

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

# ビフィズス効果 と タウリン配合

ビフィズス効果でおなかをガード  
タウリン配合ですこやか成長

森永BFT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ふやすラクチュロースをはじめ、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BFT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、どうぞご愛用ください。

新発売



森永乳業

森永 **BFT** 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

**コンセラル®** 注射液

牛の卵胞のう腫、排卵障害、  
卵巢静止の治療、排卵促進に

(要指示)

製造発売元

武田薬品工業株式会社

提携

帝国臓器製薬株式会社



## 第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<sup>し</sup>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、中途に於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<sup>はか</sup>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。

以上先生の先覚者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ア精神にのっとり、新天地の開拓に努むべきであらう。





### 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 4 3	昭和 2 6 年 8 月	アメリカ合衆国へ出張
生年月日	大正 2 年 6 月 1 7 日生	昭和 2 6 年 1 2 月	医学博士の学位を授与される
昭和 1 3 年 3 月	東京帝国大学医学部医学科卒業	昭和 3 2 年 6 月	東京大学助教授
昭和 2 2 年 3 月	復員	昭和 3 4 年 1 月	東邦大学教授
昭和 2 2 年 8 月	東京医学歯学専門学校講師を嘱託される	昭和 4 6 年 1 0 月	第 7 国際不妊学会事務総長担当
昭和 2 2 年 9 月	文部教官	昭和 4 9 年 1 0 月	日本不妊学会副理事長
昭和 2 4 年 1 2 月	東京大学講師	昭和 5 2 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馨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ったわけですが、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膣式手術、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りました。内視鏡は最初のうちは純臨床的な病変の観察のみであって、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 になってい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 Riode 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えております。以上のように現在 Human Reroduction 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で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チベータ活性

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 毅・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

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 Microscopic Study.

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

Chromosomal Sex Determination of Bovine Embryos.

HISHINUMA, M., H. KANAGAWA, K. UTAKA, 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 佑

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。

### 1. 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<sup>13-17)</sup>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や遅い転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%<sup>18-20)</sup>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ー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、受精卵移植事業を営んでいる。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>2)</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
Stephoe & Edwards (1978)	人の受精卵移植に成功、初めての子供が生まれる。	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、国の方針として、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に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、近年プロスタグランディン  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) 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は、性腺刺激ホルモン処置に  $PGF_{2\alpha}$  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 日後に 20~25mg 以上の  $PGF_{2\alpha}$  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。

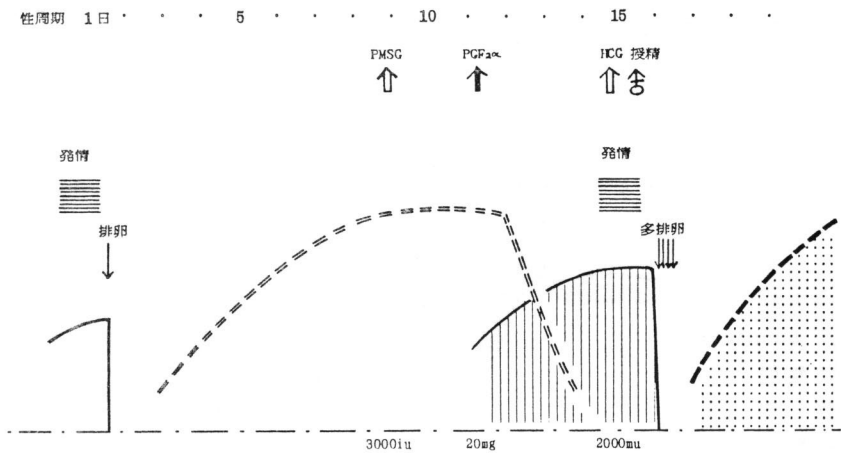


図-1  $PGF_{2\alpha}$  併用によるウシの多排卵誘起処置

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		排 卵 促 進	
	F S H (mg)	PMSG (IU)	LH (mg)	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	1 8	3	5	8					
3	1 6	7	2	1					
4		3	7	6					
4 ~ 8	1 3	1 1	1 8	3					
8	5 3	1 4	1 1	7					
8 ~ 1 6		4 6	2 6	6					
1 6		1 5	7	1 0					
早期 桑実 期		2	1 2	2 0	2 4	1 6	9	3	
桑実期 compact			1 3	3 5	4 1	2 8	1 2	1 2	
早期 胚盤 胞				4	2 1	2 8	2 0	1 9	1 7
胚 盤 胞					1 4	2 0	3 6	2 5	2 5
膨大 胚盤 胞						8	2 3	3 8	2 8
胚盤胞 zona-free						0.2		4	3 0

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經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发育できる環境は、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<sup>8)</sup>された。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、これを使用し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生産した。<sup>21-22)</sup>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、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った。<sup>23-28)</sup>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、少量の液と一諸に受精卵を注入する。注入管の挿入に当っては、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<sup>て一致していないと、受胎は望みがたい。</sup>しかし受精卵を採取した時の状態で長期間保存できると、受け入れる雌の発情後の経過を待っ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可能になるので、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℃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<sup>9)</sup>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℃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、家兎などの各家畜で多数の子が生産されるようになった。<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

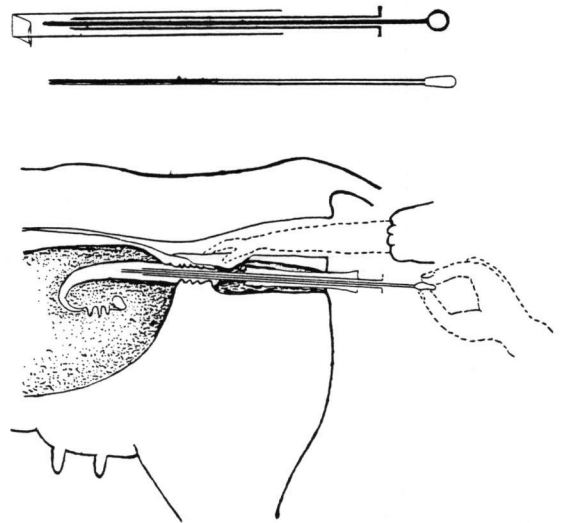


図-2 ウシの受精卵移植法



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、

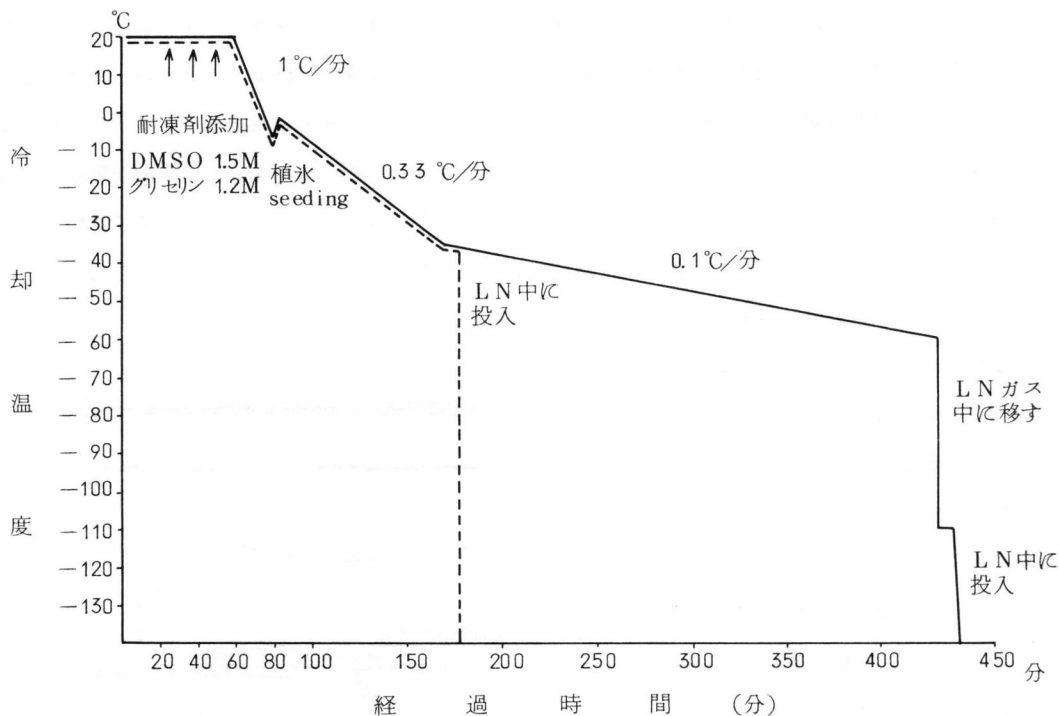


図-3 家畜の受精卵凍結における冷却法

ー60～ー80℃の低温域まで比較的緩慢に冷却してからー196℃のLN中に浸漬する方法(実線)と、ー35～ー45℃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。すなわちー60℃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。しかしー35～ー45℃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、すぐに37～40℃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なければならないと言う、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ンディン  $\text{F}_{2\alpha}$  ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) 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  $\text{PGF}_{2\alpha}$  を  $5\text{mg}$  ずつ 24 時間間隔で 2 回、計  $10\text{mg}$ 、あるいは  $15\text{mg}$  以上を 1 回筋肉内に注射するか、 $\text{PGF}_{2\alpha}$  アナログ  $0.2\text{mg}$  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  $3\text{mg}$  以上の  $\text{PGF}_{2\alpha}$  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  $\text{PGF}_{2\alpha}$  あるいは、そのアナロ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  $\text{PGF}_{2\alpha}$  を用いた発情期調整技術と、前述のホルモン処置に  $\text{PGF}_{2\alpha}$  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、健全に发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  $70\sim 80\%$  の受胎率<sup>14-17)</sup> 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、時間的に遅くなる。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良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. 受精卵の发育程度

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<sup>46)</sup> まで、またウシでは排卵後 16 日の胚盤胞<sup>15)</sup> まで、<sup>40)</sup> いずれの細胞期のものでも、その发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-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	15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发育したもの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 - 发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 早期 桑実期	发育 桑実期	ステ ージ 早期 胚盤胞	胚盤胞	膨大 胚盤胞	Zona-free 胚
開 腹 手 術								
Rowson 外 (1969) <sup>18)</sup>	53	29	43					
Schneider 外 (1980) <sup>47)</sup>			61	67	67	71		
非 開 腹								
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、その发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。したがって若い发育過程の受精卵は卵管に、发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場合の方が、受胎率ははるかに高い。<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。<sup>52-54)</sup> 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	90		65
	2 卵 1 側	80		
Rowe 外 (1980) <sup>58)</sup>	開腹手術 1 卵	60	45	
	非開腹 1 卵		75	
Boland 外 (1976) <sup>56)</sup>	開腹手術 1 卵	40		
	非開腹 1 卵			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<sup>17,59,60)</sup><sup>62)</sup><sup>63)</sup>なる。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、<sup>61)</sup>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、移植卵から發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、多くの問題があって、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ま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は確立し、実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観がある。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別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。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>64-72)</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、桑実期や胚盤胞に发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。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)<sup>78)</sup> 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、いずれも胚盤胞に发育した受精卵の 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> Mintz (1962)<sup>80)</sup> ら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。異種動物間のキメラ胚は Zeilmaker (1973)<sup>81)</sup> Stern (1973)<sup>82)</sup> Mulnard (1973)<sup>83)</sup> によって作られ、培養で发育するまでになったが、異種キメラ動物は Rossant ら (1980)<sup>84)</sup> が初めて作出した。また最近家畜でもヒツジとヤギのキメラ動物が Fehilly & Willadsen (1984)<sup>85)</sup>、Meinecke - Tillmann ら (1984)<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、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 Palmiter ら (1982)<sup>12)</sup> によって報告され、センセー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、受精卵移植に関連する技術の改善が進出に従って、顕微操作技術もさらに一層使い易く改善され、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 估, 相馬 正, 大沼秀男 : 家畜繁殖誌 10, 124 (1965)
- 9) Whittingham, 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 估, 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 估ほか : 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, 研究成果シリーズ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 估, 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 估 : 蓄誌年報 14, 87 (1976)
- 34) 杉江 估, 相馬 正, 水落一雄 : 蓄誌研報 33, 7 (1978)
- 35) 杉江 估, 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) Elsdon, 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., Martnus 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℃ 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巣を摘出し、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℃ 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℃ で一晚洗浄した後、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℃ 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)

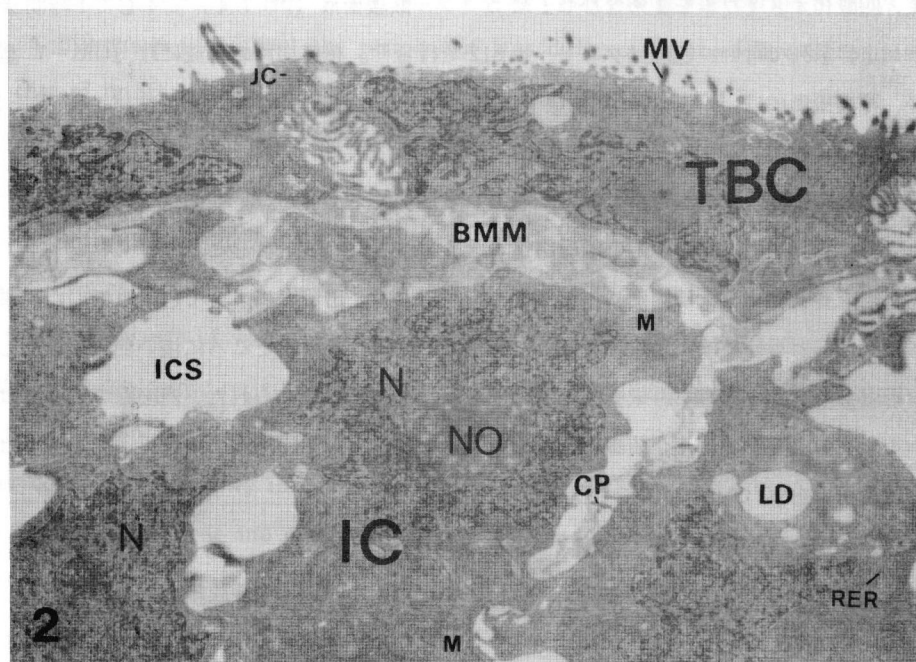
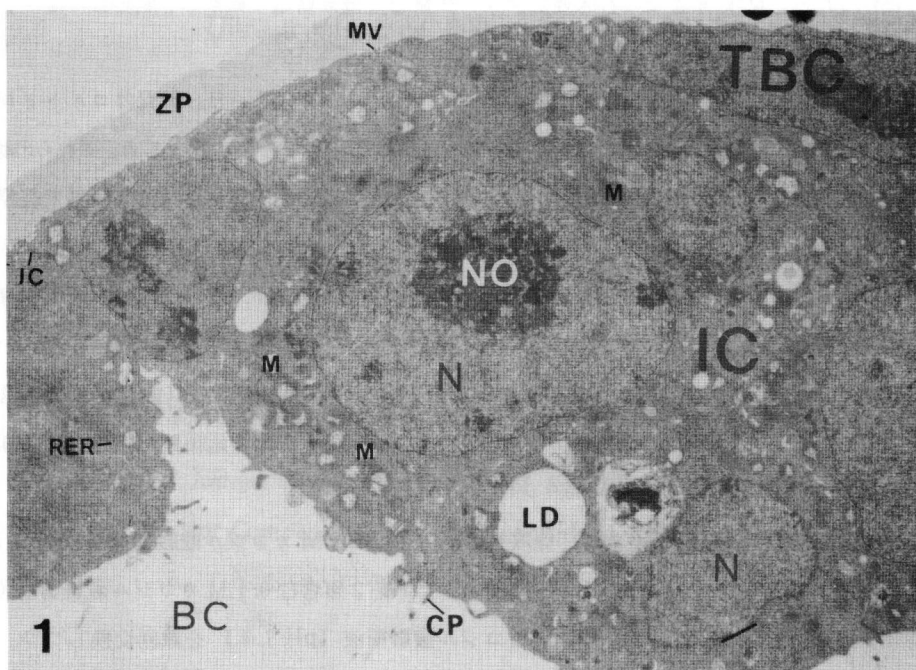
胚盤胞は扁平な栄養膜細胞とほぼ円形の内細胞からなっており、透明帯によって包まれていた。栄養膜細胞の外側表面には倒伏した短い微絨毛が生えており、微絨毛の間にはところどころに浅い陥入が存在していた。内側表面には細胞質突起がみられた。栄養膜細胞の間には接合装置が認められた。内細胞の表面には細胞質突起がみられ、これらの細胞の間に接合装置は存在しなかった。核は栄養膜細胞では扁平、内細胞ではほぼ円形

## 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ったが、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陥入がみられた。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、核膜の陥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った。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った。粗面小胞体は無処置のものと同じく槽状であったが、数は少なかった。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った。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った。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った。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った。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、上記の特徴のほかに、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

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. AITKEN, R. J.: Ultrastructure of the blastocyst and endometrium of the roe deer (*Capreolus capreolus*) during delayed implantation. J. Anat., **119**, 369-384, 1975.
5. 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.
6. NILSSON, O.: The morphology of blastocyst implantation. J. Reprod. Fert., **39**, 187-194, 1974.
7. 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  $2\mu\text{l}$  medium drops containing 0.1% fibrin and 2  $\text{cu/ml}$  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  $\mu\text{l}$  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生まれ、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<sup>1)</sup>解明された。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の課題である。

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えられる。

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<sup>5)</sup>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効に作用しているのではないかと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<sup>6)</sup> (BWW)

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 ペトリ皿: 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  $\mu$ l 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ペトリ皿の底に、BWW小滴を8ヶずつ作製し、

それぞれの内部で day1~4 の卵 1 枚を培養した (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℃ で 20 分間インキュベートして後、10% 酢酸 1 ml と

1. BWW に Fbg 0.2% と Plg 4cu/ml を加えた培養液を 1  $\mu$ l ずつ、底面に配置する。
2. 卵を 1 枚ずつ、それぞれの培養液小滴に入れる。
3. 培養液小滴の各々に、BWW に Tb 0.5U/ml を加えた培養液を 1  $\mu$ l ずつ追加する。以上の操作により、2  $\mu$ l のフィブリン (Fb) 小滴 (Fb 0.1%, Plg 2cu/ml, Tb 0.25u/ml) 内部に卵が閉じこめられた状態にして、37℃、CO<sub>2</sub> 5%、水蒸気飽和の状態 で 24 時間インキュベートした。

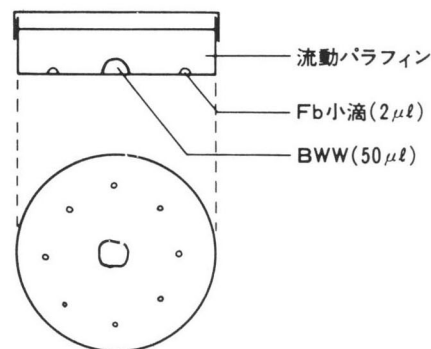


図 1 Fb 小滴内培養

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

スタンダード F b 小滴中に現れた PA 活性を産生された P l 量に換算するために、Plg を、0.05M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4 NaCl 0.15M) に 10cu/ml に溶解し、その 1 ml に UK 2000 I.U./ml 溶液を 10  $\mu$ l/ml 加え (最終濃度 20 I.U./ml)、37℃ に 4 時間インキュベートした。得られたプラスミン (P l) 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)。PA 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 (Tb を欠くもの) では P l 産生によって測定した。

F b 平板による PA 検出 Plg 含有と非含有の Fb 平板を作製し、day2~3 卵 (胞胚) の PA 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

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

表 1 各成分を欠く培養液

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 PA を F b 平板で測定する方式とを行なった。F b 平板は、Plg (2cu/ml) 含有または非含有の Fbg 溶液 (0.1%) 1 ml と Tb 水溶液 (100u/ml) 5  $\mu$ l を 0℃ に冷却して混合し、直ちにペトリ皿に注いで 37℃ 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ンしてから 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。

## 結果

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

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

Day 1 20:00 Pl 検出不能、day 2 20:00  $0.037 \pm 0.017$ mcu (mean  $\pm$  S.D., 以下同様)、day 3 2:00  $0.215 \pm 0.041$ mcu、day 3 22:00  $0.335 \pm 0.039$ mcu と、day 3 の終わりまでは、次第に Pl 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 Pl 産生能を検出できなかった。

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

/ : 判定もしくは測定不能

	Fb 平板	Plg-rich	Plg-free
検体			
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 2 Day 3 桑実胚の線溶活性

表 3 Day 3 桑実胚の線溶活性

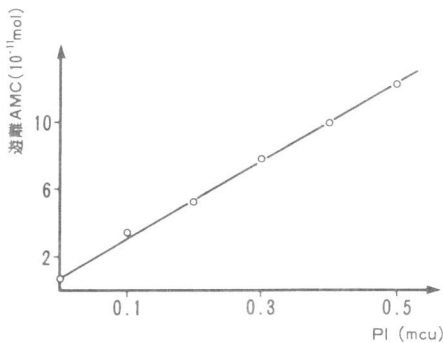


図 2 Pl スタンダード

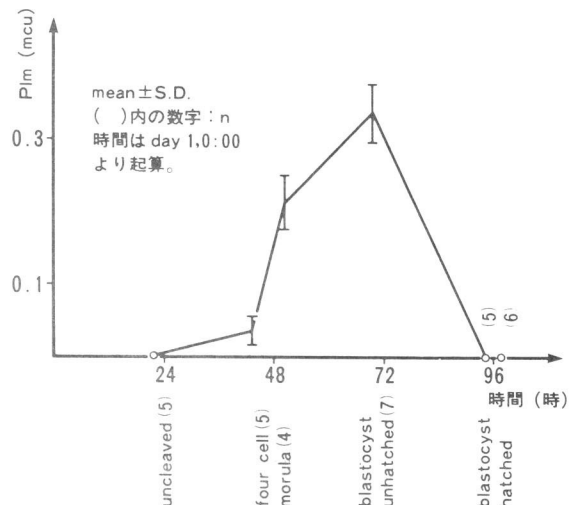


図 3 発生段階と Pl 産生



# 考察

初期胚はPlgからPlをつくり、また、Plg存在下でのみFb分解を行ったので、PA活性を持つが直接のFb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Plg含有Fb平板にのせた場合ばかりでなく、培養後のメジウムをPlg含有Fb平板にのせてもFb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。Fb平板の溶解面積の対数とPl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、Fb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、FbまたはFbgがあるとき、活性の増強がみられ、特にFb存在下で著しい<sup>10)</sup>(表4)。これはTPAがPlgに作用する効率を高めるための反応の場をFbが提供するためと考えられている<sup>10)</sup>。UK活性にはFbやFbgの存在は影響しない。初期胚のPl産生はFbまたはFbg存在下でのみ検出され、Fbの系はFbgの系の10倍以上のPlを産生した。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。Fb、Fbg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。

基質 共存因子	Glu-Plg	Lys-Plg
—	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 ( $\mu$ M)  
下段: kcat ( $s^{-1}$ )

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

さまざまな段階の初期胚を用いてPl産生を測定し、day3(胞胚、透明帯あり)をピークとするPl産生がみられたが、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きは特に、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PlのFb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。胞胚期以後の代謝活発な卵にとっては、培養の条件が好適でなかったと考えられる。つぎにFb小滴を液化させてこのなかのPlを測定するという方式についてであるが、PA活性はFbの存在下で著しく増強される<sup>10)</sup>ので、Fb分解の程度により一定量PAあたりのPl産生効率は経時

的に変化し、したがって、P1産生量はPA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PA放出能をもち、その活性はday3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PA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. Bacteriol. 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 “繊維素溶解現象とは” 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 毅, 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、最近では電頭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。しかし電頭を用いた観察では多数の精子における一般的变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-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頭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頭観察が充分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顕微鏡および透過型ノマルスキー微分干渉顕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 mBWW 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 mBWW 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 分間速沈を 2 回行い精漿成分を除いて高濃度精子浮遊液(精子濃度  $1 \sim 1.5 \times 10^8 / \text{ml}$ )を作製した。これを上記 mBWW 液で精子濃度が  $10 \sim 15 \times 10^6 / \text{ml}$  とするよう希釈し、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% hyarulonidase 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 mBWW 液 500 μl を加え mineral oil で被ったのち、上記高濃度精子浮遊液と卵を加え、30 分ないし 60 分間 co-incubation を行った。次に卵を取り出し、mBWW 液で洗浄後、スライドガ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テルオイルで被い、培養液の蒸発を防ぐようにした。観察には、OLYMPUS-BH2 (位相差顕微

鏡および透過型ノマルスキー微分干渉顕微鏡)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  $1/3$  にクサビ状の陥入像が出現し (Stage Ib), やがてこの左右の陥入が連続してくる (Stage Ib'), この時期では陥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に見える (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), ノマルスキー微分干渉顕微鏡 (以下ノマルスキーと略す) 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), ノマルスキー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)。ノマルスキー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ので (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陥入が生じ, 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,<sup>1)</sup> 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。

後帽部両側陥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 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におい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楕円輪状構造を認め、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—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

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) Soupert, 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 Embryology* (Daniel, J.C., Eds). Freeman, San Francisco, 1971.
- 18) 星 和彦, 長池文康, 桃野耕太郎, 対木 章, 斉藤 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 毅, 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 毅, 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 Calumodulin 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

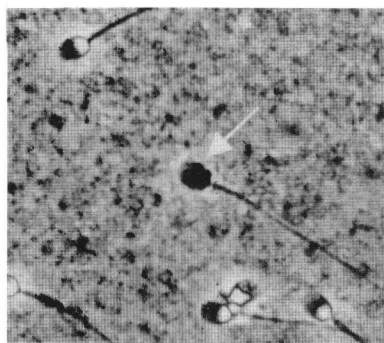


Fig 1(Stage Ia): 写真中央の黒い精子(矢印)が膨化直前の精子である。他の卵表面付着精子後帽部が白色なのに対し, 膨化直前の精子では後帽部は黒くなる(位相差顕微鏡による。以下特記してなければ位相差による写真)。

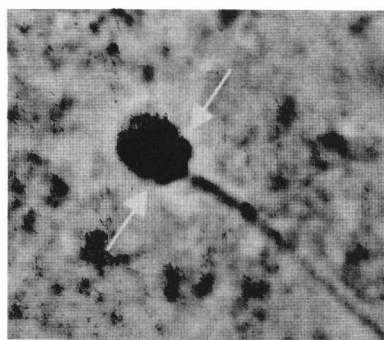


Fig. 2, (Stage Ib): 次いで後帽部中央乃至前 $\frac{1}{3}$ の側方に陥凹が生ずる(矢印)。

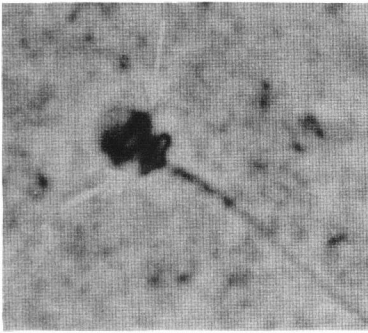


Fig. 3.(Stage Ib'): 陥凹は中央で連続して後帽部を2分するようになる(太矢印)。この頃には同部位の周辺に明い領域(halo構造)が認められる(細矢印)。

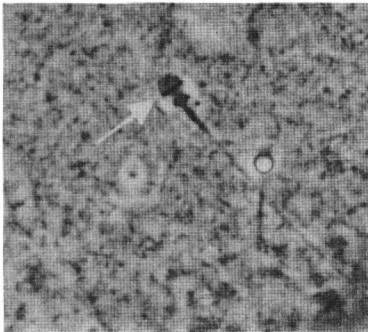


Fig. 4.(Stage IC): halo構造が後帽部周囲全体に認められるようになる(矢印)。先体部に比べて後帽部では膨化がより速く進んでいる。

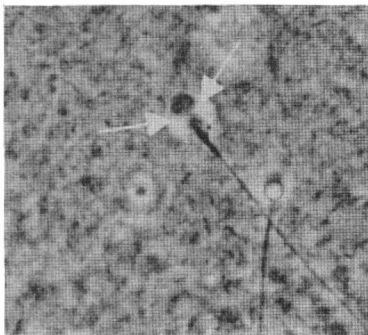


Fig. 5(Stage Id): halo構造はさらに先体領域にも拡大し、精子頭部全体を被うようになる(矢印)。

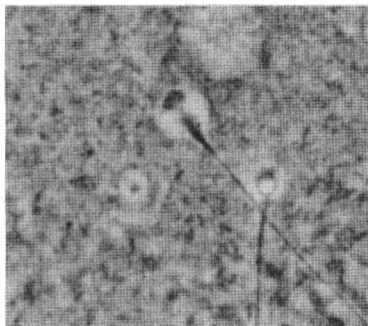


Fig. 6 (Stage Ie): 先体部先端は三ヶ月状に形を変え、その両端には黒い点が認められる。



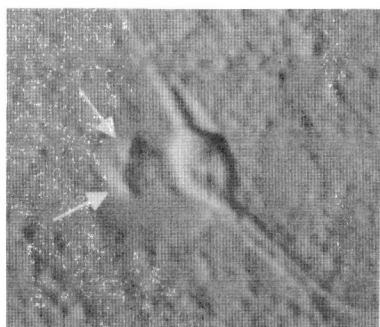


Fig. 7 (Stage Ie'): halo 構造の中央に精子先体部がある。この両側には隆起構造 (矢印) が認められ、前図での黒い点に対応するものである。(ノマルスキーによる)

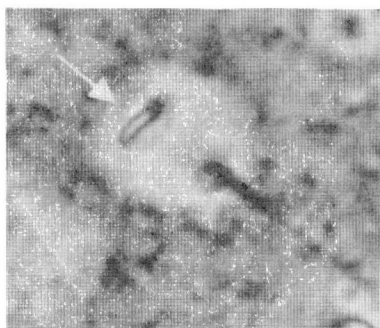


Fig. 8 (Stage IIa): 精子先体部先端が消失した直後、その該当部位に楕円輪状構造 (矢印) が認められるようになる。

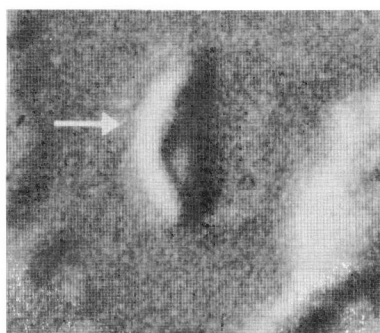


Fig. 9 (Stage IIa'): 左上方に三ヶ月状の構造 (矢印) が認められる。この中央に陥凹した部位があり、楕円輪状構造内部に対応するものである (ノマルスキー)



Fig. 10 (Stage IIb): 楕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。

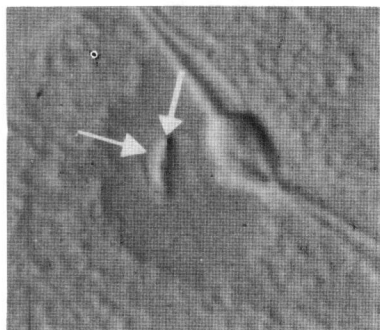


Fig. 11(Stage IIb'): 膨化した頭部の中に隆起状構造 (太矢印) が認められ, これは位相差での楕円輪状構造の線状化の図と対応している。さらに, その周囲にも輪状構造 (細矢印) が認められている (ノマルスキー)。

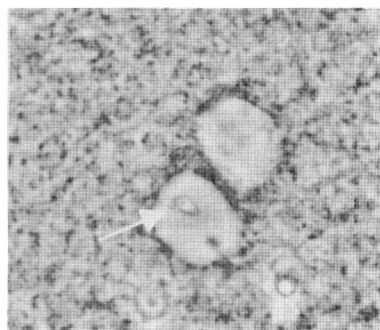


Fig. 12(Stage IIc, IIIa): 楕円輪状構造はすでに消失し, 周囲輪状構造 (矢印) のみが残っている。なお上方には Stage IIIa の精子頭部が認められる。

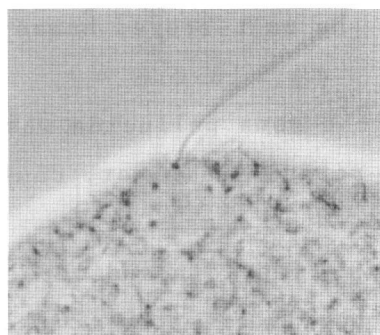
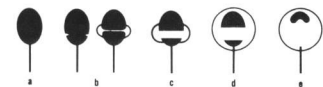


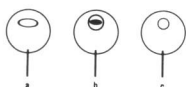
Fig. 13(Stage IIIb): 尾部を伴った膨化頭部内に核小体が認められる。この後, 尾部の離断, 核小体の成長が生ずる。

Illustrations of the process  
in human sperm chromatin decandensation.

Stage I



Stage II



Stage III

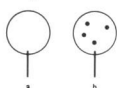


Fig. 14: 模式図

注: Stage Ia→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・斉藤 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。

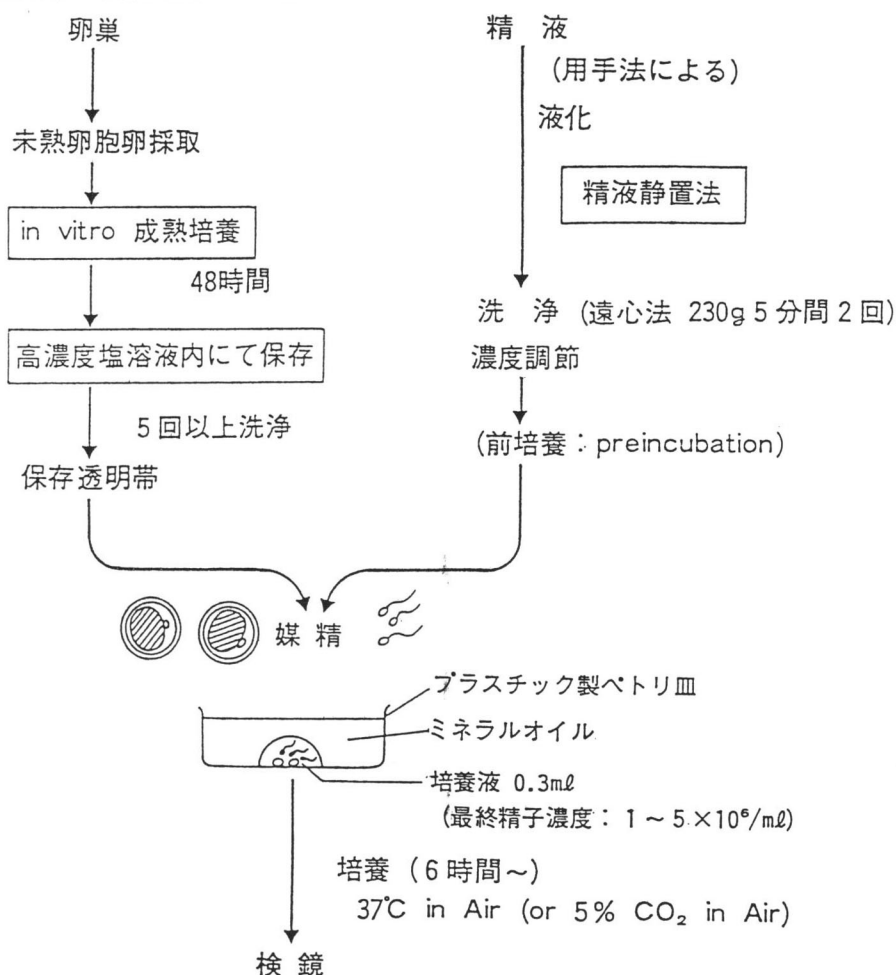
もし精子-卵結合が特別に糖同志あるいは糖と蛋白の関係の結果とすれば、構造的に関連のある物質の過剰状態で精子-卵結合が阻害されるはずである。そこでわれわれは、in vitro においてヒト精子の透明帯への接着状態を観察し、接着に与える各種糖の影響を検討した。

## 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) 中で細切り、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 (0.5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> + 1 M 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

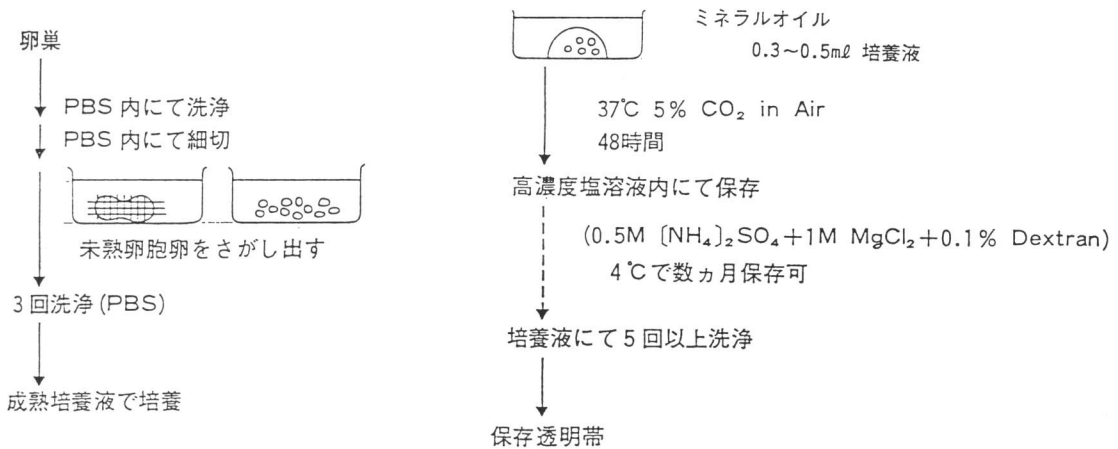
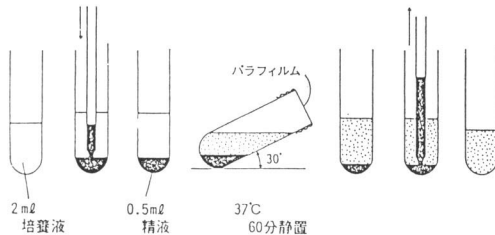


図3 精液静置法



#### 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—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  $1 \sim 5 \times 10^6 / \text{ml}$  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(±), 透明帯の輪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 単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単糖類を入れ、ヒト精子の透明帯接着に及ぼす影響を観察した。14種類の単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。

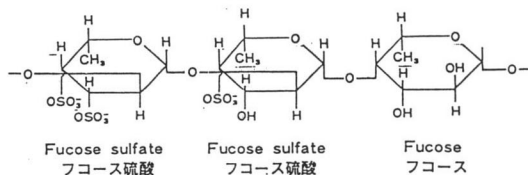
表3 精子—透明帯接着に対する単糖類の影響

単 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-Acetylneuraminic 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)		++

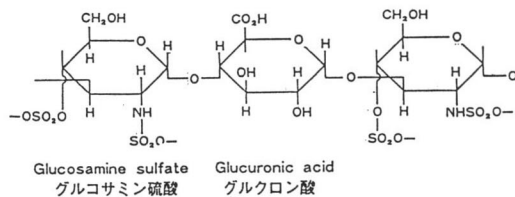
\* 高濃度では精子運動性が低下する。

図4 多糖類の構造

#### Fucoidin フコイジン



#### Heparin ヘパリン



#### Chondroitin sulfate A コンドロイチン硫酸 A

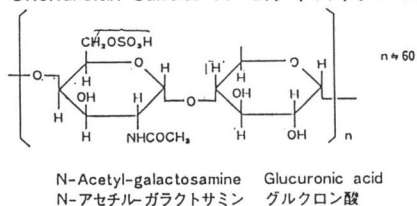


表 4 精子-透明帯接着に対する多糖類の影響

多 糖 類	濃 度 (mg/ml)	精子-透明帯 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	±
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加入し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×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、

WGA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。硫酸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を同じように持つ 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・斉藤 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 agglutinine 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 fenestrations. 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ふ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

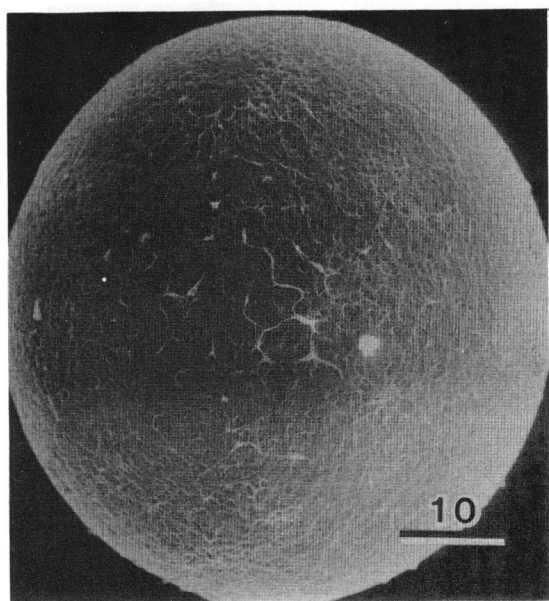


図 1 未受精卵

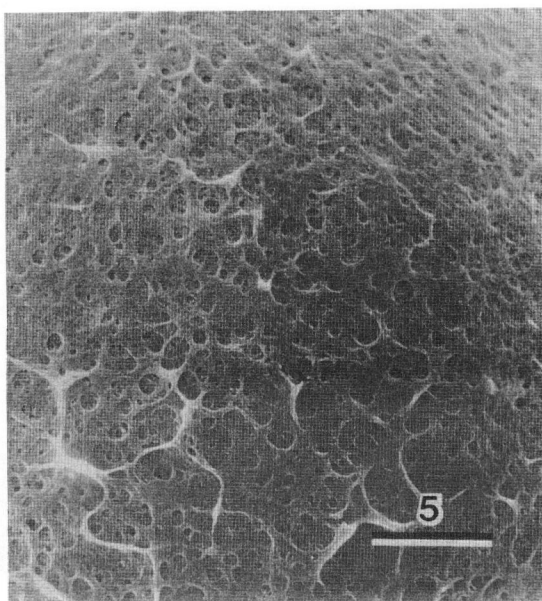


図 2 未受精卵, 図 1 の拡大

受精に伴う透明帯表面の形態学的変化については意見が分れている。

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変化が透明帯表面に起こ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

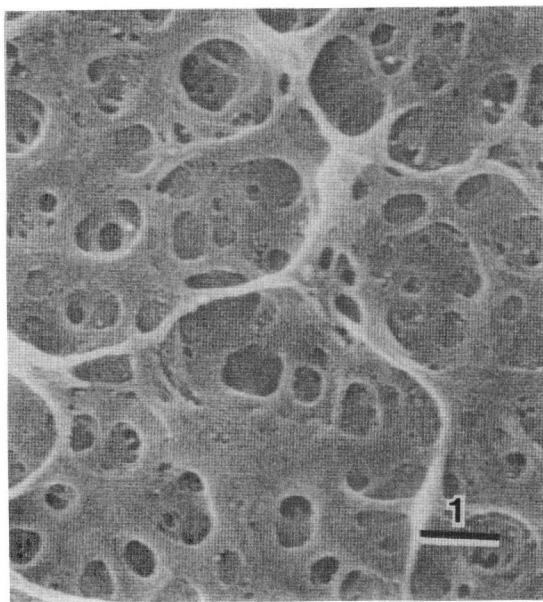


図 3 未受精卵, 図 1 の強拡大



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、一見スポン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の円形または楕円形の孔が無数にあり、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

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

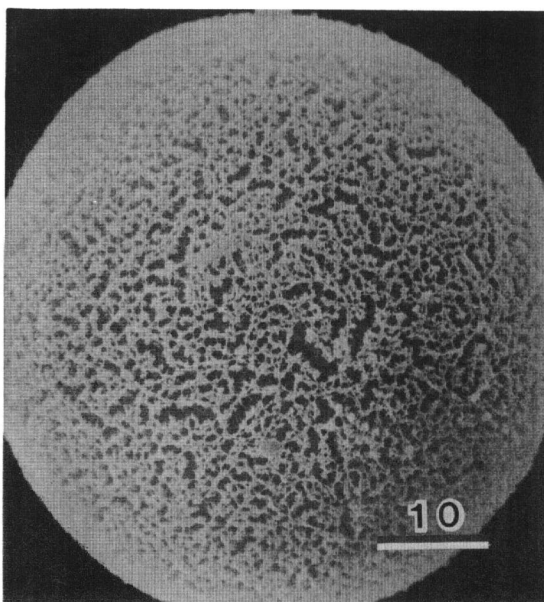


図4 未受精卵，全体的に小さなヒビ割れを認める ( artifacts )

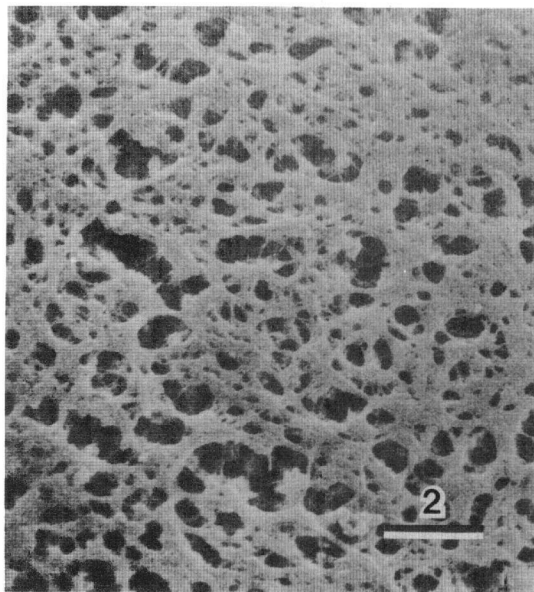


図5 未受精卵，図4の強拡大

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形が観察された (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 分割卵を一緒に固定し、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。

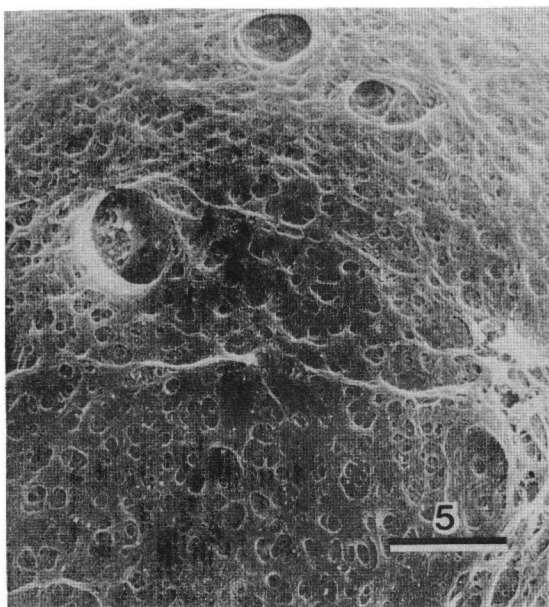


図 6 受精後約 5 時間の卵子

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%) 処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

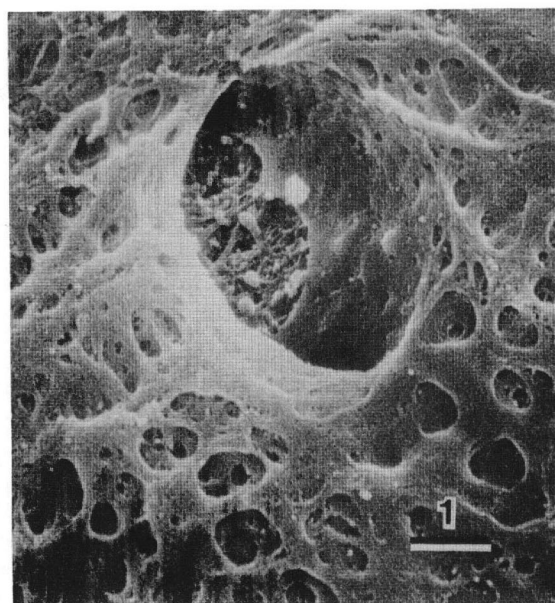


図 7 図 6 の強拡大、精子侵入孔を認める

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、<sup>6,7</sup> 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

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、最外層は卵管分泌物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

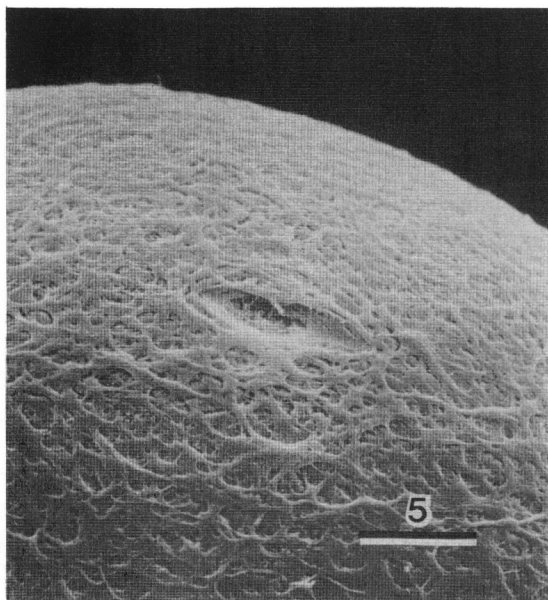


図 8 受精後約 10 時間の卵子

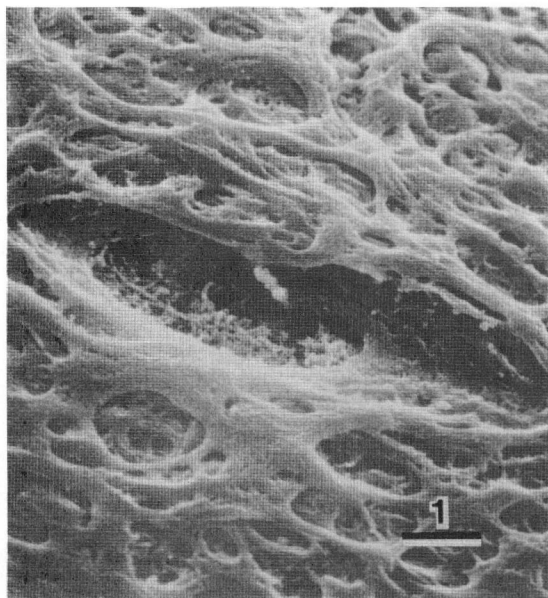


図 9 図 8 の強拡大

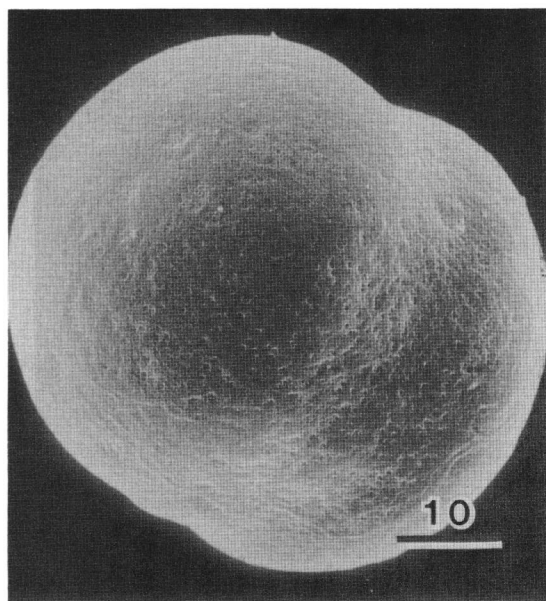


図10 2分割卵

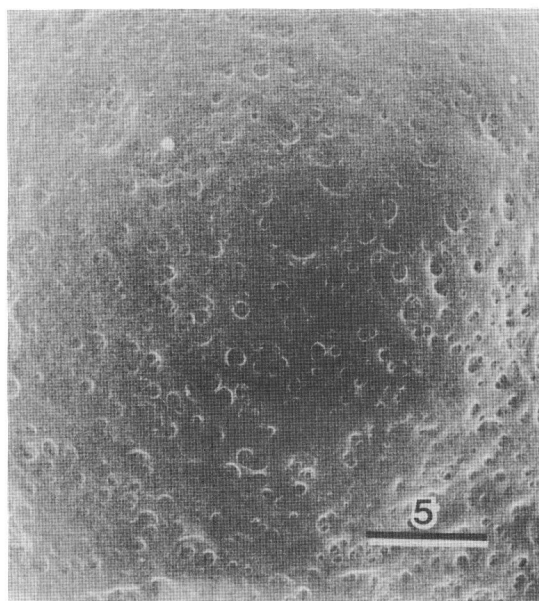


図11 2分割卵, 図10の拡大

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变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。したがって Jackowski らの成績も、透明帯の変化は受精後5時間以上経って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ったと報告している。SEMで観察される透明帯の変化は一定不変のものではなく、受精卵によっ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っ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っては、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。

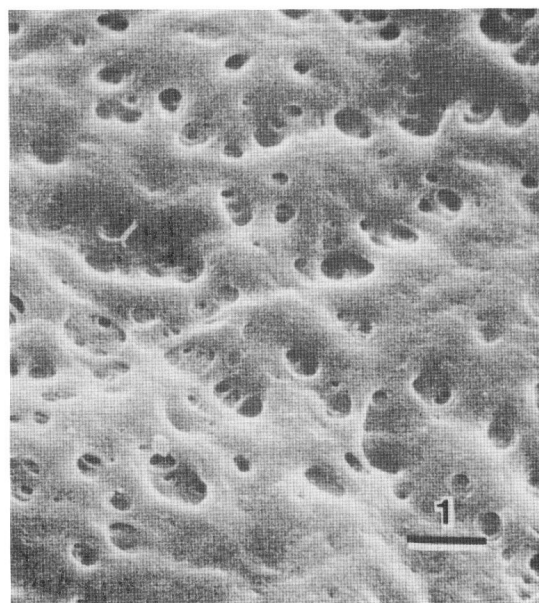


図12 2分割卵, 図10の強拡大

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-mercaptoethanol, あるいは Sodium periodate に対して難溶性となる<sup>4, 7</sup>。Schmell and Gulyas (1979)<sup>14</sup>は、溶解性の変化、

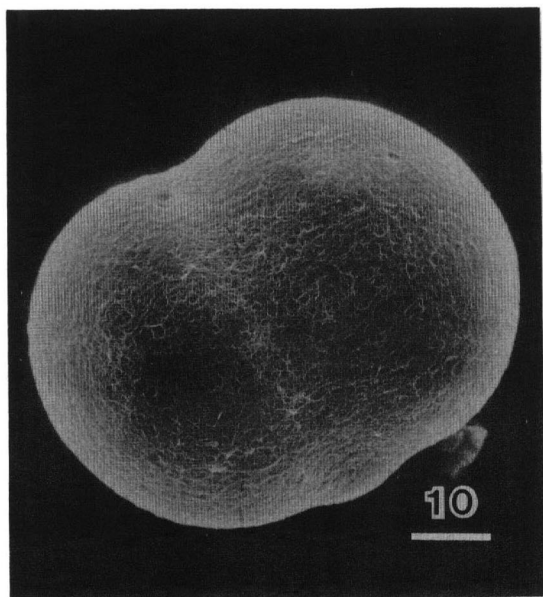


図13 2分割卵, 2個の精子侵入孔を認める

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, 透明帯表面の形態学的変化は認められなかった。受精直後に見られるSEM上の唯一の変化は精子侵入孔の存在であった。精子侵入孔の形はさまざまであるが, 2分割卵になってもほとんど修復されずに残っていた。

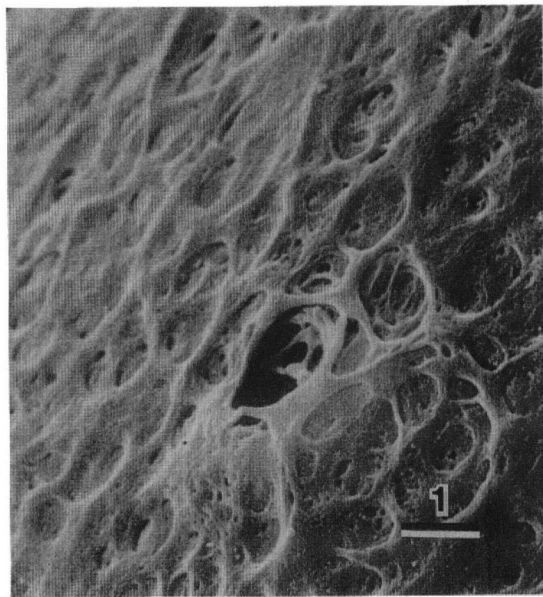


図14 2分割卵, 図13の強拡大

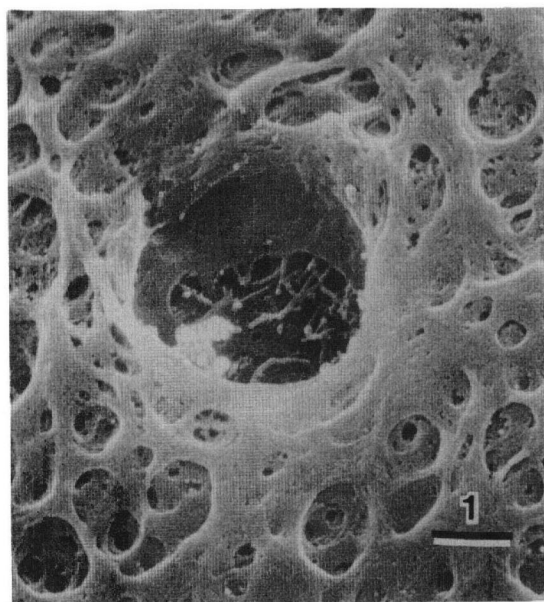


図15 2分割卵, 透明帯表面は未受精卵と変らない



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. Ultrast. 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.



## Chromosomal sex determination of bovine embryos

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  $F_{2\alpha}$ , 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  $\mu$ g/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%  $CO_2$  and 95%  $O_2$  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  $\mu$ g/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  $\mu\text{g/ml}$  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  $\mu\text{g/ml}$  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	Chromosomal analysis	Comments
	Dose of colchicine (µg/ml)	Duration of culture (hours)			
1 Early.	0.4	2	67	0	embryo degenerated on preculture <sup>b</sup>
2 Expanded.	0.4	2	111	2	chromosomes too contracted to differentiate the sex chromosomes
3 Early.	0.4	1	58	0	embryo lost at fixation
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	60, XX
7 Expanded.	0.2	2	194	8	59, X?
8 Expanded.	0.2	2	186	2	60, XX
9 Expanded.	0.2	2	170	5	60, XX
10 Expanded.	0.2	2	164	6	59, X?
11 Mid.	0.1	2	145	2	no X observed
12 Expanded.	0.1	2	154	3	no distinct Y observed
13 Expanded.	0.1	2	146	2	only one X observed
14 Expanded.	0.1	2	167	5	60, XY <sup>c</sup> 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 $\pm$ 26.0**	4.3 $\pm$ 2.1	2.8 $\pm$ 1.2
Mouse*	155	66.0 $\pm$ 15.9	5.7 $\pm$ 3.0	11.2 $\pm$ 26.8

\*: Cultured by BMOC-3 containing 0.4  $\mu$ g/ml colchicine for 2 hours.

\*\* : Mean  $\pm$  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  $\mu$ g/ml colchicine, and even when the concentration of colchicine was reduced to 0.1  $\mu$ g/ml, contraction was still observed. In mouse embryos, however, contraction of chromosomes was not observed in the culture with 0.025-1.6  $\mu$ g/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 Crițiu, E.P.: II congrés international de transfert d'embryons chez mammifères, Annecy, France, 1982, 20-21-22
  - 9) Crițiu, E.P.: Recl. Med. Vét. Éc. 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。

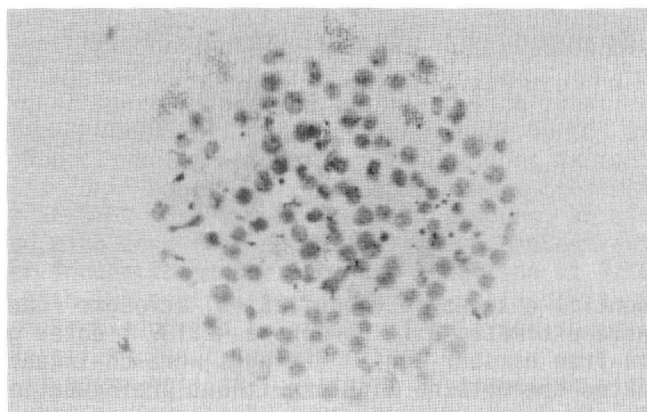


Fig.1 Chromosomal preparation of bovine blastocyst (No.6). Five metaphase plates are shown.  
Giemsa  $\times 170$

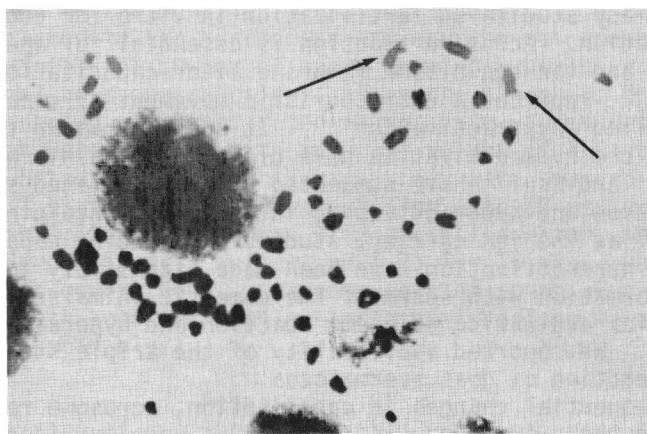


Fig.2 High magnification of Fig.1. Metaphase plate.  
Two X chromosomes ( arrow ) are observed.  
 $\times 1460$

## 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 there after. 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 amples 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 ( $2-3 \times 10^6$ /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:  $2-3 \times 10^6$ /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:  $2-3 \times 10^6$ /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

5,15), mouse<sup>16)</sup>, sheep<sup>17)</sup>, dog<sup>18)</sup> and dolphin<sup>19)</sup>.

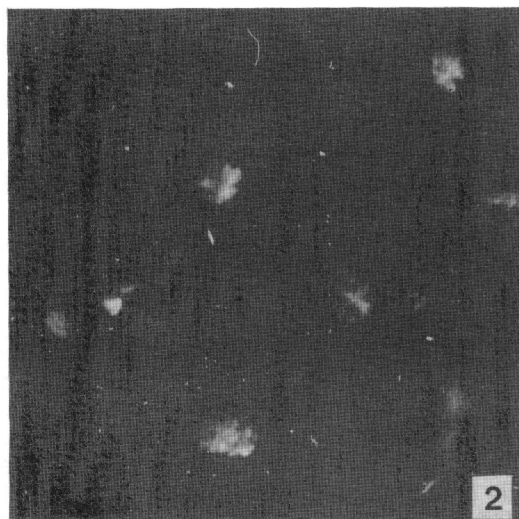
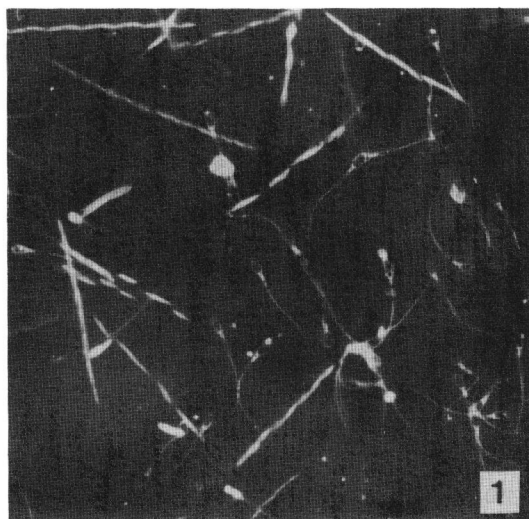


Fig. 1.2. Bulb exposure-dark field micrographs of goat spermatozoa, the shutter of camera was opened for 1 second.

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 rose 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 eggs examined	No. of eggs penetrated				Total (%)
			With enlarged sperm head	With enlarged sperm heads	With male pro-nucleus	With male pro-nuclei	
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. Proportion of hyperactivated spermatozoa rose gradually from 1 hour after incubation and reached to peak (37.6%) at 2 hours. The percentages of acrosome-reacted spermatozoa rose 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 <sup>b)</sup> pattern	Acrosome <sup>c)</sup> reaction
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  $\mu$ M 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 experi- ment	No. of eggs examined	No. of eggs penetrated				Total (%)
			With enlarged sperm head	With enlarged sperm heads	With male pro- nucleus	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  $Ca^{2+}$  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  $Ca^{2+}$ , 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>22, 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) Talbolt, 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℃, 0.5-4.0 時間のインキュベーションののち媒精された。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 ( $X^2=12.4$ ,  $P<0.01$ ). 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 30 i.u. PMSG (Peamex, Sankyo Zoki) and 56 h later with 10 i.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 0.4 ml 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 0.5 ml 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		Oocytes undergoing fertilization			
	Total	Penetrated (%)	With perivitelline sperm only	Total (%)		
				Mono- spermic (%)*	Polyspermic	
					di- spermic	tetra- spermic
7.5	21	21 (100)	0	21 (100)	18 (85.7)	2 1 0
15	161	148 (91.9)	1	147 (91.3)	121 (82.3)	24 2 0
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56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、 $0.4 \times 10^6$  精子/mlとなるように希釈し4.0-4.5時間ブ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精子液中へ導入後7-8時間に透明帯への精子侵入、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による卵巣の過度の刺激は、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けましたので，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上げます。

(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 悦

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

昭和59年10月1日 発行

( 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  
〒252 藤沢市亀井野 1866  
日本大学農獣医学部獣医生理学教室内  
Tel 0466-81-6241(内332)  
郵便振替 横浜 8 - 2 0 3 5 0

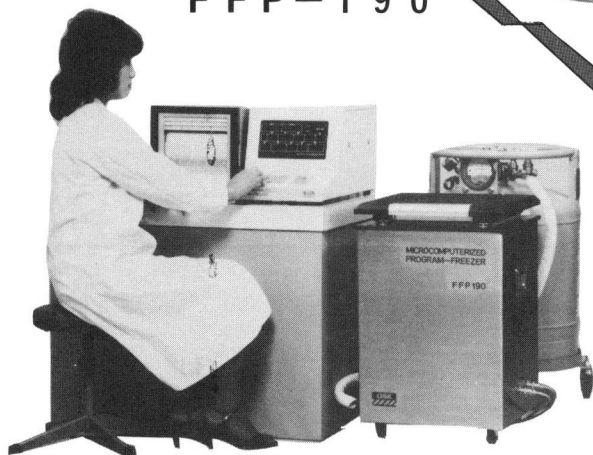
印刷所 誠和印刷株式会社  
住 所 藤沢市城南5丁目2番8号  
電 話 0466-34-9110(代表)



# 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



## 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<sup>®</sup>・F液<sup>®</sup>

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

**フベローゲン®**

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

日本薬局方 注射用血清性性腺刺激ホルモン

動物  
専用

**ピーメックス®**

1,000単位

販売元



**三共株式会社**

東京都中央区銀座2-7-12

製造元



**三共ゾーキ株式会社**

東京都中央区日本橋本町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）との組合わせ投与により排卵を誘発します。
- 更年期婦人尿由来の下垂体性性腺刺激ホルモン（HMG）製剤であり、反復投与が可能です。
- FSH活性のほかにLH活性を有し、その活性化（FSH/LH）はほぼ一定です。



【効能・効果】

間脳性（視床下部性）無月経，下垂体性無月経の排卵誘発

【用法・用量】

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

【包装】

パーゴナル注 75：10管

パーゴナル注150：10管

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



**帝国臓器製薬株式会社**  
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



**デンカ製薬株式会社**  
(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結果とともに紹介し、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)/反すう獣および鳥類の胃運動と、その自律神経支配(中里幸和・大賀 皓)/実験動物感染症への対応—経緯と現状—(藤原公策)/腸内細菌の異常性状とプラスミド(佐藤儀平・石黒直隆)/マレック病の免疫(見上 彪)/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、器具から具体的手法を、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

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 振替 東京9-168223

# PLANER

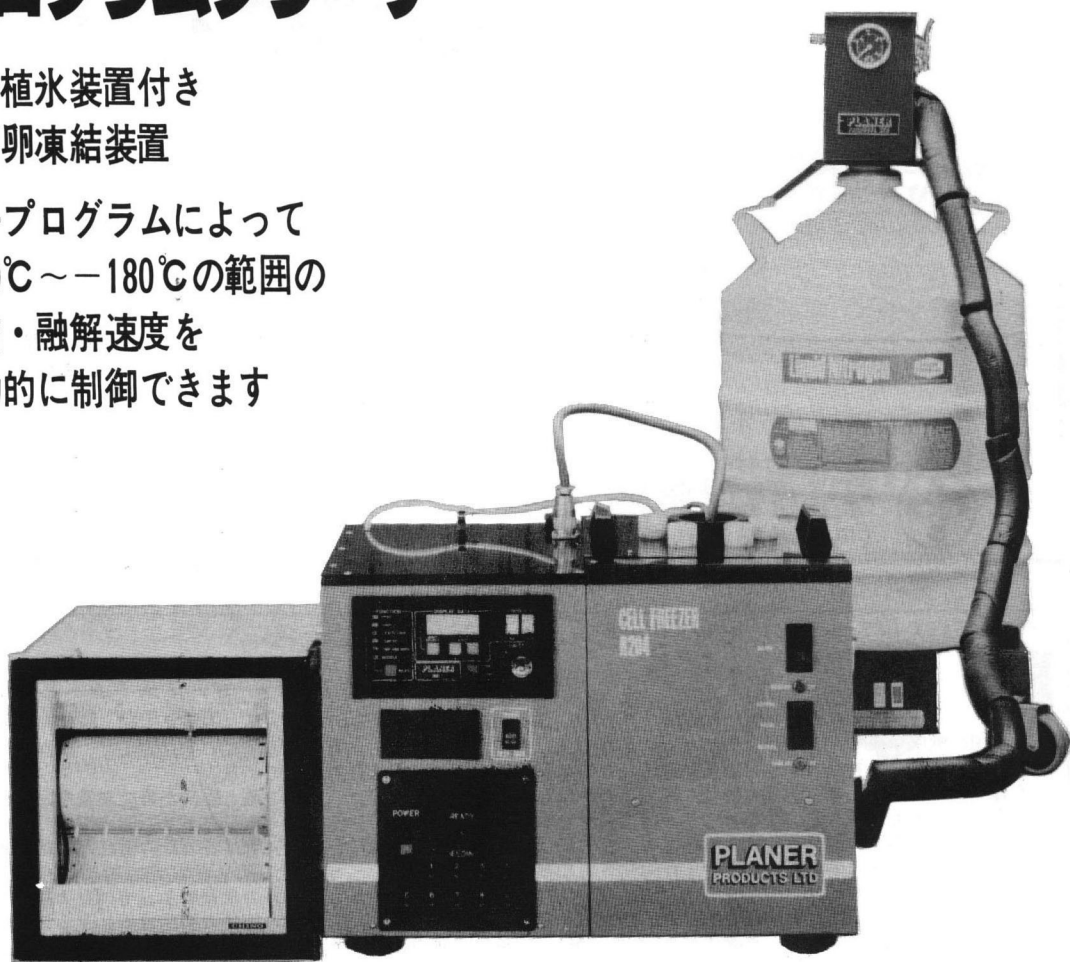
## CELL FREEZER R204

### 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℃～-180℃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)





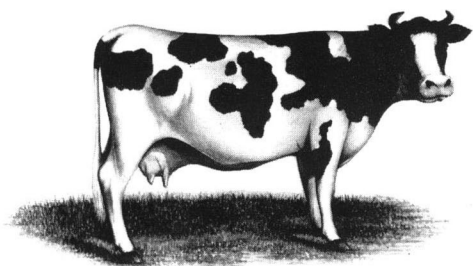
# 住友の動物用医薬品

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>

〔クロブロステノールナトリウム……0.263mg/mℓ〕



性周期の同調

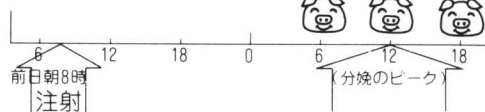
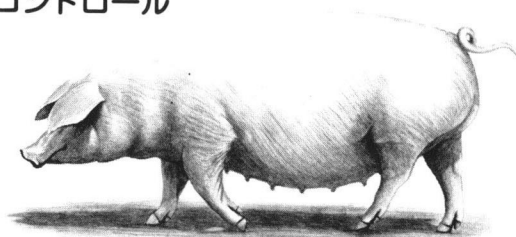
黄体退行遅延に基づく卵巣疾患の治療

- ・微量の筋注で効力を発揮します。
- ・安定で常温保存出来ます。

## プラネート <20mℓ>

〔クロブ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  
ビーエルシー(英国I.C.I.社)

