHARA, Satoru CHIDA, Takashi  
YOKAICHIYA, Kazuhiko HOSHI and  
Hiroshi HOSHIAI

東北大学医学部産科学婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Tohoku University School of Medicine

The present study was carried out in order to reveal the character of the preimplantation mouse embryo. The results obtained in the study were summarized as follows;

1. [ $^3\text{H}$ ]uridine incorporation of preimplantation embryos was stimulated by  $10^{-8}\text{M}$  estradiol,  $1\text{ }\mu\text{g/ml}$  and  $10\text{ }\mu\text{g/ml}$  of prostaglandin F $2\alpha$ , but it was inhibited by  $10\text{ }\mu\text{g/ml}$  of prostaglandin E $2$ ,  $1\text{ }\mu\text{g/ml}$  and  $10\text{ }\mu\text{g/ml}$  of indomethacin. The inhibitory effect of indomethacin on [ $^3\text{H}$ ]uridine incorporation was counteracted by prostaglandin F $2\alpha$  when added to the medium.

2. The amount of [ $^3\text{H}$ ]estradiol uptake of embryos cultured in  $4^\circ\text{C}$  was reduced, compared with that of embryos cultured in  $37^\circ\text{C}$ . There was no significant difference between the radioactivity of embryos cultured in the medium containing  $2 \times 10^{-8}\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]estradiol and that of embryos cultured in the medium containing  $2 \times 10^{-8}\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]estradiol plus  $10^{-6}\text{M}$  nonlabelled estradiol. However, the radioactivity of embryos cultured in the medium containing  $2.5 \times 10^{-8}\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]estradiol plus  $10^{-6}\text{M}$  nonlabelled estradiol was more than twice that of embryos cultured in the medium containing  $10^{-8}\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]estradiol plus  $10^{-6}\text{M}$  nonlabelled estradiol. The former results suggest that the physiological concentration of estradiol and prostaglandin F $2\alpha$  stimulated metabolism of preimplantation mouse embryo and that these substances induce implantation in vivo. Furthermore, by the latter results, it is indicated that preimplantation embryos are capable of uptake of estrogen and that the mechanism of uptake is neither selective nor receptor mediated.

**緒言：**着床機構における子宮及び胚の相互関係については近年研究が進んできているが、着床前の胞胚のもつ性質、とくに胞胚は着床期に生体内にある物質によって影響を受けるかどうか、また胞胚は子宮に対して能動的作用を及ぼすのかどうかなどについての報告は僅かである。そこで我々は、マウス胞胚の [ $^3\text{H}$ ]uridine

取り込みを指標に、estradiol, prostaglandin E<sub>2</sub> & F<sub>2α</sub>, indomethacin の及ぼす効果を調べると同時に、マウス胞胚の estradiol 取り込み能について検討し、着床前の胞胚のもつ性質についていくつかの知見を得た。

**方法：** 1. マウス胞胚の [<sup>3</sup>H] uridine 取り込みに及ぼす estradiol, prostaglandin E<sub>2</sub>, prostaglandin F<sub>2α</sub>, indomethacin の影響

週令 6 ~ 9 週の CD-1 マウスを PMSG 6 IU, hCG 10 IU で過排卵処理し交配させ、翌朝腔栓を検索した。hCG 投与後 90 時間の妊娠 4 日目に ether 麻酔下、頸椎脱臼で屠殺し子宮を摘出、それを実体顕微鏡下で 2 分し、各子宮角に Hanks 液を注入して胞胚を採取した。採取された胞胚は Hanks 液で一回洗浄され、続いて実験に使用する培養液中で再び洗浄された。使用した培養液は MEM または DMEM で、1 mg/ml BSA (bovine serum albumin), 10 μg/ml gentamycin を添加し、さらに [<sup>3</sup>H] uridine を 20 μCi/ml の濃度で加えた。各培養液には estradiol 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup> M, prostaglandin E<sub>2</sub> 1, 10 μg/ml, prostaglandin F<sub>2α</sub> 1, 10 μg/ml, indomethacin 1, 10 μg/ml 及び indomethacin 1 μg/ml + prostaglandin F<sub>2α</sub> 1 μg/ml の条件で各物質が加えられたのに対し、対照の培養液はこれらを加えないものとした。胞胚は 10 ~ 20 個を 1 群として、500 μl の各培養液中で 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下で 4 時間 incubation し、radiolabelling された。その後氷冷すると同時に非放射活性 uridine 液 (10<sup>-4</sup> M) を 1 ml 加えてから、各群を順次 PBS で 2 回洗浄した。次いで胞胚数を確認しつつ filter 上に移し、氷冷 10% TCA 液で処理、PBS で十分洗浄したあと filter を乾燥した。radioactivity 測定は液体シンチレーション法によった。実験は各物質別に行われ、各々につき 3 回以上繰り返された。

## 2. マウス胞胚の [<sup>3</sup>H] estradiol 取り込み

同様の方法で採取した胞胚を用い、 [<sup>3</sup>H] estradiol の取り込みを種々の条件下で観察した。使用した培養液は DMEM でやはり 1 mg/ml BSA, 10 μg/ml gentamycin を添加した。設定した胞胚の培養条件は、 i) [<sup>3</sup>H] estradiol 2 × 10<sup>-8</sup> M 中で 4°C 下、 ii) [<sup>3</sup>H] estradiol 2 × 10<sup>-8</sup> M 中で 37°C 下、 iii) [<sup>3</sup>H] estradiol 2 × 10<sup>-8</sup> M + nonlabelled estradiol 10<sup>-6</sup> M 中で 37°C 下、 iv) [<sup>3</sup>H] estradiol 10<sup>-8</sup> M + nonlabelled estradiol 10<sup>-6</sup> M 中で 37°C 下、 v) [<sup>3</sup>H] estradiol 2.5 × 10<sup>-8</sup> M + nonlabelled estradiol 10<sup>-6</sup> M 中で 37°C 下の 5 種で、各々 5% CO<sub>2</sub> 内で 20 時間とした。胞胚は 10 ~ 20 個を 1 群として、各条件につき 3 群以上を供した。培養後は胞胚を Hanks 液中で 6 回洗浄し、次いで 4 N NaOH 中で溶解後 4 N HCl で中和し、 radioactivity を液体シンチレーション法で測定した。

**結果：** 1. マウス胞胚の [<sup>3</sup>H] uridine 取り込みに及ぼす estradiol, prostaglandin E<sub>2</sub>, prostaglandin F<sub>2α</sub>, indomethacin の影響 (図 1, 2, 3, 4)

各物質につき 3 回以上の実験が行われ、各回で対照群の radioactivity の平均値に多少の差がみられたため、それらを 100 とし、各条件下での結果を対照に対する百分比で表わし、normalize した。統計学的解析は t-test によった。estradiol は 10<sup>-8</sup> M で [<sup>3</sup>H] uridine 取り込みを促進し、高濃度になるとその効果は減じた (図 1)。prostaglandin E<sub>2</sub> は 10 μg/ml で取り込みを抑制した (図 2) のに対し、prostaglandin F<sub>2α</sub> は 1 μg/ml, 10 μg/ml で共に促進し、その促進効果はとくに 1 μg/ml で高かった (図 3)。indomethacin は濃

度に応じて取り込みを抑制したが、indomethacin  $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ と共にprostaglandin  $F_{2\alpha} 1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ を加えた場合にはその抑制作用は減弱した(図4)。

## 2. マウス胞胚の $[^3\text{H}]$ estradiolの取り込み(図5, 6)

$4^\circ\text{C}$ 下で培養された場合の $[^3\text{H}]$ estradiol 取り込みは $37^\circ\text{C}$ で培養された場合より有意に低値をとり(図5)，この条件の radioactivity は非特異的取り込みと考えられた。 $37^\circ\text{C}$ の培養条件で得られた取り込みにおいて， $[^3\text{H}]$ estradiol  $2 \times 10^{-8}\text{ M}$ 中と $[^3\text{H}]$ estradiol  $2 \times 10^{-8}\text{ M} + \text{nonlabelled estradiol } 10^{-6}\text{ M}$ 中の取り込み量には有意差はなく(図5)，また $[^3\text{H}]$ estradiol  $2.5 \times 10^{-8}\text{ M} + \text{nonlabelled estradiol } 10^{-6}\text{ M}$ 中の取り込みは $[^3\text{H}]$ estradiol  $10^{-8}\text{ M} + \text{nonlabelled estradiol } 10^{-6}\text{ M}$ 中の取り込みの2倍以上の値を示した(図6)。

考察：estradiol は $10^{-8}\text{ M}$ ，prostaglandin E<sub>2</sub> 及び F<sub>2α</sub> は $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$  が生理的濃度と考えられ，これらの濃度で estradiol, prostaglandin F<sub>2α</sub> が $[^3\text{H}]$ uridine 取り込みを促進したことは，生体内でも胞胚に直接作用を及ぼし，着床を促進する可能性が示唆された。これに対し，prostaglandin 産生阻害物質である indomethacin が in vitro で $[^3\text{H}]$ uridine 取り込みを抑制し，さらにその抑制が外的に加えた prostaglandin F<sub>2α</sub> によって代償されたことは，胞胚の prostaglandin 産生を推測させる事実とも考えられた。

胞胚の $[^3\text{H}]$ estradiol 取り込みについての結果から， $4^\circ\text{C}$ 下での培養では胞胚が発育せず低値をとったが， $37^\circ\text{C}$ 下では胞胚が発育したため高値をとったことが考えられた。即ち， $4^\circ\text{C}$ 下での取り込み量は非特異的なものであり，また $37^\circ\text{C}$ 下での発育に伴う胞胚腔の拡大が $[^3\text{H}]$ estradiol 取り込みの原因であると推察された。また nonlabelled estradiol  $10^{-6}\text{ M}$ を用いた場合の結果， $[^3\text{H}]$ estradiol の濃度を $2.5 \times 10^{-8}\text{ M}$ と $10^{-8}\text{ M}$ の2種で行った実験の結果より，その取り込みは受容体を介さないものであることが考えられた。

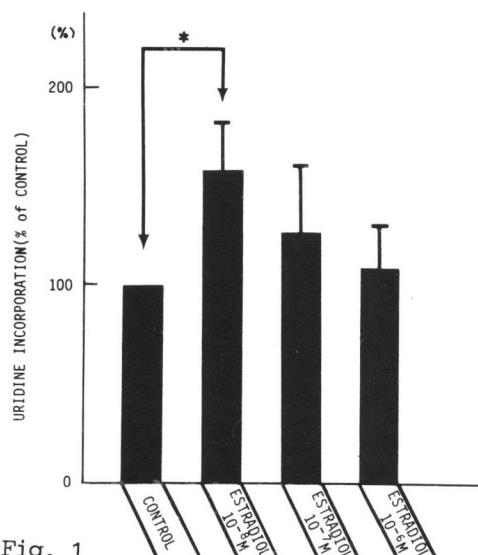


Fig. 1

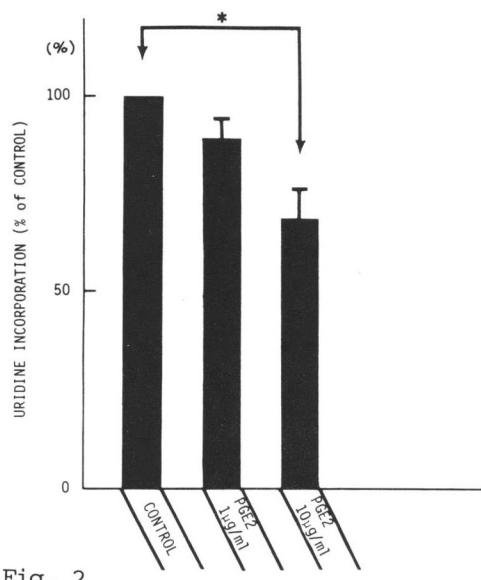


Fig. 2

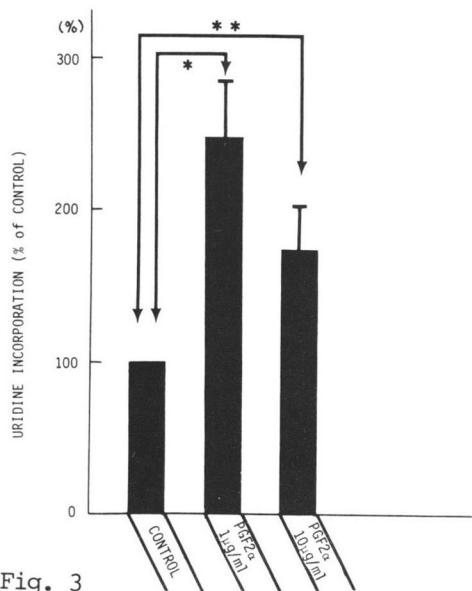


Fig. 3

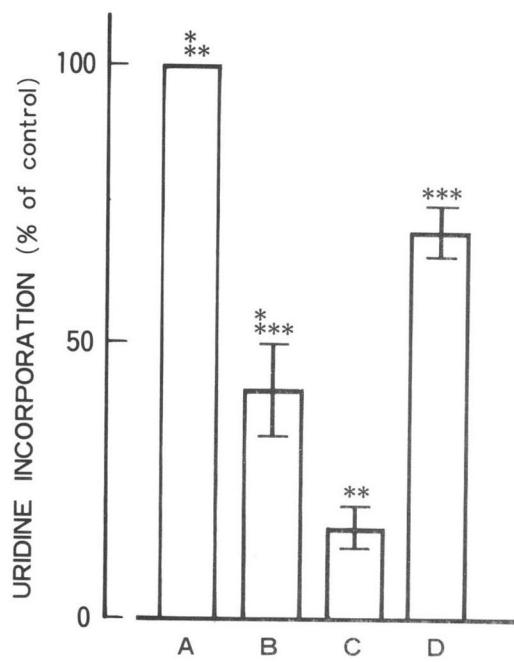


Fig. 4 A:Control, B:Indomethacin 1μg/ml, C:Indomethacin 10μg/ml, D:Indomethacin 1μg/ml=PGF<sub>2</sub><sub>α</sub> 1μg/ml.

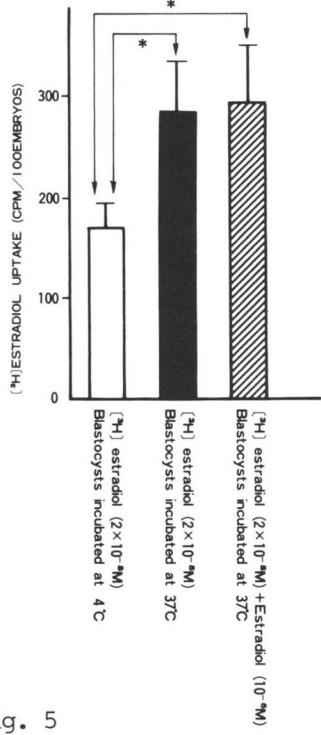


Fig. 5

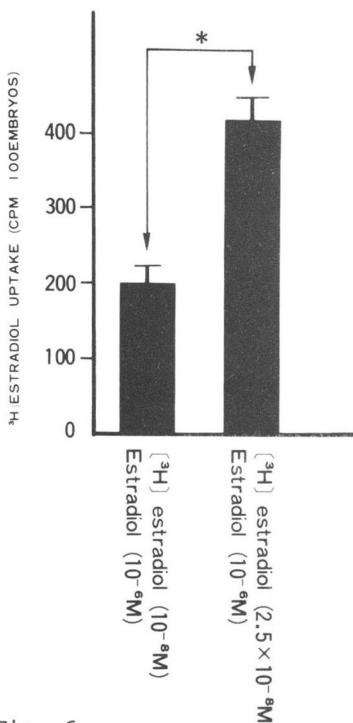


Fig. 6

凍結・融解マウス胚の生存性におよぼす  
胚の発生段階の影響

Effects of Embryonic Stages on Survival  
of Frozen-Thawed Mouse Embryos

宮本 元・石橋武彦

Hajime MIYAMOTO and Takehiko ISHIBASHI

京都大学農学部家畜生体機構学研究室

Laboratory of Functional Anatomy of Farm Animals, Faculty of Agric, Kyoto Univ.

The effects of the stages of development on survival of mouse embryos frozen by various methods were examined. When embryos were cooled to  $-40$  or  $-75^{\circ}\text{C}$  at  $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  before transfer to liquid nitrogen (LN) in the presence of DMSO (2 or 1.5 M), the survival of 8-cell embryos and morulae was higher than that of blastocysts and survival was the lowest for 2-cell embryos. After placed into a  $-20^{\circ}\text{C}$  bath for 20 min before transfer to LN with DMSO, the survival of 2-cell embryos was lower than that of embryos at later stages of development. After placed into crushed dry ice for 15 min before transfer to LN with DMSO, no embryos survived. When embryos were frozen in the presence of glycerol (2 or 1.5 M), the survival of 8-cell embryos and morulae was higher than that of blastocysts regardless of freezing methods and no 2-cell embryos survived. The present results show that differences in the susceptibility of mouse embryos of various stages of development to freezing and thawing exist.

**緒言：** 1972年にWhittinghamら<sup>1)</sup>によってマウス胚の凍結保存法が開発されて以来、今日ブタ以外のおもな哺乳類胚の凍結保存が可能になった。凍結・融解胚の生存性に影響をおよぼすおもな要因には、保護物質、冷却速度、融解速度などがある。さらに、凍結後の胚の生存性は動物種によても異なり、また同一種でも胚の発生段階によって差異がある<sup>2~5)</sup>。牛では、胚盤胞は凍結に耐えられるが8~16細胞胚は $0^{\circ}\text{C}$ に冷却するだけではとんど死滅する<sup>2)</sup>。マウスでは、1細胞胚から胚盤胞にいたるすべての発生段階の凍結胚から産子がえられているが、1細胞胚は2および8細胞胚に比べ凍結後の生存性は低い<sup>1,4)</sup>。本研究はジメチルスルフォキサイド(DMSO)およびグリセリンの存在下で、種々の方法で凍結したマウス胚の生存性におよぼす胚の発生段階の影響を明らかにするために行ったものである。

**方法：** ICR雌マウス(4~8週齢)に5~10iuのPMSGおよびHCGを約48時間間隔で腹腔内注射し、

雄と交配させた。修正 Dulbecco リン酸緩衝液 (PBS) で生殖器を灌流し、2, 4 および 8 細胞胚、桑実胚、胚盤胞を採取した。PBS (0.1 ml) を含むガラス試験管に 10 ~ 25 個の胚を入れ、0 °C で DMSO またはグリセリンを含む PBS を 0.075 ml ずつ 10 分間隔で 2 回添加し、保護物質の最終濃度を 2 M または 1.5 M とした。0 °C で 10 分間の平衡後、-7 °C で植氷し 5 分後につぎの 4 種類の方法でサンプルを凍結した。なおドライアイス凍結法では植氷を行なわなかった。(I) 緩慢凍結法 (凍結法 I) : 0.5 °C / 分 の速度で -75 °C に下げ、この温度からサンプルを液体窒素 (LN) へ浸漬した<sup>1)</sup>。(II) -40 °C から液体窒素へ急冷 (凍結法 II) : 0.5 °C / 分で -40 °C に下げ、この温度からサンプルを液体窒素へ浸漬した。(III) 二段階凍結法 (凍結法 III) : 植氷後のサンプルを -20 °C のアルコールバスに移し、このバス中に 20 分間保った後液体窒素へ浸漬した<sup>2)</sup>。(IV) ドライアイス凍結法 (凍結法 IV) : サンプルを 0 °C から魔法びん内の粉末ドライアイス中に移し、試験管の下部 2/3 をドライアイス中に 15 分間埋没させた後液体窒素へ浸漬した<sup>3)</sup>。液体窒素中で 1 ~ 24 時間凍結した後、サンプルを 40 °C の温水中で振とうして急速融解した。緩慢凍結したサンプルのみは室温下の空气中に静置して緩慢融解した。融解胚を 0 ~ 2 °C で最初、凍結時と同濃度の保護物質と 0.5 M ショ糖含有の PBS に移し、3 分後に 0.5 M ショ糖含有の PBS に移し、さらに 3 分後に新鮮な PBS で数回洗浄した。これらの胚を炭酸ガス培養装置内で培養し、胚盤胞に発生した胚を生存胚と判定した。なお、胚盤胞を培養した時には、それらが膨脹したときに生存胚とみなした。同一実験を 3 ~ 5 回くり返して行った。

**結果：** DMSO 存在下で凍結されたマウス胚の生存性におよぼす胚の発生段階の影響について検討し、それらの成績を Table 1 に示した。ドライアイス凍結法では、2 細胞胚から胚盤胞にいたるいずれの発生段階の胚もすべて死滅したが、他の 3 種類の凍結法ではこれらすべての発生段階の胚が生存した。緩慢凍結法では、8 細胞胚 (生存率 83 %) と桑実胚 (90 %) の生存率は 2 細胞胚 (32 %) と胚盤胞 (54 %) の生存率より高かった ( $P < 0.01$ )。これと同様の傾向は、-40 °C まで緩慢凍結した後液体窒素へ浸漬した場合にもみられた。-20 °C から液体窒素へ浸漬した二段階凍結法の場合には、8 細胞胚 (42 %)、桑実胚 (52 %) および胚盤胞 (40 %) の間には生存率に有意差はなく、これらに比べ 2 細胞胚 (20 %) の生存率は低かった ( $P < 0.05$ )。以上の成績から、DMSO を用いた本実験条件下では 8 細胞胚と桑実胚の凍結後の生存性が他の胚より高く、また凍結法 I, II は凍結法 III, IV より高い生存性のえられる傾向がみられた。

グリセリン存在下で凍結された胚の生存性におよぼす発生段階の影響に関する成績を、Table 2 に示した。2 細胞胚はいずれの凍結法でも死滅したが、8 細胞胚、桑実胚および胚盤胞はいずれの凍結法でも生存した。これらの凍結法において、8 細胞胚を桑実胚の生存率は胚盤胞よりも高く ( $P < 0.01$ )、また凍結法 I, II, IV は凍結法 III より高い生存性のえられる傾向がみられた。

各発生段階の胚の凍結後の生存性と保護物質 (DMSO, グリセリン) との関係をみると、緩慢凍結法と -40 °C まで緩慢凍結した後、液体窒素へ浸漬した場合には、8 細胞胚、桑実胚および胚盤胞の生存性に関して DMSO とグリセリンの間には差がなく、2 細胞胚は DMSO 存在下で生存したが、グリセリン存在下では死滅した。一方、-20 °C から液体窒素へ浸漬した二段階凍結法では、8 細胞胚と桑実胚の生存性は DMSO よりグリセリン存在下の方が高かったが、2 細胞胚は DMSO 存在下でのみ生存した。ドライアイス凍結法の場合、胚はグリセ

Table 1. Effects of embryonic stages on survival of mouse embryos frozen-thawed in the presence of DMSO

Freezing method*	% Survival			
	2-cell	8-cell	Morula	Blastocyst
(I) Slow freezing	32 (72)**	83 (80)	90 (77)	54 (68)
(II) Slow freezing to -40°C before transfer to LN	45 (60)	80 (91)	88 (75)	56 (84)
(III) Two-step freezing (-20°C (20 min) → LN)	20 (75)	42 (66)	52 (83)	40 (65)
(IV) Dry ice freezing (-79°C (15 min) → LN)	0 (63)	0 (55)	0 (68)	0 (61)

\*For details of freezing methods, see text.

\*\*The value in parentheses represents the number of embryos recovered after thawing.

Table 2. Effects of embryonic stages on survival of mouse embryos frozen-thawed in the presence of glycerol

Freezing method*	% Survival				
	2-cell	4-cell	8-cell	Morula	Blastocyst
(I) Slow freezing	0 (54)**	—	79 (66)	82 (77)	51 (63)
(II) Slow freezing to -40°C before transfer to LN	0 (68)	—	85 (59)	92 (65)	56 (71)
(III) Two-step freezing (-20°C (20 min) → LN)	0 (65)	—	56 (70)	71 (78)	39 (67)
(IV) Dry ice freezing (-79°C (15 min) → LN)	0 (51)	6 (66)	61 (71)	80 (64)	41 (68)

\*For details of freezing methods, see text.

\*\*The value in parentheses represents the number of embryos recovered after thawing.

リン存在下でのみ生存し、DMSO の保護効果は認められなかった。

**考察：**本研究において、DMSO の存在下で凍結されたマウスの2細胞胚の生存性は、8細胞胚、桑実胚、胚盤胞より低く、グリセリンの存在下で凍結すると2細胞胚のみ死滅した。これらの成績は、凍結・融解後のマウス胚の生存性は胚の発生段階によって差異があり、2細胞胚は8細胞胚以後の胚に比べ生存性が低いことを示している。

ラット胚の凍結において、2細胞胚は胚盤胞に比べ生存性が低く<sup>5)</sup>、また桑実胚は2～8細胞胚や胚盤胞より生存性の高いことが示唆されている<sup>8)</sup>。さらに、ウサギの桑実胚は8細胞胚より凍結後の生存性が高く、8細胞胚より前の発生段階の胚は凍結にはほとんど耐えられない<sup>9)</sup>。牛では、8～16細胞胚は0°Cに冷却するだけでほとんど死滅するが、桑実胚と胚盤胞は凍結後も生存できる<sup>2,3)</sup>。今日、牛、羊および山羊では桑実胚か胚盤胞の凍結保存は可能であるが、桑実胚より前の発生段階の胚の凍結には成功していない<sup>3)</sup>。

本研究および従来の報告から、マウス胚を含む哺乳動物胚の発生段階が凍結後の生存性に大きな影響を与え、一般に発生が進むにつれて耐凍性の増すことが明らかである。凍害のおもな原因是、凍結過程での細胞内水晶の形成および融解過程でのそれらの成長と再結晶化であり、一般に保護物質は細胞内に透過した方が保護効果が高まると考えられている<sup>10)</sup>。マウスの未受精卵と胚では、発生が進むにつれてグリゼリンの透過性が増加した<sup>11)</sup>。

胚の発生が進むにつれて割球の大きさは小さくなるが、それとともに割球の膜の透過性や浸透圧衝撃に対する抵抗性が増すために凍結過程で胚が脱水されやすくなり、同時に保護物質も割球内に透過しやすくなると推察される。一方、胚の発生が進むにつれて割球の細胞質自身の脱水性も脱水されやすいように変化するのかもしれない。

## 主要文献

1. WHITTINGHAM, D. G., LEIBO, S. P. and MAZUR, P. : Survival of mouse embryos frozen to  $-196^{\circ}$  and  $-269^{\circ}\text{C}$ .  
Science, 178, 411-414, 1972
2. POLGÈ, C. : The Freezing of Mammalian Embryos (ELLIOTT, K. and WHELAN, J. 編). Ciba Fndn Symp.  
No. 52, pp. 3-18, Elsevier, Amsterdam, 1977
3. MOORE, N. W. and BILTON, R. J. : The Freezing of Mammalian Embryos (ELLIOTT, K. and WHELAN, J. 編).  
Ciba Fndn Symp. No. 52, pp. 203-219, Elsevier, Amsterdam, 1977
4. WHITTINGHAM, D. G. : Low Temperature Preservation in Medicine and Biology (Ashwood-Smith, M. J. and  
Farrant, J. 編). pp. 65-83, Pitman Medical, Tunbridge Wells, 1980
5. 内海恭三. 哺乳動物卵の凍結保存, 代謝 16巻 増刊号 性, pp. 387-396, 1979
6. WOOD, M. J. and FARRANT, J. : Preservation of mouse embryos by two-step freezing. Cryobiology, 17,  
178-180, 1980
7. MIYAMOTO, H. and ISHIBASHI, T. : Solid CO<sub>2</sub> freezing of mouse embryos. J. Reprod. Fert., 67, 107-111,  
1983
8. KASAI, M., NIWA, K. and IRITANI, A. : Survival of rat embryos after freezing. J. Reprod. Fert., 66, 367-370,  
1982
9. BANK, H. and MAURER, R. R. : Survival of frozen rabbit embryos. Exp. Cell Res., 89, 188-196, 1974
10. MAZUR, P. : Cryobiology: The freezing of biological systems. Science, 168, 939-949, 1970
11. MAZUR, P., RIGOPoulos, N., JACKOWSKI, S. C. and LEIBO, S. P. : Preliminary estimates of the permeability  
of mouse ova and early embryos to glycerol. Biophys. J., 16, 232a, 1976

超低温冷凍庫を用いた牛胚の凍結と  
その成績

Freezing of bovine embryos in the ultra low  
temperature refrigerator

後藤太一・清水明・三角久雄・安田出・萱野裕是

Taichi GOTO, Akira SHIMIZU, Hisao MISUMI,  
Izuru YASUDA and Hiroshi KAYANO

小岩井農牧(株)技術研究センター

Koiwai Agriculture and Stock-farming Co., Ltd. Research and  
Development Laboratory

In order to clarify the viability after deep-freezing, thirty-normal embryos  
(from molulae to blastocysts) were undertaken.

Each embryo was deposited in the 0.25ml straw with 1.0M glycerol Dulbecco's  
Phosphate Buffered Saline (PBS) containing heat treated calf serum. The straws  
were transferred into a plastic bottle poured absolute ethyl alcohol. The bottle was  
placed on the ultra low temperature refrigerator kept to -85°C.

When the temperature of ethyl alcohol reached at -35°C, the straws were trans-  
ferred to the another pre-cooled alcohol (-70--75°C) and retransferred into liquid  
nitrogen immediately.

Each embryo was thawed directly in a water bath at 35°C.

The results obtained were as follows;

1. Cooling rates from room temperature to -5°C and -5°C to -35°C were -0.43  
C/min. and -0.25 C/min. respectively.

2. Four of 22 embryos (18%) were developed in vitro culture. Four of 8 embryos  
(50%) transferred non-surgically to recipients were confirmed in pregnancies.

Survival rate of blastocysts was higher than that of molulae in both embryo  
culture and embryo transfer of this frozen-thawed method.

(2.3.4.5) (1.2)  
緒言：牛胚の凍結には、プログラムフリーザー やドライアイス・アルコールなどが使われている。しかし、プログ  
ラムフリーザーは高価なこと、ドライアイス・アルコール法は、ドライアイスの投入が煩雑であることなど

の欠点がある。

著者らは、アルコールと超低温冷凍庫を用いて、牛胚の凍結を試みた。この方法の概要と、その成績について報告する。

方法：供試した牛胚は、多排卵誘起した牛の排卵後6～8日目に採取した正常な形態を有する、桑実胚から胚盤胞胚の計30個である。凍結保存液は20%子牛血清添加リン酸緩衝液(Dulbecco's PBS)を用いた。耐凍剤はグリセリンを用い、最終濃度は、1.0モルとした。グリセリン平衡は室温でおこない6段階のグリセリン濃度(0.17, 0.33, 0.5, 0.67, 0.83, 1.0モル)に移卵し各処理時間はそれぞれの濃度で5分間、除去は10分間とした。

牛胚は、精子凍結用の0.25mlプラスチックストローに1個ずつ入れた。

凍結方法は、周囲を断熱材(発泡スチロール)で被ったプラスチックボトルに純エタノール500mlを入れ、このエタノール中に、牛胚をいたしたストローをいれ、-85°Cに保たれた超低温冷凍庫(内容積500ℓ)の中に放置した。植水は-5°Cで、予め過冷した鉗子でストロー液面を外側からはさむか、ストロー内液を予めアルコール液面より上部に出しておく方法のいずれかでおこなった。アルコールが-35°Cまで降下した時に、ストローを予め超低温冷凍庫に置いたアルコール(-70°～-75°C)に移したのち、ただちに液体窒素に移し、保存した。

凍結胚は、ストローを35°C温湯に直接いれて融解した。グリセリン除去後は、以下の方法で生存性を調べた。

(1) 培養試験：30%子牛血清添加リン酸緩衝液に凍結融解胚をいれ、5%炭酸ガス培養を12時間以上おこない、正常な発育を示したもの生存胚とした。

(2) 移植試験：凍結融解胚で卵細胞が正常な胚を、頸管経由法で発情同期化した牛に1個ずつ移植し、受胎の有無を調べた。

結果：-5°Cで植水した11回の冷却速度は、室温から-5°Cまで、毎分 $0.43 \pm 0.06$ (S.D.)°C、-5°Cから-35°Cまで、毎分 $0.25 \pm 0.03$ (S.D.)°Cであった。

試験成績は、凍結時の胚のステージごとに表1に示した。培養では、22個のうち正常な発育をみたのは4

Table 1. The results of transfer and culture of bovine embryos after deep-freezing

Stage of embryo	culture (C) transfer(T)	No. of embryos	No. developed No. pregnant (%)
Morula	C	13	1 (8)
	T	3	0 (0)
Blastocyst	C	9	3 (33)
	T	5	4 (80)

個(18%)だった。移植では、8個中の4個(50%)、4頭の受卵牛が受胎した。凍結融解後の胚の生存率は、凍結時の胚のステージが進むほど高かった。

考察：牛胚凍結時の冷却速度は、植氷(−4～−7°C)まで、急冷、毎分−1°C、さらに植氷から−35°C位まで毎分−0.3°C<sup>(2.3)</sup>が一般的である。その冷却速度を得るために、ドライアイス・アルコール法やプログラムフリー<sup>(2.3.4)</sup>ザーが使われている。今回の方法では、室温から−5°Cの植氷まで毎分−0.43°C、植氷から−35°Cまで毎分−0.25°C<sup>(2.3.4.5)</sup>の冷却速度が得られ、多くの報告よりやや緩慢であった。

凍結融解後の培養および移植成績は、それぞれ、18%の発育率と50%の受胎率であった。胚の耐凍性は、凍結時の胚のステージにより差があるといわれ、今回の試験でも、桑実胚の生存率は胚盤胞胚に較べ著しく低く、そのために発育率も低かった。

本法は、簡単な装置と超低温冷凍庫を用いた方法であり冷却速度の再現性も良く、安価で、トラブルもない。また、アルコール容量や、断熱材の厚さを変えることで、冷却速度を変えることもできる。

今後は、移植例数を増やし実用化の検討を重ねたい。

終りに、御校閲を賜わりました、岩手大学農学部・安田泰久教授、高橋寿太郎助教授に深謝いたします。

## 文 献

1. BILTON, R. J., & MOORE, N.W.: *J. Reprod. Fertil.*, 46, 537, (*abstr*), 1976
2. 入江達彦, 加藤雅道, 白井健康: 日獸会誌, 36, 643～647, 1983
3. 鈴木達行, 高橋芳幸, 下平乙夫, 桶谷良至: 日獸会誌, 35, 337～340, 1982
4. TROUNSON, A.O., SHEA, B.F., OLLIS, G.W. & JACOBSON, M.E.: *J. Anim. Sci.*, 47, 677～681, 1978
5. WILLADSEN, S.M., POLGE, C. & ROWSON, L.E.A.: *J. Reprod. Fert.*, 52, 391～393, 1978



# 住友の動物用医薬品

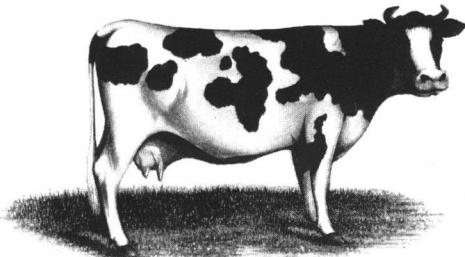
プロスタグランジンF<sub>2α</sub>類縁体製剤

[要指示医薬品]

## エストラメイト

<20ml>

[クロプロステノールナトリウム……0.263mg/ml]



性周期の同調

黄体退行遅延に基づく卵巣疾患の治療

・微量の筋注で効力を發揮します。

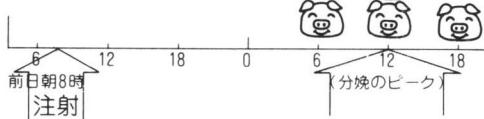
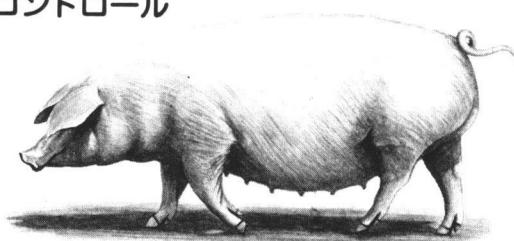
・安定で常温保存出来ます。

## プラネート

<20ml>

[クロプロステノールナトリウム……0.092mg/ml]

確かな分娩コントロール



発売元



住友化学工業株式会社 医薬事業部

大阪市東区道修町2丁目40 TEL 06(202)0051  
東京都中央区日本橋2丁目7-9 TEL 03(278)7354

提携先



インペリアル・ケミカル・インダストリーズ  
ピーエルシー(英國I.C.I.社)

## 牛凍結受精卵による受胎例

### Pregnancies by frozen embryos in cattle

早川俊司・遠藤敏明・石田和昭・山口亮・西村実

Shunji HAYAKAWA, Toshiaki ENDO, Kazuaki ISHIDA,  
Akira YAMAGUCHI and Minoru NISHIMURA,

千葉県畜産センター

Chiba Prefectural Livestock Experiment Station.

A lactating dairy cow was superovulated with PMSG, inseminated and flushed nonsurgically 8 days after standing heat (day 0).

Embryos were frozen in 1M glycerol in Dulbeccos PBS + 25% bovine serum at 1°C per min down to -6°C and seeded at -4°C. After seeding the freezing rate was 0.3°C per min and 0.1°C per min down to temperatures between -36°C and -37°C before direct transfer to liquid nitrogen at -196°C.

After storage from 13 days to 27 days, the straws containing the embryos were thawed in a water bath at 35°C.

Upon thawing, 4 embryos were recovered and transferred to 4 recipients, 2 recipients were pregnant and 2 calves were born.

**緒言：**牛受精卵の凍結保存を確立させることは供卵牛と受卵牛との発情同期化を省くことができるだけでなく野外普及の上欠くことのできない問題である。1973年Wilmut, Rowsonらが世界はじめて牛凍結受精卵から産子を得ることに成功して以来、国内においても数例の成功例が報告されている。

今回、千葉県においても野外普及を目的として農家けい養の1頭の供卵牛より得られた受精卵を凍結保存し2頭の産子を得たので報告する。

**方法：**供試卵は10才7か月（8産）になるホルスタイン種に多排卵処置を施こし非手術的に採卵した5個のexpanded blastocystを用いた。

凍結用卵子浮遊液はダルベコP B Sに25%牛血清を加えたものを使用した。耐凍剤にはグリセリンを用い、25%牛血清加P B Sにグリセリンを添加最終濃度1モルになるように0.17, 0.33, 0.5, 0.67, 0.83, 1モルの6段階に溶液を調整した。耐凍剤の添加は調整した各溶液に7分間とおし最終1モル溶液にて40分間の平衡時間をおいた。

凍結器はA社のプログラムフリーザーを使用した。

冷却方法はこのプログラムフリーザーを用い、あらかじめ0.25ml精液用ストローに封入した受精卵を室温より1°C/minで-6°Cまで冷却した。-4°Cにて自動植氷装置を作動させた。-6°Cにて5分間保持させたのち、-36°Cまでを0.3°C/minで、-37°Cまでを0.1°C/minで冷却し、それから直接LN<sub>2</sub>中に浸し保存した。

凍結保存した受精卵は13日から27日間保存、その後35°Cの温湯にて融解した。耐凍剤の除去は添加過程とは逆に6段階に各々10分間づつとおした。

融解した5個の受精卵のうち1個は融解時不明となつたが、4個は融解後培養2時間で生存性が確認され移植した。

結果：融解して得られたexpanded blastocystの正常卵4個を4頭の受卵牛に移植した。うち2頭は当センターけい養牛に、他2頭は農家けい養牛に移植した。農家牛はおよそ3時間、100km離れた場所へ輸送した。この結果各々1頭、計2頭が受胎した。そしてそれぞれ雌子牛を無事出産した。

在胎日数は各々273日、271日であった。

Table 1. The results of transfer of frozen embryos.

No.	Age	Recipients				Frozen Stage	embryos Days of store	Pregnancy
		Date of transfer	Date of last parturition	Calving number	Synchronization			
1	2-3	Mar. 2, 83'	Nov. 6, 82'	1	0	expanded blastocyst	13	-
2	2-3	Mar. 3, 83'	Nov. 28, 82'	1	+ 1	"	14	+
3	7-3	Mar. 16, 83'	Nov. 8, 82'	5	- 1	"	27	+
4	1-2	Mar. 16, 83'	—	0	- 1	"	27	-

考察：Biltonらは132個の融解した受精卵から、46例の妊娠例を報告し、Willadsenらは75%の受胎率を報告している。

今回報告した受胎例は1頭の供卵牛より得られた5個の凍結卵を融解し、4個を移植した2頭である。又用いたexpanded blastocystであり、これは当センターよりおよそ100km離れた採卵地より試験にて保温輸送し、その後凍結し保存した。そしてこれを当センターにて融解後ストローに封入、同様におよそ100km離れた移植地へ輸送した。このことから受精卵の凍結前後3~4時間の輸送は受胎に影響がなかったと思われる。牛受精卵の凍結保存には発育の進んだblastocystが適しているといわれているが、受胎した2個の受精卵はexpanded blastocystであった。すなわち良好な受精卵であり適切な取扱いをすれば輸送・凍結といったストレスに対しても充分に耐えられるようと思われる。

今回受胎した受卵牛は無事2頭の正常な雌子牛を分娩した。

#### 主要文献

1. BILTON, R. J. and MOORE, N. W: Factors Affecting the Viability of Frozen Stored Cattle Embryos. Aust. J. Biol. Sci. 32, 101~107, 1979.
2. WILLADSEN, S., POLG, C. and ROWSON, L. E. A. : The viability of deep-frozen cow embryos. J. Reprod. Fert. 52, 391~393, 1978.
3. 入江達彦, 加藤雅通, 白井健康: 牛凍結受精卵の移植に関する研究, 日獸会誌 36, 643~647, 1983.

A trial to produce monoclonal antibodies against  
H-Y antigen

角田幸生・中井裕<sup>\*</sup>・田中義夫<sup>\*\*</sup>・杉江信

Yukio Tsunoda, Yutaka Nakai, Yoshio Tanaka and  
Tadashi Sugie

農水省畜試・茨城大農・農水省家衛試

National Institute of Animal Industry, Faculty of  
Agriculture, Ibaraki University and <sup>\*</sup>National  
Institute of Animal Health

The present study examined the production of H-Y antibody by using conventional and monoclonal procedures. In the conventional method, we could obtain one serum out of 42 mice which had specific activity of H-Y antibody. We established 32 hybridomas which produce monoclonal antibodies reacting with male tail epidermal cells by ELISA. None of them was cytotoxic to mouse 8-cell embryos, however, one sample showed fluorescence on the embryos by using FITC labelled goat anti-mouse  $\gamma$ -globulin serum.

緒言：組織適合Y抗原 (Histocompatibility Y antigen) に対する抗体 (H-Y) を用いて胚の雌雄鑑別が可能なことが知られている。また特異的なH-Y抗体の作製は容易でないことも指摘されている。本実験では従来より用いられている方法 (conventional法) および最近進歩のいちじるしいmonoclonal抗体作製法を用いてH-Y抗体の作製を試みた。

方法：日本チャールスリバーより購入したC57BL/6系雌マウスに、同系雄マウスより採取した臍細胞あるいは精子を抗原として免疫した。免疫の方法は、conventional法の場合、Table 1に示すように1. 脾細胞を7日間隔で7~10回免疫 2. アジュvantとともに14日間隔で6回免疫および3. 2~3日間隔で17回免疫の3種を用いた。最終免疫後7日に血清を採取し、尾上皮細胞を指標としたcytotoxicity testにより特異抗体の有無を調べた。Monoclonal抗体の場合、被免疫マウスより採取した脾細胞とミエローマ細胞 (P3U1) をポリエチレンクリコール

(Merk 4000) で融合させ、HAT mediumで融合細胞を96穴プレート内で培養してコロニーを形成させた。ついで、コロニーを形成した各ウエルより上清を採取し、マウスの雄上皮細胞を指標としたELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) により抗体産生の有無を調べた。反応が陽性と判定された各ウエルの細胞は、24穴プレートに移してさらに培養を継続し、ついで限界希釈法によって1個の細胞よりゆるやかにコロニーを選び、96穴、24穴、6穴へと増殖させたのち上清中の抗体の有無をELISAにより判定した。

結果：Conventional法の場合、Table 1に示すように脾細胞を2~3日間隔で免疫した場合のみ15個体中1個体で特異抗体が検出された。この抗体を用いて、マウスの8細胞期胚および透明帯を除去した胚に対する細胞毒性を調べた結果、透明帯除去胚の場合に1/2~1/8希釈で供試した胚の約50%が死滅することが明らかとなった。

Monoclonal抗体の場合、雄上皮細胞と反応する合計32のクローンを分離した (Table 2)。いずれのクローンの上清も8細胞期胚に対して有意な細胞毒性効果を示さなかったが、FITC抗マウスグロブリン抗体を用いた間接ケイ光抗体法で調べた結果、1つのクローン (D1D) 上清で8細胞期胚の一部を特異的に染色することが知られた。

考察：1976にKrcic and Goldbergがマウスの8細胞期胚をH-Y抗体で処理すると約半数が死滅し、またWhiteら (1982) はH-Y抗体処理後影響をうけなかった胚を移植した場合、86%の産子が雌であったことを報告している。H-Y抗原は哺乳動物で共通することが知られていることから、マウスで作製された抗体は家畜胚の雌雄鑑別に利用できると考えられている。そのため数多くの研究者がH-Y抗体の作製を試みているが、本実験でも明かなように特異抗体を作製する確率は低く、同一の抗体を用いて一連の研究をケイ続することが困難である。一方、体外で多量の均一な抗体を作製できるモノクローナル抗体作製技術は、医学、生物学、獣医学等の広い分野で利用されている。本実験では、胚の雌雄を鑑別しうるH-Y抗原に対するモノクロ-

ナル抗体の作製を試みたが、結果で明らかなようにこれまでの所顕著な成果は得られていない。本報告では、その作製技術を中心に紹介したい。

Table 1. An example of the production of H-Y antiserum

Antigens	No.of injections	Interval of injections	No.of mice positive /immunized
Spleen cells	7-10	7 days	0/25
with adjuvant	6	14 days	0/3
Sperm with adjuvant	6	14 days	0/14
Spleen cells	17	2-3 days	1/15

Table 2. Fusion and cloning of hybrydomas producing antibodies detected by ELISA of the mail tail epidermal cells

Experiment	Fusion and development			Cloning		
	No.of wells	No.of wells with full growth	No.of positive monoclonal wells	No.of monoclonal wells	No.of positive stocks	No.of monoclonal stocks
I	980	203	4	74	36	31
II	588	146	2	48	3	1
III	294	46	0	-	-	-

## References

1. Krco,C.J. and Goldberg,E.H. H-Y(male) antigen:Detection on eight-cell mouse embryos. Science 193:1134-1135.1976
2. White,K.L.,Lindner,G.M.,Anderson,G.B. and BonDurant,R.H. Survival after transfer of "sexed" mouse embryos exposed H-Y antisera. Theriogenology 18:655-662.1982.
3. White,K.L.,Lindner,G.M.,Anderson,G.B. and BonDurant,R.H. Cytolytic and fluorescent detection of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. Theriogenology 19:701-705.1983.

H-Yモノクローナル抗体によるラット胚  
の性判別(予報)

Sex Identification of Rat Embryos by  
H-Ymonoclonal Antibody [Preliminary]

佐藤英介・内海恭三・山田雅保<sup>\*)</sup>・湯原正高

Eisuke SATO, Kyozo UTSUMI, Masayasu  
YAMADA and Masataka YUHARA

岡山大学農学部家畜繁殖学教室, <sup>\*)</sup>重井医学研究所

Laboratory of Animal Reproduction, Sch. of Agri. Okayama Univ.  
\*) Shigei Medical Research Institute

A male-specific (H-Y) antigen was discovered on the skin-graft testing within a certain inbred strain of mouse. Most of data reported indicates that H-Y antigen is postulated to be the products of sex determining genes. We found the fact that rat embryos can be separated immunologically either male or female at the morula stage(2). Rat female spleen cells immunized to rat newborn testis and mouse myeloma cells (P3/X63. Ag8U1; P3U1) were successfully fused with polyethylene glycol (PEG 4000) and some fused cell cultures were found to produce H-Y antibody, judging from embryo assays. It is expected to obtain the single clone which produce H-Y monoclonal antibody.

緒言：雄特異(H-Y)抗原は、精巣決定遺伝子の産物であるといわれており<sup>1)</sup>、この抗原に対する抗体を作製し、発生の段階において精子と卵の雌雄を判別する試みがなされてきている。著者らは、ラットによって作製された抗精巣血清或いは抗脾臓血清によって、ラット受精卵の約半数の桑実胚は胚盤胞への分化が抑制され、その内の胚盤胞から雌が得られ、いったん発育が抑制されるが抗体から開放された後、胚盤胞へと再分化するものから雄が得られることを報告した<sup>2)</sup>。また、White et al.は、マウスにおいて作製されたH-Y抗体を用いて、マウスの8cell胚の細胞毒性試験を行ない、生き残った胚から雌が得られることを報告した<sup>3)</sup>。

本研究は、ラットのH-Y抗体の受精卵を雌雄分別する機構を解析するため、H-Y抗原に対するモノクロ

ーナル抗体産生ハイブリドーマの樹立を試みた。

方法：ラットH-Y抗血清作製は、既報の方法に従った<sup>2)</sup>。すなわち、Wistar系或いはDA系の新生児精巢あるいは雄脾臓をホモジネイトし、同系雌ラットの腹腔内へ週一回六週連続注射し、ブースターの一週間後に採血される血清を抗血清とした。抗血清の抗体力価は、ラット尾上皮を用いた細胞毒性試験により検定された<sup>4)</sup>。ラット胚の雌雄判別は、桑実胚の抗体へのさらしにより、発育が抑制されて胞胚腔のできないものを雄、発育が影響されず胞胚化するものを雌とした。免疫されたラットより脾臓細胞を採取し、その細胞とマウスミエローマ由来の株化細胞 (P3u1)をPEG4000の存在下で細胞融合させ、HAT培地で融合細胞のみを選択増殖させてモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ樹立を試みた。培養上清中の抗体の有無は、ラットの桑実胚の発育性によって検定した。

結果：ラット尾上皮細胞毒性試験により免疫された雌ラットの血清中にH-Y抗体が存在することが示された (Fig. 1)。また、その抗血清のアグロブリン画分でラットの桑実胚を培養した結果、約50%が桑実胚のまま発育が停止し、それより約90%の雄産仔が得られた。また残りの抗体の影響を受けず胚盤胞へ発育したものより約80%の雌が得られた (Table 1)。HAT培地で融合細胞のみを選択増殖させた後、培養上清中の抗体の有無を調べたところいくつかのWellにおいて抗体陽性 (一部の桑実胚の胞胚形成を抑制する) であった。

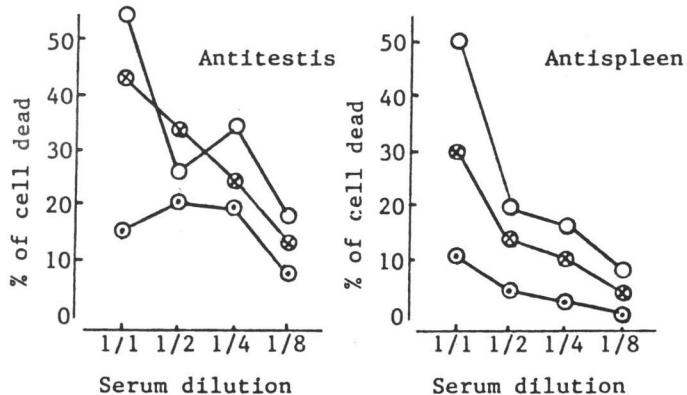


Fig.-1 Cytotoxicity test of H-Y antiserum on rat male tail epidermal cell (○: Unabsorbed serum; ●: Serum absorbed with female spleen cell; ◑: Serum absorbed with male spleen cell)

Table-1 Sex ratio of full-term fetus developed from H-Y antiserum exposed rat morula

Source of antibody after exposure (Glubul)	Development of recip trans	No. of recip eggs	No. of recip trans	% preg	Total no. of embryos	No. of pregnant females	No. of viable fetuses	Sex-ratio of fetus	
								No. of fetuses	Fe : Ma
Anti-testis	Blasto.	34	132*	6	17.6	19	15	4	79 : 21
	Morula	32	122	6	18.7	16	0	16	0 : 100
Anti-spleen	Blasto.	27	86**	11	40.7	30	23	6	77 : 23
	Morula	27	121	8	30.0	31	2	29	6 : 94

る。\*) 52% of eggs per total eggs; \*\*) 43% of eggs per total eggs

考察：本研究の結果からラットによって作製されたH-Y抗体によりラット受精卵を雌雄判別することが明らかにされたが、その機構はまだわかっていない。しかしながらモノクローナル抗体を使うことによって、H

-Y抗原の解析をすると考えられ、すでにWhite et al.は、マウスのモノクロール抗体を作製し第二抗体を蛍光ラベルしマウス受精卵の雌雄判別を試み、成功している<sup>5)</sup>。本研究でラットより採取された免疫脾臓細胞より作製されたハイブリドーマの上清中にもラット受精卵を判別する能力があることが示され、これよりsingle cloneのスクリーニングが期待できる。

#### 主要文献

- 1) Wachtel, S. S., Ohno, S., Koo, G.C. and Boyse, E. A.: Nature, 257, 235, 1975
- 2) Utsumi, K., Satoh, E. and Yuhara, M.: Proc. of 2nd Intern. Cong. of Reproductive Immunology, Suppl. 59, 1983
- 3) White, K. L., Linder, G. M., Anderson, G. B., and BonDurant, R. H.: Theriogenology, 18, 655-662, 1981
- 4) 佐藤英介, 内海恭三, 湯原正高; 日本不妊学会雑誌 28, 150, 1983
- 5) White, K. L., Linder, G. M., Anderson, G. B., and BonDurant, R.H.: Theriogenology, 19, (5), 701-705, 1983

# PLANER CELL FREEZER R204

## プログラムフリーザ

自動植氷装置付き

受精卵凍結装置

電子プログラムによって  
+40°C ~ -180°C の範囲の  
凍結・融解速度を  
自動的に制御できます



英国プランナー社が ケンブリッジ大学ポルジー教授の指導のもとに開発したもので 現在同社製のフリーザー 200基以上が 世界各国で使用されており 動物の胚の凍結・融解に活用されています

輸入 朝日ライフサイエンス株式会社  
〒102 東京都千代田区二番町 9 番地 3  
電話(03)265-5031(代)

販売 富士平工業株式会社  
〒113 東京都文京区本郷 6 丁目 11 番 6 号  
電話(03)812-2271(代表)

Analysis of an Antibody Like Factor to Porcine Zona Pellucida Found in Human Sera

武田守弘・繁田実・香山浩二・磯島晋三

Morihiro TAKEDA, Minoru SHIGETA  
Koji KOYAMA and Shinzo ISOJIMA

兵庫医科大学産婦人科学教室

Dept. Obst. & Gyn., Hyogo Medical College

Incidence and characterization of antibodies to zona pellucida in human sera were studied and the following results were obtained.

1. Some human sera showed the positive immunofluorescence staining of porcine zona pellucida after absorption with porcine red blood cells, liver and kidney.

2. The incidence of immunofluorescence positive sera in infertile women was not significantly different from pregnant women and healthy men after absorption with porcine red blood cells, liver and kidney.

3. Among sixteen sera with positive staining of porcine zona pellucida, two showed positive stainings of human oocytes.

4. The gamma globulin fraction from the above two sera also stained human zona pellucida but neither made precipitate on the surface of zona pellucida nor blocked human spermatozoa to penetrate into the zona pellucida of human oocytes.

5. There was no correlation between incidences of antibody to porcine zona pellucida and sperm immobilizing antibody in human sera.

緒言：ヒト卵の透明帯がブタ卵透明帯と抗原を交叉する性質を利用した分析方法で、抗透明帯抗体が不妊婦人に特異的に検出されるという報告もあるが<sup>1) 2)</sup>、否定的見解を示す論文も多々<sup>3) 4) 5)</sup>、未だ結論が得られていない。本研究では不妊婦人、対照婦人及び男性等多数の症例につき血中の抗透明帯抗体の検出率と抗体の特異性をブタ卵透明帯及びヒト卵透明帯の間接蛍光抗体法にて比較検討し、ヒト卵透明帯と反応した血清によるヒト卵の受精阻害実験を行った。

方法： 融光抗体法にはブタ卵又はヒト卵を被検血清と37°C 1時間反応させた後、第2抗体として家兔抗ヒトIg又はIgG抗体のFITC標識F(ab')<sub>2</sub>を37°C 30分間反応させ、洗浄後、落射型蛍光顕微鏡下で卵表面の蛍光の有無を判定し、抗体の特異性の検定には抗体吸収実験法を用いた。第2抗体はブタ卵又はヒト卵染色前にブタ新鮮血球、ヒト新鮮AB型血球で吸収後用いた。ヒト卵のin vitro受精系は、ヒト卵透明帯と反応した血清を40%飽和硫酸によりヤーグロプリン分画に精製したものと、in vitroで48時間培養した未成熟卵と反応後、精子を加え、15時間後に透明帯への結合又は進入精子を位相差顕微鏡下に観察した。

結果： 未吸収ヒト血清ではほとんど全例が蛍光染色陽性を示したが、被検血清をブタ新鮮血球で吸収後の抗Ig抗体及び抗IgG抗体による蛍光染色陽性率は、不妊婦人で25.5%(19.1%)、妊娠で33.1%(17.9%)、男性で28.8%(20.0%)であった。被検血清をさらにブタ肝・腎組織で吸収後はそれぞれ6.4%(4.3%)、13.1%(5.9%)、4.4%(2.2%)となり、更にブタ卵巢で吸収後はすべての症例で陰性となった(Table 1)。

Table 1

Incidence of positive immunofluorescent staining of porcine zona pellucida after absorption of human sera with porcine RBC, liver & kidney, and ovary

	After absorption with		Infertile women(47) <sup>*3</sup>	Pregnant women(84)	Healthy men(45)	
	Ig <sup>*1</sup>	IgG <sup>*2</sup>	Ig	IgG	Ig	IgG
RBC	12(25.5%)	9(19.1%)	28(33.3%)	15(17.9%)	13(28.8%)	9(20.0%)
Liver and kidney	3( 6.4%)	2( 4.3%)	11(13.1%)	5( 5.9%)	2( 4.4%)	1( 2.2%)
ovary	0( 0%)	0( 0%)	0( 0%)	0( 0%)	0( .0%)	0( 0%)

RBC : red blood cells

\*1) Stained with FITC-conjugated F(ab')<sub>2</sub> fragment of rabbit anti human Ig (IgA+IgG+IgM)

\*2) Stained with FITC-conjugated F(ab')<sub>2</sub> fragment of rabbit anti human IgG

\*3) No. of tested sera

抗精子抗体保有不妊婦人32例では血球吸収後8例、肝腎吸収後1例の血清がブタ卵透明帯染色陽性で、卵巢吸収後は陰性となり、抗精子抗体非保有不妊婦人28例については、それぞれ3例陽性、1例陽性、全例陰性となり、不妊患者血清中の抗ブタ卵透明帯抗体と精子不動化抗体との相関性はみられなかった(Table 2)。

Table 2

Incidence of anti porcine ZP antibody in human sera  
with or without sperm immobilizing antibody

	SIT**	
	positive	negative
No. of tested sera	32	28
No. of positive sera absorbed with RBC*	8	3
No. of positive sera absorbed with porcine liver and kidney	1	1

\* RBC: porcine red blood cells

\*\* SIT: sperm immobilization test

なお、精子不動化抗体については、各臓器吸収による抗体価の低下は全く認められなかった。肝腎吸収後にブタ卵透明帯染色陽性を示した被検血清の中でヒト卵透明帯染色陽性を示したもののは2例のみで(Table 3)、そのアーグロプリン分画によるヒト卵のin vitro受精実験では受精阻害は見られなかった。

Table 3

Immunofluorescent staining of human oocytes by human sera  
with positive staining of porcine zona pellucida (ZP)

	Infertile women	Pregnant women	Healthy men
No. of positive sera* to porcine ZP	3	11	2
No. of positive sera to human ZP	0	1	1

\* All sera were absorbed with porcine red blood cells (RBC), liver, and kidney.

FITC-conjugated second antibody was absorbed with porcine RBC, ovary and human RBC.

考察：ブタ卵透明帯の蛍光染色によって検出されるヒト血清中の抗透明帯抗体は決して不妊婦人に特異的に検出されるものではなく、妊婦、男性にも検出され不妊症の発生とは関係ないものと考えられる。又、この抗体が男性にも検出されるところから、卵透明帯抗原に対する自己抗体とは考えがたく、たまたまブタ卵透明帯抗原及びヒト卵透明帯抗原と抗原性を交叉する何らかの外来抗原によって感作されたヒトに出現してくる非自己抗原に対する抗体である可能性が強い。

References;

1. Shivers, C.A. and Dunbar, B.S.  
Autoantibodies to zona pellucida: A possible cause for infertility in women.  
Science 197: 1082-1084, 1977.
2. Mori, T., Nishimoto, T., Kitagawa, M., Noda, Y., Nishimura, T. and Oikawa, T.  
Possible presence of autoantibodies to zona pellucida in infertile women.  
Experimentia 34: 797-799, 1978.
3. Sacco, A.G. and Moghissi, K.S.  
Anti-zona pellucida activity in human sera.  
Fertil. Steril. 31: 503-506, 1979.
4. Dietl, J., Knop, G. and Mettler, L.  
The frequency of serological anti-zona pellucida activity in male, female and children.  
J.Reprod.Immunol. 4: 123-131, 1981.
5. Nayuder, P.L., Freeman, L.E. and Trounson, A.D.  
Zona pellucida antibodies in human sera.  
J.Reprod.Fert. 65: 77-84, 1982.

## 編 集 後 記

哺乳動物卵子研究会誌の第1巻第1号をここに発刊できますことを会員の皆様とともに喜びたいと存じます。

この第1巻第1号には哺乳動物卵子談話会の設立いらい、代表世話人としてご苦労を賜りました大槻清彦先生にこれまでの経過についてご執筆いただき、また、談話会時代の演題を集録いたしました。

第25回哺乳動物卵子研究会の講演内容は論文として25編掲載いたしましたが、原稿をいたしましてから発刊まで1ヶ月余りの期間しかなく、編集上に誤りがあることと存じます。次号以降これにもまして立派な研究会誌の発刊に努力するつもりでおりますので会員の皆様のご協力を賜りますようお願い申し上げます。

(遠藤克)

### 哺乳動物卵子研究会誌 Journal Mammalian Ova Research

第1巻 第1号

Vol. 1 No. 1

昭和59年3月25日 印刷

(会員頒布)

発行者 哺乳動物卵子研究会  
代表 佐久間勇次

発行所 哺乳動物卵子研究会

印刷所 誠和印刷株式会社

〒252 藤沢市龜井野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332)

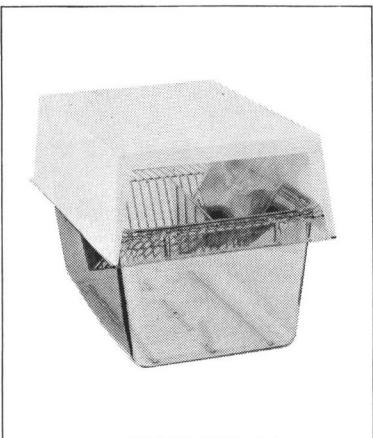
郵便振替 横浜 8-20350



**NEW!**

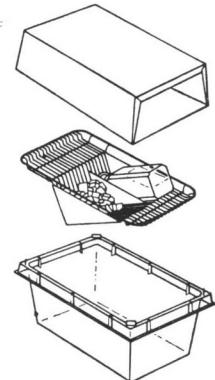
## M-7 (Isocage & Isocap)

### マウス用アイソレーションケージ



#### 特長

- Isocapの取り扱いが非常に簡単です。
- 本体はオートクレーブ可能な材質TPX製、PC製と2種類あります。



**岡崎産業株式会社**

本社：〒104 東京都中央区八丁堀4-4-3  
TEL. (03)552-4561

### 日本薬局方 注射用胎盤性性腺刺激ホルモン

動物  
専用

**プロベロゲン<sup>®</sup>**

1,500単位  
3,000単位  
5,000単位  
10,000単位

### 日本薬局方 注射用血清性性腺刺激ホルモン

動物  
専用

**ヒメックス<sup>®</sup>**

1,000単位

販売元



**三共株式会社**

東京都中央区銀座2-7-12

製造元



**三共ゾーキ株式会社**

東京都中央区日本橋本町4-15

# 牛の受精卵移植

金川弘司編著

●B5判200頁 定価2,600円  
図絵8頁 図89 表109

わが国でも実用化に向けて大きな一步を踏み出し、いま熱い注目をあびる牛の受精卵移植に関するはじめての成書。関係者の期待に応え、最新の技術・情報・成績を集大成した待望の書。

- 1章 受精卵移植の背景：概要、研究の歴史/実用化の歴史/外国にみる実用の形態/国際受精卵移植学会の発足/実用化からみたカナダ・米国とわが国との比較/牛受精卵移植に関連した用語
  - 2章 牛受精卵移植の現況と技術の実際：donorの選択/donorに対する過剰排卵処置/donorの発情/donorに対する人工授精/受精卵の回収/灌流液および保存・移植液/卵の検査/recipientの発情同期化/受精卵の移植/牛受精卵の保存/牛受精卵の人為的分割
  - 3章 牛受精卵移植を実際に行う際の手引き：心構え/受精卵移植技術の訓練/実際の手順と注意点/記録/受精卵移植生産牛（新生犢）の登録
  - 4章 研究課題と将来の展望：受精卵の保存と体外培養/受精卵の凍結保存/受精卵の輸出・入と検疫/混合精液の使用/性別の支配または判定/双仔の生産/牛受精卵の人為的分割—将来の可能性—/卵胞細胞の体外培養と成熟受精卵移植に関する免疫学的問題/牛卵子の体外受精
- 附 牛受精卵移植関係法規

## 家畜臨床生化学<第三版>

A5判 950頁 定価17,000円

J. J. KANEKO 編

久保周一郎・伊沢久夫・戸尾祺明彦監訳 獣医・畜産領域における臨床生化学の世界的名著の完訳。

●詳細内容見本呈 ●



近代出版

〒150 東京都渋谷区渋谷1-10-1  
☎03(499)5191 振替 東京9-168223

◆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

## コンセラール®注射液

牛の卵胞のう腫、排卵障害、  
卵巣静止の治療、排卵促進に

(要指示)

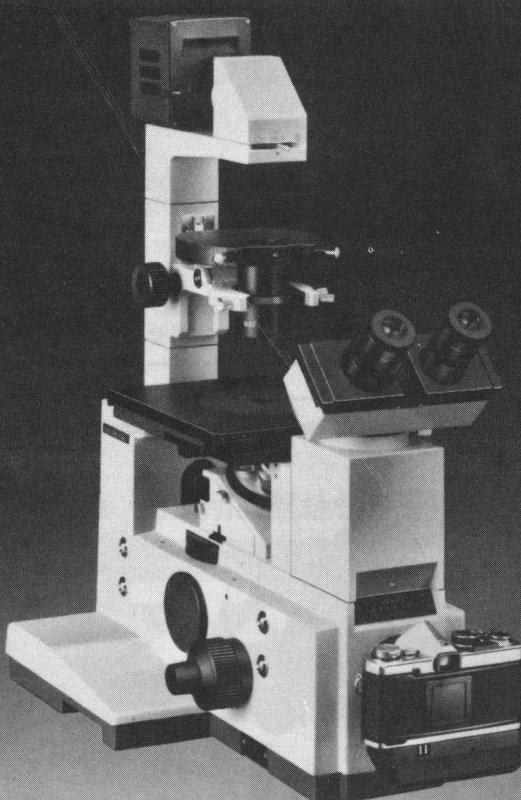
製造発売元

武田薬品工業株式会社

提携

帝国臓器製薬株式会社

蛍光、ノマルスキー、マニピュレーションなど。  
多様な検鏡法に対応できる倒立型システム顕微鏡。



新製品  
**NEW**

かずかずの機能を搭載した倒立型システム顕微鏡、登場。新技術を盛り込み、操作を簡単に、多様な検鏡に対応できるよう設計されています。

- 同時に3種の検鏡装置が付けられ、しかもワンタッチ切換え可能です。
- レボ上下動によるフォーカシング。
- X・Yの移動量が大きいステージ。
- 低い位置に設計されたステージ。
- 光路切換えは、ダイヤルひとつで。
- コンデンサー部は、ハネあげ式。
- 中間変倍と芯出し望遠鏡を内蔵。

未知をひらく光学技術

〈仕様〉●12V・50W高輝度ハロゲンランプ、位相制御調光方式、バーグラフ式Vメーター表示付●ステージ最大ストロークX方向110mm×Y方向76mm●位相差、落射蛍光、微分干渉用各対物レンズ●コンデンサー(LWCD、ULWCD)

**IMT-2 series**

倒立型システム顕微鏡

顕微鏡・内視鏡・医療器・カメラ等の光学総合メーカー

**OLYMPUS**

オリソパス光学工業株式会社

オリソパス販売株式会社

カタログ・パンフレット等のご請求は「101 東京都千代田区神田駿河台3-4(龍名館ビル) ☎03(251)8971」

# 明日の人工授精を育てる— ダイサンの凍結・保存機器

受精卵の  
凍結保存に

マイコン式  
プログラム フリーザー  
**FFP-190**



総発売元

**ダイサン容器株式会社**

本 社 大阪市西淀川区歌島 2-12-4  
電話 大阪(06)471-0798 〒555  
東京営業所 東京都港区芝公園 2-4-1  
(秀和芝パークビル 3F)  
電和 東京(03)434-2935 〒105  
大阪営業所 大阪市西淀川区歌島 2-12-4  
電話 大阪(06)474-4120 〒555  
熊本営業所 熊本市保田窪 2-1-53  
(中村ビル 1F)  
電話 熊本(0963)82-2132 〒862



受精卵・精子の保存に  
**ダリック  
DALIC**

[実用新案出願中]

製造元

**OSK 大阪酸素工業株式会社**

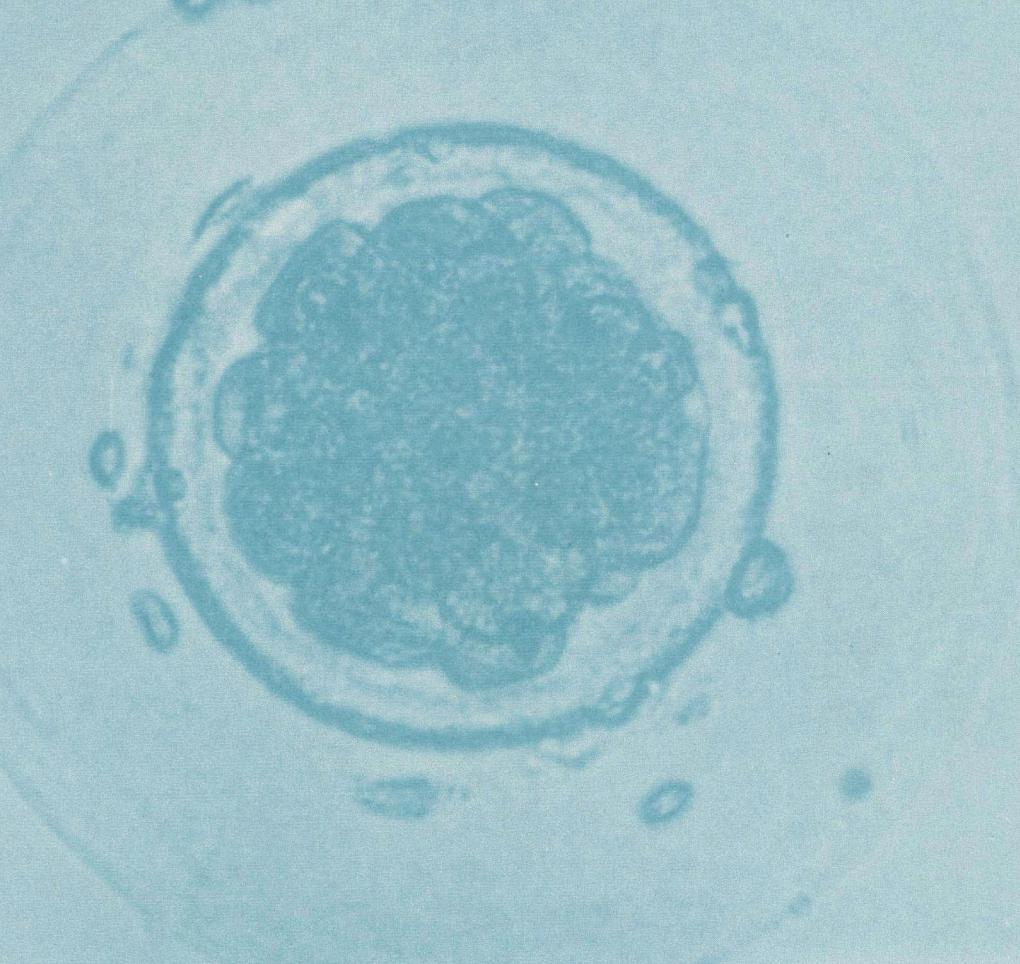
本 社 大阪市西淀川区歌島 2-12-4  
電話 大阪(06)472-1181 〒555  
守山工場 守山市勝部町1095  
電話 守山(0775)82-3773 〒524



哺乳卵研誌  
J. Mamm. Ova Res.

# 哺乳動物卵子研究会誌

Journal of Mammalian Ova Research



哺乳動物卵子研究会  
Japanese Society of  
Mammalian Ova Research

Vol. 1 No. 2

October 1984



母乳の理想にさらに近づけて  
タウリン配合

森永BF-Tドライミルクには、赤ちゃんのおなかに大切なビフィズス菌を、やさしくユースをはじめ、さまざまな栄養素を配合。さらに、赤ちゃんの脳や神経の発育に大切なタウリンも、あらたに加えました。母乳の理想にさらに一步近づいた森永BF-Tドライミルク。お母さんから赤ちゃんへ、愛情の手助けをする信頼のパートナーとして、どうぞ愛用ください。



母乳の理想にさらに近づけて

# ビフィズス効果 と タウリン配合



森永乳業

**森永BF-Tドライミルク**

◆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

**コンセラール<sup>®</sup>注射液**

牛の卵胞のう腫、排卵障害、  
卵巣静止の治療、排卵促進に

(要指示)

製造発売元

武田薬品工業株式会社

提携

帝国臓器製薬株式会社



## 第26回 哺乳動物卵子研究会のお知らせ

哺乳動物卵子研究会

会長 佐久間 勇 次

下記により第26回哺乳動物卵子研究会および総会を開催いたします。多数の会員のご参加をお願いいたします。

・日 時：昭和60年3月30日（土） 9:00より

・場 所：日本大学会館 大講堂

東京都千代田区九段南 4-8-24

TEL 03-262-2271

・一般講演：前回の大会と同様に講演内容をオフセット印刷し、哺乳動物卵子研究会誌第2巻第1号に掲載いたします。各演題は4ページまたは2ページにおまとめいただきます。

発表時間は1題につき10分、討論5分を予定します。

なお、演題多数の場合は、会場の都合などで演題の採否は会長にご一任下さいますよう。

・演題申込：締切 昭和60年1月15日必着

演題の申込みは、葉書に演題名（和文および英文）発表者および共同研究者（ローマ字）を記入のうえ下記宛お送り下さい。折り返し発表内容を記載する原稿用紙をお送りいたします。

講演原稿の〆切は昭和60年2月15日（厳守）とさせていただきます。

〒252 神奈川県藤沢市亀井野1866

日本大学農獣医学部獣医生理学教室

遠 藤 克 宛

TEL 0466-81-6241 内332





### 山根甚信先生略歴

明治22年1月20日	出生	13年3月31日まで)
大正2年7月	東北帝国大学農科大学(北大前身)畜産学科卒業	昭和16年4月 同上 理農学部付属農場長(昭和17年3月30日まで)
大正2年11月	東北帝国大学農科大学助手	昭和20年11月 台湾大学農学院に留用(昭和23年12月10日まで)
大正7年12月	同上 助教授	
大正8年4月	官制改正北海道帝国大学となり 助教授	昭和24年7月 広島大学教授 広島大学水畜産学部長(昭和29年3月31日まで)
大正9年7月	農学博士	
大正14年11月	ドイツおよびアメリカへ出張 (昭和3年8月15日まで)	昭和29年3月 停年退官 昭和29年4月 広島県立農業短期大学学長
昭和5年4月	台北帝国大学理農学部勤務	昭和39年6月 同上 退職
昭和6年5月	台北帝国大学教授	昭和47年3月 逝去
昭和11年3月	台北帝国大学理農学部長(昭和	

## 恩師山根甚信先生の追憶

加藤 浩

山根先生は昭和47年6月、ミュンヘンで開催の国際家畜繁殖学会に招かれ、その準備に忙殺されていた2月26日に心筋梗塞で急逝された。時に83才。

先生は博覧強記、かつ努力家であり、学問のために生れて来られたような方であった。しかも事務的、行政的才能にも恵まれ、台北帝大理農学部長、獣医学科の新設、終戦後は広島大学水畜産学部長、広島農業短大学長として、その新設に手腕を発揮された。

先生は我が国人工授精の草分けであるが、このことに異常なほど熱意を持たれたのは、京大医学部の石川日出鶴丸先生に負うところが大きい。石川先生はヨーロッパ留学の帰途ロシアのイワノフ教授のもとに立寄り、彼から家畜人工授精の重要性を説かれ、かつ技術の手ほどきを受け、用具一式を貰って帰国された。そして日本もロシア同様、馬の改良には人工授精に如くはなしと考えられ、このことを当時の京大総長へ報告すると共に、自らも奥羽種馬牧場で実施された。こうしたことが若い山根先生を強く感動させたのである。

先生は馬の人工授精を行うには、まず精液の理化学的性質および精子の生理を研究する必要があるとして、この面の開拓に従事され、その結果が学位論文となった。さらに精子の保存と輸送が大切と考えられて、この面の研究にも努力された。私も先生の指導の下にお手伝いすることになったが、丁度この頃（大正14年）先生はドイツに留学されたので、残された私は暗夜に杖を失った状態で、しかも参考文献の殆ど無い当時であったから、文字通り無我夢中で精子の保存と保存精子による人工授精に取り組んだ。当時を回想すると冷汗三斗の思いがあると同時に、良き指導者の如何に大切であるかを痛感する。真駒内から函館まで汽車輸送した馬精子で産駒を得た時は、さすがに嬉しかった。先生の帰国後、私達は鳩による馬精子の輸送を新冠・札幌間で試みたが、中途にして先生も私も台北帝大へ転勤となったので、終りを完うし得なかったのは遺憾であった。

先生は家畜繁殖の研究は、精子だけでなく、卵子についても行うべきだとされ、この面の開拓に並々ならぬ熱意をもって当られた。当時は哺乳動物卵子の研究は皆無に近かったので、先生は採卵方法、培養液、切片作製方法等すべてにわたって創意と工夫を重ねながら、数々の立派な成果を挙げられた。私も及ばずながら、お手伝いをしたが、計らずも私が石川先生の教室で習得したガラス細工の技術が、卵子の取り扱い上役立ったのは幸いであった。先生の卵子の研究で最も注目すべきは、卵子を囲む卵胎細胞群の分散や第2極体の放出が、精子の保有する蛋白分解酵素によっておこることを明らかにされたことである。このことは1930年に発表され、1951年に蛋白分解酵素はヒアルロニダーゼと同一のものであると確認されたことである。

以上先生の先覚的な歩みを記したが、そのほか各方面にわたって精力的な研究を行なわれ、幾多の貴重な報告をされている。卵子の研究も今日は驚異的な進歩を遂げているが、そのルーツは先生にあることを忘れてはならない。また先生にならって、研究者は常にフロンティヤー精神にのっとり、新天地の開拓に努めべきであろう。



### 林 基之 東邦大学教授略歴

本籍	和歌山県那賀郡名手町大字穴伏43	昭和26年8月	アメリカ合衆国へ出張
生年月日	大正2年6月17日生	昭和26年12月	医学博士の学位を授与される
昭和13年3月	東京帝国大学医学部医学科卒業	昭和32年6月	東京大学助教授
昭和22年3月	復員	昭和34年1月	東邦大学教授
昭和22年8月	東京医学歯学専門学校講師を嘱託される	昭和46年10月	第7国際不妊学会事務総長担当
昭和22年9月	文部教官	昭和49年10月	日本不妊学会副理事長
昭和24年12月	東京大学講師	昭和52年2月	逝去

## 林 基之先生を偲ぶ

岩城 章

本研究会の主要なメンバーの一人であられた林教授が亡くなられてから、早7年余となります。当時の談話会に比べて現在の研究会は人数的にも、大部増加しておりますので、本会員のなかでも可成り多数の方が林教授の聲咳に接しておられないと思います。先に林先生のご略歴を紹介しましたが、ごく簡単にまた特に本会との関連の深い点だけを Pick up しました。したがって医学関係のみの、例えば看護学校長、病院長、医学会での役職などは紙面の都合上省略させて頂きました。

林教授といえば日本で最初に *human ovum* を研究対象として選ばれた医学者として知られております。1964年に Singapore において開催された VIIth Conference of the International Planned Parenthood Federation で発表された Human ova の IVF の成績は、その後数年間は幾つかの文献に引用されており、私も驚いたものでした。元々、先生は卵とは大部異った領域の新生児の血液を研究され、新生児骨髓内輸血の臨床的研究という論文で学位を取られています。昭和26年のアメリカへの出張時、Carnegie Institute では、かの有名な Hertig, Boving とも知り合われ、帰国後 Reproduction の分野に研究の目を向けられるようになりました。それで本会との繋がりを持つようになつたわけですが、その経緯については本誌1号に大槻先生が述べられております。

またアメリカからの帰国に際しては腹式手術、Culdoscopy の技術を持ち帰られ、内視鏡においては我が国における婦人科内視鏡の先駆者の一人となられました。内視鏡は最初のうちは純臨床的な病変の観察のみであつて、本研究会とは直接の関係はありませんでしたが、今日では IVF-ET 実施に際しては不可欠な technique になつてゐることは皆様よく御存知の通りであります。さらに最近 Microsurgery による卵管形成の優秀さが報告されておりますが、既に昭和30年代に手術用顕微鏡を購入され、これによるテーマを教室員に与えられております。そして1974年の Rio de Janeiro における第一回 Human Reproduction の会では Culdorcopie Nicrosurgery という特別講演をさせております。以上のように現在 Human Reproduction の分野において興味を持たれ、また問題になっている Thema に対して20~30年前に目をつけられておられ、今日の盛況を御覧になれば、さぞ満足されることでしょう。その先見の明に敬服する次第であります。

また昭和49年8月には日本医学会シンポジウムにおいて初期発生という Thema を企画され、その際の卵や受精に関する発言者20名のうち約半数を本会員より選ばれ、本会に対する肩入れが推測されました。また生物学を始め多方面での交友の広さにびっくり致しました。

林先生は、その面前で先生に対する反対意見を自由にのべる事が出きた教授であったことを偲びながら、本追悼を記しました。

# 哺乳動物卵子研究会誌

第1巻 第2号

昭和59年10月

## 目次

### 総 説

家畜の受精卵移植技術の現状と将来

杉江 信 ..... 116

### 原 著

着床遅延マウス胚盤胞の微細構造

三善隆広・新村末雄・石田一夫 ..... 131

マウス初期胚のプラスミノーゲンアクトベータ活性

石川真木・堤 治・中村正雄・木下勝之・佐藤和雄・水野正彦 ..... 137

ヒト精子頭部膨化現象(光学顕微鏡を用いた連続観察)

永江 肇・土肥保之・岩城 章・木下 佐・岡田詔子 ..... 143

ヒト精子の透明帯認識・接着に与える糖の影響

星 和彦・斎藤 晃・桃野耕太郎・京野広一・対木 章 ..... 153

受精に伴うマウス透明帯の変化:走査電子顕微鏡による観察

井上正人・小林善宗・金子みつ恵・藤井明和 ..... 161

染色体検査によるウシ受精卵の性別判定(英文)

菱沼 貢・金川弘司・宇高健二・酒井 実・寺西正俊・清家 昇 ..... 169

イオノフォア処理ヤギ精子の運動性型と先体反応について(英文)

浜野光市・佐々田比呂志・菅原七郎・正木淳二 ..... 177

体外受精におけるラット卵子の受精率および多精子受精率におよぼすPMSC投与量の影響(英文)

豊田 裕・杉本正仁 ..... 183

Journal of Mammalian Ova Research

Vol. 1 No. 2

October 1984

Contents

Review

Embryo Transfers in Farm Animals.

SUGIE, T. ----- 116

Originals

Ultrastructure of Delayed Implanting Mouse Blastocysts.

SANZEN, T., S. NIMURA & K. ISHIDA ----- 131

Plasminogen Activator Activity of Early Stage Mouse

Embryos. ISHIKAWA, M., O. TSUTSUMI, M. NAKABAYASHI,

K. KINOSHITA, K. SATOH & M. MIZUNO ----- 137

Swelling of Human Sperm Head (Continuous Observations

Under Light Microscope). NAGAE, T., Y. DOHI, A. IWAKI,

T. KINOSHITA & A. OKADA ----- 143

Effects of Sugars on the Attachment of Human Spermatozoa

with the Zona Pellucida. HOSHI, K., A. SAITO,

K. MOMONO, K. KYONO & A. TSUIKI ----- 153

Fertilization-associated Changes in the Murine Zona  
pellucida: A scanning Electron Micrscopic Study.

INOUE, M., Y. KOBAYASHI, M. KANEKO & A. FUJII ----- 161

Chromosomal Sex Determination of Bovine Embryos.

HISHINUMA, M., H. KANAGAWA, K. UTKA, M. SAKAI,

M. TERANISHI & N. SEIKE ----- 169

Motility pattern and acrosome reaction of ionophore-  
treated goat spermatozoa. HAMANO, K., H. SASADA,

S. SUGAWARA & J. MASAKI ----- 177

Effect of PMSG Dose on the Fertilization Rate and  
Incidence of Polyspermy of Rat Eggs in vitro.

TOYODA, Y. & M. SUGIMOTO ----- 183

# 総 説

## 家畜の受精卵移植技術の現状と将来

家畜改良事業団

家畜改良技術センター

杉 江 信

畜産の分野では、近年「受精卵の移植」に関連する技術が著しく進歩し、子畜を生産するために実用的に利用できる状態になった。さらに最近、開発された受精卵移植の関連技術を基盤にして、細胞培養や細胞工学的技術（顕微操作技術）あるいは生殖免疫学的技術などを導入し、受精卵の細胞を分離して1卵性の双子や4つ子を生産する技術、卵子と精子を体外に取り出して容器の中で結合させる体外受精、移植前に受精卵の性を判別する技術、あるいは受精卵の核を入れ換えて同一遺伝子を持つクローン動物を生産する技術などの、先進的な技術開発を目指す研究が多くなった観がある。このように「受精卵移植技術」は、現在実用的利用でも、研究の動向においても、一つの転換期にさしかかっている感が強い。したがってこの稿では現在進められつつある顕微操作技術を含め、家畜の受精卵移植に関連する技術的展望を述べてみたいと思う。

なお受精後発育を開始して2細胞以上に分割した受精卵は、正式には胚(embryo)と呼ぶので、胚移植と言うのが正しい呼びかたと思うが、慣例で受精卵移植を用いる場合が多い。

### I. 受精卵移植の歴史とその後の展望

哺乳動物の受精卵移植の歴史はかなり古く、今から約1世紀前、正確には1890年に、イギリスでWalter, Heape<sup>1)</sup>と言う生物学者がウサギの受精卵を取り出して別の個体に移植し、子ウサギを生産したことから始まる。その後この成果を確かめた1~2の報告が発表されたが本確的に研究が開始されたのは1930年代に入ってからと思われる。この時期に家畜を用いた研究も開始され、1934年にはヒツジで、受精卵移植(Warwick B. L. ら 1934<sup>2)</sup>)に成功したことが発表された。その後1950年前後になってヒツジ<sup>3)</sup>、ヤギ<sup>3)</sup>、ブタ<sup>4)</sup>、ウシ<sup>5)</sup>と相次いで受精卵移植によって子畜が生産された。

このような研究成果を契機に、家畜の受精卵移植に関連する技術開発が急速に進展し、開腹手術によるヒツジやヤギの受精卵移植においては、受胎率が70~80%に達し、ほとんど自然繁殖に劣らない受胎率が得られるようになった。

ウシの場合は、これらに比較するとやゝ遅い軒歩で開発が進められたが、1970年前後になってウシの技術も著しく進歩し、開腹手術による受精卵移植では72~73%の受胎率が得られた。このような成果が刺激になって、受精卵移植技術を実際の子ウシ生産に利用しようとする気運が高まり、1971年にはカナダ西部のアルバータ州カルガリー市に初めて卵子移植会社が設立され、企業的にウシの受精卵移植事業を開始した。その後次々とカナダやアメリカ合衆国に同様な会社が設立され技術の改善と実用化が進められた。このような風潮は世界的に急速に広がり、現在では13カ国に亘って110余の会社や事業所が設立され、受精卵移植事業を経営している。この外、受精卵移植に関連する技術開発研究を行っている国公立の試験場や研究所は世界

表-1 哺乳動物の受精卵(胚)移植の研究経過

発表者	成 果 お よ び 事 項	動物の種類
Heape (1890) <sup>1)</sup>	最初に哺乳動物の受精卵移植に成功し子ウサギを生産	うさぎ
Beidl (1922) <sup>6)</sup>	ウサギを用い初期に受精卵移植試験を追試して成功	うさぎ
Nicholas (1933) <sup>7)</sup>	実験小動物を用い受精卵に成功	ラッテ
Warwick & Berry (1949) <sup>3)</sup>	家畜を用い受精卵移植に成功し, 子畜を生産	ひつじ, やぎ
Kvansnickii (1951) <sup>4)</sup>	豚の受精卵移植に成功	ぶた
Willett (1951) <sup>5)</sup>	牛の受精卵移植に成功し, 子ウシ生産	うし
Sugie (1965) <sup>8)</sup>	牛の non surgical 法による採卵と受精卵移植で子生産	うし
Alberta Livestock Trans. Ltd. (1971)	最初に家畜の受精卵移植会社を設立, 事業を開始	うし
Whittingham (1971) <sup>9)</sup>	哺乳動物の受精卵凍結保存に成功し子を生産	マウス
Wilmut & Rowson (1973) <sup>10)</sup>	家畜の受精卵凍結保存に成功, 子畜生産	うし
Steptoe & Edwards (1978)	人の受精卵移植に成功, 初めての子供が生れる。	ひと
Willadsen (1979) <sup>11)</sup>	人為的操作による1卵性双子の生産に成功	ひつじ
Palmiter (1982) <sup>12)</sup>	遺伝子操作による動物(スーパーマウス)生産	マウス

各国に亘っておびただしい数に達している。現在日本では主として国公立の場所で技術改善と普及事業を進めているが、國の方針として、法律を改正して実用化の体制をつくり、事業を推進しようとしているので、これからは実用的に子ウシ生産を利用する事業所の数も実施頭数も増加するものと思われる。さらに生殖細胞の顕微操作技術も進展し、新しい生産技術として実用的に利用できる日も、近いことと思われる。

## II. 受精卵移植に用いる技術

受精卵を母体の外に取り出し、さらに移植して子を生産するためには、実施の過程で、それぞれ特殊な技術を用いなければならない。それらの技術として、1. 一度に多数の卵子を生産するための多排卵誘起処置。2. 母体から受精卵を取り出す採卵技術。3. 受精卵を受け入れて育てる個体に卵を移植する技術。4. 受胎を成立させるために、受精卵を提供する母畜と、受け入れて育てる個体との発情同期化。5. 取り出した受精卵を保存する技術などが挙げられる。

### 1. 多排卵誘起処置

技術的に効率を高めるために受精卵移植においては、卵を提供する動物に多排卵誘起のホルモン処置を施す

場合が多い。幸いウシ、ヒツジ、ヤギなどは性腺刺激ホルモンを投与することによって、多数の排卵を誘起することができる。多排卵誘起処置は、常に一定して多数の健全な受精卵を生産することが大切な条件になるが、このことを目標に従来多くの方法が試みられてきた。しかし、近年プロスタグラニンF<sub>2α</sub>(PGF<sub>2α</sub>)が開発され、哺乳動物の黄体退行促進作用の強いことが解明されてからは、性腺刺激ホルモン処置にPGF<sub>2α</sub>の投与を併用する方法を用いる場合が多い。すなわち図に示すように、各家畜とも排卵後4、5日間を除いた黄体期に、それぞれ所要量(表-2)の性腺刺激ホルモンを注射しておき、2～3日後で20～25mg以上のPGF<sub>2α</sub>を投与し、発情が出現した日に、LHあるいはhCGを注射して排卵を促進し、授精を行う方法である。この方法によると供用する雌畜の性周期に束縛されることなく処置を開始することができ、採卵や移植の作業計画を立てる場合に便利に利用できる。このような処置によってウシ、ヒツジ、ヤギなどでは通常10～15個の排卵が誘起される。

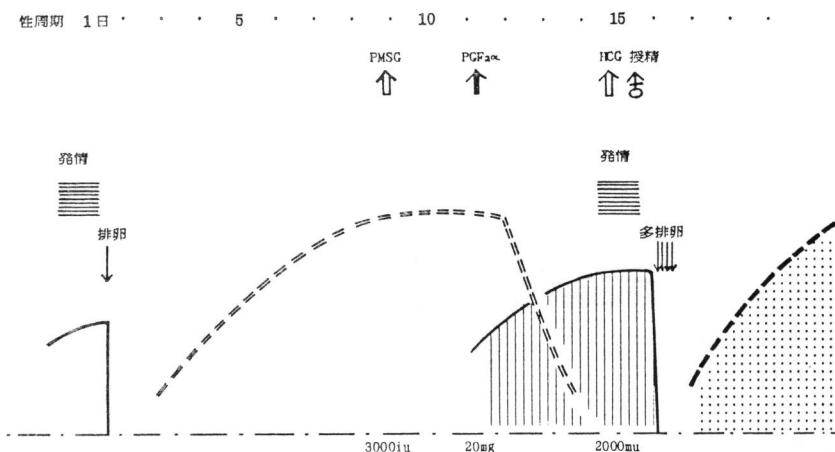
図-1 PGF<sub>2α</sub>併用によるウシの多排卵誘起処置

表-2 家畜の多排卵誘起のためのホルモン所要量

動物区分	卵胞発育促進 FSH (mg)	PMSG (IU)	排卵 LH (mg)	促進 hCG (IU)
牛(成雌)	20～50	1500～3000	75～100	1500～2000
子牛	20～50	1000～2000	50～75	1000～1500
山羊(成雌)	12～20	1000～1500	50～75	1000～1500
子山羊	10～15	1000～1200	50～75	1000～1500
めん羊(成雌)	12～20	1000～2000	50～75	1000～1500
子羊	10～15	1000～1500	50～70	1000～1500
豚	10～20	750～1500	25～50	500～1000
うさぎ	2～3	25～75	2～3	25～75

## 2. 受精卵の採取

多排卵誘起に続くステップとして受精卵採取技術がある。卵子の採取法には母畜を屠殺して摘出した卵管や子宮から卵子を回収する方法、開腹手術して卵管や子宮を灌流して採卵する方法、あるいは開腹しないで子宮を洗浄して採卵する方法などがあるが、動物種やそのときの都合によって用いられる方法も異なってくる。しかしいずれの場合も採卵では、排卵された卵子を安全に、できるかぎり多く回収することが重要な条件になる。なお技術の実用化にあたっては、採卵に用いた個体を再び繁殖に供用できる条件が要求される。したがって、中小家畜では開腹手術による採卵が主流になっている。またウシでは非手術的に採卵するために、種々の採卵

表-3 牛 胚 の 初 期 発 育

発育 stage (胚数)	3日 (46)	4日 (123)	5日 (101)	6日 (109)	6 1/2日 (258)	7日 (1242)	7 1/2日 (510)	8日 (610)	9日 (47)
2 細胞期	18	3	5	8					
3	16	7	2	1					
4		3	7	6					
4 ~ 8	13	11	18	3					
8	53	14	11	7					
8 ~ 16		46	26	6					
16		15	7	10					
早期桑実期		2	12	20	24	16	9	3	
桑実期 compact			13	35	41	28	12	12	
早期胚盤胞				4	21	28	20	19	17
胚盤胞					14	20	36	25	25
膨大胚盤胞						8	23	38	28
胚盤胞 zona-free							0.2	4	30

数値は%，(杉江 1964<sup>22</sup>), Wright 1981<sup>45</sup>), Lindner & Wright 1983<sup>48</sup>)

器具が考案され、これらを用いて子宮を洗浄し受精卵を回収する方法が用いられ、70%前後の回収率が得られている。なおウシの卵子は排卵後4~5日目に子宮に下降するので、子宮洗浄による採卵は5日以後になる。しかし最近用いられている頸管経由による移植の場合は、子宮の収縮運動が消失する発情後7日以降に移植するので、採卵も必然的に7日以降になる。また乳牛の場合は自然発情後1個の卵を目標に採卵を実施するケースも多くなってきているが、この場合は排卵側の子宮角上部を限局して洗浄するので、洗浄液も少く、300ml程度の子宮洗浄で、70%前後の採卵率が得られている。

## 3. 受精卵移植

母体から取り出した卵が完全な子供になるまで発育できる環境は、同じ種類の雌性生殖器内にかぎられている。したがって、取り出した受精卵から子畜を生産するためには受精卵を育てる個体を選び、その生殖器道内に移植しなければならない。中小動物の場合の受精卵移植は、開腹手術して卵管や子宮角を切開口に引き出し

て移植する方法を用いる。しかしウシでは開腹せずに受精卵を移植できる技術が切望され、多くの実験が繰返された。<sup>8)</sup> 1964年に畜産試験場で新しい着想から、子宮頸管を通過せずに、受精卵を子宮に注入する移植器具を考案し、これを用いて開腹せずにウシの子宮内に受精卵を移植することに成功し、その後多数の子牛を<sup>21-22)</sup> 生産した。しかしこの方法は技術的に熟練を必要とすることから、近年、技術を簡易化する目的で、人工授精と同じ要領で頸管を経由して受精卵を移植する技術開発が進められた結果、発情後7~8日以上経過すると、<sup>23-28)</sup> 頸管を経由して受精卵を移植しても受胎することが解明され、ウシの非手術的卵移植法として用いられるようになつた。術式は、人工授精用の超細型ストローを用いるか、あるいは細い管を用いて受精卵を吸いとり、人工授精の深部注入法と同じ要領で、頸管を通過して注入管を子宮角に挿入し、少量の液と一緒に受精卵を注入する。注入管の挿入に当つては、図に示すように滅菌消毒した紙製やビニール製の鞘で注入管を覆って腔内を通過させ、子宮内に細菌の持込みを防止する方法で好結果が得られている。なお、この方法による受精卵移植で最近60%前後の受胎率が得られる。

#### 4. 受精卵の保存

受精卵移植の場合、卵の発育程度と受け入れて育てる子宮の環境が、性周期的にみて一致していないと、受胎は望みがたい。しかし受精卵を採取した時の状態で長期間保存できること、受け入れる雌の発情後の経過を待つて移植することができる。また受精卵を長距離輸送することができる。国際貿易も期待できる。さらに農家の立場で考えると移植技術を習得すれば、保存卵を購入して移植することが可能になるので、望みの品種や系統の子畜を格安に導入することができるなど、受精卵の保存技術確立による利益は甚大になることが予測される。

卵子の保存技術には、0~10°C程度の低温に短期間保存する方法と、凍結して長期間保存する方法があるが、精子の保存と同様、凍結保存が最も望ましい方法といえる。受精卵の凍結保存技術は、1971年イギリスでWhittinghamがマウス卵の凍結に成功したのを契機に著しく進展した。その成果として家畜でも-196°Cの液体窒素(LN)中に凍結保存した受精卵を融解して移植し、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、家兔などの各家畜で多数の子が生産されるようになった。<sup>9)</sup><sup>10, 29) 30) 31) 32)</sup>

受精卵凍結では実用化促進のために、さらに技法を簡易化することに主眼をおいて研究が進められ、昨今家畜の受精卵凍結においては凍結に要する時間が著しく短縮された。またコンピューターを内蔵した凍結用冷却

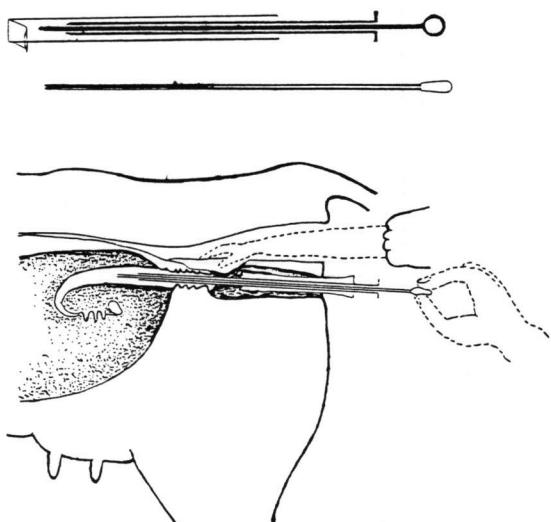


図-2 ウシの受精卵移植法

装置が開発され、動物種別にプログラムを作り、これを利用することによって自動的に凍結が完了するので、著しく簡便に実施できるようになった。受精卵凍結における冷却パターンを大別すると、図-3に示すように、

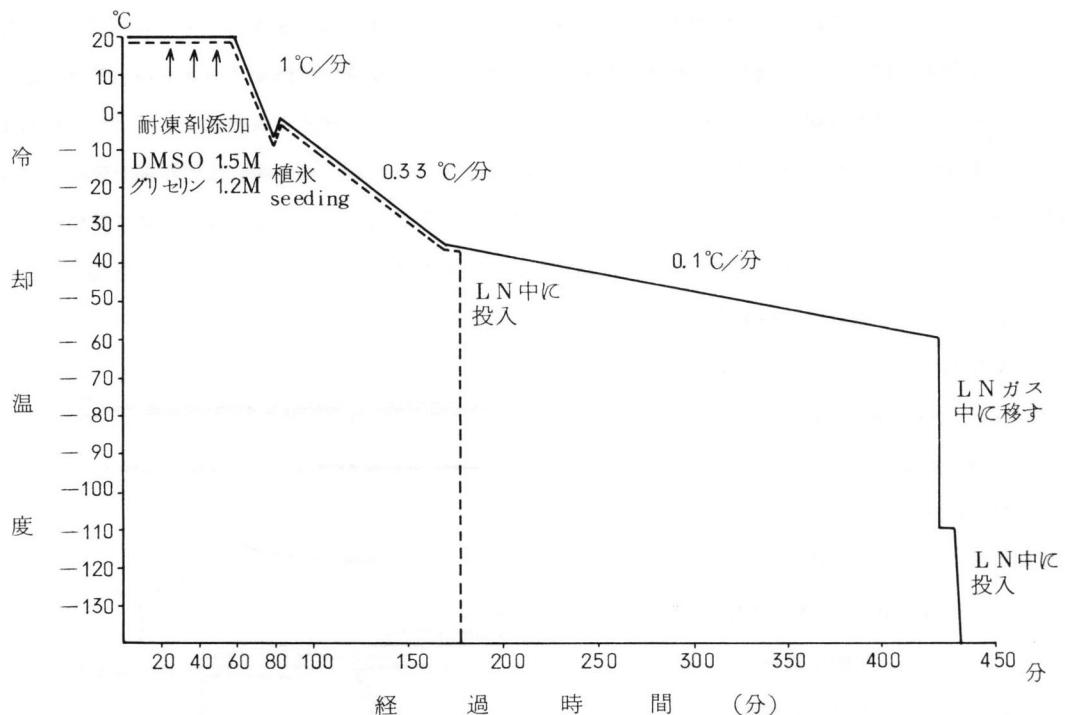


図-3 家畜の受精卵凍結における冷却法

-60～-80°Cの低温域まで比較的緩慢に冷却してから-196°CのLN中に浸漬する方法(実線)と、-35～-45°Cの比較的高い温度域から直接LN中に浸漬する方法(点線)の2つの方法が挙げられるが、ウシやヒツジ、ヤギなど家畜の受精卵凍結では冷却過程が短時間で完了する後者を用いるところが多い。

このような冷却の様式は、凍結保存後融解する場合の温度上昇パターンと重要な関連性をもっている。すなわち-60°C以下の低温域まで緩慢に冷却した場合は、融解にあたって比較的緩慢に温度を上昇させる方法が適合する。しかし-35～-45°Cの温度域から直接LN中に浸漬して保存したものは、LNから取り出し、すぐ-37～-40°Cの温湯中に漬けて急速に温度を上昇させて融解する方法が適合する。

現在、凍結保存した受精卵を移植した場合の受胎率は、ラット、マウス、ウサギなどの実験小動物ではかなり向上し、約50%が個体に発生するようになった。このような進展に伴って実験用小動物では Embryo Bank が設立され、稀少価値のある品種や特定な系統の保存に利用され始めている。しかし家畜の凍結保存卵移植では、まだ受胎率はそれほど高くなく、満足できる域に達していない。したがって凍結保存卵からの個体発生率を高くするための研究成果に期待がかけられている。

### 5. 供用雌の発情同期化

上述した主要技術のほか、受精卵移植を実施する場合は、供用する雌畜の発情期が同調していかなければならぬと言う、きびしい制約がある。しかし限られた数の雌のなかから自然の発情期が一致しているものだけを多数集めることはむずかしい。したがって予定した雌の発情期を、調整しなければならない場合が多い。

家畜の発情期調整には、黄体ホルモン投与あるいは黄体除去など、従来幾つかの方法が開発されていたが、いずれも欠陥があって受精卵移植に利用することはむずかしかった。しかし近年プロスタグラジン $F_{2\alpha}$  (PGF $_{2\alpha}$ )が開発され、哺乳動物の黄体退行促進作用の強いことが解明されてから、これをを利用して家畜の発情期調整技術が確立された。<sup>33-35)</sup>これらの成果からウシでは黄体期にPGF $_{2\alpha}$ を5mgずつ24時間間隔で2回、計10mg、あるいは15mg以上を1回筋肉内に注射するか、PGF $_{2\alpha}$ アナローグ0.2mg以上を注射すると、黄体は急激に退行し、注射後2~4日目には発情を発現し、排卵も起きる。またヒツジ、ヤギでは3mg以上のPGF $_{2\alpha}$ を1回に頸管実質内に注射すると、注射後3~4日で発情が出現することが判明した。したがって日数を計算して所要量のPGF $_{2\alpha}$ あるいは、そのアナローグを注射することにより、比較的容易に多数の雌の発情期を同期化できるので、受精卵移植にきわめて便利に利用できる。

このようなPGF $_{2\alpha}$ を用いた発情期調整技術と、前述のホルモン処置にPGF $_{2\alpha}$ を併用する多排卵誘起法を組み合わせると、雌畜の性周期に束縛されることなく、受精卵移植を計画して実施することができる。

### III. 受精卵移植の受胎に関連する諸要因

受精卵移植によって受胎が成立するのは、健全に発育している受精卵を育ちやすい環境に移植した場合であるが、受胎成立に影響する要因として幾つかの条件が指摘される。

#### 1. 発情期の同調

受精卵移植における受胎成立の重要な条件として、卵を提供する雌畜と、卵を受け入れて育てる個体の発情期(排卵時期)の同調が挙げられる。両者の発情期が24時間以内に同調したときに70~80%の受胎率が得られる。また両者の発情時期が異なる場合の許容範囲は、ヒツジ、ヤギでは前後に48時間、ウシでは24時間違いまでといえる(表-4)。

#### 2. 移植時期と受胎率

移植の時期は、用いる移植方法によって異なる。開腹手術による方法では移植時期が一般に早くなる。しかしウシで非手術的に受精卵を採取し、頸管経由で移植する場合は、移植時期が発情後7日以後に制約され、時期的に遅くなる。ウシの受精卵移植における移植時期別の受胎率をまとめると、表-5のように一般的にみて発情後5~9日に移植した場合に受胎率がなくなる傾向がうかがわれる。非手術的移植法の場合は、発情後7日以後に実施した場合に明らかに受胎率の向上がみられる。これは発情後7日以後になると、頸管刺激による子宮運動が著しく弱くなることが一つの要因と考えられる。

#### 3. 受精卵の発育程度

移植卵は排卵直後の1細胞期から、ヒツジでは発情後14日の胚盤胞まで、またウシでは排卵後16日の胚盤胞まで、いずれの細胞期のものでも、その発育程度に応じた環境の生殖器内に移植すれば受胎することが立

表-4 牛の胚移植一発情期同調と受胎率

方法および発表者	+3日	+2日	+1日	+12 hr	0日	-12hr	-1日	-2日	-3日
開腹手術									
Rowson 外(1972) <sup>20)</sup>	20	40	57		91		52	30	0
Sreenan & Beehan(1974) <sup>87)</sup>					92		71		
Schneider 外(1980) <sup>47)</sup>				61	67	66			
Newcomb(1979) <sup>37)</sup>			50		63		39		
Sreenan 外(1975) <sup>55)</sup>			67		82		62		
非開腹									
杉江 外(1972) <sup>21)</sup>	0	0	36		29		30	25	0
Boland 外(1975) <sup>88)</sup>			25		25		25		
Jillela & Baker(1978) <sup>89)</sup>			25		71		0		
Wright(1981) <sup>45)</sup>	59	61	68		59	61	58	41	
Lindner & Wright(1983) <sup>48)</sup>	38	50			42		50	39	

表-5 牛の胚移植—移植時期別にみた受胎率(%)

方法および発表者	移植時期											
	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	11日	12日	13日	14日以後
開腹手術												
Newcomb & Rowson(1975) <sup>36)</sup>	10	55	73	87	70							
Newcomb(1979) <sup>37)</sup>						49	56	48				
Nelson 外(1975) <sup>39)</sup>	30	54	63	63								
Betteridge 外(1976) <sup>40)</sup>											56	32～100
Betteridge & Mitchell(1974) <sup>38)</sup>				48	80	100		100				
Elsden 外(1978) <sup>41)</sup>					75	61	56					
非開腹												
Trounson 外(1978) <sup>26)</sup>					22	40	50	59				
Halley 外(1979) <sup>27)</sup>					24	26	42					
Lawson 外(1975) <sup>24)</sup>			7			32						
Brand 外(1978) <sup>42)</sup>					38			35	31			0
Heyman 外(1978) <sup>43)</sup>						53	67	54				
Renard 外(1977) <sup>44)</sup>					30	50						
Wright 外(1981) <sup>45)</sup>					60	59	65					

証されている。しかし若いステージの受精卵よりも桑実期や胚盤胞に発育したものの方が受胎成績は良い傾向がみられる(表-6)。

表-6 牛の胚移植—発育ステージ別にみた受胎率(%)

方法および発表者	8~12 細胞期	16 細胞期	胚の発育ステージ				Zona-free 胚
			早期 桑実期	桑実期	早期 胚盤胞	胚盤胞	
<b>開腹手術</b>							
Rowson 外(1969) <sup>18)</sup>	53	29	43				
Schneider 外(1980) <sup>47)</sup>			61	67	67	71	
<b>非開腹</b>							
Halley 外(1979) <sup>27)</sup>				24		27	38
Wright (1981) <sup>45)</sup>			44	53	65	66	64
Lindner & Wright(1983) <sup>48)</sup>	40	33	34	35	40	50	38

#### 4. 移植部位

受精卵は、その発育程度に応じて育ちやすい環境に移植することが原則になっている。したがって若い発育過程の受精卵は卵管に、発育の進んだものは子宮に移植することも一つの条件になる。しかしながら、8細胞未満の受精卵を卵管に移植した場合と、8細胞期以上の卵を子宮に移植した場合の受胎成績を比較すると、8細胞期以上の受精卵を子宮に移植した方が受胎率は高い。<sup>49,50)</sup>また片側だけに移植する場合は排卵側に移植した方が反対側に移植するより受胎率は高い。<sup>50-55)</sup>しかし排卵側子宮角に受精卵が生存する場合は、反対側に移植しても卵の生存性は高い。さらに受精卵を子宮角に移植する場合に、移植部位を、子宮角の上部、中央部、下部のいずれが良いかについても検討されているが、この場合は移植部位によって受胎率に有意差がみられない(表-7)。

表-7 牛の胚移植—移植部位と受胎率(%)

発表者	移植方法	子宮角上部	子宮角中部	子宮角下部
Sreenan (1976) <sup>51)</sup>	開腹手術 1卵	65		60
Newcomb 外(1978) <sup>90)</sup>	開腹手術 1卵	60		50
Sreenan & Beehan (1976) <sup>53)</sup>	開腹手術 2卵両側	80		70
Newcomb 外(1980) <sup>57)</sup>	{ 開腹手術 2卵両側 2卵 1側	90 80		65
Rowe 外(1980) <sup>58)</sup>	{ 開腹手術 1卵 非開腹 1卵	60 75	45	
Boland 外(1976) <sup>56)</sup>	{ 開腹手術 1卵 非開腹 1卵	40		25

## 5. その他受胎に影響を及ぼす要因

上述のほか、移植する卵の個数と受胎成績についても検討されている。移植卵は1個だけより2個あるいは3個を移植した方が受胎率は高くなる。さらに2個以上の複数卵を1個体に移植する場合は、1側の子宮角に移植するより両側に分けて移植した方が受胎率も高く、移植卵の生存性、すなわち双子の生産率も著しく高くなる。<sup>17,59,60) 62) 63)</sup> これらのほか、汚染防止処置の有無、移植時の麻酔効果、実施の温度条件などが受胎に及ぼす影響についても検討され、受胎率向上の諸条件が解明されてきている。これらの条件を整え、かつ繁殖生理的に健康な雌を選んで受精卵を移植すれば、自然繁殖に劣らない受胎成績と子畜生産が得られるものと考えられる。

## IV. 受精卵移植技術の利用

受精卵の移植技術が家畜の繁殖技術として実用化すると、直接家畜の生産技術として利用され、予測される利益も大きい。また繁殖生理学や動物遺伝学、あるいは生物学や医学などの研究分野で利用すれば、未解決の諸問題の解明に役立ち、間接的に学問の発展に寄与する効果も大きいものと考えられる。

### 1. 畜産における子畜生産上の利用効果

#### (1) 家畜の改良に利用

家畜として能力の優れている雌に多数の受精卵を生産させ、これらの卵を能力の乏しい個体や他の品種の雌の生殖器内に移植し、受精卵を受け入れた個体を妊娠させて、一時的に胎内を借りる状態で胎子を育てさせ、移植卵から発育した子畜を生産すると、卵子を提供した母親のもつ優れた遺伝形質を受け継いだ子畜が多数生産される。この種の利用効果は、とくにウシを対象にした生産面で期待されている。

#### (2) 特定品種の増産に利用

受精卵提供畜を特定な品種の雌に置きかえ、受け入れる側に、既存の雌を用いると、産業的に要望の多い特定な品種の子畜を急速に増産することが可能になる。ウシを例にとると、乳用、肉用いずれの品種でも、そのときの要望に応じて生産することが出来る。とくに、乳牛の腹を借りて肉牛を生産する場合は、乳の生産を減らすことなく、肉資源の増産をはかることが出来る。このような特定品種増産の利用法は、現在カナダやアメリカ合衆国における受精卵移植会社のおもな事業になっている。

#### (3) 家畜導入に利用

受精卵の凍結による長期保存技術が確立すると、受精卵の国際貿易が技術的に可能になるので、高価な種畜を、高い輸送費をかけて輸入する必要がなくなる。また、家畜を飼育している農家の立場では、繁殖能力のある雌畜を所有していれば、望むときに望みの品種や系統の受精卵を購入して移植することにより、要望する純粋な子畜を、安い経費で導入することが出来る。

#### (4) 誘起多胎に利用

肉畜の増産対策として誘起多胎技術の開発が着目され、すでに各国で多くの研究が行われているが、本来、誘起多胎は、自家生産卵を過剰に着床させ、双子あるいは三つ子を生産することを言う。しかし、ウシでは、ホルモン処置の影響によって受胎率が低下し、多胎子の出産率も低くなるなど、多くの問題がある、期待出来る成果は得られていない。近年、多胎生産に受精卵移植技術を利用する試みが行われ、複数の卵子を両側の

子宮角に分けて移植することにより、かなり高率に双子や三つ子が生産されることが証明され、特にウシでは期待のもてる多胎生産技術になった。

#### (5) 品種や系統の保存に利用

近年、家畜や実験動物の品種や系統が著しく多くなってきている。一方消滅の危機に瀕する貴重な原品種などの保存を望む世論も強い。しかしこのような多岐に亘る品種や系統の動物を生体のまゝ飼育して保存することは、施設や経費、労力などの点で困難な問題が生ずる。したがって品種や系統の特質を完全に継承している受精卵の状態で凍結保存しておき、必要に応じて融解して移植し、子を生産すると、多くの品種や系統を著しく安価に、半永久的に、保存することができる。この企画はすでに実験用小動物では実用化され、数か国に Embryo Bank が設立されて多くの品種や系統の受精卵を凍結保存している。家畜や野生動物の場合は、実用的に Embryo Bank を開設するまでに至らないが、近き将来実現する可能性が強いと思われる。

以上畜産の分野における子畜生産上の利用効果について述べたが、このほか受精卵移植技術は試験研究を進めるために一つの手段として利用され、未解決の諸問題解明に寄与する効果も大きい。とくに繁殖生理学の研究分野で有効に利用され、受精現象の解明から、体外受精技術の開発に発展している。そのほか受精卵の発育や着床を検査する方法で、低受胎の原因、夏期受胎率低下の要因、性周期の機序、妊娠期間の決定因子など種々な問題を解明するための試験研究に利用され、多大な成果が挙げられている。

また、動物遺伝学的な研究分野では生産子に及ぼす母体効果を調べるための研究に用いられ、種々の新知見が得られている。上述のように受精卵移植技術は、すでにかなり広い分野で利用され効果を挙げているが、今後実用的に普及するに従って利用効果も一段と拡大されるものと思われる。

### V. 卵子の研究分野における新しい動向

受精卵移植技術は基礎的にほぼ確立し、実用的に普及され始めてきたが、一方、哺乳動物の卵子に関与する研究の分野では、開発された受精卵移植技術を基盤にして、最近新しい技術を開発しようとする動きが活発になり、一つの転換期にさしかかった觀がある。すなわち、細胞工学的(顕微操作)技法を導入して、受精卵の細胞を分離し、それぞれの分離細胞の再生能を利用して個体発生をはかり、一卵性の複数子を生産する技術、あるいは卵の核を置換してクローン動物を作出する技術、または受精卵から分離した細胞を融合させてキメラ動物を作出する技術、そのほか体外受精や胚の性判別などの技術開発研究が進められている。さらに遺伝子操作技術を組み入れて、新しい品種の作出や特性を持つ動物を生産する技術開発研究も始められている。

#### 1. 細胞分離による一卵性複数子の生産

一卵性複数子の生産技術は、単に畜産の分野で優良な子畜の増産に利用できるだけではなく、一卵性双子を試験研究の供試動物として使用すると、信頼性の高い結果が得られることから、かなり古くから着目され、技術開発のために多くの試験研究も試みられていた。<sup>64-72)</sup>しかし長年月に亘ってその成功はみられなかった。Willadsen (1979)<sup>11)</sup>がヒツジを用い、2細胞期の受精卵の細胞を分離し、分離細胞を別々に空の透明帯のなかに納め、寒天包埋して育て、これらの分離卵を移植して始めて一卵性双子の生産に成功した。同氏ら (1981) は同じ方法を用い牛でも受精卵分離による一卵性双子と、1/4 分離により一卵性3つ子の生産に成功した。こ

これらの試験では2細胞～8細胞期の早期卵が用いられたが、その後、桑実期や胚盤胞に発育した受精卵を金属<sup>74-76)</sup>製やガラス製のナイフ、あるいはガラス棒で切断して2分離する方法が開発され、ウシで多数の一卵性双子が生産されるようになった。

## 2. 核移植技術開発研究

初期発生期の卵の核を置換して生物の発生を促す試みは、下等脊椎動物を用いた実験でかなり古くから行われていたが、近年顕微操作技術や哺乳動物の受精卵移植技術が開発されたことに伴い、哺乳動物でも核の置換<sup>77)</sup>技術を繁殖領域に応用できる可能性が示唆されてきた。Illmensee & Hoppe (1981) はマウスの初期受精卵の核を除去して、これに他の胚盤胞の inner cell mass から分離した核を置換して子を生産した。<sup>78)</sup>その後引き続いた報告が見られなかったが、最近 Mc Grath & Salter (1983) が、核置換した受精卵を育て64個を移植して10匹の子を生産し、核置換技術開発の可能性を立証した。これらの両実験では、いずれも胚盤胞に発育した受精卵の inner cell mass から分離した核を用いている、このような核の置換技術は、家畜の繁殖分野に利用すると、優秀な同一遺伝形質をもつ多数の個体(クローン動物)を生産できる可能性を示唆し、家畜改良に利用すると著しい効果が期待される。

## 3. キメラ動物の作出

別々な受精卵から分離した細胞を融合させてキメラ動物を作出する技術は同種間では Tarkowski (1961)<sup>79)</sup>  
<sup>80)</sup> Mintz (1962) によってマウスを用いた実験で開発され、その後多数のキメラマウスが作出されている。<sup>81)</sup>  
異種動物間のキメラ胚は Zeilmaker (1973) Stern (1973) Mulnard (1973) によって作られ、培<sup>82)</sup><sup>83)</sup>  
養で発育するまでになったが、異種キメラ動物は Rossant ら (1980) が初めて作出了した。また最近家畜で<sup>84)</sup>  
もヒツジとヤギのキメラ動物が Fehilly & Willadsen (1984), Meinecke-Tillmann ら (1984)<sup>85)</sup><sup>86)</sup> によって作出されている。これらのキメラ動物については、発生学などの研究分野では重要な意義をもつが、  
その特性調査が始められたばかりの状態で、実用的な利用法は、まだ開発されていない感がある。

上述のほか、近年哺乳動物の遺伝子組み換えに成功し、ラッテの生長因子を持ったスーパーマウスを生産したことが<sup>12)</sup> Palmiter ら (1982) によって報告され、センセイションを巻き起したことは、まだ記憶に新しい事柄である。以上家畜の受精卵の移植、ならびにこれを基盤にした利用の概要、最近の研究動向などについて記述したが、受精卵移植に関する技術の改善が進出し従って、顕微操作技術もさらに一層使いやすく改善され、利用範囲も拡大されて畜産における生産分野や種々の試験研究分野に寄与する効果も増大するものと推測される。

## 引用文献

- 1) Heape, W. : Proc. Roy. Soc. [Lond.], 48, 457 (1890)
- 2) Warwick, B.L., et al. : Proc. Amer. Soc. Anim. Prod. 27th Ann. Meet, 225 (1934)
- 3) Warwick, B.L. & Berry, R.O. : J. Hered., 40, 297 (1949)

- 4) Kvansnickii, A.V. : Sovetsk. Zootech., 1, 36 (1951)
- 5) Willett, E.L. et al. : Science, 113, 247 (1951)
- 6) Beidle, A., et al. : Zts. Chr. Gelrustshulft Gynakol., 84, (1922)
- 7) Nicholas J.S. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 30, 1111 (1933)
- 8) 杉江 信, 相馬 正, 大沼秀男 : 家畜繁殖誌 10, 124 (1965)
- 9) Whittinghan, D.G. : Nature [Lond.] 233, 125 (1971)
- 10) Wilmut, I. & Rowson, L.E. : Vet. Rec., 92, 686 (1973)
- 11) Willadsen S.M. : Nature 277, 298 (1979)
- 12) Palmiter R.D. et al. : Nature 300, 611 (1982)
- 13) Averill, R.L. & Rowson, L.E. : J. Endocrinol., 16, 326 (1958)
- 14) Moore, N.W. & Shelton, J.N. : J. Reprod. Fert., 7, 145 (1964)
- 15) Moor, R.M. & Rowson, L.E. : J. Endocrinol., 34, 233 (1966)
- 16) Rowson, L.W. & Moor, R.M. : J. Reprod. Fert., 11, 207 (1966)
- 17) 杉江 信, 相馬 正 : 蓄誌研報 23, 7 (1970)
- 18) Rowson, L.E., et al. : J. Reprod. Fert., 18, 517 (1969)
- 19) Rowson, L.E., et al. : J. Reprod. Fert. 25, 261 (1971)
- 20) Rowson, L.E. et al. : J. Reprod. Fert., 28, 427 (1972)
- 21) 杉江 信ほか : 蓄誌研報 25, 35 (1972)
- 22) 農林水産技術会議 : 牛の人工妊娠技術化に関する研究, 研究成果シリズ6号 (1973)
- 23) Hahn, J. et al. : Dish. Tierarztl. Wschr., 82, 429 (1975)
- 24) Lawson R.A.S. et al. : J. Reprod. Fert. 45, 101 (1975)
- 25) Sreenan J.M. : Vet Rec 102, 58 (1978)
- 26) Trounson A.O. et al. : Vet. Rec. 102, 74 (1978)
- 27) Halley S.M. et al. : Theriogenology 12, 97 (1979)
- 28) Newcomb R. & Rowson, L.E.A. : Theriogenology 13, 41 (1980)
- 29) 杉江 信, 角田幸生, 相馬 正 : 家畜繁殖誌 25, 203 (1979)
- 30) Yamamoto Y., et al. : J. Reprod. Fert. Suppl. 32, 399 (1982)
- 31) Willadsen, S.M. et al. : J. Reprod. Fert. 46, 151 (1976)
- 32) Bilton, R.J. & Moore, N.W. : J. Reprod. Fert. 46, 537 (1976)
- 33) 杉江 信 : 蓄誌年報 14, 87 (1976)
- 34) 杉江 信, 相馬 正, 水落一雄 : 蓄誌研報 33, 7 (1978)
- 35) 杉江 信, 相馬 正, 角田幸生 : 蓄誌研報 41, 1 (1983)
- 36) Newcomb, R. & Rowson L.E.A. : J. Reprod. Fert. 43, 539 (1975)

- 37) Newcomb, R. : Vet. Rec. 105, 432 (1979)
- 38) Betteridge, K.J. & Mitchell, D. : Theriogenology 1, 69 (1974)
- 39) Nelson, L.D., et al. : J. Anim. Sci. 41, 371 (1975)
- 40) Betteridge K.J. et al. : Proc. 8th Int. Congr. Anim Reprod. A.I., [Krakow] 3, 237 (1976)
- 41) Elsden, R.P., et al. : Theriogenology 9, 17 (1978)
- 42) Brand, A. et al. : Control of Reproduction in Cows, 281, Ed. J.M. Sreenan Martinus Nijhoff, The Hague (1978)
- 43) Heyman, Y. et al. : In Control Reproduction in the Cow, 330 Ed. Sreenan J.M. (1978)
- 44) Renard J.P., et al. : Theriogenology 7, 189 (1977)
- 45) Wright J.M. : Theriogenology 15, 43 (1981)
- 46) Woody, G. & Ulberg, L. : Reprod. Fert., 5, 203 (1963)
- 47) Schneider H.J.Jr., et al. : Theriogenology 13, 73 (1980)
- 48) Linder G.M. & Wright R.W. : Theriogenology 20, 407 (1983)
- 49) Moore, N.W. et al. : J. Reprod. Fert., 1, 332 (1960)
- 50) Shelton, J.M. & Moore N.W. : J. Reprod. Fert. 11, 149 (1966)
- 51) Sreenan, J.M. : Proc. 8th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I. [Krakow] 3, 269 (1976)
- 52) Newcomb R. & Rowson, L.E.A. : Proc. 8th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I. [Krakow] 3, 262 (1976)
- 53) Sreenan, J.M. & Beehan D. : J. Reprod. Fert. 48, 223 (1976)
- 54) Del Campo, M.R. et al. : Biol. Reprod. 16, 580 (1977)
- 55) Sreenan, J.M., et al. : J. Reprod. Fert. 44, 77 (1975)
- 56) Boland, M.P., et al. : Proc. 8th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I. [Krakow] 3, 24k (1976)
- 57) Newcomb R., et al. : J. Reprod. Fert. 59, 31 (1980)
- 58) Rowe R.F. et al. : Am. J. Vet. Res. 41, 1024 (1980)
- 59) Rowson, L.E.A., et al. : Ver. Rec., 85, 582 (1969)
- 60) Rowson, L.E.A., et al. : J. Reprod. Fert. 25, 261 (1971)
- 61) Gordon, I. & Boland, M.P. : In Control of Reproduction in Cows. 336, Ed. Sreenan J.M. (1978)
- 62) 高橋芳幸, 鈴木達行, 下平乙夫 : 家畜繁殖誌 28, 30 (1982)

- 63) Curtis J.L. et al. : Theriogenology 15, 124 (1981)  
64) Nicholas J. & Hall B. : J. Exp. Zool. 90, 441 (1942)  
65) Brochart M. : Nature [Lond.] 173, 160 (1954)  
66) Seidel F. : Nature [Wiss] 39, 355 (1952)  
67) Tarkowski A.K. : Nature [Lond] 184, 1286 (1959)  
68) Tarkowski A.K. & Wroblwska J. : J. Embryol. Exp. Morph. 18. (1)  
155 (1967)  
69) Moore N.W. et al. : J. Reprod. Fert. 17, 527 (1968)  
70) Moore N.W. et al. : Aust. J. Biol. Sci. 22, 979 (1969)  
71) Trounson A.O. & Moore N.W. : Aust. J. Biol. Sci. 27, 505 (1974)  
72) Rossant J. : J. Embryol. Exp. Morph. 36, 283 (1976)  
73) Willadsen S.M. & Polge C. : Vet. Rec. 108, 211 (1981)  
74) 長嶋比呂志, 尾川昭三 : 家畜繁殖誌 27(1) 12 (1981)  
75) Williams T.J. : Theriogenology 17, (1) 114 (1982)  
76) Ozil J.P. et al. : Vet. Rec. 110, 126 (1982)  
77) Illmensee K. & Hoppe P.C. : Cell 23, 9 (1981)  
78) James McGrath & Davor Solter : Science 220, 1300 (1983)  
79) Tarkowski A.K. : Nature [Lond] 190, 857 (1961)  
80) Mintz B. : Science 138, 594 (1962)  
81) Zeilmaker G.H. : Nature [Lond] 242, 115 (1973)  
82) Stern M.S. : Nature [Lond] 242, 472 (1973)  
83) Mulnard J.G. : C.R. Acad. Sci. [Paris] 276, 379 (1973)  
84) Rossant J. & Frels W.I. : Science 208, 419 (1980)  
85) Fehilly C.B. et al. : Nature [Lond] 307, 634 (1984)  
86) Sabine Meinecke-Tillmann & Meineke B. : Nature [Lond] 307, 637  
(1984)  
87) Sreenan, J.M. & Beehan D. : J. Reprod. Fert. 41, 497 (1974)  
88) Boland, M.P. et al. : Br. Vet. J. 131, 738 (1975)  
89) Jillela, D. & Baker A.A. : The Vet. Rec. 103, 574 (1978)  
90) Newcomb, R., et al. : In Control of Reproduction in the Cow, 292,  
Ed. Sreenan J.M., Martinus Nijhoff, The Hague (1978)

着床遅延マウス胚盤胞の微細構造

Ultrastructure of Delayed Implanting  
Mouse Blastocysts

三善隆広・新村末雄\*・石田一夫

Takahiro SANZEN, Sueo NIIMURA\*  
and Kazuo ISHIDA

新潟大学農学部家畜管理学教室・\*新潟大学医学部附属動物実験施設

Department of Animal Husbandry, Faculty of Agriculture, Niigata University

\*Facilities for Comparative Medicine and Animal Experimentation,  
Niigata University School of Medicine

The ultrastructure of delayed implanting mouse blastocysts during the period of Days 10 through 30 showed no differences throughout the period, but was different in the following points, as compared with that of intact blastocysts on Day 4.

I. Trophoblastic cells. (1) Elongation of trophoblastic cells that had long cytoplasmic projections at the intercellular portion near the blastocoele, (2) Appearance of the basement membrane-like material along the inner surface of the trophoblast, (3) Irregularity in the shape of the nucleus with invaginations of the nuclear membrane, and the thickening in the density of the nuclear substrate, (4) Disappearance of vacuolated cristae in mitochondria, (5) Decrease in the number of rough-surfaced endoplasmic reticula, of polysomes and of Golgi apparatus, (6) Increase in the number of lipid droplets, (7) Disappearance of fibrous inclusions.

II. Inner cells. (1) Irregularity in the shape of inner cells with fine cytoplasmic projections, (2) Phenomena concerning nuclear and cytoplasmic organelles and fibrous inclusions similar to those in trophoblastic cells.

**緒言 :** 着床遅延胚盤胞の微細構造は、アルマジロ<sup>1)</sup>、ミンク<sup>2)</sup>、イタチ<sup>2)</sup>、オットセイ<sup>2)</sup>、ノロジカ<sup>3,4)</sup>およびコウモリ<sup>5)</sup>で調べられているほか、卵巣摘出後プロジェステロンを投与したマウス<sup>6,7)</sup>とラット<sup>8,9)</sup>で、前者では Day 5 から Day 17 まで(腔栓が確認された日を Day 1), 後者では Day 8 と Day 9(腔内

に精子が確認された日を Day 1) の時期に観察されている。しかしながら、これらの時期よりさらに着床を遅延させた胚盤胞の微細構造については、報告がみられない。

本実験は、Day 10から Day 30までの着床遅延マウス胚盤胞の微細構造を観察し、無処置の雌から得た Day 4 の胚盤胞と比較したものである。

**方法 :** 供試動物として ICR 系の成熟マウス (*Mus musculus*) を用いた。飼育はコイトロン (EA-8 HW) 内で行い、室温を24°Cに保ち、点灯を午前4時から午後6時までの14時間とした。これらの雌に PMSG (セロトロピン、帝国臓器) 5 IU と HCG (ゴナトロピン、帝国臓器) 5 IU を 48時間間隔で腹腔内に注射し、過排卵を誘起した。HCG 注射後直ちに同系統の雄と同居させ、翌朝、腔栓の確認されたものを実験に供し、その日を Day 1 とした。着床遅延を誘起するために、Day 3 の午後にこれらの動物の卵巢を摘出し、その日から 0.05 ml のゴマ油に溶解した 1 mg のプロジェステロン (半井化学) を毎日皮下注射した。

着床遅延胚盤胞は、Day 10, 17, 24および30において 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) で子宮を灌流して採取した。なお対照として、交配後無処置の Day 4 のマウスから、着床遅延胚盤胞の場合と同様な方法で胚盤胞を採取した。

透過型電子顕微鏡用試料を作成するために、採取した胚盤胞は 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) で洗浄後、直ちにグルタルアルデヒドを 4%, パラホルムアルデヒドを 2% 含む 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) で 4°C で 2 時間、前固定した。引き続き、0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) を数回交換しつつ、4°C で一晩洗浄した後、四酸化オスミウムを 1% 含む 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) で 4°C で 1 時間後固定した。脱水はアセトン上昇系列で行い、包埋はクエトール 812 で行った。超薄切片の作成には JUM-7 型超ミクロトームを用い、写真撮影には JEM-100 B 型電子顕微鏡を使用した。なお、電子染色はウランと鉛で行った。

観察した胚盤胞の数は各時期のものについてそれぞれ 5 個程度であった。

### 結果 : 1. 無処置胚盤胞 (Day 4) の微細構造 (図 1)

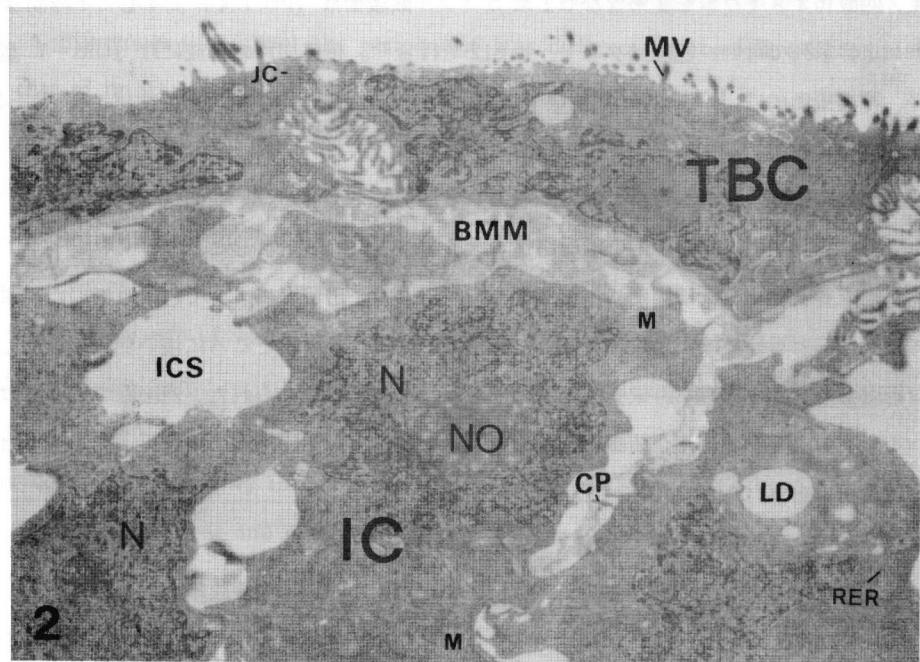
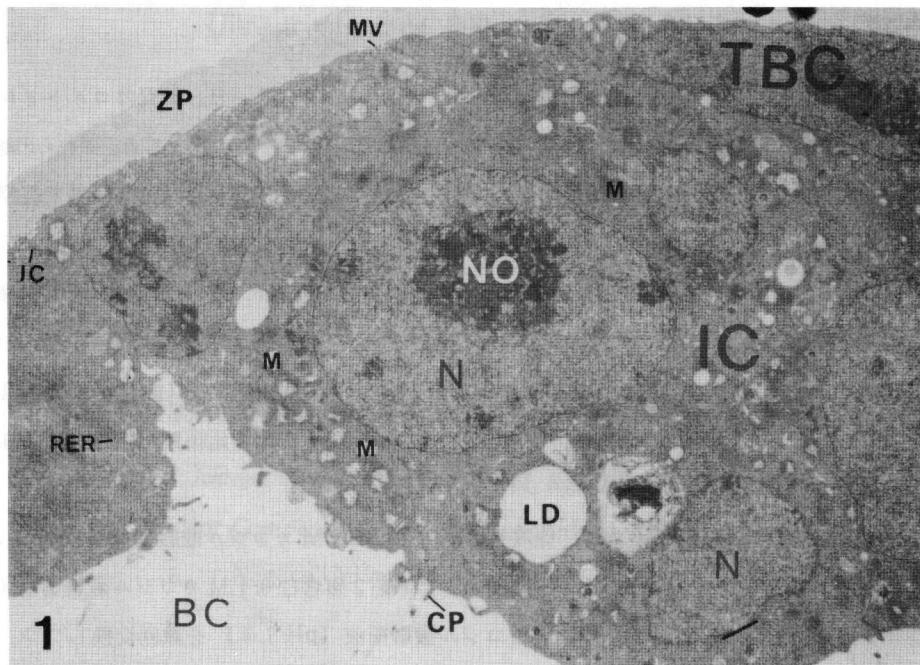
胚盤胞は扁平な栄養膜細胞とほぼ円形の内細胞からなっており、透明帯によって包まれていた。栄養膜細胞の外側表面には倒伏した短い微絨毛が生えており、微絨毛の間にはところどころに浅い陷入が存在していた。内側表面には細胞質突起がみられた。栄養膜細胞の間には接合装置が認められた。内細胞の表面には細胞質突起がみられ、これらの細胞の間に接合装置は存在しなかった。核は栄養膜細胞では扁平、内細胞ではほぼ円形

### 付 図 説 明

略号 BC 胚盤胞腔, BMM 基底膜様物質, CP 細胞質突起, TBC 栄養膜細胞, IC 内細胞, ICS 細胞間隙, JC 接合装置, LD 脂肪滴, M ミトコンドリア, MV 微絨毛, N 核, NO 核小体, RER 粗面小胞体, ZP 透明帯

図 1 無処置マウス胚盤胞 (Day 4). × 4,800.

図 2 着床遅延マウス胚盤胞 (Day 24). × 8,000.



であったが、いずれも核質の電子密度が低く、核小体を1個ないし2個含んでいた。栄養膜細胞と内細胞において、細胞質小器官と封入体の状態はよく似ていた。すなわち、ミトコンドリアは大部分のものが球状であったが、一部に桿状のものもみられた。これらのミトコンドリアのクリステは板状であったが、空胞状のものも散見された。粗面小胞体は槽状であったが断片的で細胞質に散在しており、まれに、長く伸びたものもみられた。遊離リボゾームはポリゾームを形成し、細胞質全域に多数分布していた。ゴルジ装置は未発達で、核の周辺に少数観察された。ライソゾーム様小体および脂肪滴は少なかった。線維状封入体は多かった。

## 2. 着床遅延胚盤胞の微細構造 (図2)

着床遅延胚盤胞においては、遅延時期による微細構造の相違はみられなかつたが、胚盤胞によっていろいろな像が出現した。それらのうち、どの胚盤胞にも共通してみられるものをまとめると、およそ次の通りである。いずれの胚盤胞においても透明帯は消失していた。栄養膜細胞は扁平であったが、直接胚盤胞腔に面しているものは、無処置のものに比べ著しく伸張していた。外側表面には直立した短い微絨毛が生えており、微絨毛の間には浅い陷入がみられた。内側表面は比較的平坦であった。栄養膜細胞の外側に近い隣接部位には接合装置がみられ、内側に近い部位には長い細胞質突起がみられた。無処置の胚盤胞と異なり、内細胞は不定形で細胞質突起が多く、細胞はこれらの突起によって接していた。栄養膜細胞や内細胞の間隙は拡張していた。栄養膜の内側に沿って基底膜様物質が出現し、これは内細胞の間隙にもしばしば侵入していた。核は栄養膜細胞においても、また、内細胞においても不定形で、核膜の陷入が随所に認められ、核質の電子密度は高く、核小体を1個ないし2個含んでいた。着床遅延胚盤胞においても、細胞質小器官と封入体の状態は栄養膜細胞と内細胞の間では似ていたが、無処置のものとはかなり異なっていた。すなわち、ミトコンドリアはほとんどのものが桿状で、無処置の胚盤胞にみられるような球状のものは存在しなかつた。クリステは板状であったが迂曲するものが多く、空胞状のものはみられなかつた。粗面小胞体は無処置のものと同じく槽状であったが、数は少なかつた。遊離リボゾームは細胞質全域に多数分布していたが、ポリゾームを形成しているものはわずかであった。ゴルジ装置はほとんど認められなかつた。ライソゾーム様小体と脂肪滴は主として栄養膜細胞に含まれており、胚盤胞腔に面している栄養膜細胞に散在している脂肪滴はとくに大型であった。この大型脂肪滴は無処置の胚盤胞のものと比べると多かつた。無処置の胚盤胞にみられる線維状封入体は全く認められなかつた。このほか、胚盤胞によっては無処置のものにはみられないフィラメントの束、多胞体などが出現した。

**考察 :** 従来の報告によると、Day 5から Day 17までのマウス着床遅延胚盤胞<sup>6,7)</sup>と、Day 8と Day 9のラット着床遅延胚盤胞<sup>8,9)</sup>における微細構造の特徴は、高電子密度の小体 (dense body) の出現、基底膜様物質の出現、ポリゾーム、粗面小胞体およびゴルジ装置の未発達などであるとされている。高電子密度の小体については、その類似構造物がノロジカ<sup>3,4)</sup>とラット<sup>8)</sup>でも報告されており、脂肪小滴<sup>3,4)</sup>あるいは蛋白質様物質を含む小体<sup>8)</sup>と考えられているが、その本質は明らかにされていない。本実験の Day 10から Day 30までの着床遅延胚盤胞には、このような小体は観察されなかつた。しかし、基底膜様物質、未発達なポリゾーム、粗面小胞体およびゴルジ装置は認められ、これらの点については従来の報告とほぼ一致していた。

本実験の着床遅延マウス胚盤胞においては、上記の特徴のはかに、無処置胚盤胞に比べ核の微細構造と細胞

質に分布する線維状封入体の消失の点が異なっていた。核小器官については、着床遅延マウス胚盤胞の核小体が無処置胚盤胞のものと変わらないという報告<sup>7)</sup>がある。本実験では、着床遅延胚盤胞の核質が無処置胚盤胞のものより電子密度が高かった。一般に、マウス<sup>10-13)</sup>とラット<sup>14)</sup>の着床遅延胚盤胞は、DNAとRNAの合成が低下しており、細胞分裂も停止しているといわれている。しかし、着床遅延マウス胚盤胞のRNA合成の低下を疑問視する研究者もいる<sup>7,15)</sup>。本実験の微細構造の観察からは、核酸合成の低下を示す確固たる証拠は得られなかったが、ポリゾームが未発達であることから、少なくともmRNA合成の低下は示唆される。

マウスなどのげっ歯類の卵に含まれている線維状封入体の成分は蛋白質で、卵の分割や分化のためのエネルギー源として貯えられていると考えられている<sup>16)</sup>。本実験では、線維状封入体は無処置の胚盤胞にはみられたが、着床遅延胚盤胞では消失していた。マウスの着床遅延胚盤胞では、アミノ酸の取り込みは減少し、蛋白質の合成も低下していることから<sup>7,10,17-22)</sup>、無処置胚盤胞に含まれている線維状封入体が、着床遅延中に胚盤胞が要求する蛋白源として消費されたものと推察される。

既に述べたように、本実験の着床遅延胚盤胞では、ポリゾーム、粗面小胞体およびゴルジ装置は未発達であった。このことから、着床遅延胚盤胞における蛋白質合成能および分泌機能の低下が形態学的に推察される。

## 文 献

- ENDERS, A. C.: Fine structural studies of implantation in the armadillo. In Delayed Implantation (ENDERS, A. C. 編). pp. 281-292. The Univ. of Chicago Press, Chicago and London, 1963.
- ENDERS, A. C.: The fine structure of the blastocysts. In Biology of the Blastocyst (BLANDAU, R. J. 編). pp. 71-94. The Univ. of Chicago Press, Chicago and London, 1971.
- AITKEN, R. J., BURTON, J., HAWKINS, J., KERR-WILSON, P., SHORT, R. V. and STEVEN, D. H.: Histological and ultrastructural changes in the blastocyst and reproductive tract of the roe deer, *Capreolus capreolus*, during delayed implantation. J. Reprod. Fert., **34**, 481-493, 1973.
- AITKEN, R. J.: Ultrastructure of the blastocyst and endometrium of the roe deer (*Capreolus capreolus*) during delayed implantation. J. Anat., **119**, 369-384, 1975.
- KIMURA, K. and UCHIDA, T. A.: Ultrastructural observations of delayed implantation in the Japanese long-fingered bat, *Miniopterus schreibersii fuliginosus*. J. Reprod. Fert., **69**, 187-193, 1983.
- NILSSON, O.: The morphology of blastocyst implantation. J. Reprod. Fert., **39**, 187-194, 1974.
- VAN BLERKON, J., CHAVEZ, D. J. and BELL, H.: Molecular and cellular aspects of facultative delayed implantation in the mouse. In Maternal Recognition of Pregnancy. pp. 141-172, Ciba Foundation Symposium 64 (new series), Excerpta Medica, Amsterdam, Oxford and New York, 1974.

8. WU, J. T. and MEYER, R. K.: Ultrastructural changes of rat blastocysts induced by estrogen during delayed implantation. *Anat. Rec.*, **179**, 253-272, 1973.
9. 安田泰久, 高橋寿太郎, 安部徹良.: 着床. 生殖機能の組織学 (菅原七郎, 安田泰久, 石田一夫, 正木淳二. 編). pp. 291-334, 理工学社, 東京, 1981.
10. HOLMES, P. V. and DICKSON, A. D.: Temporal and spatial aspects of estrogen-induced RNA, protein and DNA synthesis in delayed implantation mouse blastocysts. *J. Anat.*, **119**, 453-459, 1975.
11. SHERMANN, M. I. and BARLOW, P. W.: Deoxyribonucleic acid content in delayed mouse blastocysts. *J. Reprod. Fert.*, **29**, 123-126, 1972.
12. WEITLAUF, H. M.: Effect of uteri flushings on RNA synthesis by "implanting" and "delayed implanting" mouse blastocysts *in vitro*. *Biol. Reprod.*, **14**, 566-571, 1976.
13. WEITLAUF, H. M.: A comparison of the rates of accumulation of nonpolyadenylated and polyadenylated RNA in normal and delayed implanting mouse embryos. *Dev. Biol.*, **93**, 266-271, 1982.
14. SANYAL, M. K. and MEYER, R. K.: Deoxyribonucleic acid synthesis *in vitro* in normal and delayed nidation preimplantation blastocysts of adult rats. *J. Reprod. Fert.*, **29**, 439-442, 1972.
15. CHAVEZ, D. J. and VAN BLERKON, J.: Persistence of embryonic RNA synthesis during facultative delayed implantation in the mouse. *Dev. Biol.*, **70**, 39-49, 1979.
16. 佐々木博之, 新村末雄, 石田一夫.: 哺乳動物卵子の板状または線維状封入体について. 日畜会報, **50**, 88-94, 1979.
17. WEITLAUF, H. M. and GREENWALD, G. S.: Influence of estrogen and progesterone on the incorporation of  $^{35}\text{S}$ -methionine by blastocysts in ovariectomized mice. *J. Exp. Zool.*, **169**, 463-470, 1968.
18. WEITLAUF, H. M.: Changes in the protein content of blastocysts from normal and delayed implanting mice. *Anat. Rec.*, **176**, 121-124, 1973.
19. WEITLAUF, H. M.: *In vitro* uptake and incorporation of amino acids by blastocysts from intact and ovariectomized mice. *J. Exp. Zool.*, **183**, 303-308, 1973.
20. WEITLAUF, H. M.: Effect of actinomycin D on protein synthesis by delayed implanting mouse embryos *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, **189**, 197-202, 1974.
21. DABICH, D. and VAN WINKLE, L. J.: Progesterone induced diminished incorporation of exogenous  $^{14}\text{C}$ -amino acid in diapausing mouse blastocysts. *Experientia*, **36**, 253-254, 1980.
22. VAN WINKLE, L. J.: Activation of amino acid accumulation in delayed implantation mouse blastocysts. *J. Exp. Zool.*, **218**, 239-246, 1981.

マウス初期胚の  
プラスミノーゲンアクチベーター活性

Plasminogen Activator Activity  
of Early Stage Mouse Embryos

石川真木 堤治 中林正雄 木下勝之 佐藤和雄 水野正彦

Maki ISHIKAWA Osamu TSUTSUMI Masao NAKABAYASHI

Katsuyuki KINOSHITA Kazuo SATOH and Masahiko MIZUNO

東京大学医学部産科婦人科学教室

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

To study fibrinolytic activity of preimplantation embryos, microassay methods to quantify plasminogen activator in a single embryo were developed. 1. Preimplantation mouse embryos of day 2 and day 3 (4 cell to unhatched blastocyst stage) were incubated in  $2\mu l$  medium drops containing 0.1% fibrin and  $2 \text{ cu}/\text{ml}$  plasminogen for 24 hours. Day 2 and day 3 embryos gave complete liquefaction of the fibrin drops. The amount of plasmin produced by a single ovum was assayed with synthetic fluorogenic substrate, Boc-Glu-Lys-Lys-MCA, and was  $0.215 \pm 0.041$  mcu with day 3 morula and  $0.335 \pm 0.039$  mcu with day 3 blastocyst. Day 1 and day 4 to 5 embryos (uncleaved ova and hatched blasocysts, respectively), incubated in the same way, produced only partial liquefaction of the fibrin drops. 2. When applied directly on plasminogen-rich fibrin plates, day 3 ova (morulae) produced grossly recognizable fibrinolysis. No lysis was observed on application of day 3 ova on plasminogen-free fibrin plates. Five  $\mu l$  medium drops incubated with day 3 embryos were applied on both kinds of fibrin plates and gave similar results.

緒言

卵の発生と分化について多くの研究がつまれ、未分化な初期胚の段階にあっても、細胞内では代謝活動やその調節が行われていると考えられる。

たとえばマウスでは、4細胞期までは培養液に含まれるグルコースをエネルギー源として利用できない

ことが知られていたが、解糖系酵素を分析した結果、4細胞期まではhexokinase活性が低くグルコースを効率よく代謝できないことなどが解明された<sup>1)</sup>。このような初期胚の現在を物質的、定量的にとらえる試みは、卵が微小微量であるという方法論的制約より困難であったが、たいへん重要である。初期胚そのものの機能の解明はこれから課題である。

特に、着床というできごとの全経過にわたって、初期胚は母体の器官と何事かを“交信しあって”いると考えられ、環境との接点という見方から、初期胚の分泌、吸収、膜受容体、細胞運動などについての興味がそぞられる。

我々は初期胚の分泌能の一例として、培養初期胚の周囲にあらわれるプラスミノーゲンアクチベーター(PA)活性の測定法の開発を試みた。動物のPAはウロキナーゼと体組織のPAに大別され、後者は成体では、血管内皮<sup>2)</sup>、マクロファージ<sup>3)</sup>、多形核白血球<sup>4)</sup>などから分泌されることが知られている。体組織のPAは、活性化された一つの酵素が次のプロ酵素を限定分解し活性化する機構を重ねて enzyme cascade をつくるセリンプロテイナーゼ群に属するため、PA活性は単に線溶に機能するのみならず、広く炎症や組織の改変に関与するものと想定されている。また、悪性黒色腫の in vitro 培養系において、強いPA活性が培養上清にあらわれるが、この腫瘍が高度の転移能、浸潤発育能を持つのはひとつにはPA活性機能によるのかもしれない。現時点では初期胚のPA活性の具体的な位置づけは不明確であるにしても、以上のような点からみて、着床にともなう急速な組織の改変にあたって、初期胚から分泌されるPA活性が母体の器官に有效地に作用しているのではないかとの期待がもたれるのである。

#### 材料

マウス ICR系マウス、雌8~9週齢。雄10週齢以上。

培養液 Basic medium for ovum culture (BWW)<sup>6)</sup>

試薬 Fibrinogen(Fib) : 第一化学薬品 Bovine fibrinogen type 2 (Plasminogen非含有)。

Plasminogen (Plg) : 第一化学薬品 Bovine plasminogen。Thrombin (Tb) : 持田製薬 Human thrombin。

Urokinase (UK) : 持田製薬 Human urokinase。 Boc-Glu-Lys-Lys-MCA (Plasmin測定用合成基質) : ペプチド研究所、箕面。

その他 ベトリ皿: Falcon社, USA, #3001. 35×10mm. 蛍光光度計: Farand Ratio II, USA.

#### 方法

交配・採卵 自然交配によって得た妊娠雌をday1,2,3 または day4 まで飼育し、頸椎脱臼法により sacrificeした。妊娠の確認は膣栓によった(day 1)。Day1~3では卵管、day4では子宮腔をBWWでフラッシュし、卵を得た。ついで、実体顕微鏡下に正常な発育を示す卵を選択し、約 300 μlのBWWドロップで2回洗浄し、PA活性の測定に用いた。

Fibrin (Fb) 小滴内での培養 流動パラフィンをはったベトリ皿の底に、BWW小滴を8ヶずつ作製し、

それぞれの内部で day1~4 の卵 1ヶを培養した(図1)。

プラスミン測定 Boc-Glu-Lys-Lys-MCA を 0.05M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4 NaCl 0.15M) に  $3 \times 10^{-4}$  M に溶解し、1  $\mu$ lずつをそれぞれの F b 含有 BWW 小滴 (2  $\mu$ l, 液化している) に

加えて37°Cで20分間インキュベートして後、10%酢酸 1 ml と

混合して反応を停止し、放出された aminomethylcoumarin による 380nm 励起 460nm 発光の蛍光光度を測定した。<sup>7)</sup>

スタンダード F b 小滴中に現れた P A 活性を産生された P I 量に換算するために、P Igを、0.05M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4 NaCl 0.15M) に 10cu/ml に溶解し、その 1ml に UK 2000 I.U./ml 溶液を 10  $\mu$ l/ml 加え(最終濃度 20 I.U./ml)、37°C に 4 時間インキュベートした。得られたプラスミン (P I) を 2  $\mu$ l あたり 0.1~0.5 mcu の濃度に希釈し、サンプルと同じ条件で Boc-Glu-Lys-Lys-MCA の分解を行い、検量線を作成した。

線溶活性の分析 卵を含む F b 小滴と同様に各種の成分を欠く培養液の小滴を作り、卵をインキュベートした(表1)。P A 活性は、F b 小滴(凝固したもの)では小滴の液化によって判定し、Fbg 小滴 (T b を欠くもの) では P I 産生によって測定した。

F b 平板による P A 検出 P Ig含有と非含有の F b 平板を作製し、day2~3 卵(胞胚)の P A の検出に用いた。F b 平板上に直接卵をのせて 24 時間培養する

方式と、流動パラフィンの中につくった 5  $\mu$ l の培養液小滴で卵を 24 時間培養し、この培養液中の P A を F b 平板で測定する方式とを行った。F b 平板は、P Ig (2cu/ml) 含有または非含有の Fbg 溶液 (0.1%) 1ml と T b 水溶液 (100u/ml) 5  $\mu$ l を 0°C に冷却して混合し、直ちにペトリ皿に注いで 37°C のインキュベーターの内の水平面に 1 時間おいて作製した。各 F b 平板は作製から 24 時間以内に使用した。Fbg の溶解液は、卵を直接のせる場合は BWW を、卵を培養した培養液をのせる場合は 0.05M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4 NaCl 0.15M) を用いた。いずれの方式でも検体をアプライしてから 16~24 時間後に、この部位に一致して凹んだ液面がみられるかどうかを肉眼的に観察し、凹んだ液面のみられたものを F b 分解ありと判定した。

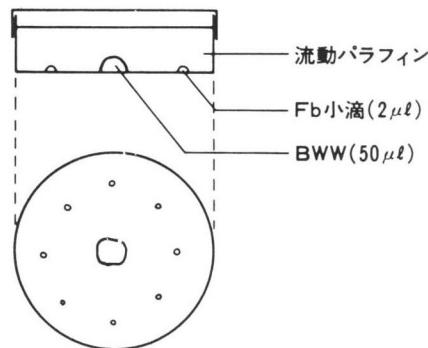


図 1 Fb 小滴内培養

欠如成分	培養液小滴中の因子				
	Fbg	Fb	P Ig	Tb	卵
Fbg			+	+	+
P Ig		+		+	+
Tb	+		+		+
卵		+	+	+	

表 1 各成分を欠く培養液

## 結果

初期胚の線溶活性の特色 Day 3 の桑実胚は P Ig 存在下で F b を分解したが、P Ig 非存在下では F b 分解能はみられなかった。F b g を含み T b を含まないメジウム小滴でインキュベートすると、F b と T b を含む場合に比べてごく低い P I 産生が認められた。表 2 に BWW 小滴内培養による day 3 桑実胚の線溶活性を示す。なお、図 2 に MCA 基質による P I アッセイの検量線を示す。また、F b 平板法のうち、P Ig 含有 F b 平板では卵培養後の培養液小滴、卵そのものどちらにも F b 分解が認められ、P Ig 非含有 F b 平板ではどちらの検体についても全く F b 分解が認められなかった。表 3 に F b 平板による day 3 桑実胚の線溶活性を示す。

発生段階と P I 産生 Day 1~4 の様々な時期に採取した初期胚の P I 産生について、図 3 に示す。

Day 1 20:00 P I 検出不能、day 2 20:00  $0.037 \pm 0.017 \text{ mcu}$  (mean  $\pm$  S.D.)、day 3 2:00  $0.215 \pm 0.041 \text{ mcu}$ 、day 3 22:00  $0.335 \pm 0.039 \text{ mcu}$  と、day 3 の終わりまでは、次第に P I 産生の増加する傾向がみられたが、透明帯を脱出した胞胚、day 4 22:00 および day 5 1:00 では P I 産生能を検出できなかった。

欠如成分	Fb 分解	P I (mcu)	検体数
—	+	$0.215 \pm 0.041$	4
Fbg	—	—	7
P Ig	—	—	3
Tb	—	$0.018 \pm 0.004$	5
卵	—	—	3

/: 判定もしくは測定不能

表 2 Day 3 桑実胚の線溶活性

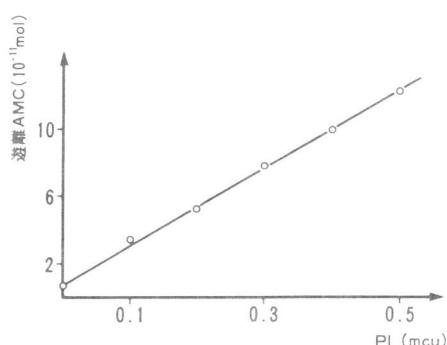


図 2 PI スタンダード

検体	Fb 平板	
	P Ig-rich	P Ig-free
卵	$\frac{3}{3}$	$\frac{0}{3}$
培養液	$\frac{4}{5}$	$\frac{0}{3}$

分子: Fb 分解のみられた検体数 分母: 検体数

表 3 Day 3 桑実胚の線溶活性

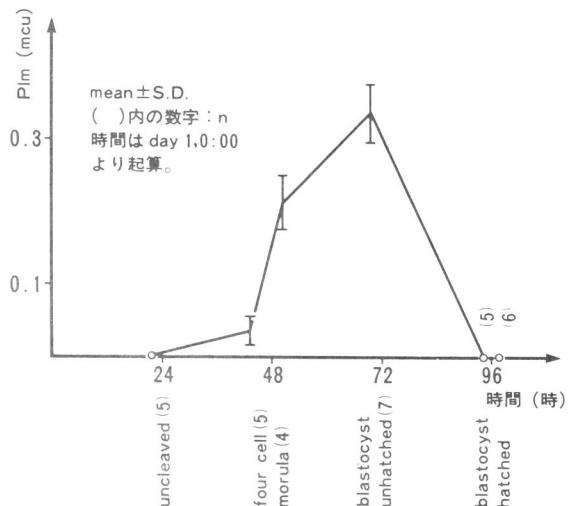


図 3 発生段階と PI 産生

## 考察

初期胚は P Ig から P I をつくり、また、P Ig 存在下でのみ F b 分解を行ったので、PA 活性を持つが直接の F b 分解能はないと考えられる。

電気ショックやカテコルアミン投与などの負荷によって、血中に線溶活性が現れる。<sup>11)</sup> また、マクロファージは 膜の活性化に呼応して PA 活性を放出する。<sup>3)</sup> In vivo でも in vitro でも、何らかの細胞膜刺激を加えて PA 活性が検出されるのがふつうであり、何の刺激もなしに PA 活性が観測されるのは珍らしいことである。（悪性黒色腫はただ培養するだけで PA 活性を放出する）<sup>5)</sup>

初期胚を P Ig 含有 F b 平板にのせた場合ばかりでなく、培養後のメジウムを P Ig 含有 F b 平板にのせても F b 分解がおこった。すなわち、全体量からみてかなりの PA 活性が胚の外へ遊離されていたと考えられる。F b 平板の溶解面積の対数と P I 量の対数の間には直線的な関係があるので、溶解面積は間接的に PA 活性と対応するが、F b 平板に直接卵をのせた系と卵を培養したメジウムをのせた系とでは培養の条件がかなり違う点などから、この二つの系を比較して卵から遊離されずにはたらく PA 活性（膜表面や細胞内で機能する因子）を検定する事はできないと思われる。

動物の PA 活性は酵素作用からみて、組織プラスミノーゲンアクチベーター (TPA) 型とウロキナーゼ (UK) 型に大別される。TPA 型の PA では、F b または F bg があるとき、活性の増強がみられ、特に F b 存在下で著しい<sup>10)</sup> (表 4)。これは TPA が P Ig に作用する効率を高めるための反応の場を F b が提供するためと考えられている。<sup>10)</sup> UK 活性には F b や F bg の存在は影響しない。初期胚の P I 產生は F b または F bg 存在下でのみ検出され、F b の系は F bg の系の 10 倍以上の P I を產生した。これらの結果は、初期胚の PA 活性は TPA 型であることを示唆する。F b 、F bg を含まないメジウムにも PA 活性は分泌されたので、これらは PA 分泌の刺激として機能したわけではないと考えられる。

さまざまな段階の初期胚を用いて P I 產生を測定し、day3 (胞胚、透明帯あり) をピークとする P I 产生がみられたが、この実験結果の解釈にあたって問題点を以下に挙げる。まず培養液について、BWW は本来、桑実胚までの卵に適合し、胞胚以後の卵には、一般にエネルギー代謝やアミノ酸要求からみてグルコースとアミノ酸を含む培養液 (例、BME) が使用される。卵の利用できる培養液の量が少ないと特に、この点は重要である。本実験では、必須アミノ酸のリジンが P I の F b 分解作用を阻害するために、リジンを含まない BWW を使用したが、胞胚期以後の代謝活性な卵にとっては、培養の条件が好適でなかったと考えられる。つぎに F b 小滴を液化させてこのなかの P I を測定するという方式についてであるが、PA 活性は F b の存在下で著しく増強されるので、F b 分解の程度により一定量 PAあたりの P I 产生効率は経時

基質 共存因子	Glu-P Ig	Lys-P Ig
—	5 0.061	19 0.2
Fbg	28 0.3	1.8 0.3
Fb	0.16 0.1	0.02 0.2

上段 : Km ( $\mu\text{M}$ )  
下段 : kcat ( $\text{s}^{-1}$ )

表 4 TPA(子宮)の Michaelis constant と catalytic rate (文献 10)

的に変化し、したがって、P 1 産生量は P A 活性の総量と必ずしも並行しないと推察される。

### 結語

本実験では、初期胚が P A 放出能をもち、その活性は day 3 で最大であることが示された。初期胚をよい培養条件で培養し、刺激を加えなくてもこれが持続的に P A を放出するのかどうかは、興味深い問題である。

### 文献

- 1) 堤 治 佐藤和雄 矢野 哲 木下勝之 水野正彦 坂元正一 加藤尚彦 マウス卵細胞の hexokinase 活性とその受精後の変化。日本不妊学会雑誌 第 3 号 399-403, 1983
- 2) Todd,A.S. The histological localization of fibrinolysin activator. J. Pathol. Bacteiol. 78:81-283, 1959.
- 3) Gordon,S. Macrophage neutral proteinases and defense of the lung. Fed. Proc. 36:2707, 1977.
- 4) Baggiolini,M. Bretz,V. Dewald,B. Feigensen,M.E. The polymorphonuclear leukocyte. Agents Actions 8 (1-2) :3-10, 1978.
- 5) Rijken,D.C. Collen,D. Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture. J. Biol. Chem. 256:7035-7041, 1981.
- 6) Spindle,A. An improved culture medium for mouse blastocysts. In Vitro. 16:669-674, 1980.
- 7) Kato,H. Adachi,N. Ohno,Y. Iwanaga,S. Takada,K. Sakakibara,S. New fluorogenic peptide substrates for plasmin. J. Biochem. 88:183-190, 1980.
- 8) Albrechtsen,O.K. The fibrinolytic activity of human tissues. Brit. J. Haemat. 3:284-291, 1957.
- 9) Astrup,T. Mullerz,S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. Arch. Biochem. Biophys. 40:346-351, 1952.
- 10) Hoylaerts,M. Rijken,D.C. Lijnen,H.R. Collen,D. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. J. Biol. Chem. 257 (6) :2912-2919, 1982.
- 11) 佐藤智 “纖維素溶解現象とは” 1963年、中外医学社。

ヒト精子頭部膨化現象  
(光学顕微鏡を用いた連続観察)

Swelling of Human Sperm Head  
(Continuous Observations under Light Microscope)

永江 肇, 土肥保之, 岩城 章, 木下 佐, 岡田詔子\*

Takeshi NAGAE, Yasuyuki DOHI, Akira IWAKI,  
Tasuku KINOSHITA, Akiko OKADA\*

東邦大学医学部第2産婦人科学教室

\* 東邦大学医学部第2解剖学教室

2nd Dep. of Obstet. & Gynec., School of Med., Toho Univ.  
2nd Dep. of Anat., School, of Med., Toho Univ.

Although there are many reports of sperm chromatin decondensation within eggs, only two reports have shown this observations with the use of the electromicroscopy. Nobody has shown the process of human sperm chromatin decondensation with the continuous observations of living ooplasm. Our previous report has shown that calmodulin antagonist W-7 can stimulate the acrosome reaction of human sperm, and that these sperm are capable of penetrating zona-free hamster eggs.

This study has shown the continuous observations of chromatin decondensation of human sperm treated with W-7 by means of zona-free hamster eggs. Although various patterns of decondensation were recognized, almost all of the sperm showed the following: 1) the brightness of the post acrosomal region was lost just before decondensation began, 2) chromatin dispersion began at the anterior one-third or mid lateral region of the post acrosome, 3) the bright area originated from this post acrosomal region and gradually increased, 4) the decondensation of the post acrosomal region was more rapid than the acrosomal region, 5) the oval shaped ring formation was shown to be a remaining chromatin mass by Nomarski Interference Microscopy, and was recognized at the apex area of the acrosome, 6) the peripheral ring formation appeared around the oval shaped ring formation which was fusing in the front and rear. This ring formation was observed for a period of approximately 2 to 5 minutes after the oval shaped ring formation disappeared.

From these observations, we suggest that the mechanism of human sperm chromatin decondensation does not resemble other mammalian sperm chromatin decondensation on the basis of such ring formation.

## 緒 言

哺乳動物精子の卵進入機序や雄性前核形成過程については多くの報告<sup>1~4)</sup>があり、最近では電顎<sup>5~9)</sup>を用いた微細変化を報告したもの<sup>5~9)</sup>が増えている。しかし電顎を用いた観察では多数の精子における一般的な変化を知ることは非常に困難なため、ある現象に関する所見についても全く相反する報告が発表されていることがある。例えば精子一卵融合の初期過程などでも equatorial segment から始まるとする報告<sup>10~11)</sup>と postacrosomal region とする報告<sup>12~13)</sup>に別れている。ヒト精子の研究では、観察に使用可能な成熟卵採取の困難性など医学的問題と体外受精に対する社会的問題が複雑に関与し、いまだ研究は緒についたばかりと考えられる。このため今日までヒト精子頭部膨化現象を生体連続観察した報告はなく、これらの問題を克服するために是非ともヒト卵に代り得るもの（卵）が望まれていた。1976年柳町<sup>14)</sup>により、ヒト卵に代り得るものとして透明帯除去ハムスター卵が紹介され、先体反応完了ヒト精子が卵に進入して雄性前核を形成することが報告された。Barros et al.<sup>15)</sup>, Talbot and Chacon<sup>16)</sup>らは、この系を用いて初期受精過程を電顎で詳細に観察したが、なお不明な点も残っている。これは、他の哺乳動物において光顎観察が充分に行われてきたのに対し、ヒト精子においては全く行なわれていないためと考えられる。

そこで今回我々は、この系におけるヒト精子頭部膨化現象を位相差顎微鏡および透過型ノマルスキーメンタル干渉顎微鏡を用いて連続観察し、興味ある知見を得たので報告する。

## 実 験 方 法

基本培養液として Krebs Ringer 液である m BWW 液<sup>17)</sup>を使用し、これに HSA (Human Serum Albumin) 30 mg/ml を添加した。培養条件は 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in air である。

健康成人男子より得られた精液は、室温で 30 分間静置し充分液化状態にしたのち、W-7・50 μM 添加 m BWW 液 2 ml の入った試験管底に静かに分注した。1 時間精液静置法<sup>18)</sup>を行ったのち、上清中の運動良好精子を集めて 300 × g, 5 分間遠沈を 2 回行い精漿成分を除いて高濃度精子浮遊液（精子濃度 1~1.5 × 10<sup>8</sup>/ml）を作製した。これを上記 m BWW 液で精子濃度が 10~15 × 10<sup>6</sup>/ml となるよう希釈し、2 時間 incubation を行い先体反応を促進させた。終了後、W-7 を除き、再度高濃度精子浮遊液を作製し、媒精に用いた。

透明帯除去卵の作製は柳町ら<sup>14)</sup>の報告に準じて行った。すなわち、ゴールデンハムスター 6~9 周齢を用いて発情周期とは無関係に、PMS 30 iu, 48 時間後 HCG 30 iu を投与し、17~19 時間後卵管中より成熟卵を回収した。次に 0.1% hyaluronidase で顆粒膜細胞を、0.1% trypsin で透明帯を除去したのち実験に使用した。

Petri dish(10×35 mm, Falcon) に m BWW 液 500 μl を加え mineral oil で被つたのち、上記高濃度精子浮遊液と卵を加え、30 分ないし 60 分間 coincubation を行った。次に卵を取り出し、m BWW 液で洗浄後、スライドグラス上に移しカバーガラスで圧迫して観察した。この時カバーガラス周囲をミネルオイルで被い、培養液の蒸発を防ぐようにした。観察には、OLYMPUS-BH2（位相差顎微

鏡および透過型ノマルスキ一微分干渉顕微鏡)を用いた。

## 結 果

卵表面付着精子の中で卵内進入可能な精子頭部は膨化直前の後帽部が黒く輝きが失なわれ(Stage Ia), 他の付着精子と明瞭に区別できるようになる。しばらくすると後帽部中央ないし前1/3にクサビ状の陷入像が出現し(Stage Ib), やがてこの左右の陷入が連続してくる(Stage Ib')。この時期では陷入像の周辺に明るい領域(Stage Ib', Stage Ic)が出現し, 我々はこの領域をhalo構造と名付け, 精子頭部の卵実質内への拡散により生じるものと考えている。その後, 先体部に比し, 後帽部の膨化はすみやかに終了し, halo構造の拡大により精子頭部全体がこの構造に取り囲まれるよう見える(Stage Id)。さらに膨化が進むと, 残存精子頭部の両側に小さな黒い点が認められ(Stage Ie), ノマルスキ一微分干渉顕微鏡(以下ノマルスキ一と略す)で観察すると小さな隆起性構造であることがわかる(Stage Ie')。

以上の変化は, ヒト精子頭部の原型が失なわれてゆく一連の過程であるので, Stage Iと分類した。

次に最後まで残存した精子頭部先端部には, 楕円輪状構造が認められるようになるが(Stage IIa), ノマルスキ一において同構造を観察すると中央部の陥凹した精子頭部の遺残構造であることがわかる(Stage IIa')。さらに時間が経つと, 楕円輪状構造は前後に接近・融合して一本となり, またこの周囲にも輪状構造が出現してくることが観察される(Stage IIb)。ノマルスキ一において同時期の構造を観察すると, 中心部の隆起性構造とその周囲に輪状構造が認められるが, その間の構造は周辺より陥凹しているように見える(Stage IIb')。その後一本化した楕円輪状構造はすみやかに消失するが, 周囲輪状構造はしばらくの間認めることができる(Stage IIc)。

以上の変化は, ヒト精子頭部の原型が失なわれた後に観察できる一連の過程であるので, Stage IIと分類した。

周囲輪状構造の消失後, しばらくの間は核小体が認められず, (Stage IIIa)受精能の評価には主として, この時期の膨化頭部が観察されている。その後, 核小体の出現をもってこの受精系の過程が完了する(Stage IIIb), 我々はこれらをStage IIIと分類した。

以上観察したヒト精子頭部の主な膨化過程を模式的に表わすと図-14の様になる。また, これら一連の過程を時間で追ってみると, 主な精子は10分前後で全過程を終了しており, 生体内においてはかなり速く膨化を完了するものと考えられる。

## 考 察

卵表面に接触した精子は, その後卵microvilliのtrappingにより取り込まれてゆくものと考えられているが,<sup>19,20)</sup>この時, 精子赤道節あるいは後帽部との間で初期膜融合が生じるものと考えられている。<sup>10~13)</sup>今回我々が観察した後帽部初期の変化, すなわち輝きが失なわれ黒くなる過程は, 卵microvilliの後帽部へのtrappingに相当するものと思われる。その後, 後帽部前1/3または中央あたりの両側方に陷入が生じ, この部位から膨化が開始された。これは, 光顕観察で認められる後帽部が

前後に分断されている訳で、前方の部位が赤道節ではないかと考えられることより、初期膨化・膜融合もこの部位において生じるものと思われる。

Talbot and Chacon<sup>16)</sup> は、同様の実験系を電顕観察し、膨化が進むにつれて先体部は後帽部より早期に消失すると報告したが、光顕連続観察した今回の実験では多数の精子後帽部がより早期に膨化を完了し、消失していた。これは、内先体膜が比較的溶解しにくい構造を持つためと考えられ、<sup>21, 22)</sup> 後帽部には赤道節以外にこの膜が存在しないためであろう。

我々が観察した変化は rat, hamster<sup>23)</sup> 精子の生体観察によるものとも比較的一致しており、一般的な過程と考えられる。

後帽部両側陷入像の認められる周辺には、明るく見える領域が急速に出現、拡大してくるが、これは後に膨化頭部になることが観察されている。それ故、この halo 構造は精子頭部膨化により卵実質に流入した chromatin を含む成分により形成されたものと考えられる。Talbot and Chacon<sup>16)</sup> は、電顕による観察で、精子頭部周辺に認められる organelle free zone を報告しているが、光顕により観察された halo 構造は、この organelle free zone<sup>24)</sup> と一致するものと考えられる。

さらに膨化が進み精子頭部原型が失なわれる直前には、頭部両側に黒い点が出現し、隆起性構造物であることが観察された。この変化は非常に短時間しか観察されず、位相差よりもノマルスキーオンにて容易に確認できるものであった。この構造については成因等不明であるが、ウサギ精子の膨化途中に chromatin の一部が lateral projection として観察されており、<sup>24)</sup> ヒト精子においても同様な構造が形成されることとは非常に興味深い。

Barros and Franklin<sup>23)</sup> は、ハムスター精子において今回の観察と同様な橈円輪状構造を認め、内先体膜（先体下基質を含む）と卵形質膜によって形成されていると考えているが、ノマルスキーオンによる観察で、これは精子頭部の遺残物であることが判明したことより、この構造に卵形質膜の関与する可能性は少ないものと考えている。その後出現する周囲輪状構造については、現在までのところヒト以外の精子についても類似報告はなく、全く解明されていない。このため、今後はこれらの変化を参考に電顕レベルでの解明が必要であると考えている。

今回観察したヒト精子は、Calmodulin 阻害剤 W-7 を用いて先体反応を促進させたが、既に正常な形態変化で先体反応が生じること<sup>25)</sup> や、この実験系においては媒精後 30 分で 45% 前後、60 分で約 90% の受精率を得ることが知られている。<sup>26)</sup> また卵受精能に関して透明帯除去後 90 分ですでに有意な低下が認められる<sup>27)</sup> ことから、今回媒精後 30 分または 60 分で観察したのは媒精一観察の時間としては適当なものと考えられる。また、今回供覧したヒト精子頭部膨化過程は、この系における全ての精子が同様な変化をした訳ではなく、異なる変化を行ったものもあった。しかし、大半の精子は今回我々が観察した過程に属するものであったことから、この系における最も一般的な変化であると考えられる。

本論文要旨は、第 28 回日本不妊学会総会に於いて発表した。また、研究に協力していただいた生化

学工業株式会社滝川英之氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Louise, D., Blandau, R.J.: Observations on fertilization and the first segmentation division in rat ova, Am. J. Anat., 89: 29, 1951.
- 2) Austin, C.R., Bishop, M.W.H.: Role of the rodent acrosome and perforatorium in fertilization, Proc. Roy. Soc. B, 149: 241, 1958.
- 3) Chang, M.C., Hunt, D.M.: Morphological changes of sperm head in the ooplasm of mouse, rat, hamster and rabbit, Anat. Record., 142: 417, 1962.
- 4) Witkowska, A.: Pronuclear development and the first cleavage division in polyspermic mouse egg, J. Rep. Fertil., 62: 493, 1981.
- 5) Yanagimachi, R., Noda, Y.D.: Physiological changes in the postnuclear cap region of mammalian spermatozoa; A necessary preliminary to the membrane fusion between sperm and egg cells, J. Ultrastruct. Res., 31: 486, 1970.
- 6) Soupart, P., Strong, P.A.: Ultrastructural observations on polyspermic penetration of zona pellucida free human oocytes inseminated in vitro, Fertil. Steril., 26: 523, 1975.
- 7) Usui N., Yanagimachi, R.: Behavior of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization and early development, J. Ultrastruct. Res., 57: 276, 1976.
- 8) Barros, C., Herrera, E.: Ultrastructural observations of the incorporation of quinea-pig spermatozod into zona free hamster oocytes, J. Reprod. Fertil., 49: 47, 1977.
- 9) Imai, H., Niwa, K., Iritani, A.: Ultrastructural observations of boar spermatozoa penetrating zona-free hamster eggs, Biol. Reprod., 23: 481, 1980.
- 10) Noda, Y.D., Yanagimachi, R.: Electron microscopic observations of quinea pig spermatozoa penetrating eggs in vitro, Dev. Growth Differ., 18: 15, 1976.
- 11) Bedford, J.M., Moore, H.D.M., Franklin, L.E.: Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoon in eutherian mammals, Exp. Cell Res., 119: 119, 1979.

- 12) Bedford, J.M.: An electron microscopic study of sperm penetration into the rabbit egg after natural mating, Am. J. Anat., 133: 213, 1972.
- 13) Yanagimachi, R.: Mechanisms of fertilization in mammals; Fertilization and Embryonic Development in vitro (L. Mastroianni, J.D. Biggers Eds) P.81, Plenum, New York.
- 14) Yanagimachi, R., Yanagimachi, H., Roger, B.J.: The use of zona-free ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa, Biol. Reprod., 15: 471, 1976.
- 15) Barros, C., Gonzalez, J., Herrera, E., Bustos-Obregon, E; Human sperm penetration into zona-free hamster oocytes as a test to evaluate the sperm fertilizing ability, Androl., 11: 197, 1979.
- 16) Talbot, ., Chacon, R., S.: Ultrastructural observations on binding and membrane fusion between human sperm and zona pellucida-free hamster oocytes, Fertil., Steril., 37: 240, 1982.
- 17) Biggers, J.D., Whitten, W.K., Whittingham, D.G.: The culture of mouse embryos in vitro, Methods in Mammalian Embriology (Daniel, J.C., Eds). Freeman, San Francisco , 1971.
- 18) 星 和彦, 長池文康, 桃野耕太郎, 対木 章, 斎藤 晃, 鈴木雅洲, 林 恵子, 柳町隆造: われわれの行っている精液静置法 "Layering Method" による精液中からの良好精子の分離, 日不妊会誌, 28 : 101, 1983.
- 19) Yanagimachi , R., Noda, Y.D.: Scanning electron microscopy of golden hamster spermatozoa before and during fertilization, Experimentia, 28: 69, 1972.
- 20) Shalgi, R., Phillips, O.: Mechanics of sperm entry in cycling hamsters, J. Ultrastruct. Res., 71: 154, 1980.
- 21) Srivastava, P.N., Munnell, J.F., Yang, C. H., Foley, C.W.: Sequential release of acrosomal membranes and acrosomal enzymes of ram spermatozoa, J. Reprod. Fertil., 36; 363, 1974.
- 22) Wooding, F.B.P.: Studies on the mechanism of the hyamine-induced acrosome reaction in ejaculated bovine/spermatozoa, J. Reprod. Fertil., 44: 185, 1975.

- 23) Bauros, C., Franklin, L.E: Behavior of the gamete membranes during sperm entry into the mammalian egg, *J. Cell Biol.*, 37: C13, 1968.
- 24) Szollosi, D., Hunter, R.H.F.: Ultrastructural aspects of fertilization in the domestic pig; sperm penetration and pronucleus formation, *J. Anat.*, 116:181, 1973.
- 25) 永江 肇, 岩城 章, 木下 佐, 村上邦夫, 黒田 優: カルモデュリン阻害剤W-7処理ヒト精子先体反応の微細構造, 哺乳卵研誌, 1: 81, 1984.
- 26) 永江 肇, 川村 良, 館花明佳, 岩城 章, 木下 佐, 岡田詔子, 加藤守男: ヒト精子の先体反応, 受精におよぼす Calmodulin 阻害剤の影響, 受精, 着床 '83, p46, 1983.
- 27) Berger, T., Marrs, R.P., Saito, H., Kletzky O.A., : Factors affecting human sperm penetration of zona-free hamster OVA, *Am. J. Obstet. Gynec.*, 145: 397, 1983.

### 付 図

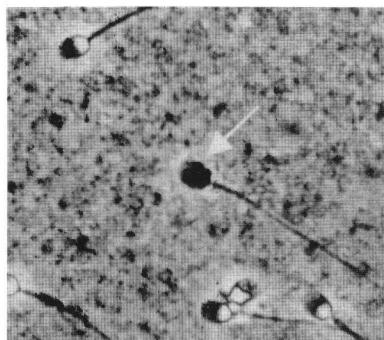


Fig 1(Stage Ia): 写真中央の黒い精子（矢印）が膨化直前の精子である。他の卵表面付着精子後帽部が白色なのに對し、膨化直前の精子では後帽部は黒くなる（位相差顕微鏡による。以下特記してなければ位相差による写真）。

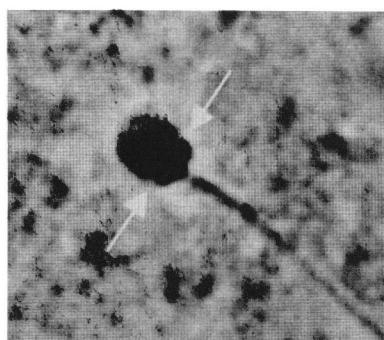


Fig. 2, (Stage Ib): 次いで後帽部中央乃至前 $\frac{1}{3}$ の側方に陥凹が生ずる（矢印）。

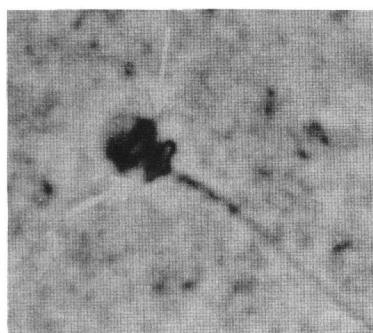


Fig. 3.(Stage Ib'): 陥凹は中央で連続して後帽部を2分するようになる(太矢印)。この頃には同部位の周辺に明い領域(halo構造)が認められる(細矢印)。

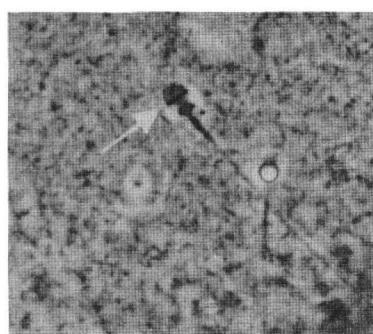


Fig. 4.(Stage IC): halo構造が後帽部周囲全体に認められるようになる(矢印)。先体部に比べて後帽部では膨化がより速く進んでいる。

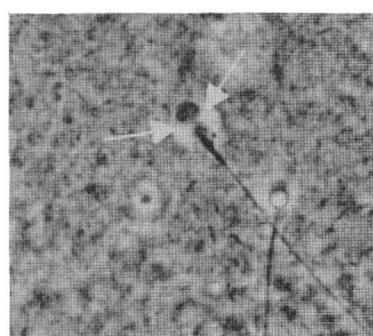


Fig. 5(Stage Id): halo構造はさらに先体領域にも拡大し、精子頭部全体を被うようになる(矢印)。

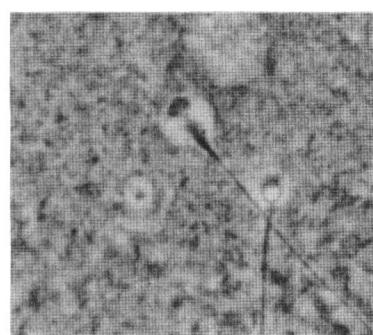


Fig. 6(Stage Ie): 先体部先端は三ヶ月状に形を変え、その両端には黒い点が認められる。

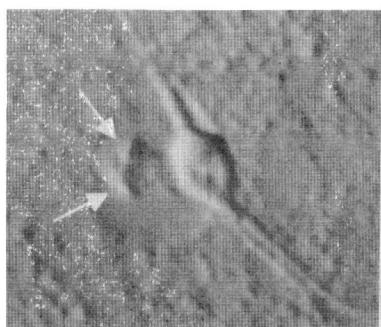


Fig. 7 (Stage Ie'): halo 構造の中央に精子先体部がある。この両側には隆起構造（矢印）が認められ、前図での黒い点に対応するものである。（ノマルスキーによる）

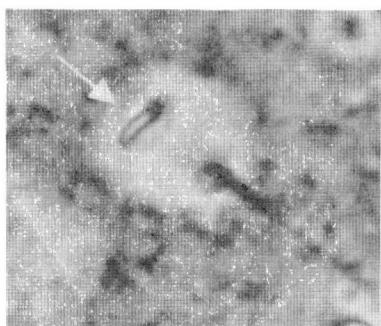


Fig. 8 (Stage IIa): 精子先体部先端が消失した直後、その該当部位に橢円輪状構造（矢印）が認められるようになる。

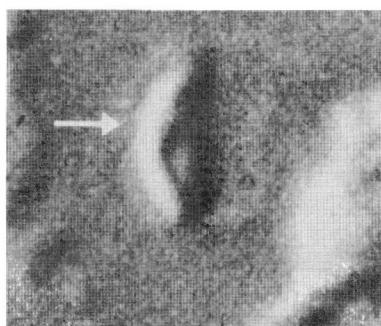


Fig. 9 (Stage II'a): 左上方に三ヶ月状の構造（矢印）が認められる。この中央に陥凹した部位があり、橢円輪状構造内部に対応するものである（ノマルスキー）



Fig. 10 (Stage IIb): 橢円輪状構造は前後に融合し、一本の線状に見えてくる（細矢印），その周囲には新しい輪状構造（太矢印）が認められる。

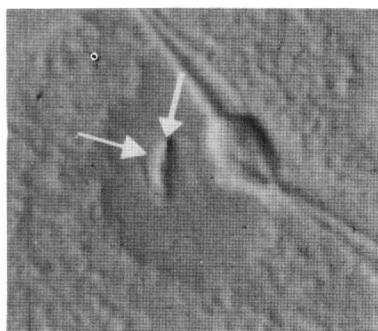


Fig. 11(Stage IIb'): 膨化した頭部の中に隆起状構造(太矢印)が認められ、これは位相差での橢円輪状構造の線状化の図と対応している。さらに、その周囲にも輪状構造(細矢印)が認められている(ノマルスキー)。

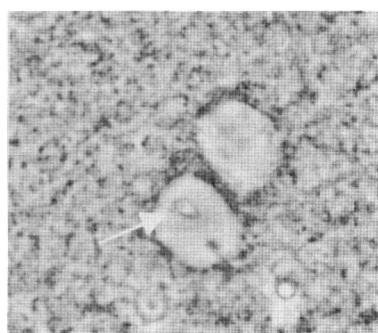


Fig. 12(Stage IIc, IIIa): 橢円輪状構造はすでに消失し、周囲輪状構造(矢印)のみが残っている。なお上方には Stage IIIa の精子頭部が認められる。

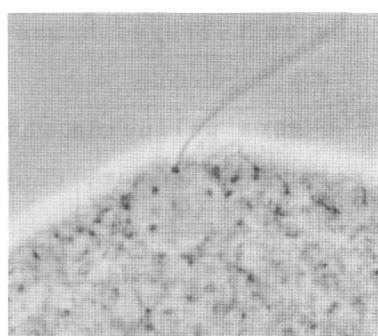


Fig. 13(Stage IIIb): 尾部を伴った膨化頭部内に核小体が認められる。この後、尾部の離断、核小体の成長が生ずる。

Illustrations of the process  
in human sperm chromatin decandensation.

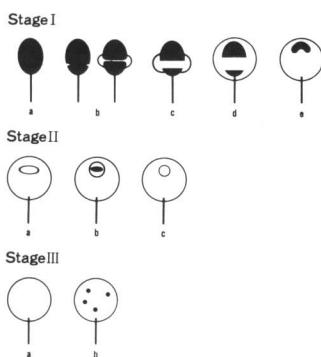


Fig. 14: 模式図

注: Stage I a→Stage Ib, Stage Ic→Stage IIc までは同一精子の連続観察より得られたもの。またノマルスキーによる変化も同一精子による。

## ヒト精子の透明帯認識・接着に与える糖の影響

Effects of sugars on the attachment of  
human spermatozoa with the zona pellucida.

星 和彦・斎藤 晃・桃野耕太郎・京野広一・対木 章

Kazuhiko HOSHI, Akira SAITO, Kotaro MOMONO,  
Koichi KYONO and Akira TSUIKI

東北大学医学部産科学婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Tohoku University  
School of Medicine.

Experiments were designed to test the effects of simple sugars and complex polysaccharides on the attachment of human spermatozoa with the zona pellucida. For this in vitro system the salt-stored human eggs (Yanagimachi et al. 1979) were used.

The attachment of capacitated spermatozoa to the zona pellucida was inhibited by fucoidin. Fucoidin was a very potent inhibitor, completely blocking attachment at a concentration of 0.1 mg/ml.

When the spermatozoa were treated with 1 mg/ml fucoidin and were mixed with ova in fucoidin-free medium, they barely attached to the zona. However, pretreatment of the zonae identically, prior to mixing with untreated spermatozoa, did not inhibit attachment. These results suggest that fucoidin probably reacted with spermatozoa, not with zonae.

### 緒 言

受精現象についての研究は近年急速な進歩をみているが、そのメカニズムの細部については未だ不明な点が数多く残されている。

精子が同種の卵をどのようにして認識し接着するかは、受精の種特異性を考える上で極めて大きな課題であ

るが、その詳細は十分解明されているとはいえない。現在のところ、哺乳類では精子の原形質膜の表面構造と透明帯の表面構成成分の相互作用によるものと推定されている。

卵膜層の構成成分は糖蛋白である。精子に対する種特異的結合部位が糖部分なのか、蛋白部分なのかは明らかではないが、植物性凝集素を用いた実験などから哺乳類では糖部分であろうとの説が有力である。

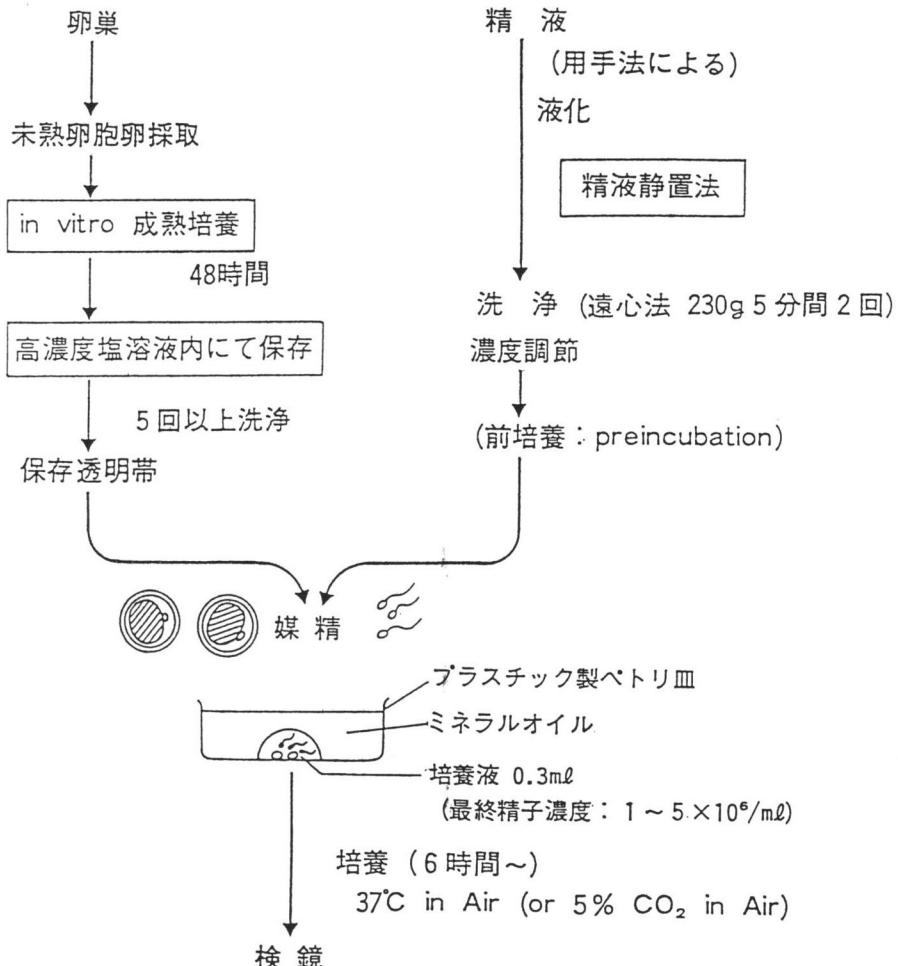
もし精子一卵結合が特別は糖同志あるいは糖と蛋白の関係の結果とすれば、構造的に関連のある物質の過剰状態で精子一卵結合が阻害されるはずである。そこでわれわれは、*in vitro*においてヒト精子の透明帯への接着状態を観察し、接着に与える各種糖の影響を検討した。

### 方法・材料

#### ① 実験方法の概略

高濃度塩溶液内にて保存されたヒト卵透明帯をよく洗浄した後、ヒト精子を加え、培養液内における精子の透明帯への接着を調べた。図1はその概略である。

図1. 透明帯への精子接着テスト法



## ② 培養液

研究に用いた基本となる培養液は modified Biggers, Whitten and Whittingham<sup>1)</sup>液 (mBWW液) である。その組成については表1に示した。

## ③ ヒト卵透明帯の作製・保存法

概略は図2に示した。

手術で得られたヒト卵巣を Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) 中で細切し、実体顕微鏡下に未熟ヒト卵を採取する。3~5回PBSで洗浄後、成熟用培養液(表2)に入れ37°C・5% CO<sub>2</sub>大気中で48時間培養して成熟させる。48時間後に卵をとり出し高濃度塩溶液 (0.5M [NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>+1M MgCl<sub>2</sub>+0.1% Dextran) 中に入れ、実験に供するまで4°Cで保存した。実験に際してはmBWW液で5回以上洗浄して用いた。

高濃度塩溶液に入れられることにより、卵実質はもちろん死滅するが、その透明帯は精子接着・通過性に対する性質を変えることなく保存可能なことが報告されている<sup>2)</sup>。

表1. 研究に用いた基本培養液の組成  
modified Biggers, Whitten and  
Whittingham 液

	g/l	mM
NaCl	4.910	84.00
KCl	0.356	4.78
CaCl <sub>2</sub>	0.189	1.71
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.162	1.19
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.294	1.19
NaHCO <sub>3</sub>	3.000	35.71
Na-pyruvate	0.028	0.25
Na-lactate	2.416	2.158 <sup>a</sup>
Glucose	1.000	5.56
Human serum albumin <sup>b</sup>	35.000	....
Antibiotics stock soln. <sup>c</sup>	1.0ml	....
mOsmol	308	

<sup>a</sup> DL-lactic acid, Na-salt (Sigma Chem., St. Louis, MO); 60% syrup, 3.68ml.

<sup>b</sup> Purified human serum albumin, Norite-treated, (Sigma Chem., St. Louis, MO)

<sup>c</sup> 100,000 IU/ml K-Penicillin G and 50 mg/ml streptomycin sulfate in distilled water, stored frozen until use.

表2. 成熟培養用培養液の組成

成 分	量
TC Medium 199 <sup>a</sup>	·80ml
Fetal calf serum <sup>b</sup>	20ml
Lactate/Pyruvate stock soln. <sup>c</sup>	5ml
Antibiotics stock soln. <sup>d</sup>	0.1ml
NaHCO <sub>3</sub>	160ml
Distilled water	20ml

This mixture has PH 7.3 under 5% CO<sub>2</sub> in air and an osmolality of about 290 mOsmol.

<sup>a</sup> Hank's solution; base; Difco Lab., Detroit. MI.

<sup>b</sup> Heat-inactivated; Grand Island Biol. Co., Grand Island, NY.

<sup>c</sup> 200mM Na-lactate and 20mM Na-pyruvate in distilled water, stored frozen until use.

<sup>d</sup> 100,000 IU K-Penicillin G and 50 mg/ml streptomycin sulfate in distilled water, stored frozen until use.

図 2 ヒト卵透明帯の作製・保存法

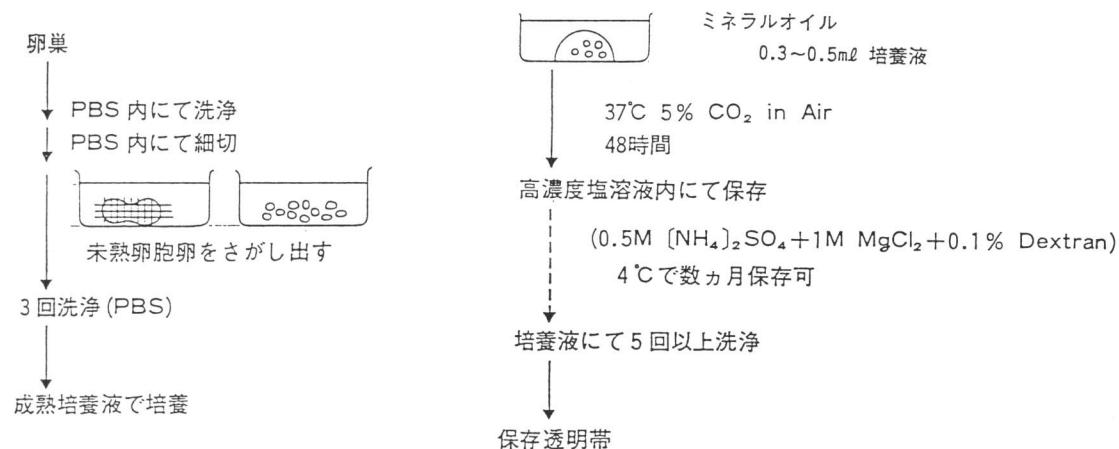
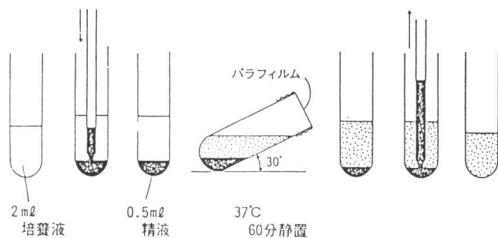


図 3 精液静置法



#### ④ 精子の準備

精子を回収するために用いた方法、精液静置法<sup>3)</sup>については図 3 にその概略を示した。

精液は健康成人男子より用手法にて得られた。20分間室温に置くことにより十分液化させた精液を 0.5 ml づつ、培養液が 2.0 ml 入れられた小試験管底に静かに分注する。精液一培養液境界面が大きくなるように試験管を 30° 傾け、試験管口をパラフィルムでシールして 37°C に 1 時間静置する。

この間に、運動良好精子は精液中から培養液中に浮遊してくる。管底に残った精漿を捨て、残った培養液を集めて 230 × g 5 分間遠心し、上清を捨て、培養液を加えて再度遠心洗浄し高濃度精子浮遊液にする。

#### ⑤ in vitro における透明帯への精子接着実験法ならびに判定

培養液（3.5% ヒト血清アルブミンを含む）0.3 ml を 3.5 × 1.0 cm の Petri dish 内に入れ、その上をミネラルオイルでおおう。培養液にはあらかじめ検討すべき物質が溶解されている。

培養液内に保存ヒト卵透明帯と精子を入れ、37°C 大気中で 6 時間培養する。最終精子濃度は 1 ~ 5 × 10<sup>6</sup> /ml になるよう調節する。

透明帯接着の判定は、位相差顕微鏡下に観察して行う。全く精子が透明帯に接着していない場合を(-)、わずかに接着する精子がみられる場合を(±)、透明帯の輸廓がわかるように密に接着しているときを(+)、透明帯が識別できない程沢山接着している場合を(++)と表現した。

## 成 績

## ① 单糖類の透明帯接着に与える影響

培養液に、精子の運動性を阻害しない程度の過剰の各種单糖類を入れ、ヒト精子の透明帯接着に及ぼす影響を観察した。14種類の单糖類について検討した成績を表3に示したが、全てControlと差がなく影響は認められなかった。

## ② 多糖類の透明帯接着に与える影響

同様に3種類の多糖類を個々に加えて検討した。用いたのは Fucoidin, Heparin, Chondroitin sulfate A で、全て硫酸基を有するポリマーである(図4)。実験の成績は表4に示したが、ヒト精子は Fucoidin の存在下で著しく透明帯接着が抑制され、その効果は Fucoidin 低濃度でも認められた。

表3 精子—透明帯接着に対する单糖類の影響

单 糖 類	濃 度 (mM)	精子 - 透明帯 接着状態
D-Fructose	100	++
D-Galactose	50	++
	100	++
D-Mannose	100	++
D-Fucose	100	++
D-Glucosamine*	10	++
D-Galactosamine*	10	++
N-Acetylneurameric acid*	10	++
	1	++
L-Fucose	100	++
	50	++
	10	++
Arabinose	100	++
D-Glucuronic acid*	10	++
D-Galacturonic acid*	10	++
N-Acetyl-D-glucosamine*	10	++
N-Acetyl-D-galactosamine*	10	++
N-Acetyl-D-mannosamine*	10	++
Control (None)		++

\* 高濃度では精子運動性が低下する。

図4 多 糖 類 の 構 造

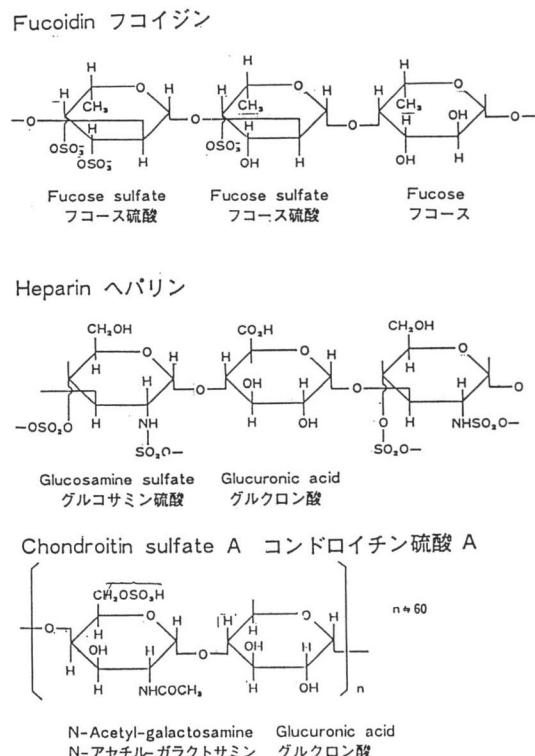


表4 精子-透明帯接着に対する多糖類の影響  
多 糖 類 濃 度 精子-透明帯  
( $mg/ml$ ) 接着状態

Fucoidin	1.5	-
	0.1	-
Heparin	2.0	+
Chondroitin sulfate A	2.0	+
Control (None)		+

表5 Fucoidin処理精子およびFucoidin処理透明帯の精子-透明帯接着

精 子	透 明 帯	精子-透明帯 接 着 状 態
Fucoidin 処理 ( $1mg/ml$ 1時間)	無 処 理	土
無 処 理	Fucoidin 処理 ( $1mg/ml$ 1時間)	+
無 処 理	無 処 理	+

③ Fucoidin による精子あるいは卵透明帯の前処理が、精子の透明帯接着に与える影響

ヒト精子もしくはヒト卵透明帯を Fucoidin が  $1mg/ml$  含まれる培養液内であらかじめ 1 時間前処理し、培養液で 1 回洗浄した後に培養液中に加えて精子の透明帯への接着性を調べた。精子の洗浄は遠心法 ( $230 \times g$  5 分間) によった。

その成績は表 5 に示したが、この場合は精子を前処理したときに抑制がみられた。

### 考 察

受精の種特異性は、精子-卵両配偶子の表面構造によって規定されることが最近の研究で次第に明らかになりつつある。

哺乳類の透明帯は糖蛋白から構成されており、精子の細胞膜表面には糖蛋白の分子が露出している。lectin を用いた実験によると透明帯表面には N-acetyl-D-glucosamine・N-acetyl-D-galactosamine・D-galactose・L-fucose などの糖残基が豊富に分布しており<sup>4)</sup>、精子の膜表面にも同様の糖残基が密に存在する<sup>5)</sup>。そしてこれらの糖鎖あるいは糖蛋白が精子-卵接着の相互作用の役割を担っている。精子が認識して接着する透明帯の精子結合部位は、その構造がおそらく動物種によって異なりこれが受精の種特異性を決定しているのであろう。

これら配偶子認識に関与する膜構造はいくつかの動物種では同定されている。モルモットでは精子表面の lectin 様物質が卵表面の糖分子の一群に結合することが確かめられ、特に fucose に選択的に結合する lectin 様物質らしいことが示唆されている<sup>6)</sup>。マウスでは、卵をあらかじめ糖で前処理するとその後の受精が阻害され、それに対応する glycosidase で精子を処理しても同様に受精がおこらなくなることから、配偶子認識に関与するのは透明帯の lectin 様物質と精子原形質膜の ligand 様物質らしい<sup>7) 8)</sup>。Mus musculus (研究用マウス) は卵の sialic acid (neuraminic acid) 処理や精子の neuraminidase 処理で、精子-卵接着が抑制される。Mus caroli (野生のマウス) は卵の  $\alpha$ -methyl mannose 処理や精子の mannosidase 処理で配偶子接着が抑制される<sup>9)</sup>。ブタでも免疫学的検討からマウス同様精子の ligand 様物質が関与するとの報告がある<sup>10)</sup>。ハムスターに関して、Oikawa ら<sup>4) 11)</sup> は未受精卵を麦芽凝集素 (wheat germ agglutinin, WGA) で処理すると受精が大きく抑制され、他の lectin では影響がみられないことから、

WG Aが透明帯と特異的に結合し、精子の結合および貫通を阻止すると考え、透明帯の精子結合部位は糖ペプチドの部分で N-acetyl-D-glucosamine 様残基であろうと推定した。しかし最近、Ahuja<sup>12)</sup> は糖や糖蛋白を用いての精子-卵接着抑制実験や精子の glycosidase 処理による受精阻害実験を試み、ハムスターの配偶子接着は fucose・galactose・N-acetyl-glucosamine そして N-acetylgalactosamine 残基を有する精子表面の ligand 様物質によって行われていることを示した。このように未だ十分とは言えないが、実験動物においては配偶子間の認識作用部位が次第に明らかになりつつある。ヒトでは、材料とくに卵入手の困難性からか、この方面に関する研究報告はほとんどみられない。

われわれは、in vitro でのヒトの精子-卵接着の実験に Yanagimachi らが 1979 年に報告した<sup>2)</sup> 塩溶液内保存ヒト透明帯を用いて検討してみた。硫安溶液内に冷却保存されたこの透明帯は、精子の接着・通過性などに対する性質が変化しないことが報告されている。in vitro で、種々の糖を加えた培養液内に精子と透明帯を入れると fucoidin の存在下で精子の透明帯への接着が著明に抑制された。今回の実験で用いた他の単糖類や多糖類では全く接着抑制はみられていない。fucoidin は fucose と fucose 硫酸からなるポリマーであるが、この配偶子接着抑制が硫酸基によるものでないことは硫酸基と同じように持つ heparin や chondroitin sulfate A では影響がみられないことからも明らかであり、fucoidin による特異的な現象である。精子や透明帯を fucoidin で前処理したときは、精子の前処理の場合にのみ接着が抑制され、精子が選択的に fucoidin に結合して透明帯への結合が抑制されたものと考えられる。この実験結果より、ヒト透明帯の精子結合部位は fucoidin 類似物質で fucose が重要な役割を演じていると思われるが、fucose はハムスターやモルモットでも結合部位の一部である可能性が高く、哺乳類透明帯の精子結合部位の共通構成部分かも知れない。しかし、他の哺乳動物では配偶子接着を抑制する galactose, acetylated amino sugars, sialic acid, mannose などでは配偶子の接着は影響されず、種特異性の存在が示唆される。今後さらに多数の糖類、糖化合物による研究で配偶子結合部位の詳細な構造解析を行いたいと考えている。

### 文 献

1. BIGGERS, J. D., WHITTEN, W. K. and WHITTINGHAM, D. G.: The culture of mouse embryos in vitro. In Methods in Mammalian Embryology, pp.86 Ed. J. C. Daniel, Jr. W. H. Freeman and Co., San Francisco, 1971
2. YANAGIMACHI, R., LOPATA, A., ODOM, C. B., MAHI, C. A. and NICOLSON, G. L.: Penetration of biologic characteristics of zona pellucida in highly concentrated salt solution: The use of salt-stored eggs for assessing the fertilizing capacity of spermatozoa. Fertil. Steril. 35: 562, 1979
3. 星 和彦・長池文康・桃野耕太郎・京野広一・対木 章・斎藤 晃・鈴木雅洲・林 恵子・柳町隆造:

われわれの行っている精液静置法“layering method”による精液中からの良好精子の分離。日不妊会誌 28: 101, 1983.

4. OIKAWA, T., NICOLSON, G. L. and YANAGIMACHI, R.: Inhibition of hamster fertilization by phytoagglutinins. *Exp. Cell. Res.*, 83: 239, 1974
5. NICOLSON, G. L. and YANAGIMACHI, R.: Terminal saccharides on sperm plasma membranes; Identification by specific agglutinins, *Science*, 177: 276, 1972
6. HUANG, T. T. F., OHZU, E. and YANAGIMACHI, R.: Evidence suggesting that L-Fucose is part of a recognition signal for sperm-zona pellucida attachment in mammals. *Gamete. Res.*, 5: 355, 1982
7. CHAPMAN, V. C., LAMBERT, H. and LE, A. V.: Analysis of the sperm-zona binding complex in the mouse., *Anat. Rec.*, 202: 29, Abstr 1982
8. LAMBERT, H. and CHAPMAN, V. M.: Analysis of binding and fertilization differences in two species of mouse., *Biol. Reprod.* 26, 85 : Abstr 1982
9. LAMBERT, H.: Role of sperm-surface glycoproteins in gamete recognition in two mouse species., *J. Reprod. Fert.* 70: 281, 1984
10. PETERSON, R. N., RUSSELL, L., BUNDMAN, D. and FREUND, M.: Sperm-egg interaction: direct evidence for boar plasma membrane receptors for porcine zona pellucida. *Science*, N. Y. 207: 73, 1980
11. OIKAWA, T., YANAGIMACHI, R. and NICOLSON, G. L.: Wheat germ agglutinin blocks mammalian fertilization. *Nature* 241: 256, 1973
12. AHUJA, K. K.: Fertilization studies in the hamster: The role of cell-surface carbohydrates., *Exp. Cell. Res.* 146: 353, 1982

## 受精に伴うマウス透明帯の変化

：走査電子顕微鏡による観察

Fertilization-Associated Changes in the Murine

Zona pellucida : A Scanning Electron Microscopic Study

井上正人・小林善宗・金子みつ恵・藤井明和

Masato INOUE, Yoshimune KOBAYASHI,  
Mitsue KANEKO and Akikazu FUJII

東海大学医学部産婦人科学教室

Department Obstetrics and Gynecology, School of Medicine,  
Tokai University

The surface of the zona pellucida from unfertilized and fertilized mouse ova was examined with the scanning electron microscope (SEM). The zona of a mature unfertilized ovum showed a sponge-like appearance with numerous fenes-trations. Up to 5 hours after fertilization no change was observed in this structure, except for sperm penetration hole which remained almost unchanged even after cleavage. The zona of 2-cell embryo was considerably smoother and a porous appearance was much less obvious. SEM-detectable surface change in the mouse zona pellucida may be due to the precipitates of tubal secretions.

緒言：哺乳類の成熟卵子は弱酸性の糖蛋白質から成る、比較的厚い膜、透明帯におおわれている。透明帯は受精により変化し、多精子受精から卵子を守るという重要な働きをしている。<sup>1</sup>しかし透明帯における多精子拒否、すなわち透明帯反応のメカニズムについてはまだよく分っていない。受精前後で透明帯の性質が変化することはこれまでいくつか報告されている。<sup>2~7</sup>また透過型電子顕微鏡による観察では未受精卵は2層から、受精卵は4層からなり、受精後に新たに形成される2層のうち最内層は表層顆粒由来のもので、最外層は卵管分泌物の沈着によるものと考えられている。<sup>8</sup>一方

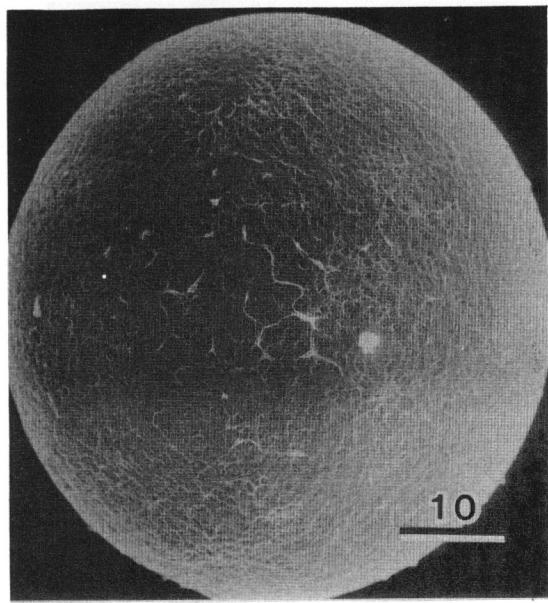


図 1 未受精卵

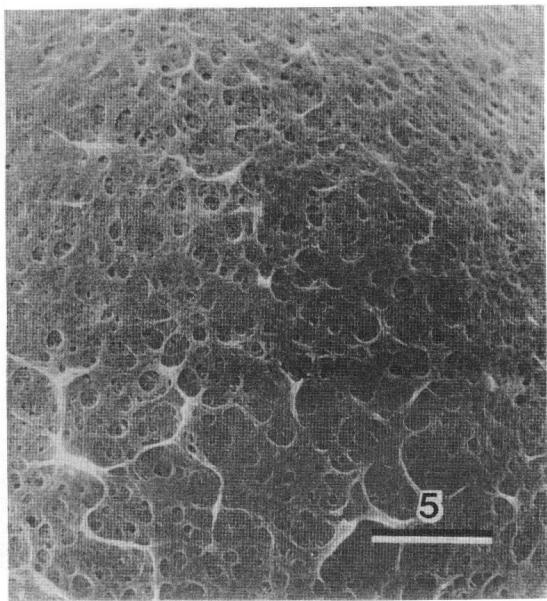


図 2 未受精卵, 図 1 の拡大

受精に伴う透明帯表面の形態学的变化については意見が分かれている。

Jackowski and Dumont (1979)<sup>9</sup> はマウス透明帯の表面は受精により明らかに変化すると報告した。これに対して Phillips and Shalgi (1980)<sup>10</sup> は透明帯の表面は受精前後では全く変わらないとしている。われわれはマウス透明帯について一連の実験を行い、溶解性は受精直後より変化し、精子結合性は受精後しばらくしてから変化することを明らかにしてきた。<sup>6, 7</sup>

本研究では、マウス卵子を走査型電子顕微鏡 (SEM) にて観察し、溶解性および精子結合性の変化に対応する形態学的变化が透明帯表面に起るか否かを検討した。

#### 実験材料および方法

DDY 系成熟マウス (6 ~ 10 週齢) に 7.5 iu の PMS および HCG を約 48 時間間隔で腹腔内に投与し、未受精卵は HCG 注射後 16 ~ 17 時間で卵管膨大部より採取した。受精卵は交配した雌を HCG 投与後 17 時間 (受精後約 5 時間)、22 時間 (受精後約 10 時間) および 40 時間で屠

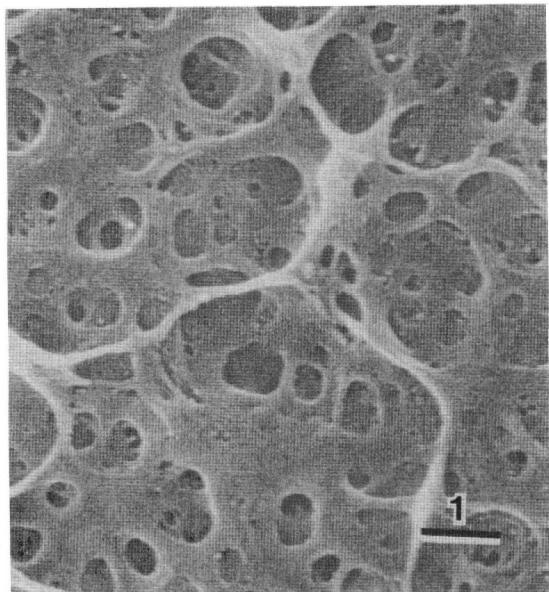


図 3 未受精卵, 図 1 の強拡大

殺し、2分割卵は培養液（BWW液）にて卵管を洗滌して採取した。未受精卵および受精後約5時間の卵子は0.1% hyaluronidaseを含む培養液に移し、顆粒膜細胞を除去した。1細胞期の受精卵は実体顕微鏡下に雌雄前核を確認したものを実験に供した。卵子は2% glutaraldehyde-0.025M phosphate bufferで22~24時間固定後、0.2% poly-L-lysineであらかじめ処置したカバーガラス上に移し、接着させてから上昇アセトン系列で脱水し、臨界点乾燥を行った。炭素および金で二重蒸着後、日本電子JSM-35型SEMにて観察した。

結果：マウス未受精卵はほぼ正円形で、その表面は網の目状を呈し、一見スponジ様構造をしている（図1~3）。強拡大で見ると、透明帯の表面には大小不同的円形または橢円形の小孔が無数にあり、比較的大きい孔の中にさらに小さな孔が開いている（図3）。ところどころに帯状の部分が見られるが、マウス透明帯の特徴的な所見としてPhillips and Shalgi (1980)<sup>10</sup>が報告した、太い帯状の隆起や格子状のバンドは認められなかった。これは多分系統差により、透明帯の表面構造が多少異なるためではないかと思われる。予備実験の段階では、しばしば透明帯に細かなヒビ割れが観察された（図4~5）。Jackowski and Dumont (1979)<sup>9</sup>はこのような所見をもって、マウス未受精卵の表面構造としたが、これはPhillips and Shalgi (1980)が指摘するように、明らかに人工的産

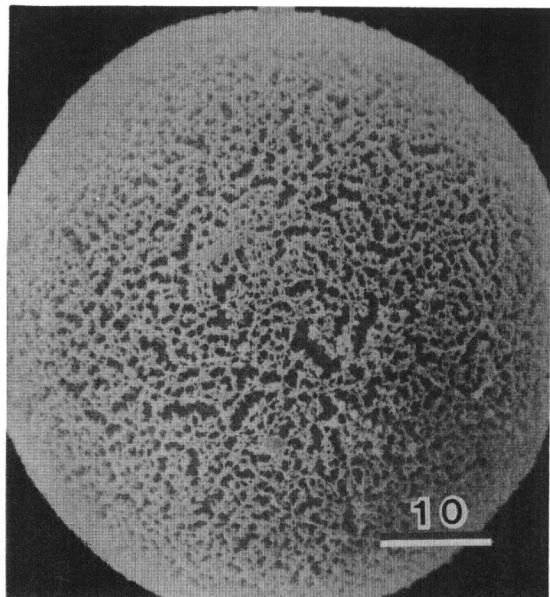


図4 未受精卵、全体的に小さなヒビ割れを認める（artifacts）

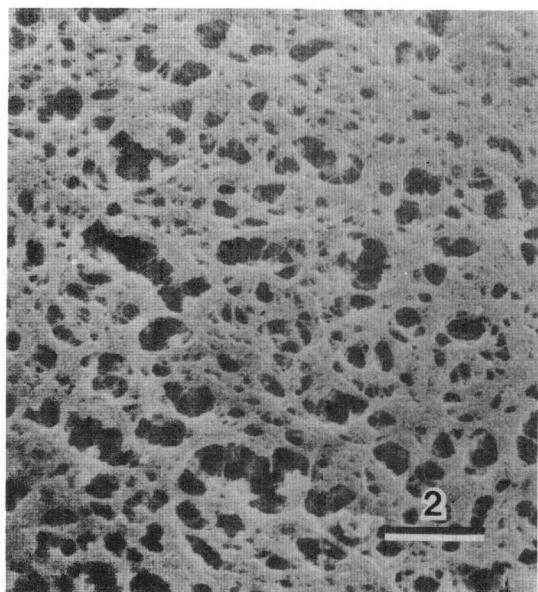


図5 未受精卵、図4の強拡大

物であり、固定、脱水の段階に問題があるのではないかと思われる。受精後約5時間の卵子も、透明帯表面はほぼ未受精卵のそれと同じような構造を示した（図6~7）。受精後約10時間になると顆粒膜細胞は卵子から自然に離脱する。この時期の透明帯は未受精卵のそれに比べて表面

がやや密になる傾向が認められた(図8~9)。

また精子侵入孔は必ずしも円筒形ではなくさまざまなかたちが観察された(図9)。2分割卵は米俵のような形をしており、中央がややくびれている(図10, 13)。したがって未受精卵と2分割卵の鑑別は容易であり、両者を見違えることはない。そこで条件を一定にするために、その後の実験では未受精卵と2分割卵と一緒に固定し、同一のカバーガラス上に接着させた。2分割卵の透明帯は未受精卵に比べて、表面がやや平滑で、小孔の数は少なく、しかも浅くなる傾向が認められた(図10~14)。しかしこれは必ずしも一般的なものではなく図15のように未受精卵とほとんど同じ透明帯も観察された。

考察：透明帯の生理化学的性質が受精前後で変化することはかなり古くから知られている。<sup>2~7</sup> 1969年 Barros and Yanagimachi<sup>11</sup>

はハムスター卵子の精子結合性が受精により変化すること、また透明帯を除去した卵子を *in vitro* で受精させて、表層顆粒様物質を培養液中に集め、その中で未受精卵を培養すると、透明帯の精子結合性が失われて、受精が阻止されることを報告し、初めて透明帯反応に実験的根拠を与えた。続いて Gwatkin らは、<sup>12</sup> ① trypsin (0.001%) 处理によりハムスター透明帯の精子結合性が消失する、②表層顆粒様物質による精子結合性の変化は trypsin inhibitor の存在下で阻止される、ことから透明帯反応のメカニズムは表層顆粒内の trypsin

<sup>6, 7</sup> 様酵素による精子結合部位の破壊であると推論した。一方マウスを用いたわれわれの実験では、未受精卵を trypsin (0.01%) で 30 分間処理しても精子結合性は変化せず、受精卵における精子結合性の変化は受精後約 5 時間から 10 時間の間、ちょうど顆粒膜細胞が受精卵から離脱する

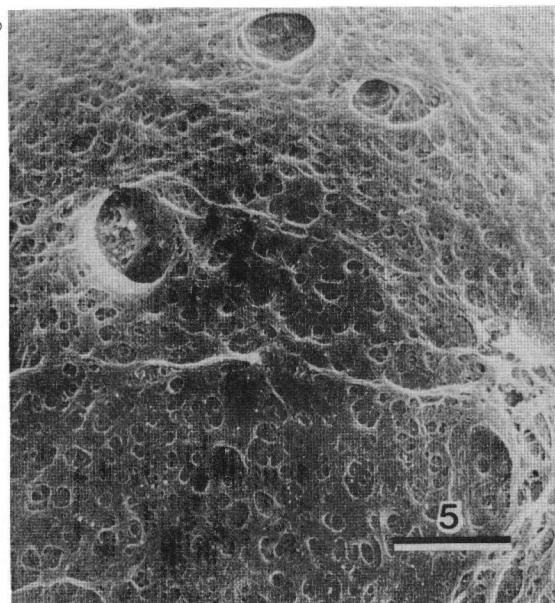


図6 受精後約5時間の卵子

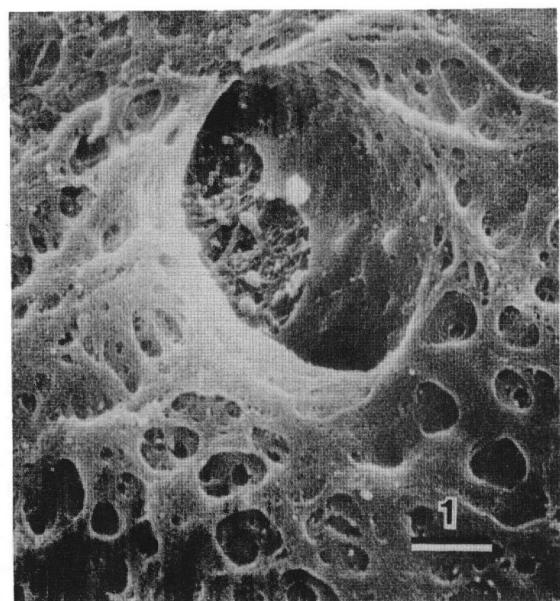


図7 図6の強拡大、精子侵入孔を認める

時期に一致して起こった。また *in vitro* で受精した 2 分割卵は不完全な精子結合性の変化を示した。したがってマウス透明帯の精子結合部位は trypsin に対して感受性がなく、精子結合性の変化は受精直後には起こらず、受精卵が卵管分泌物の影響を受けて完成されるものと思われる。マウス卵子を *in vitro* で媒精すると、表層顆粒の約 50 % は受精が起こる前に放出される。<sup>13</sup> しかしこのような条件下でも受精は阻害されない。表層顆粒の放出だけでは透明帯反応は起こらないのか、受精により表層顆粒内の酵素が活性化されて、透明帯反応が誘起されるのか、非常に興味深い問題である。受精に伴う透明帯の形態学的変化

としては、Baranska ら (1975)<sup>8</sup> は ruthenium red 染色したマウス卵子を透過型電子顕微鏡にて観察し、未受精卵の透明帯は 2 層から、受精卵のそれは 4 層から成っていると報告した。受精後に新たに形成される 2 層のうち、最内層は表層顆粒が付着したものであり、最外層は卵管分泌の沈着によるものであると考えられている。今回の SEM によるわれわれの観察でも、透明帯の表面は受精直後では変化なく、受精後約 10 時間頃より多少変化する傾向が認められた。このような変化はやはり卵管分泌物の沈着によるものではないかと思われる。受精に伴う透明帯表面の変化を SEM で比較検討した研究はきわめて少ない。Jackowski and Dumont (1979)<sup>9</sup> はマウスを用いて、透明帯表面は受精により著

明に変化すると報告した。しかし彼らが未受精卵の特徴として示した写真は、明らかに人工的産物によるものである。卵子の固定、脱水は必ずしも容易ではなく、透明帯にヒビ割れなどの人工的産物を形成することが少くない。また彼らの示した受精後約 6 時間の卵子の透明帯は、われわ

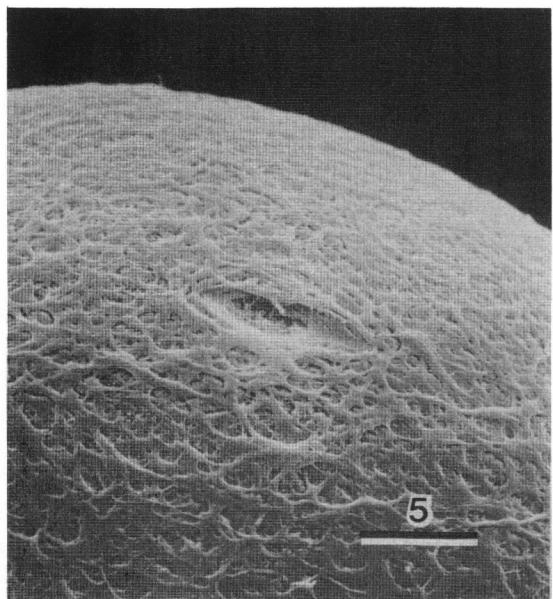


図 8 受精後約 10 時間の卵子

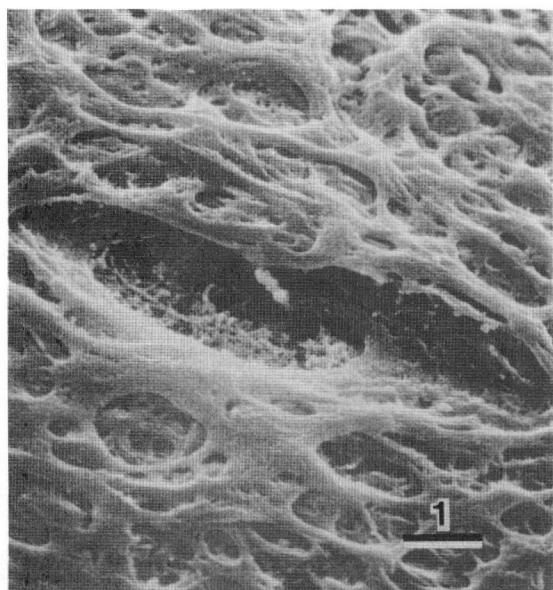


図 9 図 8 の強拡大

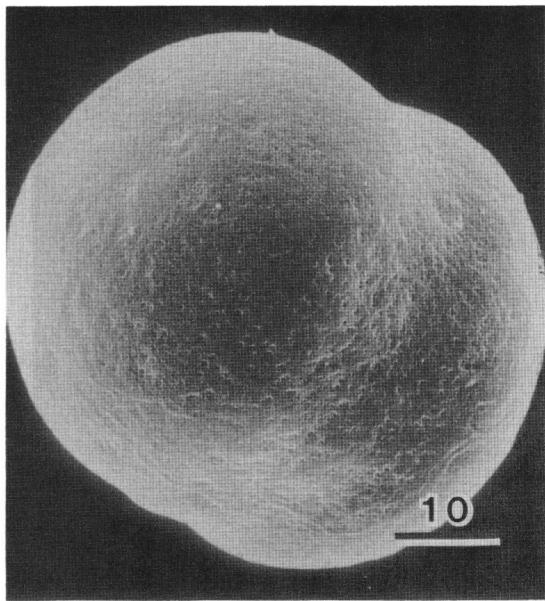


図 10 2分割卵

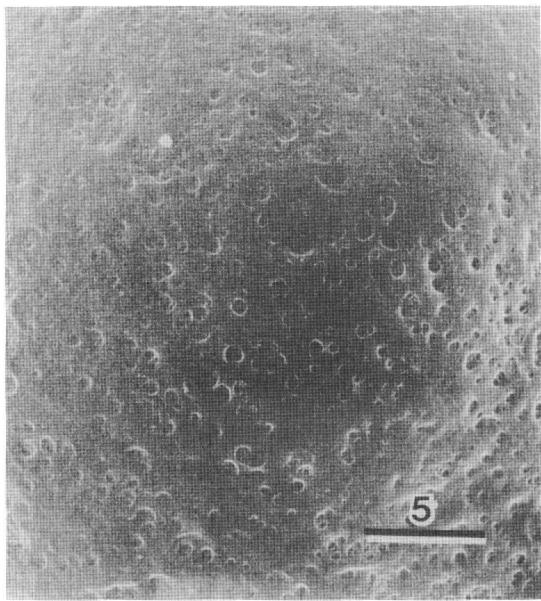


図 11 2分割卵, 図 10 の拡大

れのいう未受精卵のそれと全く同じである。彼らが透明帯の最終的変化として示した受精後 11 時間の卵子は、われわれの 2 分割卵のそれに相当する。したがつて Jackowski らの成績も、透明帯の変化は受精後 5 時間以上経つから起こることを示しているといえよう。一方 Phillips and Shalgi (1980)<sup>10</sup> はマウスおよびハムスターの未受精卵と 2 分割卵を比較し、受精による透明帯表面の変化は認められなかつたと報告している。SEMで観察される透明帯の変化は一定不变のものではなく、受精卵によつては未受精卵とほとんど変わらないものもある。卵管分泌物の透明帯への沈着は卵子によつてかなり異なるのかも知れない。また固定や脱水の仕方によつては、このような沈着物が除去されてしまう可能性も十分考えられる。

マウス透明帯の溶解性は受精直後より変化し、酸性溶液、2-mercaptopethanol, あるいは Sodium periodate に對して難溶性となる<sup>4, 7</sup>。Schmell and Gulyas (1979)<sup>14</sup> は、溶解性の変化、

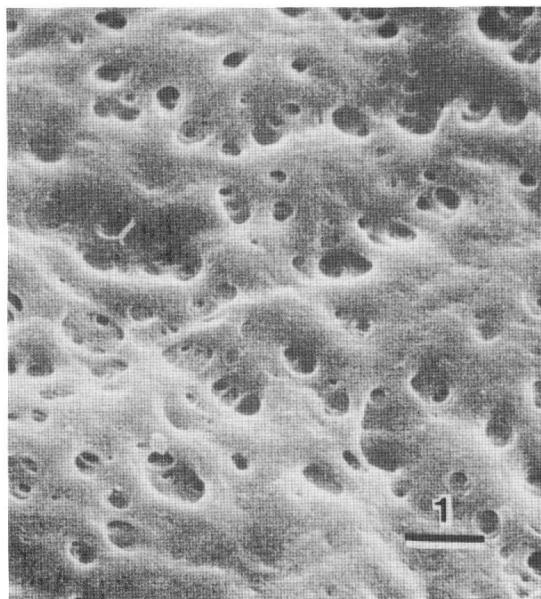


図 12 2分割卵, 図 10 の強拡大

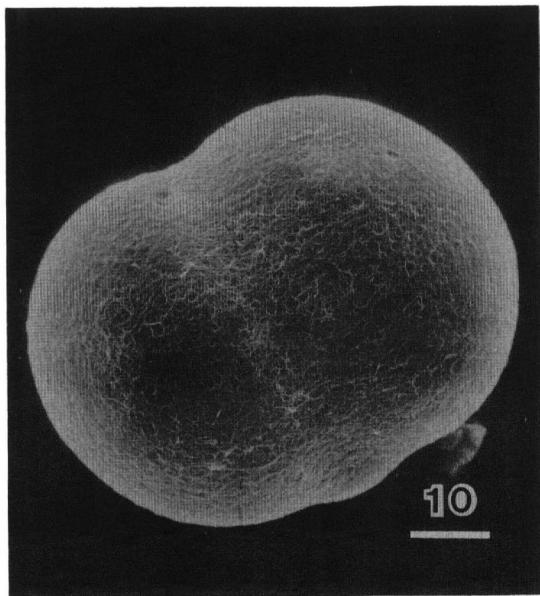


図 13 2 分割卵, 2 個の精子侵入孔を認める

すなわち透明帯の硬化は表層顆粒に含まれる ovoperoxidase によって誘起されると報告している。しかし今回の実験では溶解性の変化に対応する、透明帯表面の形能学的変化は認められなかつた。受精直後に見られる SEM 上の唯一の変化は精子侵入口の存在であつた。精子侵入孔の形はさまざまであるが、2 分割卵になつてもほとんど修復されずに残つていった。

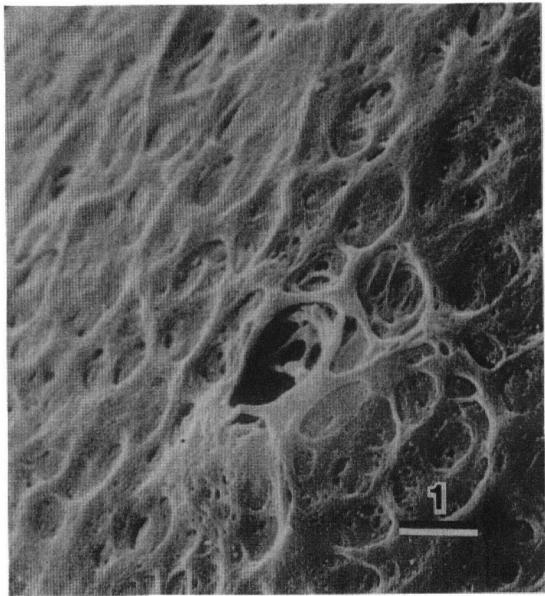


図 14 2 分割卵, 図 13 の強拡大

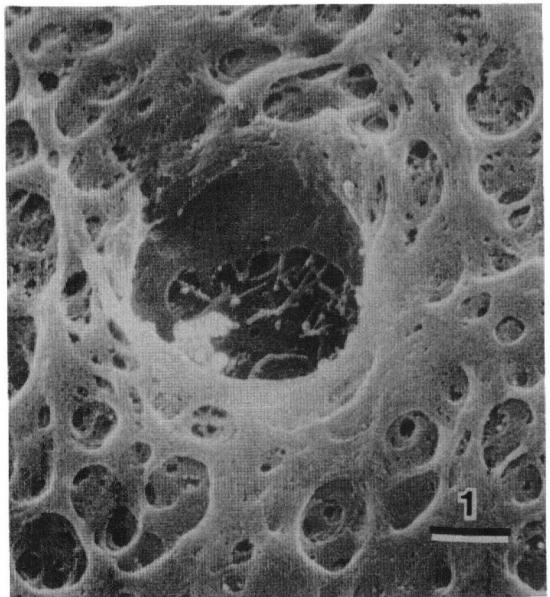


図 15 2 分割卵, 透明帯表面は未受精卵とならない

文 献

1. Braden, A. W. H., Austin, C. R. and David, H. A. : The reaction of the zona pellucida to sperm penetration. *Aus. J. Biol. Sci.* 7 : 391, 1954.
2. Chang, M. C. and Hunt, D. M. : Effects of proteolytic enzymes on the zona pellucida of fertilized and unfertilized mammalian eggs. *Exp. Cell. Res.* 11 : 497, 1956.
3. Gwatkin, R. B. L. : Effect of enzymes and acidity on the zona pellucida of the mouse egg before and after fertilization. *J. Reprod. Fert.* 7 : 99, 1964.
4. Inoue, M. and Wolf, D. P. : Comparative solubility properties of the zonae pellucidae of unfertilized and fertilized mouse ova. *Biol. Reprod.* 11 : 558, 1974.
5. Inoue, M. and Wolf, D. P. : Comparative solubility properties of rat and hamster zonae pellucidae. *Biol. Reprod.* 12 : 535, 1975.
6. Inoue, M. and Wolf, D. P. : Sperm binding characteristics of the murine zona pellucida. *Biol. Reprod.* 13 : 340, 1975.
7. Inoue, M. and Wolf, D. P. : Fertilization-associated changes in the murine zona pellucida. : A. time sequence study. *Biol. Reprod.* 13 : 546, 1975.
8. Baranska, W., Knowinski, M. and Kujawa, M. : Fine structure of the zona pellucida of unfertilized egg cells and embryos. *J. Exp. Zool.* 192 : 193, 1975.
9. Jackowski, S. and Dumont, J. N. : Surface alterations of the mouse zona pellucida and ovum following *in vivo* fertilization : Correlation with the cell cycle. *Biol. Reprod.* 20 : 150, 1979.
10. Phillips, D. M. and Shalgi, R. : Surface architecture of the mouse and hamster zona pellucida and oocyte. *J. Ultrastr. Res.* 72 : 1, 1980.
11. Barros, C. and Yanagimachi, R. : Induction of the zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material. *Nature* 233 : 268, 1971.
12. Gwatkin, R. B. L., Williams, D. T., Hartmann, J. F. and Kniazuk, M. : The zona reaction of hamster and mouse eggs : Production *in vitro* by a trypsin-like protease from cortical granules. *J. Reprod. Fert.* 32 : 259, 1973.
13. Nicosia, S. V., Wolf, D. P. and Inoue, M. : Cortical granule distribution and cell surface characteristics in mouse eggs. *Devel. Biol.* 57 : 56, 1977.
14. Schmell, E. D. and Gulyas, B. J. : First demonstration of mammalian ovoperoxidase and its role in hardening the zona pellucida of activated mouse eggs. *J. Cell. Biol.* 83 : 203a, 1979.

M.Hishinuma, H.Kanagawa\*, K.Utaka, M.Sakai,  
M.Teranishi & N.Seike\*\*

\* Department of Veterinary Obstetrics, Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

\*\* Laboratory of Embryo Transfer, Snow Brand Milk Products Co. Ltd., Naganuma, Hokkaido, Japan.

#### Abstract

Chromosomal analysis of bovine embryos was attempted on 14 blastocysts. Eleven blastocysts (78.6%) showed metaphase plates, but sex determination was successful in only 4 embryos (28.6%). Failure to identify sex of embryos was due to contraction of chromosomes and a low number of metaphase plates. It was especially difficult to differentiate the Y chromosome due to contraction. The mitotic index of bovine expanded blastocysts was 2.8%, while that of mouse expanded blastocysts was 11.2%. These results suggested that more studies are needed in chromosomal preparation of bovine embryos for sex determination.

#### Introduction

Chromosomal analysis studies for the purpose of sex determination of bovine embryos have been reported from many laboratories. Sexing 2-week-old bovine embryos by chromosomal analysis of trophoblast biopsies is possible in about 60% of the embryos (1-5). In the case of 1-week-old bovine embryos, namely morulae and blastocysts, about 60% of the embryos were sexed by Moustafa et al.(6), while the successful sexing rate of these embryos reported by Singh et al.(7) and Popescu and Cribiu (8, cited by Cribiu, 9) was about

30%. Failure of sexing embryos is attributed to poor quality or absence of metaphase plates. The number of metaphase plates available for chromosomal analysis greatly affects the results of sexing. As reported by King et al.(10), the number of metaphase plates of bovine embryos can be increased by prolonging the length of culture with colchicine. It is thus necessary to examine the optimum conditions for colchicine treatment in order to obtain many metaphase plates of good quality.

In this study, whole blastocysts of mice were used to study mitotic activity. Bovine blastocysts were then cultured under the conditions for mouse blastocysts for the purpose of chromosomal analysis. The feasibility of sexing bovine blastocysts by this method was discussed by comparing it with the methods used for sexing mouse blastocysts and those described in other reports.

#### Materials and Methods

Mice were treated with 5IU of pregnant mare's serum gonadotrophin (PMSG), followed by 5IU of human chorionic gonadotrophin (HCG), and the embryos were flushed from the uterus on day 4 (day 0 = day of mating) with Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS). A total of 155 expanded blastocysts were used to study the mitotic index. Cows were treated with 3500-4000IU of PMSG followed by 30-40mg of prostaglandin F<sub>2</sub>α, and the embryos were flushed from the uterus on day 6 to 7 (day 0 = day of estrus) with Eagle's minimum essential medium (MEM) containing 60 µg/ml of Kanamycin. Bovine embryos were cultured by Brinster's BMOC-3 medium for 4-20 hours before the colchicine treatment, and chromosomal analysis was attempted on 14 blastocysts.

All embryos were cultured in 5% CO<sub>2</sub> and 95% O<sub>2</sub> at 37°C. Colchicine treatment of the embryos was attempted based on the method of Hishinuma and Kanagawa (11) : the culture was made by BMOC-3 containing 0.4 µg/ml colchicine and kept for 2 hours.

Chromosomal preparations were made by the air-drying method of Mikamo (12). Following the colchicine treatment, the embryos were placed in PBS containing 0.5% trypsin for 1 minute and immediately transferred into a hypotonic solution of 1% sodium citrate for 15 minutes. Fixation was carried out in three steps in order to fix

the embryos gradually: first with a fixative of methanol and acetic acid and distilled water ( 5:1:4 ) for 5 minutes, then with methanol and acetic acid ( 3:1 ) for over 20 minutes and finally with methanol and acetic acid and distilled water ( 3:3:1 ) for 1 minute. Each embryo was placed onto a clean, grease-free slide glass with a small drop of the first fixative. Since the zona pellucida of the mouse embryos was easily dissolved by the first fixative, they attached themselves to the slide glass. It was difficult to dissolve the zona pellucida of bovine embryos within 5 minutes with the first fixation, and some embryos were fixed for 1 hour. The second and third fixations were carried out by placing the slide glass in a coplin jar filled with fixative. Spreading of the cells was accomplished by blowing on the slide glass under a stereomicroscope. The preparations were stained with 2% Giemsa, pH 6.8.

The number of nuclei and metaphase plates were counted. The mitotic indices of mouse and bovine blastocysts were calculated to compare the mitotic activities or frequency of cell division.

### Results

Chromosomal preparations of 14 bovine blastocysts were attempted and 4 of the embryos ( 28.6% ) were sexed ( Table I ). In the 5 embryos cultured with 0.4 µg/ml colchicine, it was difficult to determine the sex because of loss of embryos during fixation ( No.4 ), absence of metaphase plates ( Nos.1,3 ) and contraction of chromosomes ( Nos.2,5 ). In the 8 embryos cultured with 0.1 or 0.2 µg/ml colchicine, the X chromosome was easily found ( Nos.6-10 12-14 ), but it was difficult to differentiate the Y chromosome because of contraction ( Nos.7,10,12-14 ). The Y chromosome was differentiated in one embryo ( No.11 ), but the X chromosome could not be found.

The number of nuclei, metaphase plates and the mitotic index obtained from bovine expanded blastocysts, and, for comparison, those obtained from mouse expanded blastocysts, are shown in Table II.

### Discussion

In chromosomal studies on bovine embryos, 2-week-old embryos

Table I. Results of sexing bovine blastocysts

No.	Developmental stage of blastocysts	Colchicine treatment <sup>a</sup>		No. of nuclei metaphase plates	No. of chromosomes analysis	Comments
		Dose of colchicine (μg/ml)	Duration of culture (hours)			
1	Early.	0.4	2	67	0	
2	Expanded.	0.4	2	111	2	60,??
3	Early.	0.4	1	58	0	embryo degenerated on preculture <sup>b</sup>
4	Expanded.	0.4	1	—	—	chromosomes too contracted to differentiate the sex chromosomes
5	Expanded.	0.4	1	121	6	60,??
6	Mid.	0.2	2	161	5	embryo lost at fixation
7	Expanded.	0.2	2	194	8	chromosomes too contracted to differentiate the sex chromosomes
8	Expanded.	0.2	2	186	2	only one X observed
9	Expanded.	0.2	2	170	5	60,XX
10	Expanded.	0.2	2	164	6	60,XX
11	Mid.	0.1	2	145	2	59,X?
12	Expanded.	0.1	2	154	3	no X observed
13	Expanded.	0.1	2	146	2	60,XY <sup>c</sup>
14	Expanded.	0.1	2	167	5	only one Y observed
						no distinct Y observed
						only one X observed
						no distinct Y observed

a: Embryos were cultured by BMOC-3 containing colchicine.

b: Embryos were cultured by BMOC-3 for 4-20 hours before the colchicine treatment.

c: Only one X chromosome was observed in 60 chromosomes, so there might be the Y chromosome in this metaphase plate.

Table II. Mitotic indices of bovine and mouse expanded blastocysts

Species	No. of embryos	No. of nuclei per embryo	No. of metaphase plates per embryo	Mitotic index (%)
Cattle	9	157.0 ± 26.0**	4.3 ± 2.1	2.8 ± 1.2
Mouse*	155	66.0 ± 15.9	5.7 ± 3.0	11.2 ± 26.8

\*: Cultured by BMOC-3 containing 0.4 µg/ml colchicine for 2 hours.

\*\*: Mean ± SD.

have been examined by means of biopsy. Recently 1-week-old morulae and blastocysts were used in chromosomal analysis. Sex determination was possible in 33.0% and 63.0% of manipulated morulae, reported by Singh and Hare (7), and Moustafa (6), respectively, and in 53% of manipulated blastocysts reported by Moustafa (6). Chromosomal analysis for detecting abnormality in the number and structure of chromosomes was also possible in 44.6%, 48% and 47.4% of the embryos reported by King et al.(13), King and Linares (14) and King et al.(15), respectively. In these studies, colchicine or colcemid was used under various conditions, and a few studies were reported on colchicine treatment (10).

Sex determination was successful in only 28.6% of the bovine blastocysts in this study. This rate is lower than the successful rate of 63% reported by Moustafa et al.(6), but it agreed with that of Singh and Hare (7), and Popescu and Cribiu (8), who reported a value of 33% and 30%, respectively. The main reason for the failure was contraction of chromosomes and the presence of only a few metaphase plates.

Heavy contraction of chromosomes was observed in the embryos cultured with 0.4 µg/ml colchicine, and even when the concentration of colchicine was reduced to 0.1 µg/ml, contraction was still observed. In mouse embryos, however, contraction of chromosomes was not observed in the culture with 0.025-1.6 µg/ml colchicine (11), which suggests different sensitivity against colchicine between bovine

and mouse embryos.

The mitotic index of bovine expanded blastocysts was an average of 2.8%. This value is lower than the 7.3% reported by King et al. (10), who cultured bovine blastocysts for 2-2.5 hours. They also reported that the mitotic index of blastocysts was doubled by lengthening the incubation time from 2-4 hours to 4-10 hours. It was reported by Singh and Hare (7) that bovine morulae cultured for 4-6 hours showed a mitotic index of 8.9%, and by King et al. (10) that day-7 bovine embryos cultured for 4-8 hours showed a value of 5.2%. This may suggest that the low mitotic index in this study was caused by insufficient incubation of the culture. In the mouse expanded blastocysts, however, the average mitotic index was 11.2%, and this agrees with Singh and Hare (7), Sato et al. (16) and Niimura et al. (17). Moreover, there was no significant difference in the mitotic index of mouse embryos between a 2-hour and a 6-hour culture (11). This may suggest that mitotic activity is different between bovine and mouse embryos, or that the bovine embryos examined in this study had low mitotic activity. It was shown by Singh and Hare (7) that the lower levels of mitotic activity might be explained by the existence of a donor factor. Morphology of embryos might be related to mitotic activity, since the average number of nuclei of bovine blastocysts in this study was 141.8, while that of blastocysts used by King et al. (10) was 76.9.

In conclusion, sexing of bovine blastocysts could not be achieved with the culture condition for chromosomal preparation of mouse blastocysts. More studies, especially on the concentration of colchicine, duration of culture and morphology of the embryos, are needed in order to obtain a higher rate of successful sex determination of bovine blastocysts by chromosomal analysis.

#### References

- 1) Hare,W.C.D., Mitchell,D., Betteridge,K.J., Eaglesome,M.D. and Randall,G.C.B.: Theriogenology, 5, 243 (1976)
- 2) Mitchell,D., Hare,W.C.D., Betteridge,K.J., Eaglesome,M.D. and Randall,G.C.B.: VIII th Int.Cong.Anim.Reprod.A.I., Crakow, 3, 258 (1976)
- 3) Hare,W.C.D., Singh,E.L., Betteridge,K.J., Eaglesome,M.D., Randall,G.C.B. and Mitchell,D.: In "Control of Reproduction

- in the Cow", ed. J.M.Sreenan, Martinus Nijhoff, The Hague/Boston/London, 1978, pp.441
- 4) Hare,W.C.D. and Singh,E.L.: 4th Eur.Colloq.Cytogenet.Domest.Anim., 1980, pp.172
- 5) Wintenberger-Torres,S. and Popescu,P.C.: Theriogenology, 14, 309 (1980)
- 6) Moustafa,von Laila A., Hahn,J. and Roselius,R.: Berl.Münch.Tierärztl.Wsch., 91, 236 (1978)
- 7) Singh,E.L. and Hare,W.C.D.: Theriogenology, 14, 421 (1980)
- 8) Popescu,C.P. and Cribiu,E.P.: II congrés international de transfert d'embryons chez mammifères, Annecy, France, 1982, 20-21-22
- 9) Cribiu,E.P.: Recl.Med.Vet.Ec.Alfort, 159, 95 (1983)
- 10) King,W.A., Linares,T., Gustavsson,I. and Bane,A.: Vet.Sci.Comm., 3, 51 (1979)
- 11) Hishinuma,M. and Kanagawa,H.: Japan J.Anim.Reprod., in press
- 12) Mikamo,K.: Clinical Gynec.Obstet., 31, 1137 (1977)
- 13) King,W.A., Linares,T., Gustavsson,I. and Bane,A.: Hereditas, 92, 167 (1980)
- 14) King,W.A. and Linares,T.: Theriogenology, 15, 116 (1981)
- 15) King,W.A., Linares,T. and Gustavsson,I.: Hereditas, 94, 219 (1981)
- 16) Sato,Y., Niimura,S. and Ishida,K.: Japan J.Anim.Reprod., 26, 141 (1980)
- 17) Niimura,S., Sato,Y., Sasaki,H. and Ishida,K.: Memoirs Facult.Agri.Niigata Univ., 33, 53 (1981)

### 染色体検査によるウシ受精卵の性別判定

菱沼 貢, 金川弘司\*

宇高健二, 酒井 実, 寺西正俊, 清家 昇\*\*

\* 北海道大学獣医学部家畜臨床繁殖学講座

\*\* 雪印乳業株式会社長沼受精卵移植研究所

ウシの胚盤胞 14個について染色体の検出を試みた。その結果、11個(78.6%)の受精卵に中期核板がみられ、4個(28.6%)の受精卵で性別判定が可能であった。しかし、ウシの受精卵には中期核板が少なく、さらに染色体の収縮が起こるため、Y染色体の識別は困難であった。以上の結果から、ウシの受精卵の染色体検査を行う場合には、さらに培養条件の検討が必要と考えられた。

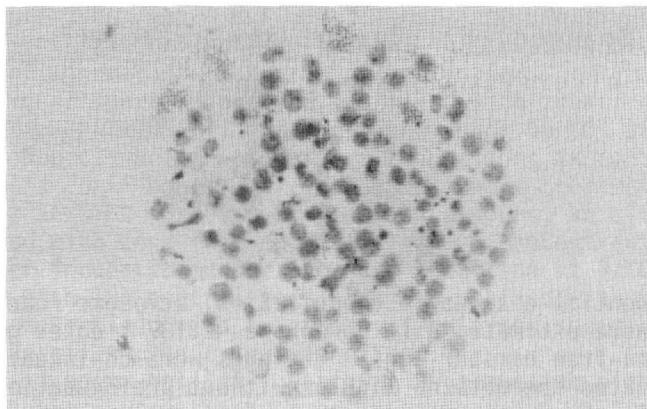


Fig.1 Chromosomal preparation of bovine blastocyst  
(No.6). Five metaphase plates are shown.  
Giemsa  $\times 170$

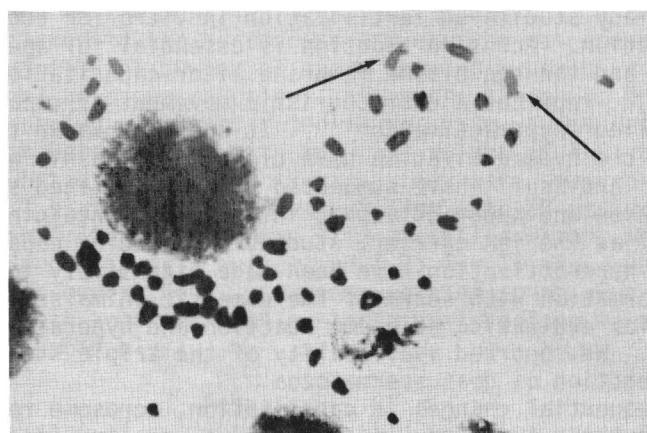


Fig.2 High magnification of Fig.1. Metaphase plate.  
Two X chromosomes (arrow) are observed.  
 $\times 1460$

Motility pattern and acrosome reaction of  
ionophore-treated goat spermatozoa

Koichi Hamano, Hiroshi Sasada, Shichiro Sugawara  
and Junji Masaki

Laboratory of Animal Reproduction, Department of  
Animal Science, Faculty of Agriculture,  
Tohoku University, Sendai, Japan

**Abstract.** Sequential changes in capacitation, acrosome reaction and hyperactivation were estimated with ionophore A23187 treated goat spermatozoa using zona-free hamster eggs. The eggs were co-incubated with the ionophore-treated spermatozoa with or without preincubation at 37°C for 0.5-4 hours in the drops of B0 medium. Acrosome reaction and hyperactivation occurred almost simultaneously in the spermatozoa. Their penetrating ability to zona-free hamster eggs dropped rapidly thereafter. Early capacitation and acrosome reaction were induced in ionophore-treated spermatozoa compared with those preincubated in the female reproductive tract.

#### Introduction

There have been many studies on fertilization *in vitro* for the purpose of investigating capacitation. Acrosome reaction is essential for spermatozoa to pass through the zona and the egg plasma membrane after capacitation<sup>1)</sup>.

Yahagimachi(1970)<sup>2)</sup> reported a characteristic movement of capacitated hamster spermatozoa, later called "hyperactivation"<sup>3)</sup>. It has been known that the acrosome reaction and the hyperactivation have close relationship with capacitation<sup>2-8)</sup>. Yanagimachi and Usui<sup>5)</sup> have suggested that capacitated spermatozoa undergo acrosome reaction and hyperactivation in a medium containing  $\text{Ca}^{2+}$ . Using ionophore A23187 as the ion carrier, studies on inducing capacitation, acrosome reaction and hyperactivation have been made extensively in many species<sup>10, 11)</sup>. However, information with sperm of the domestic animals is sparse and the reliable methods for evaluating acrosome reaction and hyperactivation have not yet been obtained. We reported availability of the triple stain method for evaluating acrosome reaction of goat spermatozoa<sup>12)</sup>.

In this study, sequential changes in capacitation, acrosome reaction and hyperactivation of ionophore-treated goat spermatozoa were examined using zona-free hamster eggs.

#### Materials and Methods

**Media.** Brackett and Oliphant(B0) medium<sup>13)</sup> was used as basic medium, BSA free B0 medium for ionophore treatment of spermatozoa and B0 medium containing both 3 mg/ml BSA and 2mM caffeine for *in vitro* fertilization and sperm incubation.

Preparation of eggs and spermatozoa. Mature female golden hamsters were superovulated by injection of 30 IU PMSG at the day of post ovulation discharge and by injection of 30 IU of hCG 52-56 hours later. The eggs, recovered from the ampulae of oviducts 15-17 hours after the hCG injection, were removed zona pellucida with 0.05% hyaluronidase and 0.05% trypsin. After three times washing, the zona-free 10-15 eggs were introduced into 0.3ml insemination drops and covered with paraffin oil in plastic culture dishes. One of three mature male goats of Japanese native breed, which had shown the highest penetrating ability of the ionophore-treated spermatozoa in the previous experiment, was used as donor of semen. Semen was collected by artificial vagina, diluted to double with BSA-free B0 medium and centrifuged at 1,200 rpm for 5 min. Washing was repeated three times. Treatment with 0.5 $\mu$ M ionophore for 2 min. was made for the sperm suspension( $2\text{-}3\times 10^7/\text{ml}$ ).

In vitro fertilization and examination. After ionophore treatment, penetrating ability of spermatozoa was examined as follows 1) Soon after ionophore treatment, a part of sperm suspension was mixed with zona-free hamster eggs(final sperm concentration: $2\text{-}3\times 10^6/\text{ml}$ ) and incubated under 5% CO<sub>2</sub>, 95% air at 37°C for 0.5, 1, 2 and 3 hours. Non-treated sperm suspensions as control were mixed with eggs and incubated for 4 hours. 2) After ionophore treatment followed by pre-incubation under at 37°C for 0, 0.5, 1, 2 and 3 hours, an aliquot of sperm suspension was mixed with zona-free eggs(final sperm concentration:  $2\text{-}3\times 10^6/\text{ml}$ ). Following further incubation under the same condition at 37°C for 4 hours, the eggs were fixed with 10% neutral formaline and stained with 0.25% lacmoid. Sperm penetration was determined with existence of enlarged sperm head(s) and/or male pronucleus(pronuclei) in the cytoplasm of egg.

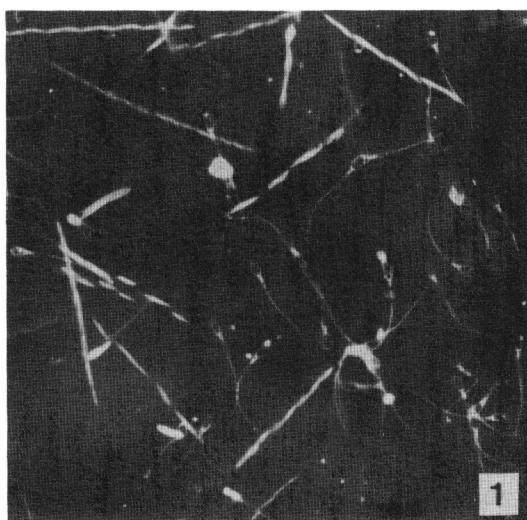
Evaluation of sperm motility pattern. Spermatozoa either treated or non-treated with ionophore were transferred into the drops of insemination medium. They were covered with paraffin oil and incubated under 5% CO<sub>2</sub>, 95% air at 37°C for 0.25, 0.5, 1, 2, 3 and 4 hours. After that, sperm suspensions recovered from the drops were centrifuged at 1,000 rpm for 3 min. to concentrate the cell number. After examination of motility, 5  $\mu$ l sperm suspensions were placed onto glass slides and covered. Edges of the cover glass were sealed with paraffin oil. Sperm motility pattern was observed using microscope equipped with dark field condenser(OLYMPUS). Photographing of the images of sperm motility pattern was prepared according to the modified method of Nakano<sup>14)</sup>. A camera loaded with ASA 400 film was attached to the microscope and shutter was opened for 1 second. From enlarged prints, the number of sperm showing hyperactivation was counted.

Evaluation of acrosome reaction. After the ionophore treatment, the spermatozoa were incubated and centrifuged in the same way as described above. The sperm suspensions were diluted with an equal volume of 1.0% trypan blue(in B0 medium) and incubated at 37°C for 15 min. They were smeared onto glass slides and fixed with 3% glutaraldehyde after washing with B0 medium. These specimens were stained with 0.1% Bismark brown Y(in distilled water, pH 1.8) for 3 min. and with 0.8% Rose Bengal(in Tris buffer, pH 5.3) for 15 min. Observation was made under light microscope(x1,000). Acrosome reacted sperm were evaluated as acrosome lost live sperm(both acrosomal and postacrosomal regions were not stained with Rose Bengal and trypan blue).

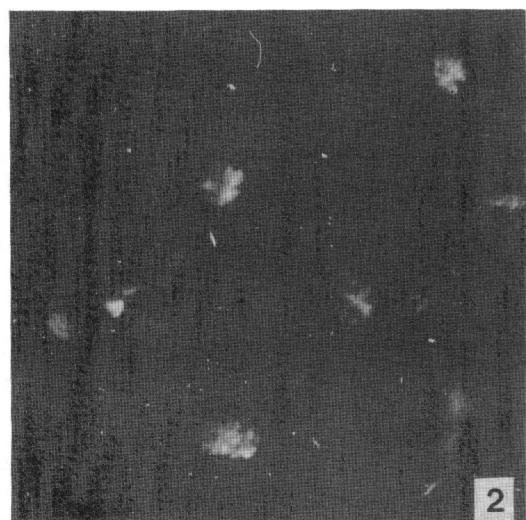
## Results

Motility pattern of spermatozoa treated with ionophore A23187. The ionophore-treated spermatozoa showed characteristic changes in motility pattern 1-2 hours after incubation(Table 2) in the insemination medium. By the ionophore treatment, the progressive motility pattern, commonly observed in non-treated fresh spermatozoa, was changed into whiplash -like beating of their flagellae (Figs, 1 & 2). The latter pattern(Fig. 2) was same as or similar to that of hyperactivation which was reported in other mammals such as hamster<sup>3)</sup>, guinea pig

<sup>5,15)</sup>, mouse<sup>16)</sup>, sheep<sup>17)</sup>, dog<sup>18)</sup> and dolphin<sup>19)</sup>.



1



2

Fig. 1.2. Bulb exposure-dark field micrographs of goat spermatozoa, the shutter of camera was opened for 1 second.

Fig. 1. Heads of non-treated motile sperm look like chains.

Fig. 2. Ionophore treated sperm heads show hyperactivation

Penetrating process of goat spermatozoa treated with ionophore A23187 into zona-free hamster eggs in vitro. The penetrating process into zona-free hamster eggs was observed in hourly intervals after insemination (Table 1). A few eggs(19.4%) were penetrated 2 hours after insemination. The percentages in 3 and 4 hours rised to 70.6% and 86.1%, respectively. Non-treated spermatozoa were unable to penetrate within 4 hours observation. Of the penetrated eggs, only enlarged sperm head(s) was found at 2 hours, and the completion of formation of pronucleus(or pronuclei) at 4 hours after insemination.

Table 1. Penetrating process of goat spermatozoa treated with ionophore A23187 to zona-free hamster eggs in vitro.

Incubation time after insemination (h)	No. of experiment	No. of examined eggs	With enlarged sperm head	With enlarged sperm heads	With male pronucleus	With male pronuclei	Total (%)
0.5	3	29	0	0	0	0	0 (0)
1.0	3	32	0	0	0	0	0 (0)
2.0	3	31	1	5	0	0	6 (19.4)
3.0	3	34	3	11	4	6	24 (70.6)
4.0	3	36	2	1	5	23	31 (86.1)
4.0 <sup>a)</sup>	3	32	0	0	0	0	0 (0)

a) Non-treated spermatozoa were inseminated with zona-free hamster eggs (control)

Changes in motility and acrosome reaction of spermatozoa treated with ionophore A23187, Table 2 indicates hourly changes in the motility and acrosome reaction of the ionophore-treated spermatozoa. They retained their motility for 2 hours after incubation. Thereafter, it gradually declined. Propotion of hyperactivated spermatozoa rised gradually from 1 hour after incubation and reached to peak(37.6%) at 2 hours. The percentages of acrosome-reacted spermatozoa rised from 1 to 3 hours after incubation. The rising period was almost synchronized

between hyperactivation and acrosome reaction.

Table 2. Changes in motility and acrosome reaction of goat spermatozoa treated with ionophore A23187

Incubation time after treatment <sup>a)</sup> (h)	Percentages of spermatozoa evaluated for		
	Motility	Motility pattern <sup>b)</sup>	Acrosome reaction <sup>c)</sup>
0.25	59.3	0	8.9
0.5	57.6	7.6	18.5
1.0	53.2	27.1	26.8
2.0	52.5	37.6	29.3
3.0	29.2	18.5	31.4
4.0	18.4	6.4	28.2

a) Spermatozoa were treated with 0.5 μM ionophore A23187 for 2 min.

b) Percentages hyperactivated/motile spermatozoa.

c) Percentages of acrosome-lost live spermatozoa.

Table 3. Changes in penetrating ability of goat spermatozoa treated with ionophore A23187

Incubation time before insemination (h)	No. of eggs examined	No. of eggs penetrated				Total (%)
		With enlarged sperm head	With enlarged sperm heads	With male pronucleus	With male pro-nuclei	
0	3	36	2	1	5	23 31 (86.1)
0.5	3	29	2	2	4	14 22 (75.8)
1.0	3	33	1	1	6	3 11 (33.3)
3.0	3	31	1	0	0	0 1 (3.2)

#### Changes in penetrating ability of spermatozoa treated with ionophore A23187.

The data summarised in Table 2 show how long the spermatozoa retain their penetrating ability to the zona-free hamster eggs after the ionophore treatment. The penetrating ability of the treated spermatozoa declined soon after 0.5-1.0 hour incubation and to only 3.2% after 3 hours incubation.

#### Discussion

The results of the present study have indicated that the ionophore-treated goat spermatozoa show hyperactivation. Recently, the characteristic movement of ionophore-treated bull spermatozoa was reported<sup>20)</sup>. Reed and Lardy(1972)<sup>9)</sup>, Talbott et al(1976)<sup>10)</sup> and Byrd(1981)<sup>11)</sup> have suggested that Ca<sup>2+</sup> channel in sperm plasma membrane increased by ionophore A23187 should make up a physiological situation for capacitation of the treated spermatozoa. Hyperactivation had been thought to be caused by metabolic changes requiring extracellular Ca<sup>2+</sup>, enzymes and a good balanced energy sources<sup>2,5,10,21)</sup>. These hypotheses may be applied to the goat spermatozoa. In vivo conditions, phenomenon of hyperactivation was observed in hamster<sup>2,23)</sup> and rabbit<sup>24,25)</sup>. However, in the domestic animals, such as goat<sup>26)</sup>, boar<sup>27,28)</sup> and bull<sup>28,29)</sup> incubation of spermatozoa either in homologous or heterogenous female reproductive tract did not induce hyperactivation. We do not know whether goat spermatozoa incubated in vivo are the case. Goat spermatozoa preincubated for 5-5.5 hours in gilt reproductive tract were enable to be capacitated and penetrated into zona-free hamster eggs<sup>26)</sup>. In the present study, penetration of the ionophore-treated goat spermatozoa to zona-free hamster eggs occurred in much shorter time than that of spermatozoa incubated in vivo. The time required for capacitation of bull spermatozoa<sup>20)</sup> treated with the ionophore A23187 was shorter than in those preincubated in bovine reproductive tract(3-4 hours)<sup>29)</sup>, in isolated rabbit reproductive tract(12-14 hours)<sup>29)</sup> and

in rabbit uterus(5 hours)<sup>28)</sup>. It is also suggested that the acrosome reaction may be induced rapidly if spermatozoa are treated with ionophore A23187<sup>10,11)</sup>. In the present study, the enlargement of heads of the penetrated goat sperm began at 2 hours after insemination. According to the suggestion of Yanagimachi(1981)<sup>31)</sup> on the initiation of sperm heads enlargement, attachment and fusion of goat spermatozoa treated with ionophore A23187 to vitelline membrane may begin during 1-1.5 hours after insemination. In this study, formation of the pronucleus was almost completed in 2 hours after sperm heads enlargement(4 hours after insemination), same as data of hamster by Yanagimachi(1981)<sup>31)</sup> and of bull by Takahashi (1984)<sup>28)</sup>. From the above data, it appears that goat spermatozoa was advanced capacitation and acrosome reaction by the ionophore treatment, and that penetrated spermatozoa developed to male pronuclei in the normal fertilizing process.

Observation on the acrosome reaction using transmission electron microscopy showed that the fusion and vesiculation between outer acrosome membrane and overlying plasma membrane occurred<sup>30,31)</sup>. According to Bedford(1968)<sup>30)</sup>, the loss of acrosomal cap must have occurred after fusion and vesiculation in the capacitated spermatozoa. The present results that the loss of acrosomal cap occurred 1 hour after ionophore treatment suggest that the fusion and vesiculation proceed within 0-1 hour after the treatment. Since there were no cumulus and zona in the hamster eggs used in this study, it is proposed that the sperm attachment to vitelline membrane occurred within 1-1.5 hours after insemination. Hyperactivation, evaluated as characteristic vigorous whiplash-like beating of the flagellum, is essential movement to pass through the cumulus and zona<sup>2,3,8)</sup>. It begins shortly before<sup>3,6)</sup> the acrosome reaction or simultaneously<sup>3,5)</sup>. In the present study, it seems that the hyperactivation was initiated simultaneously or shortly after the acrosome reaction. It was uncertain whether this time lag to the initiation of hyperactivation was due to the species specificity or by the treatment of ionophore A23187.

Within 1 hour incubation after ionophore treatment, penetration ratio declined to below one half. From the comparison of the data of this study with those of preincubation in gilt reproductive tract<sup>26)</sup>, it may be assumed that the penetrating ability of ionophore-treated goat spermatozoa declines within shorter incubation periods. It seems that their penetrating ability to zona-free hamster eggs began to decline after acrosome reaction and hyperactivation almost completed. However, even this period, spermatozoa retained their hyperactivation for 1 more hour and their motility for several more hours. In acrosome reacted guinea pig spermatozoa, their penetrating ability declined from 3 hours and hyperactivation from 2-3 hours after acrosome reaction. However, sperm motility was kept for 3-4 hours after the occurrence of hyperactivation<sup>8)</sup>. Barros(1973)<sup>32)</sup> reported that aged hamster spermatozoa with acrosome reaction are unable to penetrate the zona regardless of maintaining high motility. In this study, the time differences in the fall of penetrating ability, hyperactivation and motility were observed in the ionophore-treated goat spermatozoa. However, the physiological meaning remained uncertain.

#### References

- 1) Austin, C.R.: Biol.Reprod., Suppl., 2, 128(1970)
- 2) Yanagimachi, R.: J.Reprod.Fertil., 23, 193(1970)
- 3) Yanagimachi, R.: In Fertilization and Embryonic Development In vitro. L. Mastroianni and J.D.Biggers, eds. p.109. Plenum Press, New York(1981)
- 4) Mahi, C.A. and Yanagimachi, R.: J.Reprod.Fertil., 35, 55(1973)
- 5) Yanagimachi, R. and Usui, N.: Exp.Cell Res., 89, 161(1974)
- 6) Yanagimachi, R.: Biol.Reprod., 13, 519(1975)
- 7) Fleming, A.D. and Yanagimachi, R.: Gamete Res., 4, 253(1981)
- 8) Fleming, A.D. and Yanagimachi, R.: J.Exp.Zool., 220, 109(1982)
- 9) Reed, P.W. and Lardy, H.A.: J.Biol.Chem., 247, 6970(1972)
- 10) Talbott, P., Summers, R.G., Hylander, B.L., Keough, E.M. and Franklin, L.E.:

- J.Exp.Zool., 198, 383(1976)  
 11) Byrd, W.: J.Exp.Zool., 215, 35(1981)  
 12) Hamano, K., Sasada, H., Sugawara, S. and Masaki, J.: J.Mamm.Ova.REs., 1, 73  
 (1984)  
 13) Brackett, B.G. and Oliphant, G.: Biol.Reprod., 12, 260(1975)  
 14) Nakano, M.: Jap.J.Fert.Ster., 28(3), 363(1983)(in Japanese)  
 15) Yanagimachi, R.: Anat.Rec., 174, 9(1972)  
 16) Fraser, L.E.: J.Exp.Zool., 202, 439(1977)  
 17) Shams-Borhan, G. and Harrison, R.A.P.: Gamete Res., 4, 407(1981)  
 18) Mahi, C.A. and Yanagimachi, R.: J.Exp.Zool., 196, 189(1976)  
 19) Fleming, A.D., Yanagimachi, R. and Yanagimachi, H.: J.Reprod.Fertil., 63,  
 509(1981)  
 20) Takahashi, Y. and Hanada, S.: Japan J.Anim.Reprod., 30(1), 30(1984)(in  
 Japanese)  
 21) Fraser, L.E. and Quinn, P.J.: J.Reprod.Fertil., 61, 25(1981)  
 22) Katz, D.F. and Yanagimachi, R.: Biol.Reprod., 22, 759(1980)  
 23) Cummins, J.M. and Yanagimachi, R.: Gamete Res., 5, 239(1982)  
 24) Overstreet, J.W., Katz, D.F. and Johnson, L.L.: Biol.Reprod., 22, 1083(1980)  
 25) Suares, S.S. and Katz, D.F.: Biol.Reprod., 26, 146(1982)  
 26) Kim, C.I., Niwa, K., Iami, H. and Iritani, A.: J.Exp.Zool., 213, 181(1980)  
 27) Iritani, A., Sato, E. and Nishikawa, Y.: Jap.J.Fert.Steril., 20, 404(1975)  
 28) Hanada, A. and Nagase, H.: Japan J.Anim.Reprod., 27(2), 113(1981)  
 29) Iritani, A. and Niwa, K.: J.Reprod.Fertil., 50, 119(1977)  
 30) Bedford, J.M.: Am.J.Anat., 123, 329(1968)  
 31) Meizel, S.L.: In Development in Mammals, M.H.Johnson, ed. Vol.3. pl. North  
 Holland, Amsterdam(1978)  
 32) Barros, C.M., Fujimoto, M. and Yanagimachi, R.: J.Reprod.Fertil., 55, 89  
 (1973)

## イオノフォア処理ヤギ精子の運動性型と先体反応について

浜野光市, 佐々田比呂志, 菅原七郎, 正木淳二

東北大学農学部家畜繁殖学教室

### 要約

イオノフォア A23187 で処理したヤギ精子の capacitation, acrosome reaction および hyperactivation を透明帯除去ハムスター卵子を用いてしらべた。卵子はイオノフォア処理後インキュベーションなしに、あるいはパラフィンオイル下の BO 液での 37°C, 0.5-4.0 時間のインキュベーションのち媒精された。イオノフォア処理精子では、acrosome reaction と hyperactivation はほぼ同時に起きたが、その後、処理精子の透明帯除去ハムスター卵子への侵入能は、速やかに低下した。イオノフォア処理精子は雌生殖器内でプリインキュベーションした精子に比べて、早い capacitation と acrosome reaction が誘起された。

Effect of PMSG Dose on the Fertilization Rate  
and Incidence of Polyspermy of Rat Eggs in vitro

Yutaka TOYODA and Masahito SUGIMOTO

School of Veterinary Medicine and Animal Sciences  
Kitasato University, Towada-shi, 034

Summary. Recently ovulated oocytes were obtained from immature female rats of JCL-SD strain which had been treated with 7.5, 15 or 30i.u. PMSG and with 15i.u. hCG 56 h later. The oocytes were inseminated in vitro with epididymal spermatozoa in a chemically defined medium under 5% CO<sub>2</sub> in air at 37°C. At 7-8 h after insemination, the oocytes were examined for the evidence of fertilization. The percentages of the oocytes undergoing fertilization were 100, 91.3 and 76.9% when oocytes were obtained from immature females treated with 7.5, 15 and 30i.u. PMSG, respectively. The fertilization rate in the oocytes stimulated with 30i.u. PMSG was significantly lower than that for the oocytes stimulated with 15i.u. PMSG ( $\chi^2=12.4$ ,  $P<0.01$ ). The rates of polyspermy were 14.3, 17.7 and 27.5% in the oocytes obtained from females treated with 7.5, 15 and 30i.u. PMSG, respectively. These results suggest that excessive stimulation of ovaries with PMSG may increase the incidence of oocytes with low fertilizability.

### Introduction

Since the first report of successful fertilization in vitro of intact rat eggs with epididymal spermatozoa<sup>1)</sup>, various conditions for the capacitation of spermatozoa and the fertilization of rat eggs in vitro have been reported.<sup>2-9)</sup> Although these authors have invariably used the superovulated oocytes from immature females by the administration of exogenous gonadotrophins, it is not known whether the variation of gonadotrophin dose exerts any effect on the fertilizability of the ovulated oocytes. Very recently, Evans and

Armstrong<sup>10)</sup> have reported the reduction in fertilization rate in vitro when the oocytes were obtained from immature rats which had been induced to superovulate with PMSG. The purpose of this study was to examine the effect of PMSG dosage on the rates of fertilization and polyspermy of rat oocytes fertilized in vitro.

#### Materials and Methods

Recently ovulated oocytes were obtained from immature female rats (24-27 days old) of JCL-SD strain that had been injected subcutaneously with 7.5, 15 or 30i.u. PMSG (Peamex, Sankyo Zoki) and 56 h later with 10i.u. hCG (Puberogen, Sankyo Zoki) intraperitoneally. All different levels of PMSG stimulation were examined in each experiment. The females were killed 16 to 16.5 h after the injection of hCG. The medium used throughout this study was a chemically defined medium reported by Toyoda and Chang.<sup>1)</sup> The oocytes in cumulus were released from excised oviducts and placed in 0.4ml medium under paraffin oil at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in air.

Spermatozoa were obtained from cauda epididymidis of mature male rats (more than 30 weeks old) of the same strain and suspended into 0.5ml medium. Sperm suspensions showing large numbers of turbulence swirls were used. They usually contained  $1.0-2.5 \times 10^7$  spermatozoa/ml. After about 10 min, a small volume of the sperm suspension was introduced to 0.4 ml fertilization medium under oil in a different dish by means of a calibrated Pasteur pipette. The final sperm concentration was adjusted to  $0.4 \times 10^6$  spermatozoa/ml by changing the adding volume of original sperm suspension.

After sperm preincubation for 4.0-4.5 h, the oocytes with surrounding cumulus were introduced into the diluted sperm suspension and incubated for 7-8 h in a CO<sub>2</sub> incubator (5% CO<sub>2</sub> in air at 37°C). At the end of incubation, the oocytes were washed, mounted and stained with 0.25% lacmoid in 45% acetic acid. They were classed as 'penetrated' if a spermatozoon was inside the perivitelline space or the oocytes were undergoing fertilization. Those with more than one enlarged sperm head or male pronucleus in the vitellus were classed as 'polyspermic'. Statistical significance between the rates of fertilization was determined by  $\chi^2$ -test and the difference

in the mean numbers of supernumerary spermatozoa in polyspermic oocytes was determined by Student's t-test.

### Results and Discussion

The results are presented in Table 1. Ovulation was induced in all females except two of five rats received 7.5i.u. PMSG. The mean number of ova per ovulating animal was 7.0, 14.6 and 23.1 for the females treated with 7.5, 15 and 30i.u. PMSG, respectively. In 7.5i.u. group, all of the 21 oocytes were undergoing fertilization with two dispermy and one trispermy. But, due to small number of ovulated oocytes, the difference in either fertilization rate or polyspermy was not statistically significant as compared with 15 and 30i.u. group. The percentages of penetrated oocytes (91.9%) and of the oocytes undergoing fertilization (91.3%) in the 15i.u. group were significantly higher ( $\chi^2=5.4$ ,  $P<0.05$  and  $\chi^2=12.4$ ,  $P<0.01$ ) than those of 30i.u. group.

The rate of polyspermy showed a tendency to increase with the higher dose of PMSG; 14.3, 17.7 and 27.5% in 7.5, 15 and 30i.u. dose group, respectively. The average number of supernumerary sperm in the fertilized oocytes was 0.19, 0.19 and 0.32 in the 7.5, 15 and 30i.u. group, respectively. The mean number in the highest dose group (30i.u.) was significantly higher than that of the lower dose (15i.u.) group ( $t=2.20$ ,  $P<0.05$ ). This is in agreement with the results of Maudlin and Fraser<sup>11)</sup> which have shown in the mouse that the frequency of polyploidy was raised in proportion to increasing dose of PMSG. Austin and Braden<sup>12)</sup> and Odor and Blandau<sup>13)</sup> reported that the frequency of polyspermy in rat uterine tube was 1.2% (10/810) and 0.3% (1/336), respectively. The rate of polyspermy in the present study was much higher than those reported *in vivo*. Several factors, including sperm concentrations around the oocytes<sup>4)</sup>, maturity and postovulatory ageing of the oocytes<sup>5,6)</sup>, presence of follicle cells around the oocytes<sup>7)</sup> and culture conditions for sperm capacitation and fertilization<sup>2,3,8,9)</sup> are known to exert some influence on the rate of polyspermic fertilization *in vitro*.

It has been shown in the mouse<sup>14)</sup> that induced ovulation in immature animals may cause an increase in the incidence of abnormal

Table 1. Effect of PMSG dose on the fertilization of rat eggs in vitro

PMSG (i.u.)	No. of oocytes examined	Total	Penetrated (%)	With perivitelline sperm only	Oocytes undergoing fertilization			
					Total (%)	Mono- spermic (%)*	Polypermic	tri- spermic
7.5	21	21 (100)	0		21 (100)	18 (85.7)	2	1
15	161	148 (91.9)	1		147 (91.3)	121 (82.3)	24	2
30	208	173 (83.2)	13		160 (76.9)	116 (72.5)	38	5
								1

\* Percentage of the oocytes undergoing fertilization

oocytes with defective fertilizability. Moreover, Evans and Armstrong<sup>10)</sup> have recently shown that proportionately fewer oocytes recovered from superovulated immature rats are competent to undergo in vitro fertilization than are oocytes recovered from control rats. Further investigation is needed to clarify the cause of lowered fertilization rate and higher incidence of polyspermy in the oocytes stimulated with a high dose of PMSG.

This work was supported by a grant aided by the Ministry of Health and Welfare of Japan for research on handicapped children.

#### References

- 1) Toyoda,Y and Chang,M.C.: Fertilization of rat eggs in vitro by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. *J. Reprod. Fert.* 36, 9-22, 1974.
- 2) Toyoda,Y. and Chang,M.C.: Capacitation of epididymal spermatozoa in a medium with high K/Na ratio and cyclic AMP for the fertilization of rat eggs in vitro. *J. Reprod. Fert.* 36, 125-134, 1974.
- 3) Miyamoto,H., Toyoda,Y. and Chang,M.C.: Effect of hydrogen-ion concentration on in vitro fertilization of mouse, golden hamster and rat eggs. *Biol. Reprod.* 10, 487-493, 1974.
- 4) Niwa,K. and Chang,M.C.: Optimum sperm concentration and minimum number of spermatozoa for fertilization in vitro of rat eggs. *J. Reprod. Fert.* 40, 471-474, 1974.
- 5) Niwa,K. and Chang,M.C.: Fertilization of rat eggs in vitro at various times before and after ovulation with special reference to fertilization of ovarian oocytes matured in vitro. *J. Reprod. Fert.* 43, 435-451, 1975.
- 6) Miyamoto, H. and Ishibashi, T.: The role of calcium ions on fertilization of mouse and rat eggs in vitro. *J. Reprod. Fert.* 45, 523-526, 1975.
- 7) Miyamoto,H. and Ishibashi,T.: Effects of follicular cells and bovine serum albumin on fertilization of rat eggs in vitro. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 46, 226-229, 1975.
- 8) Kaplan,R. and Kraiser,P.F.: Effect of elevated calcium concentration on fertilization of rat oocytes in vitro. *Gamete Res.* 1, 281-285, 1978.
- 9) Quigley, M.M.: In vitro fertilization in the rat. In 'In vitro Fertilization and Embryo Transfer', pp. 77-88. Eds. E.S.E. Hafez and K. Semm. MTP Press Ltd, Lancaster, 1982.
- 10) Evans, G. and Armstrong,D.T.: Reduction in fertilization rate in vitro of oocytes from immature rats induced to superovulate. *J. Reprod. Fert.* 70, 131-135, 1984.
- 11) Maudlin, I. and Fraser, L. R.: The effect of PMSG dose on the incidence of chromosome anomalies in mouse embryos fertilized in vitro. *J. Reprod. Fert.* 50, 275-280, 1977.
- 12) Austin, C.R. and Braden, A.W.H.: An investigation of polyspermy in the rat and rabbit. *Aust. J. Biol. Sci.* 6, 674-692, 1953.
- 13) Odor, D.L. and Blandau, R.J.: Incidence of polyspermy in normal

and delayed mating in rats of the Wistar strain. Fertil. Steril. 7, 456-467, 1956.

- 14) Minato, Y. and Toyoda, Y.: Immature tubal ova in PMSG treated and PMSG-hCG treated prepuberal mice and fertilization of these ova by epididymal spermatozoa in vitro. Japan. J. Anim. Reprod. 26, 81-88, 1980.

体外受精におけるラット卵子の受精率  
および多精子受精率におよぼす  
PMSG投与量の影響

豊田 裕 杉本 正仁

北里大学獣医畜産学部

JCL-SD系幼若雌ラット(24-27日齢)に7.5, 15または30IU PMSGと10IU HCGを5時間間隔で投与し、HCG投与16-16.5時間後に卵管膨大部より卵子を採取し、体外受精によって受精能を検討した。精子は同系統の成熟雄(30週齢以上)の精巢上体尾部から採取し、0.4×10 精子/mlとなるように希釈し4.0-4.5時間プレインキュベートした。卵子は卵丘細胞層に包まれたままの状態で精子液中へ導入後7-8時間に透明帶への精子侵入、卵細胞質内の精子の有無および多精子受精について位相差顕微鏡下で検査した。7.5, 15および30IU PMSG投与区における平均排卵数は、7.0, 14.6および23.1であった。受精率は、それぞれ100%、91.3および76.9%であり、30IU投与区は15IU区に比べて有意に低い値であった。多精子受精率は、それぞれの投与区で14.3, 17.7および27.5%で、投与量の増加に伴って上昇する傾向を示した。これらの結果から、PMSGによる卵巢の過度の刺激は、排卵卵子の受精能力を低下させることが示唆された。

## 編 集 後 記

本年4月研究会の発足と共に、会誌の発刊に関して春は講演要旨を、秋は投稿論文を掲載し、年2回発行を目標として検討してきましたが、幸い多くの方々が入会され、未確定な資金の目安がつきましたので、とりあえず在京幹事で臨時編集委員会をつくり、時間的問題を考慮して、甚だ独断的と存じますが、主な幹事に論文を推せん頂き、スタートにふさわしい模範研究会誌を編集し、皆様にお届けすることにしました。来年4月には正式に編集委員会を発足し、広く会員投稿論文を募集致しますので、今回の処置を御理解頂き、今後共御協力の程お願い申しあげます。

(大 槻 清 彦)

### 編 集 委 員

委 員 長：大 槻 清 彦

委 員：岩 城 章 石 島 芳 郎 鈴 木 秋 悅  
花 田 章 遠 藤 克

### 哺 乳 動 物 卵 子 研 究 会 誌

Journal of Mammalian Ova Research

第 1 卷 第 2 号

Vol. 1

No. 2

昭和59年9月25日 印刷

(会 員 頒 布)

昭和59年10月1日 発行

発行者 哺乳動物卵子研究会  
代表 佐久間勇次

発行所 哺乳動物卵子研究会  
〒252 藤沢市龜井野1866  
日本大学農獣医学部獣医生理学教室内  
Tel 0466-81-6241(内332)  
郵便振替 横浜 8-20350

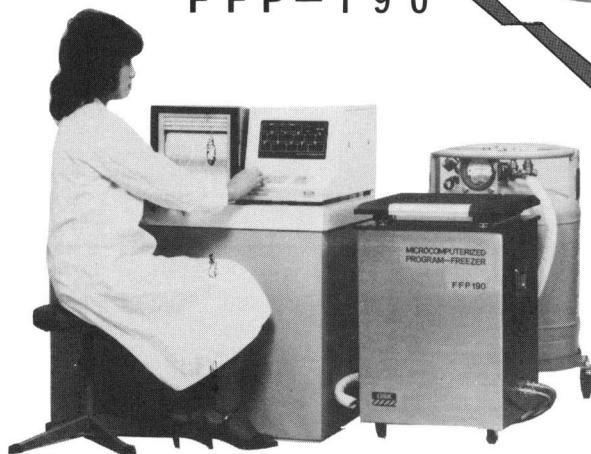
印刷所 誠和印刷株式会社  
住 所 藤沢市城南5丁目2番8号  
電 話 0466-34-9110(代表)



# 明日の人工授精を育てる— ダイサンの凍結・保存機器

受精卵の  
凍結保存に

マイコン式  
プログラム フリーザー  
**FFP-190**



総発売元

**ダイサン容器株式会社**

本 社 大阪市西淀川区歌島 2-12-4  
電話 大阪(06)471-0798 〒555  
東京営業所 東京都港区芝公園 2-4-1  
(秀和芝パークビル 3F)  
電和 東京(03)434-2935 〒105  
大阪営業所 大阪市西淀川区歌島 2-12-4  
電話 大阪(06)474-4120 〒555  
熊本営業所 熊本市保田窪 2-1-53  
(中村ビル 1F)  
電話 熊本(0963)82-2132 〒862



受精卵・精子の保存に  
**ダリック  
DALIC**

[実用新案出願中]

製造元

**OSK**

**大阪酸素工業株式会社**

本 社 大阪市西淀川区歌島 2-12-4  
電話 大阪(06)472-1181 〒555  
守山工場 守山市勝部町1095  
電話 守山(0775)82-3773 〒524

# 繁殖障害の治療と 卵子移植のときに!

プロスタグランジンF<sub>2α</sub>製剤

要指示医薬品

(動物用医薬品)

# パナセラン・F液

共済薬価基準表収載品

## [効能・効果]

牛：性周期の同調

黄体退行遅延に基づく卵巢疾患の治療

馬：性周期における黄体期の短縮

黄体退行遅延に基づく卵巢疾患の治療

豚：無発情の治療（黄体の退行遅延ないし遺残に基づくもの）

## [用法・用量]

牛：本品は子宮内注入または筋肉内注射します。

〈子宮内注入法〉……従来通り。

〈注射法〉

性周期の同調及び卵巢疾患の治療には

通常ジノプロストとして12～15mgを1回筋肉内に注射します。

馬：黄体期の短縮及び卵巢疾患の治療には

通常ジノプロストとして3～6mgを1回筋肉内に注射します。

豚：無発情の治療には

通常ジノプロストとして6mgを1回筋肉内に注射します。

## [貯法] 室温・しゃ光保存

## [包装] 12mg/6ml×5V・30mg/15ml×5V

○ 詳細は商品添付の説明書をご参照ください。

発売元

第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋三丁目14番10号



製造元

富士薬品工業株式会社 富山県高岡市長慶寺530番地



日本薬局方 注射用胎盤性性腺刺激ホルモン

動物  
専用

プロベロゲン®

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



三共ソーキ株式会社

東京都中央区日本橋本町4-15

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。



使用上の注意等については添付文書をよくご覧ください

【効能・効果】

間脳性(視床下部性)無月経、下垂体性無月経の排卵誘発

【用法・用量】

1日卵胞成熟ホルモンとして75~150国際単位を連続筋肉内投与し、頸管粘液量が約300mm<sup>3</sup>以上、羊歯状形成(結晶化)が第3度の所見を指標として(4日~20日、通常5日~10日間)、胎盤性性腺刺激ホルモンに切りえる。

【包装】

パーゴナル注75:10管  
パーゴナル注150:10管



日本器械製薬株式会社  
東京都港区赤坂二丁目5番1号

# 繁殖障害に!!



(家畜共済診療点数採用)

要指示医薬品

動物用  
医薬品

# アントリン

前葉性卵胞刺激  
ホルモン剤

特長

- 米国アーマー社との技術提携によって製造された新しい前葉性のFSH剤です。  
(アーマー社のFSHは世界で最初のFSH標準品に採用されています。)
- FSH成分を主に含有し、卵胞の発育、排卵、黄体化作用を有します。
- HCG又は、PMSGで無効或いは不的確な繁殖障害牛にも有効です。

適応症

牛・馬：卵胞のう腫、排卵障害、卵胞発育障害  
(卵巣発育不全、卵巣静止、卵巣萎縮)

包装

10アーマー単位(A.U.) 20アーマー単位(A.U.)  
40アーマー単位(A.U.) 溶解液付



テンカ製薬株式会社

(旧東芝製薬株式会社)

神奈川県川崎市川崎区中瀬3-19-11

☎(044)288-1391(代)

〒210

PROGRESS IN VETERINARY SCIENCE 1984

創刊 毎年1回発行

# 獣 医 学

# 1984

編集主幹/伊沢久夫 清水悠紀臣

B5判 256頁 図98 表53 定価5,000円

わが国の獣医学研究は、世界に誇る数々の業績を残しながら、目覚ましい進歩を続けている。加えて、獣医学の研究・技術に対する社会の期待と要求は最近、とみに高まり、その内容も多様化している。

本書発刊の目的は、細分化し専門化しているわが国獣医学の、個々の分野における最も優れた研究業績を国内外の研究成果とともに紹介し、合わせて獣医学の将来を展望することにある。それゆえ本書により、同一専門分野はもとより異なる専門分野にある獣医学研究者、さらには獣医学の関連領域にいる研究者は各分野の優れた最新の研究情報を的確・迅速に効率よく、しかも体系化された形で修得できる。

目次より▶抗原刺激とリンパ節の食細胞(杉村 誠・橋本善春) / 反応性の胃運動と、その自律神経支配(中里幸和・大賀 真) / 実験動物感染病への対応—経緯と現状—(藤原公策) / 腸内細菌の異常性状とプラスミド(佐藤義平・石黒直隆) / マレック病の免疫(見上 雄) / 広東住血線虫における宿主特異性と好酸球(吉村堅太郎) / 家畜繁殖学領域における人為的支配(金川弘司)

# 牛の受精卵移植

金川弘司編著 B5判 200頁 定価2,600円

牛受精卵の人為的分割まで最新の情報と技術をまとめ、将来を展望するとともに、実際に受精卵移植を行うにあたっての心構え、器具から具体的な手技を、図と写真を豊富に用いてわかりやすく解説。関係法規併載。

# 家畜臨床生化学<第三版>

J. J. KANEKO 編 久保周一郎

伊沢久夫 監訳

戸尾祺明彦

本書は単なる生化学の解説書ではない。現在まで提出された研究者の豊富なデータに、著者らの追試したデータを加え、臨床生化学の基礎から応用、展望に至るまで、種差、個体差について言及しながら、家畜の臨床生化学を体系づけた唯一の成書である。

A5判 950頁 定価17,000円

●詳細内容見本贈呈●



近代出版

〒150 東京都渋谷区渋谷1-10-1

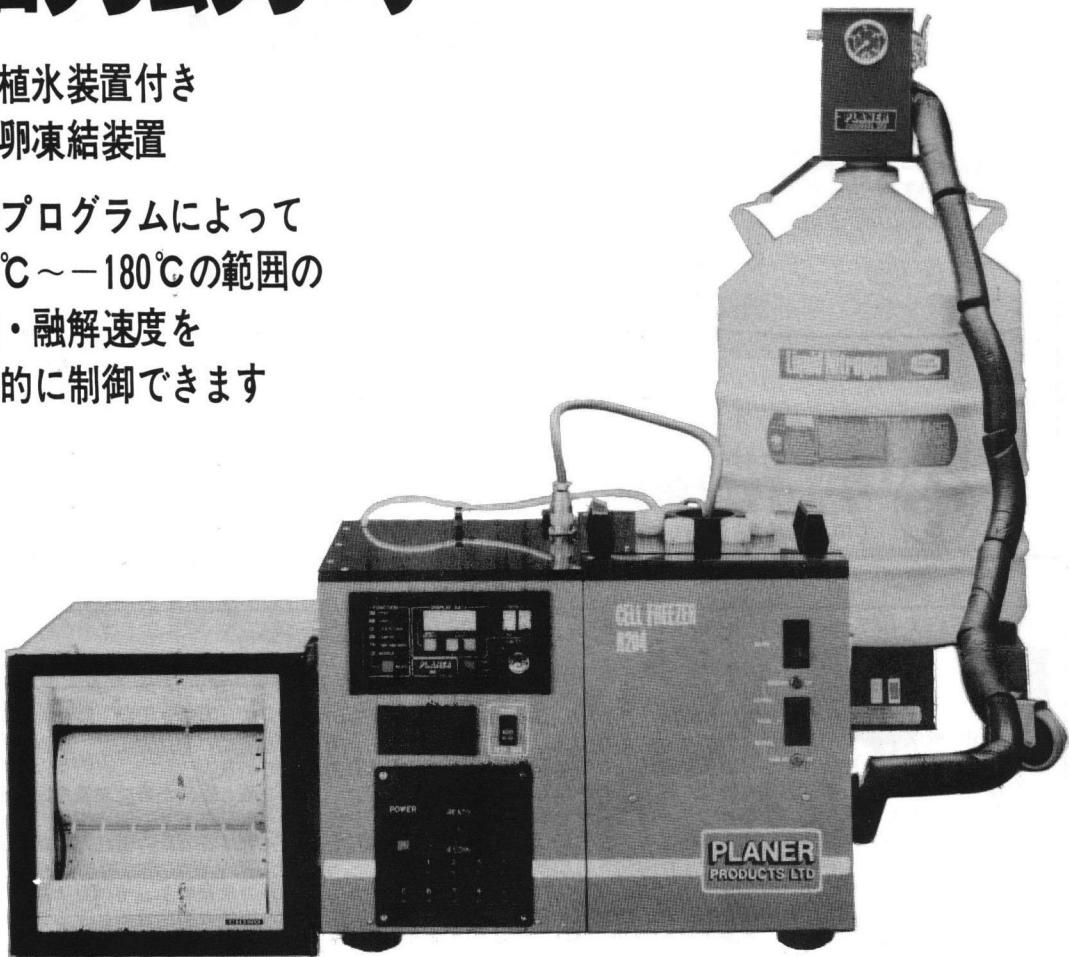
☎03(499)5191 搭替 東京9-168223

# PLANER CELL FREEZER R204

## プログラムフリーザ

自動植氷装置付き  
受精卵凍結装置

電子プログラムによって  
+40°C ~ -180°C の範囲の  
凍結・融解速度を  
自動的に制御できます



英国プランー社が ケンブリッジ大学ポルジー教授の指導のもとに開発したもので 現在同社製のフリーザー 200基以上が 世界各国で使用されており 動物の胚の凍結・融解に活用されています

輸入 朝日ライサイエンス株式会社  
〒102 東京都千代田区二番町9番地3  
電話(03)265-5031(代)

販売 富士平工業株式会社  
〒113 東京都文京区本郷6丁目11番6号  
電話(03)812-2271(代表)



# 住友の動物用医薬品

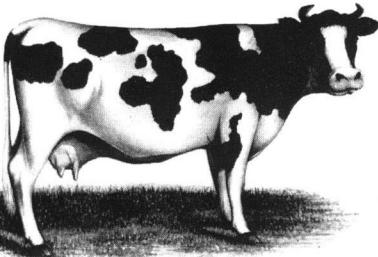
プロスタグランジンF<sub>2α</sub>類縁体製剤

[要指示医薬品]

## エストラメイト

<20ml>

[クロプロステノールナトリウム……0.263mg/ml]



性周期の同調

黄体退行遅延に基づく卵巣疾患の治療

- ・微量の筋注で効力を發揮します。

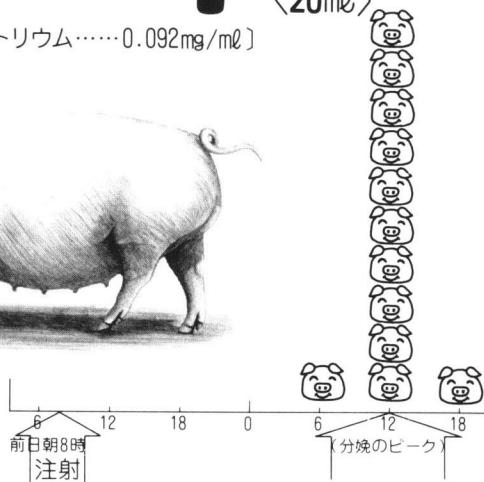
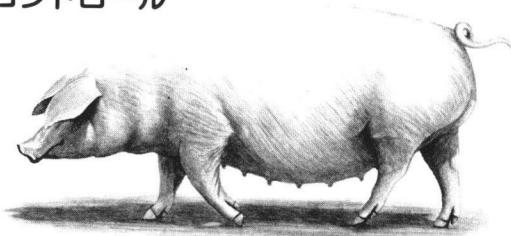
- ・安定で常温保存出来ます。

## プラネット

<20ml>

[クロプロステノールナトリウム……0.092mg/ml]

確かな分娩コントロール



発売元



住友化学工業株式会社 医薬事業部

大阪市東区道修町2丁目40 TEL 06(202)0051  
東京都中央区日本橋2丁目7-9 TEL 03(278)7354

提携先



インペリアル・ケミカル・インダストリーズ  
ピーエルシー(英國I.C.I.社)

