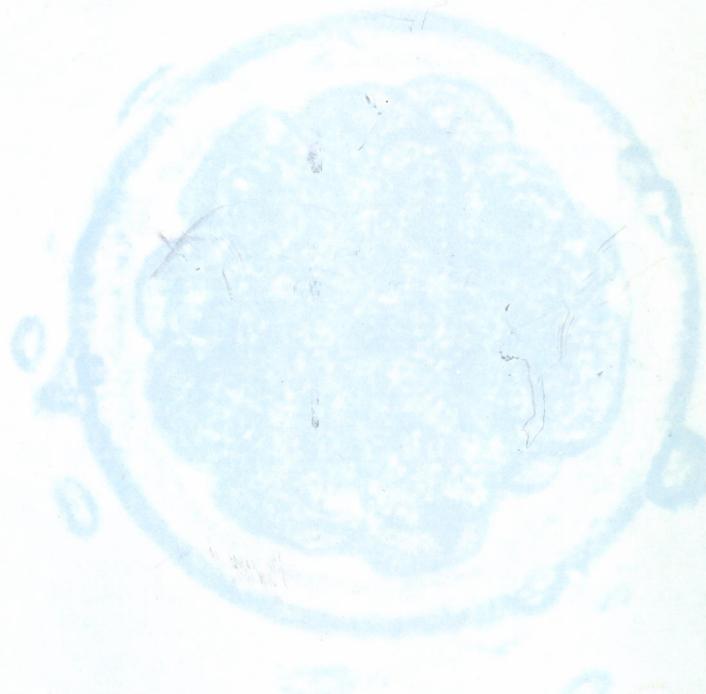


ISSN 0289-5439

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. 2 No. 1

April 1985



◆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、
卵巣静止の治療、排卵促進に

(要指示)

製造発売元
武田薬品工業株式会社

提携
帝国臓器製薬株式会社



●ビタミンKについても増強しました。
菌叢に更に近づきました。
ラクチヨースをはじめとするビフィズス菌増殖因子の増強と、緩衝能、pH、浸透圧などの改良により、従来より更にビフィズス菌が増えやすくなり、乳児の腸内のpHを下げると共に高いリゾチーム活性を維持して病原菌・有害菌の増殖を抑制します。
また便性もさらに母乳栄養児に近づきました。

森永 **BF-Tドライミルク**



●脳や神経の発育に大切なタウリン
を新しく配合しました。

タウリンは新生児の脳や肝臓などの臓器に
とくに多く含まれており、脳神経系の機能
や脂肪吸収の上で重要な役割を果しています。森永
BF-Tドライミルクでは、タウリンがミルクから充分に補給
できるよう、製品100g当たり20mg配合し、調乳液
100ml当たり2.6mgとし、母乳の値に近づけました。

●ビフィズス菌が増えやすく母乳栄養児の腸内

新発売



ビフィズス効果
と
タウリン配合

母乳の理想にさらに近づけて——

森永乳業

哺乳動物卵子研究会誌

第2巻 第1号

昭和60年4月

目 次

第26回哺乳動物卵子研究会講演要旨集

X精子とY精子について	毛利秀雄	1
ペントバルビタル塩投与の過排卵処理ラットにおけるhCG曝露が排卵数におよぼす影響	利部聰	3
下垂体抽出液投与によるラットの過排卵および過剰妊娠誘起	高橋寿太郎、伊藤敦、安田泰久	5
めん羊の反復過排卵誘起	福井豊、加納宏、小林正之、小野斎	9
細胞質の側からみた卵成熟機構の生化学的解析	堤治、矢野哲、綾部琢哉、石原理、木下勝之、佐藤和雄、水野正彦	11
哺乳動物卵子におけるステロイド代謝	綾部琢哉、堤治、北川浩明、矢野哲、木下勝之、佐藤和雄、水野正彦	15
ハムスター精子尾部の卵細胞質への進入	平尾幸久、平岡純一	17
ハムスター卵胞卵子の雄性前核形成能について	鈴木淑恵、佐藤嘉兵	21
体外成熟培養牛卵胞卵子への精子注入に関する研究		
II. 凍結乾燥精子頭部の注入		
内視鏡によるブタ卵胞内卵子の採取法	亀山賢次、浜野光市、菅原七郎、正木淳二	25
菅原七郎、亀山賢次、橋本伸二、浜野光市、宮本明夫、渡辺伸也、佐々木比呂志 梅津元昭、正木淳二、武田光彦、菅野興文		27
カニューレ経由子宮内incubationヤギ精子の透明帯除去ハムスター卵子への侵入	浜野光市、佐々田比呂志、菅原七郎、正木淳二	31
透明帯除去ハムスター卵子を用いた精子受精能力検査と体外受精の比較	井上正人、小林善宗、本田育子、金子みつ恵、藤井明和	33
豚精子により体外受精した透明帯除去ハムスター卵子の融合について	吉田光敏、番場公雄、小島義夫	37
体外受精由来マウス胚の発生に対するZn ²⁺ の影響	鈴木宏志、東貞宏、山田秀一、豊田裕	41

○	マウス受精卵の体外培養法の検討 木村資亜利、小島博子、横山峯介、勝木元也	43
	マウス胚培養に及ぼす水質の影響について 福田愛作、津久井伸一、辰巳賢一、松本 央、野田洋一、森 崇英	45
	マウス誘起着床遅延モデルの胚発生について 久保春海、安部裕司、林 鴻程、片山 進	49
	ハムスター卵に対するモノクロナル抗体による受精阻害実験 繁田 実、松田孝之、香山浩二、磯島晋三	53
	精子の透明帯貫通に及ぼす精子不動化抗体の抑制作用 津久井伸一、福田愛作、野田洋一、森 崇英	55
	胚の短期保存を目的とした非凍結保存方法の検討 佐原弘益、金山喜一、遠藤 克、佐久間勇次	57
	2段階凍結したマウス胚の生存性におよぼす予備凍結温度と保護物質の影響 宮本 元、宮本庸平、石橋武彦	59
	蛍光色素D A P Iによる凍結融解後のマウス胚盤胞の生存性判定 Boon-Guan LOW, 高橋芳幸、金川弘司	63
	卵操作におけるマイクロマニュープレーションの応用 鈴木秋悦、倉沢滋明、北井啓勝、小宮優子、飯塚理八、小松節子、橋本孝雄	67
	汎用マイクロコンピューター制御による受精卵及び初期胚への注入・切断の顕微操作 尾川昭二、高橋 一、水野仁二、柏崎直巳、山根雅己、成茂栄一	71
	ラット前核期卵における核移植法に関する基礎的研究 舟橋弘晃、内海恭三、湯原正高	75
	染色体検査によるマウス2分割胚の性別判定 中川 明、高橋芳幸、金川弘司	79
	発生速度の差異によるマウス初期胚の性判別の試み 徳永智之、角田幸生、杉江 信	83
	H-Y抗体によって性判別された山羊、牛受精卵の受胎例について 佐藤英介、田 誠、内海恭三、湯原正高、山田雅保	86
	ヒツジの切断二分離胚移植による受胎例 吉羽宣明、大竹通男、塩谷康生	90
	切断二分離した胚盤胞からの子牛生産 塩谷康生、花田 章、小林 仁	94

Journal of Mammalian Ova Research

Vol. 2 No. 1

April 1985

Contents

Proceeding of the 26th Annual Meeting of Japan Society
for Mammalian Ova Research

X-sperm and Y-sperm	MOHRI, H. --- 1
Effect of exposure to hCG on the number of ova shed in sodium pentobarbital treated superovulation rats.	KAGABU, S. --- 3
Induction of superovulation and superpregnancy in rat by pituitary extract injection.	TAKAHASHI,J., A.ITHO & Y.YASUDA. --- 5
Repeated superovulation in the sheep.	FUKUI,Y., H.KANO, M.KOBAYASHI & H.ONO. --- 9
Biochemical analysis of the mechanisms of, cytoplasmic maturation of the oocyte.	TSUTSUMI,O., T.YANO, T.AYABE, O.ISHIHARA, K.KINOSHITA, K.SATO & M.MIZUNO. --- 11
Steroid metabolism in the mammalian oocyte.	AYABE,T., O.TSUTSUMI, H.KITAGAWA, T.YANO, K.KINOSHITA, K.SATO & M.MIZUNO. --- 15
Incorporation of the sperm tail into the hamster oocytes.	HIRAO, Y. & J.HIRAOKA. --- 17
The ability of hamster follicular oocytes to form male pronuclei.	SUZUKI,Y. & K.SATO --- 21
Freeze-dried sperm head injection into bovine eggs matured in vitro.	KAMEYAMA,K., K.HAMANO, S.SUGAWARA & J.MASAKI. --- 25
Laparoscopic procedures for collection of follicular oocytes in gilts.	SUGAWARA,S., K.KAMEYAMA, S.HASHIMOTO, K.HAMANO, A.MIYAMOTO, S.WATANABE, H.SASADA, M.UMEZU, J.MASAKI, M.TAKEDA & O.SUGANO --- 27
Penetration of goat spermatozoa incubated in uterus via cannulae into zona-free hamster eggs.	HAMANO,K., H.SASADA, S.SUGAWARA & J.MASAKI. --- 31
Correlation of human in vitro fertilization with zona-free hamster egg sperm penetration test.	INOUE,M., Y.KOBAYASHI, I.HONDA, M.KANEKO & A.FUJII. --- 33

Fusion of zona-free hamster eggs fertilized by boar spermatozoa
in vitro. YOSHIDA,M.,K.BAMBA & Y.KOJIMA. -- 37

Effect of Zn^{2+} on the preimplantation development of mouse embryos
fertilized in vitro. SUZUKI,H., S.AZUMA, S.YAMADA & Y.TOYODA. -- 41

The culture of mouse zygotes in vitro.

KIMURA,S., H.KOJIMA, M.YOKOYAMA & M.KATSUKI. -- 43

Influence of water quality on mouse embryos cultured in vitro.

FUKUDA,A., S.TSUKUI, K.TATSUMI, H.MATSUMOTO, Y.NODA & -- 45
T.MORI.

Developmental ability of the model of induced delayed implantation
in mouse blastocysts. KUBO,H., Y.ABE, K.LIN & S.KATAYAMA. -- 49

Blocking effect of monoclonal antibodies to hamster oocytes on in
vitro fertilization in hamster.

SHIGETA,M., T.MATSUDA, K.KOYAMA & S.ISOJIMA. -- 53

Effects of sperm immobilizing antibodies on zona penetration test.

TSUKUI S., A.FUKUDA, Y.NODA & T.MORI. -- 55

Studies of non-freezing storage for short term on embryos.

SAHARA, H., K.KANAYAMA, T. ENDO & Y. SAKUMA. -- 57

Survival of mouse embryos frozen to -196°C by a two-step
procedure with reference to preliminary freezing temperatures and
cryoprotectants. MIYAMOTO,H., Y.MIYAMOTO & T.ISHIBASHI. -- 59

Viability assessment of frozen-thawed mouse blastocysts by 4'6'
-diamidino-2-phenylindole (DAPI) -fluorescence test.

Boon-Guan Low, Y.TAKAHASHI & H.KANAGAWA. -- 63

Application of micromanipulation for ovum research.

SUZUKI, S., S.KURASAWA, H.KITAI, Y.KOMIYA, R.IIZUKA,
S.KOMATSU & T.HASHIMOTO. -- 67

Micromanipulation by personal computer for microinjection and micro-
bisection of fertilized eggs and early embryos.

OGAWA, S., H.TAKAHASHI, J.MIZUNO, N.KASHIWAZAKI,
M.YAMANE. & E.NARISHIGE. -- 71

The basic study on nuclear transplantation in rat zygote by HVJ-
mediated cell fusion of karyoplast.

FUNAHASHI, H., K.UTSUMI & M.UHARA. -- 75

Sexing of bisected mouse embryos by chromosomal analysis.

NAKAGAWA,A., Y.TAKAHASHI & H.KANAGAWA. -- 79

- Different sex ratio of live young after transfer of the fast-and
slow-developing mouse embryos. TOKUNAGA, T., Y.TSUNODA & --- 83
T. SUGIE.
- Development of sexed goat and cow embryo by H-Y antibody.
SATOH,E., M.DEN, K.UTSUMI & M.YUHARA. --- 86
- Viabilities of bisected hatched blastocyst in sheep.
YOSHIBA N., M.OHTAKE & Y.SHIOYA. --- 90
- Calf production from micromanipulated "Half" blastocyst.
SHIOYA, Y., A.HANADA & J.KOBAYASHI. --- 94

X 精子と Y 精子について

X - s p e r m a n d Y - s p e r m

毛 利 秀 雄

H i d e o M o h r i

東京大学教養学部生物学教室

Department of Biology, University of Tokyo

ヒトを含む哺乳類の雌雄の産み分け、およびそれを目的とするX精子とY精子の分離は古くから多くの研究者達によって試みられてきた。われわれはキナクリンマスターD染色によるF—bodyの存否でX精子とY精子を識別できるヒト精子を用いて、この問題の検討を行った。

まずPercollの不連続密度勾配遠心法を試みたところ、X精子の方が沈降速度が大きいことが分った。しかし両精子の間には密度に差が認められなかった。

そこで表面負荷電に差があるかどうかを無担体電気泳動法で調べたところ、X精子とY精子が別々のピークに分離する結果を得た。さらにこの負荷電の差を生ずる原因をシリダーゼを用いて検討したところ、X精子の方が表面により多くのシアル酸をもつことが判明した。

尚両者の間に形態的な違いは認められなかった。

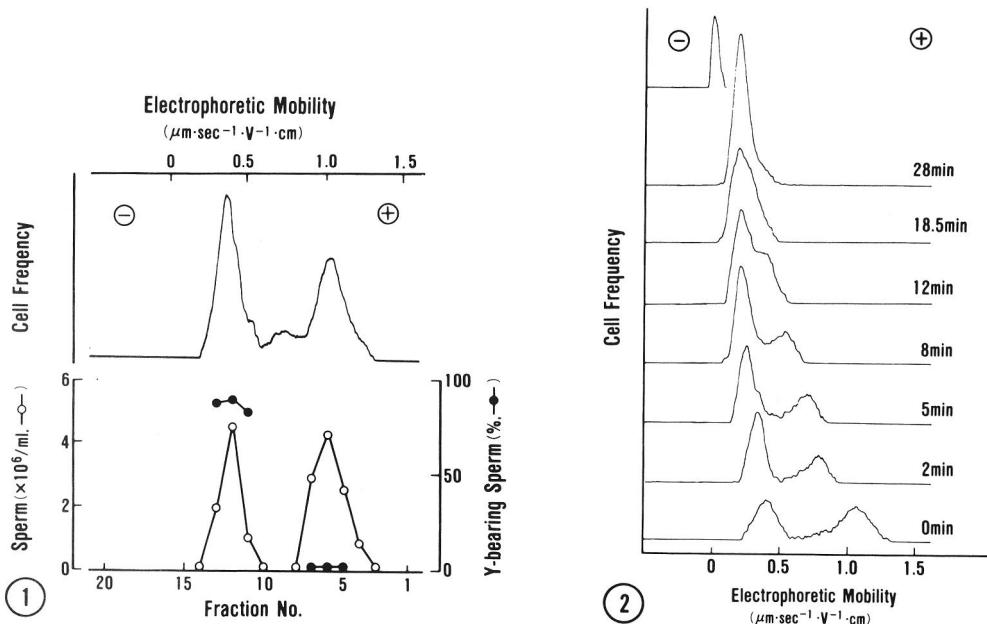


Fig. 1 i Analytical free-flow electrophoresis of the washed human sperm
Upper panel : profile of densitometric tracing
Lower panel : sperm counts

Fig. 2 Effect of sialidase treatment on the electrophoretic mobilities
of human X- and Y-bearing sperm
The small peak at the top left of figure shows the elution profile
of dextran, a non-migrating substance used as a standard.

Effect of exposure to hCG on the number of ova shed in
sodium pentobarbital treated superovulation rats

利 部 聰
KAGABU Satosi

山口大学農学部獣医学科畜臨床繁殖学教室

Laboratory of Veterinary Reproduction, Faculty
of Agriculture, Yamaguchi University

New method of superovulation treatment using sodium pentobarbital (PB) were examined. Suggested that PB is effective to maintain the ability of antral follicles by block LH release. In this study, observed the number of ova shed in superovulation rats after injection small dose of hCG instead of endogenous LH.

Reduction of the number of ova shed observed injection greater than 0.25 iu hCG at PB injection.

緒論：過排卵処理にペントバルビタール塩 (PB) を併用すると、排卵数が飛躍的に増加することを報告した¹⁾。増加の理由は、PBによって抑制されたLHが卵胞のLH受容体を減少させないことであると推測した。本報告は、この推測をたしかめるため、PBでLH放出を抑制したラットに微量のhCGを投与して、排卵数を調べたものである。

方法：実験にはウイスター・イマミチ系ラットを使用し、人工昼夜(14時間明/10時間暗)下で飼育し正常な4日型発情周期を2回以上くり返したもの用いた。過排卵処理後の排卵数および性腺刺激ホルモンに反応する卵胞数は、週令により異なるので12週令のものだけを供試した。実験方法を図に示した。

結果：PB投与の当日にhCGを投与すると、0.25 iu以上のばあい排卵数が減少した。また、hCGが2.5 iu以上になると卵子は卵管狭部にも観察された。一方、PBを投与しない対照動物の膨大部にある卵は約60個あり、一部のラットでは狭部にも存在した。

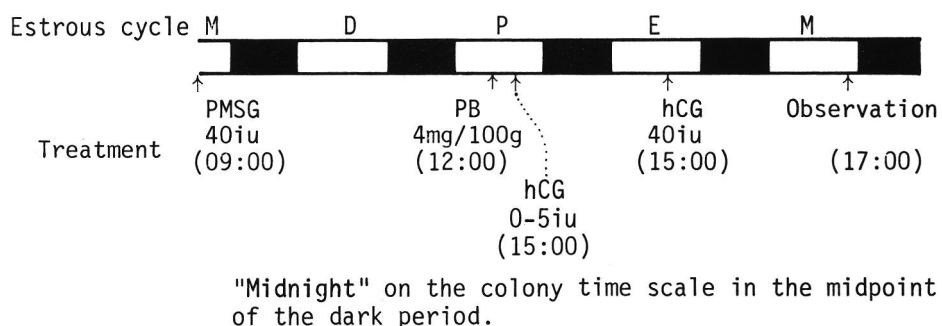


Fig. 1 Experimental schedule

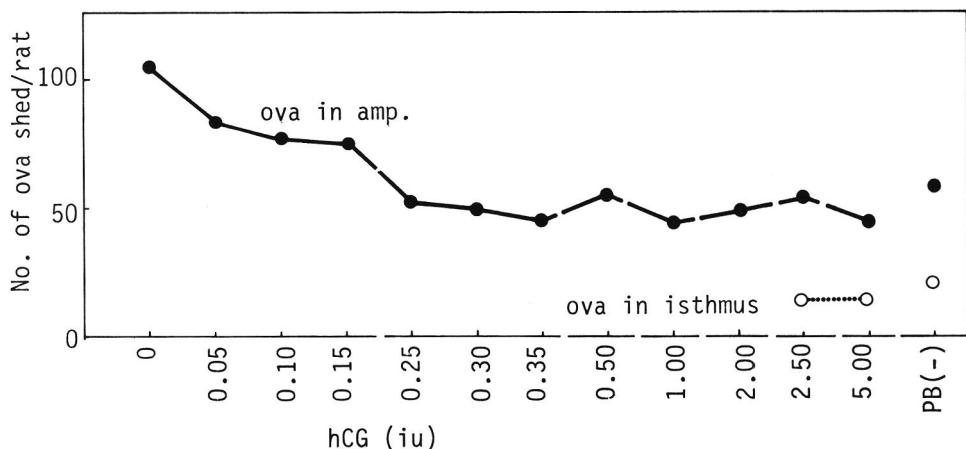


Fig. 2 Number of ova shed after hCG exposure in superovulation rats

考察：LH放出を抑制することのできる時期にPBを投与し、さらにhCGを少量投与して、LH放出をおこした動物のモデル作製を試みた。hCGを0.25iu以上投与すると、排卵数は有意に減少し、PBを投与しないラットとほぼ同様な結果となった。卵の存在部位に関しては、PBを投与しないラットと類似するのは、hCGを2.5iu以上投与したばあいであった。LHのかわりにhCGを使用し、排卵数と卵の存在部位を指標とするなら、hCG 0.25iu以上がPMSG 40iuを投与したラットのLH放出量に相当すると思う。一方、hCGを10iu以上投与すると、排卵すべき卵胞は、このhCGに反応して排卵する可能性があるので、10iu未満であろう。ラットの排卵のためのhCG最少有効量は0.625iuとの報告がある²⁾。これにくらべて、この結果は最小でも4倍になっているが、この差違は今後解明しなければならない点である。そしてまた、hCGは、はたしてLHのかわりとなりうるかも検討しなければならない課題である。

主要文献

1. 利部聰：成熟ラットにおけるPMSG投与後の大型卵胞の消長ならびに過排卵処理後の排卵数におよぼすペントバルビタールの影響、家畜繁殖誌、29、20～23、1983
2. 伊藤哲子、鯫島秀暢、江藤禎一：ラットの下垂体単一移植排卵における移植後の卵胞の発育及び排卵能について、第93回日本獣医学会講演要旨集、49、1982

下垂体抽出液投与によるラットの過排卵
および過剰妊娠誘起

Induction of superovulation and superpregnancy in rat

by pituitary extract injection

高橋寿太郎・伊藤 敦・安田泰久

Jutaro TAKAHASHI, Atsushi ITOH
and Yasuhisa YASUDA

岩手大学農学部動物育種学教室

Laboratory of Animal Breeding, Iwate University,
Morioka 020, Japan

As a part of studies to research the possibility of superpregnancy, the induction of superovulation and superpregnancy was attempted by the administration of pituitary extract to female rat. Pituitary gland removed from 3-10 months old male rat was homogenized and centrifuged. The supernatant fluid extracted from one pituitary was administered to 3-6 months old female rat at metestrus. Effects of pituitary extract injection on ovulation, recovery rate of ova, development of ova, ovo-implantation and viable fetuses in pregnant adult rat were studied.

Nine of nineteen treated female rats were induced superovulation at following estrus and copulated. Mean number of ovulated ova of treated rat was about twofold that of control ones on day 1 of pregnancy.

Recovery rates of ova on day 3 and 5 of pregnancy in the treated rats were lower (68.9 and 67.0%, respectively) than those of control rats (88.6 and 82.7%, respectively). Most of the ova recovered were developed to 2cell and 4-cell stage on day 3 and to blastocyst stage on day 5 of pregnancy. Development of ova recovered from treated rats slightly retarded in comparison with that of control ones.

The mean number of implantation sites of the treated animals on day 7 and 10 of pregnancy was higher (19.6 ± 4.2 and 15.4 ± 7.7 , respectively) than that of control ones (12.3 ± 1.0 and 11.6 ± 1.0 , respectively), and the size of implantation site in the treated animals was not different from that of control ones. The estimated loss of ova before implantation was 10-15% in treated rats.

The mean number of viable fetuses in treated rats on day 21 of pregnancy was more than that in control ones (18.3 ± 4.1 vs 8.5 ± 3.7). But, the mean weight of fetuses in treated rats was lighter than that in control ones (4.08 ± 0.48 gr. vs 4.62 ± 0.34 gr.).

Large vesicular ovarian follicles were hardly observed during their pregnancy.

In conclusion, about fifty percent of animals treated with pituitary extract were induced superpregnancy.

緒言： PMSG の単一投与または HCG との併用投与による過排卵誘起実験は、これまで数多く行われている。しかし、過排卵を誘起しても一般に妊娠率は低く、過剰妊娠に導くことは困難であるといわれている。特に PMSG と HCG 処理された妊娠ラットでは、着床前の胚の損失が多く、着床数は正常妊娠ラットと同程度か逆に少なく、全く着床しない例も多い。^{1,2)} そこで、雄ラットの下垂体の抽出液を雌ラットに投与して過排卵を誘起し、雄と交尾させて、受精率、胚の発育、着床について調べ、過剰妊娠誘起の可能性を検討した。

方法： 1. 供試動物：実験には Wistar 系ラットを使用した。照明時間は、7 時から 19 時とし、室温は 23 ± 1 °C の条件下で飼育した。固型飼料と水は自由に摂取させた。2. 下垂体抽出液：下垂体抽出液は、3 ~ 10 ヶ月齢の交尾経験のない雄ラットの下垂体を用いた。雄ラットをエーテル麻酔下で放血と殺して、下垂体を摘出し、0.5 ml の滅菌生理食塩水とともに小試験管に入れ、-20 °C で保存した。保存期間は 3 ヶ月以内のものを使用した。使用時にこれを解凍し、加えていた生理食塩水とともにホモゲナイズし、2,500 r. p. m. (1,000g) で 15 分間遠心した。上清の全量を下垂体抽出液とした。3. 雌ラットへの下垂体抽出液の投与：腔スメアの観察によって、正常な 4 日の性周期を 3 回以上くり返した 3 ~ 6 ヶ月齢の未経産ラットを用いた。発情後期像を示す日の 12 時から 13 時の間に、下垂体抽出液を頸部皮下に投与した。投与 2 日後の発情前期像を示す日に、成熟雄ラットと一緒に同居させ、翌朝、腔スメア中の精子の存在によって交尾を確認し、この日を妊娠 1 日目とした。4. 排卵、受精、胚の発生、着床の確認：下垂体抽出液を投与して、交尾させた雌ラットを妊娠 1, 3, 5, 7, 10 および 21 日の 12 時から 13 時に殺して、排卵数、受精率、回収胚数、胚の発生、着床数、生存胎子数および黄体数を調べた。また、対照群として、無処置の 3 ~ 6 ヶ月齢雌ラットを交尾させ、投与群と同じ日に殺して同様の観察を行った。a) 妊娠 1 日目：卵管を摘出し、生理食塩水の入っている時計皿の中に入れ、卵管膨大部を切り裂き顆粒層細胞と一緒に卵子塊を取り出した。これに 1% ヒアルロニダーゼ溶液 0.1 ~ 0.2 ml を加え、37 °C に加温し顆粒層細胞を離散させて実体顕微鏡下で卵子を数えた。さらに、光学顕微鏡下で卵細胞内の雌雄前核形成の有無によって受精卵と未受精卵を区別した。b) 妊娠 3 日目：卵管を摘出して時計皿上に置き、先端を丸めた注射針を卵管峡部に挿入して生理食塩水を灌流して卵管内の卵子および胚を回収した。子宮内の卵子および胚は、子宮頸管から注射針を挿入して鉗子で固定し、時計皿上で子宮の卵管端をメスで切開して生理食塩水を灌流して回収した。実体顕微鏡下で回収した卵子および胚を数えた後、光学顕微鏡下で胚の発育段階、形態の異常および変性について調べた。c) 妊娠 5 日目：妊娠 3 日目と同様の方法で卵管と子宮から胚を回収し、その数や発生段階、異常および変性について調べた。d) 妊娠 7 日目：子宮を摘出し数珠状になった膨隆部の数を着床数とした。e) 妊娠 10 日目：反子宮間膜側の子宮壁を 2 本のピンセットで破り、慎重に胚を取りだした。正常胚および吸収胚の数を記録し、胎胞重量を測定した。f) 妊娠 21 日目：子宮間膜付着部付近の子宮壁を 2 本のピンセットで破り、胎膜を傷つけないように取り出した。生存胎子や吸収胚の数を調べ、胎胞、胎子および胎盤重量と体長を測定した。妊娠 3 日目から 21 日目までの卵巣を実体顕微鏡下で観察し、黄体数および大型胞状卵胞の有無を調べた。

結果： 妊娠 1 日目の排卵数は、投与群は表 1 に示すように投与群で有意に多く、19 例中 9 例に 19 個以上の過排卵が誘起され、受精率も 90% 以上で対照群と差はみられなかった。排卵しないものは 19 例中 5 例に認められた。また、1 日遅れて排卵するもの (表 1, Day -2) が認められたが排卵数は増加しなかった。妊娠 3 日目の胚は、両群ともにすべて卵管から回収された。妊娠 5 日目の胚は、対照群で卵管から 1 個の胚が回収されたものが 1 例あったが、他はすべて子宮から回収された。妊娠 3 および 5 日目 (表 2) の回収胚の数は、投与群は対照群よりも有意に多かった ($P < 0.01$, $P < 0.05$) が、排卵数 (黄体数) に対する回収胚数の割合 (回収率) は、対照群で 80 ~ 90% であったのに対し、投与群は約 70% と低い値を示した。また、対照群では、妊娠 3 日目に回収された胚の約 60% が 4 細胞期であったのに対して、投与群では、2 細胞期と 4 細胞期の胚がそれぞれ約 30% みられ、胚の発生が遅れていた。妊娠 5 日目には、対照群の約 90% が胚盤胞であったのに対して、投与群では、胚盤胞と桑実胚とがそれぞれ約 70% と約 10% を占めており、胚の発生に遅延が認められた。また、異常胚や変性胚の出現率は、対照群との間に差はみられなかった。妊娠 7 日目および 10 日目 (表 3) の着床数も対照群より投与群で多かったが、排卵数に対する着床数の割合 (着床率) は、

Table 1 Effect of the pituitary extract treatment on ovulation in 3-6 months old female rats on day 1 of pregnancy.

Day of autopsy	Control		treated		Day2	
	Day 1	Day 1				
		Ovulated	Not ovulated			
No. of rats	5	14	5	7		
Ave. No. of ova recovered \pm S.D. (Range)	12.4 \pm 2.2 (11-16)	22.8 \pm 8.9 (6-40)	-	9.1 \pm 2.5 (6-14)		
Rates of fertilization(%)	92.2	94.6	-	100.0		

Table 2 Number of embryos in control and treated rats on day 5 of pregnancy.

	Control	Treated
No. of rats	8	9
Ave. No. of embryos recovered \pm S.D. (range)	12.0 \pm 2.0 (9-14)	18.8 \pm 2.7 (14-23)
Ave. No. of C.L. \pm S.D. (Range)	14.1 \pm 1.9 (12-17)	28.8 \pm 4.9 (23-37)
Embryos / C.L. $\times 100$ (%)	82.7 \pm 8.6	67.0 \pm 15.4

Table 3 Number of implantation sites in control and treated rats on day 10 of pregnancy.

	Control	Treated
No. of rats	7	12
Ave. No. of live fetuses \pm S.D. (Range)	11.6 \pm 1.0 (10-13)	15.4 \pm 7.7 (5-28)
Ave. No. of C.L. \pm S.D. (Range)	11.9 \pm 0.7 (11-13)	24.8 \pm 11.9 (11-46)
Implantation rate \pm S.D. (%) (Implantation sites / C.L. $\times 100$)	97.5 \pm 4.3	69.2 \pm 18.5

対照群で90%以上であったのに対して、投与群では約70%であった。また、妊娠7日目の子宮の膨隆部の大きさや妊娠10日目の胎胞重量は、両群の間で差はなかった。妊娠21日目の生存胎子数は、投与群で18.3±4.1、対照群8.5±3.7で有意に多かった ($P < 0.01$) が、投与群の胎胞、胎子および胎盤重量は、対照群のそれらよりも有意に軽かった ($P < 0.01$)。体長には有意差はみられなかった。本実験において、卵巣に大型胞状卵胞がみられたのは、投与群の妊娠7日目に2例、妊娠10日目に1例あつただけで、その数は1~2個にすぎなかった。

考察： 本実験では雄ラットの下垂体抽出液を投与することによって、投与された成熟雌ラットの約50%に過剰妊娠を誘起することができた。PMSG 50IUとHCG 50IUの投与による過排卵誘起に比較すると下垂体抽出液投与による過排卵誘起率は低いが、過排卵が誘起された個体の着床前の胚の損失は少なく、着床率は高く、妊娠21日目における生存胎子数も多い。この違いは、PMSGとHCG処理ラットでは、妊娠初期に遺残卵胞が多く、それが分泌する過剰なエストロジエンが、妊娠初期の胚の損失の原因であると考えられている³⁾。本実験では妊娠中の卵巣への大型胞状卵胞の出現はほとんど認められなかった。しかし、投与群の妊娠3日目と妊娠5日目の胚の回収率は対照群に比較して低く、胚の発生にも遅れが認められたが、これらは排卵前の多くの卵胞から分泌されるエストロジエンや排卵時間などが影響しているかもしれない。妊娠7日目および10日目には、投与群では対照群に比較して、多数の胚が着床するが、着床した胚の発育は阻害されていなかった。妊娠21日目でも、投与群の生存胎子数は、対照群のそれよりも多く、過剰妊娠が妊娠後期まで維持されることがわかった。投与群で妊娠21日目の胎胞、胎子および胎盤重量は対照群に比較して軽いのは、多くの胎子が着床、発育するために、胎子一頭あたりの血液供給量の不足や、胎子同士の機械的圧迫などが原因と考えられた。

主要文献

1. 高橋寿太郎, 本田和正, 正木淳二：過排卵処置による成熟ラットの妊娠阻害と妊娠前半期の血清プロラクチンおよびプロジェステロン濃度の変化について, 家畜繁殖誌, 28, 59~66, 1982
2. 石橋 功：種々の量のPMSGとHCGを投与した成熟ラットにおける排卵数と受精および発育について, 家畜繁殖誌, 29, 1~7, 1983
3. Miller, B. G. and Armstrong, D. T. : Effects of a Superovulatory dose of pregnant mare serum gonadotropin on ovarian function, Serum estradiol, and progesterone levels and early embryo development in immature rats. Biol. Reprod., 25, 261~271, 1981

めん羊の反復過排卵誘起

Repeated Superovulation in the Sheep

福井 豊・加納 宏・小林 正之・小野 齊

Yutaka FUKUI, Hiroshi KANO,
Masayuki KOBAYASHI and Hitoshi ONO

帯広畜産大学畜産学部肉畜増殖学教室

Department of Meat Animal Reproduction,
Obihiro Univ. of Agr. & Vet. Med.

Superovulation was induced repeatedly in ewes with medroxyprogesterone (MAP) sponge and follicle stimulating hormone (FSH) plus gonadotropin releasing hormone (GnRH) throughout the year. Fifteen mature ewes were treated with MAP sponge for 12 days, followed by 18 mg FSH (IM) with 12-hr intervals over 3 days and 100 μ g GnRH (IM) at estrus observed. Estrous ewes were artificially inseminated with either fresh or frozen-thawed semen. Mean ovulation rates were decreased in repeatedly treated ewes: 7.4, 5.5, 8.4, 3.2, 1.3, 5.5, 1.0 for 1 - 7 treatments, respectively. Embryo recovery rate averaged 55.7% and fertilization rate was 48.8%. The present study indicates that repeated superovulation could be obtainable at least in 3 successive treatments in ewes by a progestogen treatment combined with FSH and GnRH regardless of seasons.

緒言：めん羊の受精卵移植の研究および実用化の弊害になっている一つは、めん羊の季節繁殖性である。今日まで、非繁殖季節における発情および過排卵誘起の報告は多数見られるが（1, 2），年間を通した反復過排卵に関する報告は少ない。今回、筆者らは季節に関係なく過排卵誘起を実施し、反復処置後の排卵数、卵子回収率、受精率を検討した。

方法：サフォーク種およびコリデール種の成熟雌羊15頭を用いた。雌羊に60mgの6-methyl-17-acetoxy-progesterone (MAP) を含む腔内スポンジを12日間挿入した。挿入後11, 12 (スポンジ除去日), 13日目の

3日間、12時間毎に計6回(4, 4, 3, 3, 2, 2 mg)の卵胞刺激ホルモン(FSH:アントリン、東芝製薬)を筋肉内注射した。さらに、発情出現時に100 μg GnRH(コンセラール、武田薬品)を筋注した。発情雌羊は新鮮原精液または凍結・融解精液で1~3回人工授精した。その後2~3日目に開腹手術し、排卵数の記録、卵子回収を行なった。供試頭数は漸次減少したが、同様の処置を7回まで反復した。

結果:反復過排卵処置による排卵数、卵子回収率、受精率をTable 1に示した。排卵数は反復処置により低下する傾向にあったが、3回目までは有意差は認められなかった。平均卵子回収率は55.7%で、反復処置による影響はなかった。受精率は漸次低下したが、3回目処置時の受精率は60.9%と良好であった。

Table 1. Results of repeated superovulation in the sheep

No. of treatment (Interval: days)	No. ewes treated	No. ewes heated	Ovulation (Mean±S.D.)	Ova Recovered (%)	Ova Fertilized (%)
1.	15	15	111 (7.4±3.8) ^{A,B}	59 (53.2) ^a	38 (64.4) ^a
2. (67.8±30.8)	9	6	33 (5.5±6.4)	16 (48.5) ^a	3 (18.8) ^c
3. (56.1±41.4)	7	5	42 (8.4±5.4) ^C	23 (54.8) ^a	14 (60.9) ^{a,b}
4. (47.3±20.4)	6	6	19 (3.2±1.6) ^{A,C}	13 (68.4) ^a	4 (30.8) ^{b,c}
5. (55.3±13.5)	4	3	4 (1.3±1.5) ^{B,D}	3 (75.0) ^a	1 (33.3) ^{c,d}
6. (120.0±12.7)	2	2	11 (5.5±2.1) ^D	9 (81.8) ^a	0 (0.0) ^d
7. (38)	1	1	1 (0.0)	0 (0.0) ^a	0 (0.0) ^d
Total	44	38	221 (5.8±4.5)	123 (55.7)	60 (48.8)

A,B,C,D: The same superscripts are significantly different ($P < 0.05$).
 a,b,c,d: The same superscripts in the column are not significantly different ($P > 0.05$).

考察:卵子回収は外科的であるため卵管・子宮などの癒着などにより供試頭数は減少したが、本法により季節に関係なくめん羊の反復過排卵が可能であることが認められた。特に、約60日間隔で3日目までの反復処置では排卵数の有意な低下は見られなかった。初回処置時の受精率(64.4%)は人工授精としては満足のいくものであったが、反復処置により漸次低下した。2回目処置時の受精率(18.8%)が低かったのは、雌羊の1頭が14個排卵し、その内11個回収できたがすべて未受精卵子であったためである。自然交配によれば受精率の向上が期待されよう。

主要文献:

1. Boland, M.P. and Gordon, I. (1977). J. Dept. Agric. & Fisher. Irish Republic 74:81-83.
2. Mutiga, E.R. and Baker, A.A. (1984). Vet. Rec. 114:13-15.

Biochemical Analysis of the Mechanisms of Cytoplasmic Maturation of the Oocyte

堤 治・矢野 哲・綾部塙哉・石原 理

木下勝之・佐藤和雄・水野正彦

Osamu TSUTSUMI, Tetsu YANO, Takuya AYABE,
Osamu ISHIHARA, 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 & Gynecology, Faculty of Medicine.

University of Tokyo

We have developed a microassay method sensitive enough to analyse single oocyte in order to know the mechanism of cytoplasmic maturation of the oocyte.

Immature Wistar rats were superovulated with PMS-hCG and immature oocytes with intact germinal vesicle (GV) and maturing oocytes in GVB and PB stages were obtained. They were denuded, freeze-dried and applied for the assay to determine the enzyme activities and metabolite levels.

Glycolytic pathway in the immature oocyte was incomplete. Hexokinase activity was demonstrated to be one-tenth or one-one hundredth as low as in other tissues, indicating that the oocyte can not utilize glucose as energy source. The activities of hexokinase and other energy-yielding enzymes increased markedly in the process of maturation being induced by hCG. ATP content was also dramatically increased in the maturing oocytes.

The results indicate glycolysis is stimulated in parallel with oocyte maturation, in other words, the more energy metabolism is activated, the more oocyte maturation is promoted. The present study indicates that completion of the metabolic pathway for glycolysis may be a good indicator to know cytoplasmic maturation.

緒論：哺乳動物の卵子は一般にゴナドトロピン刺激をうけ第一減数分裂を再開し成熟する。同様の現象は、卵子を卵胞からとり出し培養すると観察される。¹⁾ ところが、近年の体外受精胚移植等の研究により、形態学的には成熟したと考えられる卵子でも、*in vitro*のものは *in vivo*のものに比較して受精率が低く、受精後の発育が悪いことが報告された。²⁾ これは卵子の成熟においては、(1)核の形態学的变化と同時に(2)細胞質内の質的変化を知る必要があることを示す。そこで我々は卵1個を試料とする微量定量法³⁾を用いて、細胞質の側からみた卵成熟機構を生化学的に解析することを試みた。

方法：

1) 動物実験

Wistar系幼若雌ラット(25日齢約50g)に、PMS 10iu/0.2ml 生食、その48時間後にhCG 30iu/0.2ml 生食を皮下注射し過排卵をおこした、排卵はhCG投与後約12時間でおこり排卵率は、8時間後0%，16時間後100%であった。

2) 卵試料

PMS処置の卵胞からは卵核の認められる未成熟卵、hCG投与8時間以内の卵胞からは、卵核崩解の起こった卵を採取した。hCG投与16時間では卵管より極体の認められる成熟卵を採取した。卵は周囲の卵丘細胞を剥離除去し单一の卵とした上で凍結乾燥した。

3) 生化学的分析

卵の細胞質のもつ、解糖系の律速酵素である hexokinase, phosphofructokinase (PFK), 五炭糖シャントの律速酵素 glucose 6-P dehydrogenase (G6PD), TCA回路の malate dehydrogenase (MDH), 解糖末端の lactate dehydrogenase (LDH) 等の活性や、TCA回路の中間代謝物である citrate, 高エネルギー化合物 ATP の含量をサイクリング法⁴⁾を用いて增幅定量した⁵⁾(図1参照)。反応液組成等は Lowry によった。

また卵の重量測定にはミクロ天秤、試験管の代わりにはオイルウェル法³⁾を用いた。

結果：

1) 未成熟卵の酵素活性

PMS処置の未成熟卵の酵素活性を対照として卵巣ホモジネートのものを図2に示した。 hexokinase活性は、 $35.0 \pm 2.8 \text{ nmol/mg of dry weight/h}$ (mean \pm S. D. n = 8) と極めて低い。G6PD活性は極めて高活性を示した。

図1 Glucose Metabolism

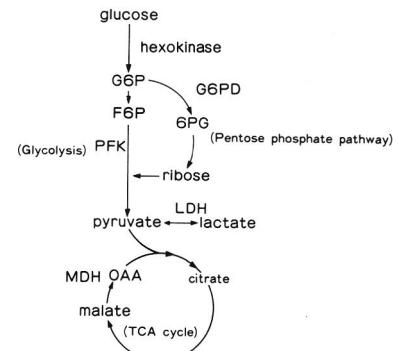
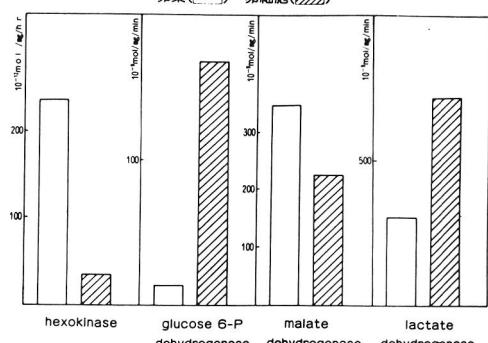


図2 酵素活性の比較(乾燥重量当り)
卵巣(□) 卵細胞(▨)



MDH や LDH の活性も高く、一般の体細胞の水準であった。

2) 成熟過程での活性変化

卵成熟過程での活性変化を hCG 投与後経時にみると(図3)，MDH の特異活性は約 3 倍と著明に増加した。hexokinase 活性、PFK 活性も 2 倍程度に増加し、解糖系が活発化することが明らかとなった。LDH 活性に著変なく G6PD 活性は低下傾向を示した。

3) ATP と citrate 含量の変化

ATP 含量は図4に示す PMS 处理卵の 0.28 pmol/oocyte から、hCG 处理 16 時間の 0.61 pmol/oocyte へと 2 倍以上の増加を示し、卵成熟に伴う解糖の活発化を示した。PMS 处理による差は認められなかった。逆に、citrate 含量は、2.43 ± 0.40 pmol/oocyte から 1.80 ± 0.26 pmol/oocyte へと hCG 投与後有意に低下した。

考察：

1) 未成熟卵の特徴

未成熟卵のもつ酵素量で、最も特徴的なことは、hexokinase 活性が他組織に比較して $1/10 \sim 1/100$ と極めて低いことである。これは、卵では hexokinase が解糖の律速酵素となり、glucose 利用が不良で、卵の解糖系が未熟であることを示す。G6PD 活性が高く、五炭糖シャントは活発で、核酸合成の素材であるリボースの供給や、還元型補酵素の NADPH 等の産生はおこなわれると考えられる。MDH や LDH の活性が高いことは、Pyruvate などの基質の供給を受ければ、独自の ATP 産生が可能であろう。

2) 成熟過程での変化

hCG 投与後の卵成熟過程で、卵内部の解糖系の活性は上昇し、エネルギー代謝が活発化することが分かった。各酵素活性が上昇する中で、G6PD 活性が低下することは、LH 刺激により、五炭糖シャントというバイパスから解糖の主要路へとスイッチの切

図3 hCG投与後成熟過程での酵素活性の変化

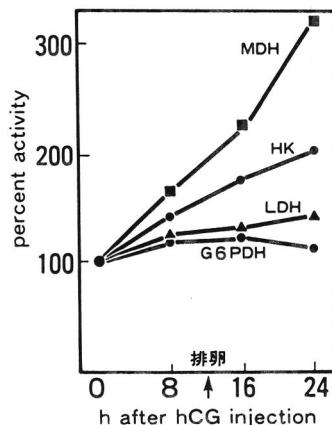


図4 卵内 ATP 含量

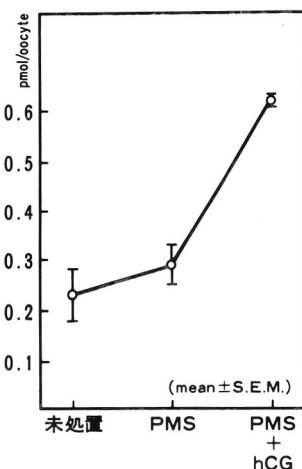


図5 卵成熟にともなう代謝経路の変化



成熟にともない五炭糖シャントは低下する
F6Pは、Phosphofructokinaseのactivatorで
成熟にともない増加する(post toward activation)

替が起こることを意味する(図5)。これに関連して卵内部の解糖系の制御には、巧妙な代謝調節機構が関与することが明らかとなった(図6)。まず、先に述べたスイッチの切替により卵内で fructose 6-P が蓄積してくる。これは代謝系の上位に生成する代謝物が後方の律速酵素をアロステリックに活性化するモデルであり、 PFK のアクチベーターである。逆に PFK の活性をアロステリックに抑制する citrate 含量は低下し、抑制は解除の方向にすすむ。これより、 PFK 活性の制御には酵素量の増加のみならず F6P の増加による post forward activation および citrate 減少による negative feed back の解除が関係することが明らかになった。ATP 含量の増加は、卵成熟に伴うエネルギー代謝の活発化を反映していると考えられる。

3) 細胞質の成熟

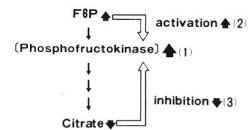
未成熟卵のエネルギー代謝は、不完全で未熟であり、 LH 刺激後、代謝路の変化、活性化が起り、成熟型へと移行する。すべての細胞は、生命を維持しなんらかの活動をおこなうために、エネルギーが供給されなければならない。エネルギー代謝の未熟型から成熟型への変化は、細胞質成熟の指標ということができるが、さらに進んで細胞質内のエネルギー代謝の成熟こそが細胞質の成熟を代表するととも考えられる。そこで我々は、卵核崩壊に始まる核の成熟に対して、細胞質の成熟を卵内部のエネルギー代謝の成熟としてとらえ、卵成熟機構をさらに究明したいと考えている。OMI や cAMP の成熟抑制効果についても核、細胞質の両面から分析を加え、近年明らかになりつつある、卵の特異なステロイド代謝能、プロスタグラジン代謝能等⁶⁾との相関についても明らかにしたい。

文献：

- 1) Pincus, G. and Enzmann, E. V. : The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro, J. Exp. Med., 62 : 665, 1935
- 2) Fulka, J., Pavlok, A. and Fulka, J. : In vitro fertilization of zona free bovine oocytes matured in culture, J. Reprod. Fert., 64 ; 495, 1982
- 3) 堤治、矢野哲、石原理、石川真木、木下勝之、佐藤和雄、水野正彦、坂元正一、サイクリング法による哺乳動物卵子代謝動態解析、哺乳卵研誌 1 : 45, 1984
- 4) 堤治、佐藤和雄、坂元正一、加藤尚彦：酵素的サイクリングによる超微量分析法の産婦人科領域における応用、臨婦産 34 ; 653, 1980
- 5) Lowry, O. H. and Passoneau, J. V. : A flexible system of enzymatic analysis, Academic Press, New York 1972
- 6) 堤治、受精着床過程における卵の物質代謝およびその microenvironment 形成の生化学的解析、日産婦誌 36 : 1377, 1984

図6 PFK活性の制御機構

1. 酵素の増加 (Induction)
2. F6P增加 (feed forward activation)
3. Citrate減少 (feed back inhibition↓)



Steroid Metabolism in the Mammalian Oocyte

綾部琢哉・堤 治・北川浩明・矢野 哲・木下勝之・佐藤和雄・水野正彦

Takuya AYABE, Osamu TSUTSUMI, Hiroaki KITAGAWA,
Tetsu YANO, Katsuyuki KINOSHITA, Kazuo SATOH,
Masahiko MIZUNO

東京大学医学部産科婦人科学教室

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

In order to know the significance of estrogens on mammalian oocyte maturation, several experiments were done using PMS + hCG superovulated Wistar rat.

1. Conversion experiment revealed that the oocyte itself doesn't produce E, but cumulus cells produce an amount of E.
2. 17β -HSD activity in the oocyte was measured by cycling method. It was high compared with other tissues. It showed that oocyte has metabolic capacity of E.
3. Aromatase inhibitor did not suppress the number of oocytes ovulated, but did suppress the completion of the 1st meiotic division. E₂ treatment showed recovery effect.

緒言：両生類卵子においては、その成熟過程に、ステロイドホルモンが重要な役割を演じているが、哺乳動物卵子においては、卵成熟におけるステロイドの意義はいまだ明らかではない。

今回我々は、卵・卵丘細胞におけるエストロゲン（E）の産生・代謝動態を分析し、その卵成熟における意義について検討を加えたので報告する。

方法：Wistar 系ラット（25日齢）に、PMS（10iu）、48時間後に hCG（30iu）を皮下注し、過排卵を起こさせ、hCG 投与16時間後に卵管膨大部より採取した卵・卵丘細胞、及び、卵丘細胞を除去した卵を、試料とした。

E 産生能の検索には、³H-androstenedione (Δ^4) を基質とした転換実験を行なった。即ち、³H- Δ^4

60p mol (5 μ Ci) と progesterone (P₄; 5 α -reductase による基質の消費を防ぐ) を添加したm BWW 200 μ l に、それぞれ、卵600コ、卵・卵丘細胞複合体250コを加え、95% air, 5% CO₂ 37°C 下で24時間培養した。産生物をクロロホルム：メタノール (1:1) にて3回抽出し、Phenolic separationを行ない、薄層クロマトグラフィー (TLC) にて分離した。E と思われる放射能ピークを無水酢酸：ピリジン (1:1) にてアセチル化し、再びTLCを用いて、純品Eのアセチル化産物と同じ位置にピークができるることにより同定した。

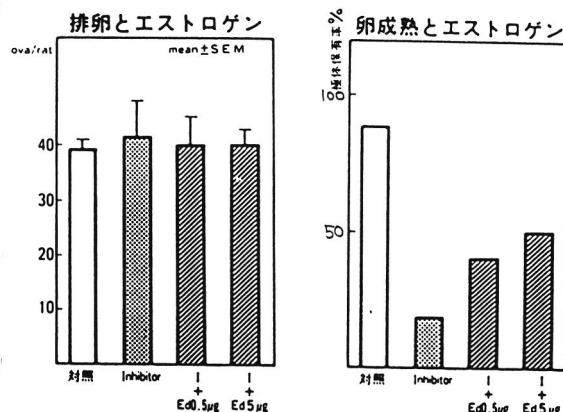
E代謝能の検索には、Estrone (E₁)–Estradiol (E₂) 間の転換酵素である17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD) の活性を、サイクリング法を用いて測定した。

Eが、卵の成熟に及ぼす影響については、E産生酵素であるaromataseの阻害剤を用いて検討した。即ち 5 α -dihydronorethisterone 0.5 μ gをhCGと同時に投与し、排卵数と、第1極体保有率を観察した。更に E₂ 0.5 μ g、あるいは5 μ gを補充して、阻害からの回復の有無をみた。

結果：1) E産生能；卵自身は600個培養しても△⁴からEへの転換は認められなかつたが、卵・卵丘細胞複合体250個では、Eが0.34 \times 10⁶ DPM (転換率8%) 産生されていた。

2) 17 β -HSD活性は、卵で1.37 \pm 0.46 p mol/oocyte/h (mean \pm SD. n=10。卵1個あたりの蛋白量25ng とすれば55 n mol/mg protein/h) と、高レベルで代謝能が存在した。

3) E産生を阻害した時、排卵数には変化が認められなかつた。しかしながら、第1極体保有率は、対照80%に比べ、18%と有意に低下し、E₂ 0.5 μ g補充群では41%、E₂ 5 μ g補充群では50%と、回復がみられた。



考察：本研究により、卵自身にはaromatase活性が検出されず、Eは主として卵丘細胞側で産生されること、卵細胞はEを代謝しうること、Eが卵の成熟過程に関与していること、が明らかにされた。即ち、卵丘細胞側で産生されたEが、何らかの経路で卵側に移行して代謝され、その過程で卵の成熟に影響を及ぼしていることが推測されよう。今後は、卵の細胞質の成熟とEとの関係等について検討をすすめていく予定である。

主要文献

- 堤 治、他：受精着床過程における卵およびその microenvironment 形成の生化学的解析、日産婦誌、36；1377、1984。
- Eppig, J. J., Freter, R. R., Ward-Bailey, P. F., and Schultz, R. M. : Inhibition of oocyte maturation in the mouse : Participation of cAMP, steroid hormones, and a putative maturation-inhibitory factor, Dev. Biol., 100 ; 39, 1983.

ハムスター精子尾部の卵細胞質への進入

Incorporation of the Sperm Tail into the Hamster Oocytes

平 尾 幸 久・平 岡 純 一*

Yuki-hisa HIRAO and Jun-ichi HIRAKAWA*

和歌山県立医科大学 生物学教室・解剖学教室*

Department of Biology and Department of Anatomy, Wakayama Medical College*

At various times after the artificial insemination *in vivo*, the fertilized eggs were flushed from the ampulla of the oviduct of hamsters. The processes of the sperm tail entry into the ovum were studied with the scanning electron microscope. At 6~7 hr after the insemination, the sperm head was incorporated completely into the ooplasm, but the entire sperm tail still projects freely over the oocyte surface. The region which the second polar body is extruded was different from where the first polar body emerged. At 8~9 hr after the insemination, the sperm tail was attached in a ripple-like fashion to the oocyte surface. The sites where some portions of the tail attached were trapped by the microvilli of the oocyte, and began to sink into the ooplasm. Thus, the entire sperm tail was incorporated into the ooplasm successively but almost synchronously. From these observations, we have become to propose a model for the mechanism of the sperm tail entry into the ooplasm *in vivo*.

緒言：近年哺乳動物卵の受精現象に関する解析に走査電顕(SEM)を用いて、卵表上に見られる微細構造の変化を観察した研究が多い(1~8)。しかしながら、これまで行われた観察は皆、卵表上での精子頭部の取り込みに関する問題にのみ終始された感がある。即ち卵表に接した精子頭部はEquatorial segment及びpost-acrosomal regionで卵膜と融合したあと、やがて頭部全体が卵細胞質に沈んで行くことが明らかにされた(1.2.4.5.7)。そして頭部の侵入後、やがて尾部もその全長にわたって卵細胞質へ取り込まれると考えられている。尾部の取り込みはあたかも頭部の融合点から卵内に吸い込まれるかのように思われている。しかしながら侵入した頭部はただちに膨化(Decondensation)を起し、まだ卵表外にある長い尾部はもはやその推進力は失っており(3.9~11)，頭部の膨化部を卵細胞質中に深く押しやりながら、自らも卵細胞質に進入すると考えるには不自然さが残る。そこで本観察はゴールデンハムスターを用い、頭部の侵入後に起り得る出来事に注目して、尾部がどのようにして取り込まれるかをSEMで詳しく観察した。その結果、尾部の全長にわたって、ところ

どころ卵表上で膜融合を起しながら、ほぼ同時にその全体が取り込まれることが判ったので報告する。

方法：ゴールデンハムスターは自動的に昼夜をコントロールした飼育室で繁殖させたものを用いた（室温は20°C～25°C）。受精卵を得るために、成熟した雌（6～10週齢、体重100～300g）の発情周期の第1日目の午前にPMSGを30単位、続いて第3日目の夕方にHCGを25単位を腹腔内に注射することによって過剰排卵させた。HCGの注射のあと12時間目に、雄の精巣上体尾部の基部を切り出し、2mlの0.85%のNaCl中で精子懸濁液を作り、次いで0.2～0.3mlの精子懸濁液を雌の子宮に注入して人工媒精を行った。人工媒精後6～10時間の間の各1時間毎に、輸卵管を切り出し、Ampulla部に注射針（No.30 gause needle）をさし込んでFlushすることによって受精卵を得た。取り出した卵子を0.1%Hyaluronidase、次いで0.1%Trypsinで処理して、卵丘細胞及び透明帯を溶解して裸の卵子を得た。卵子の固定には2.5%Glutaraldehydeで2時間固定した。固定後、予めpoly-L-lysine(sigma)溶液に5×5mmのガラス片を浸しておいて、使用時に0.1M cacodylate bufferで洗ったあと、このガラス片に卵子を乗せて付着させた。卵子の付着したガラス片を0.1M cacodylate bufferの入った秤量ビンに入れて、冷蔵庫（4°C）で一晩保存した。脱水はアセトンで行い、酢酸イソアミルに通して臨界点乾燥を行った。観察はHitachi S-450型の走査電子顕微鏡で行った。

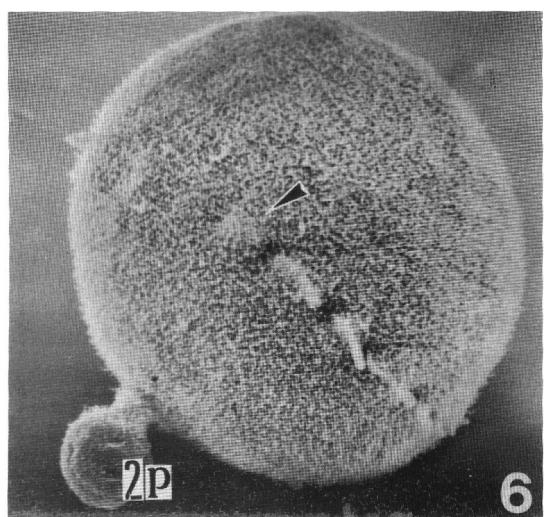
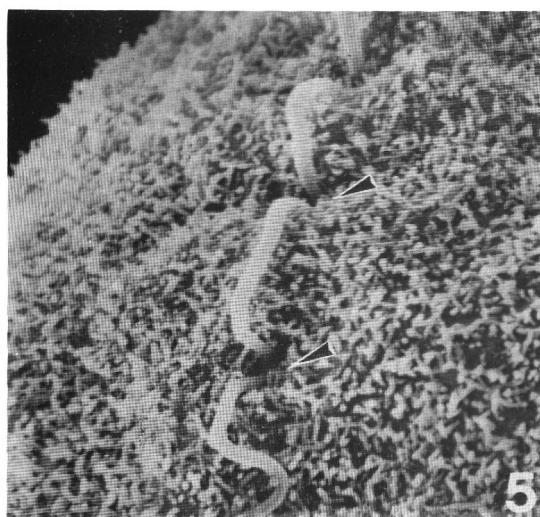
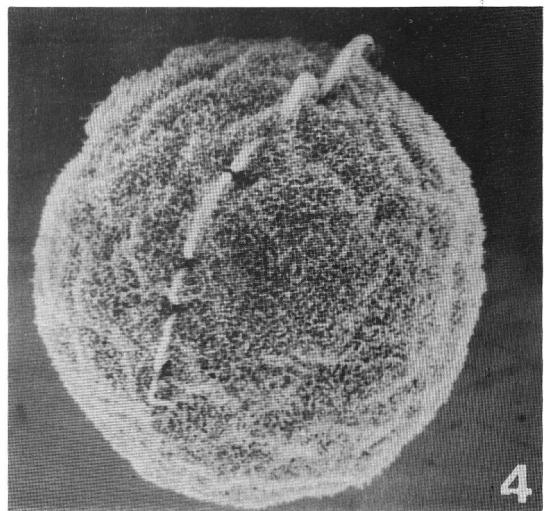
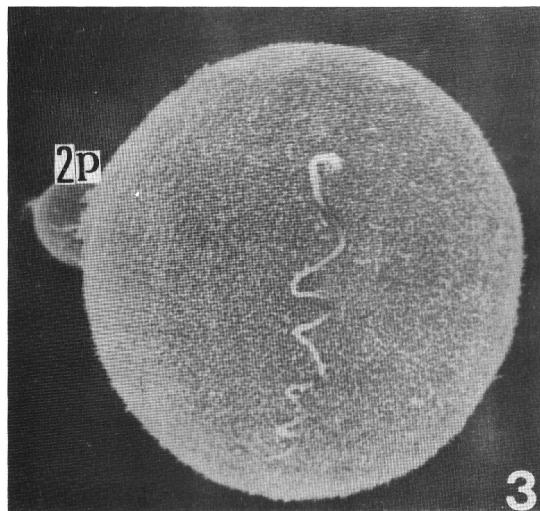
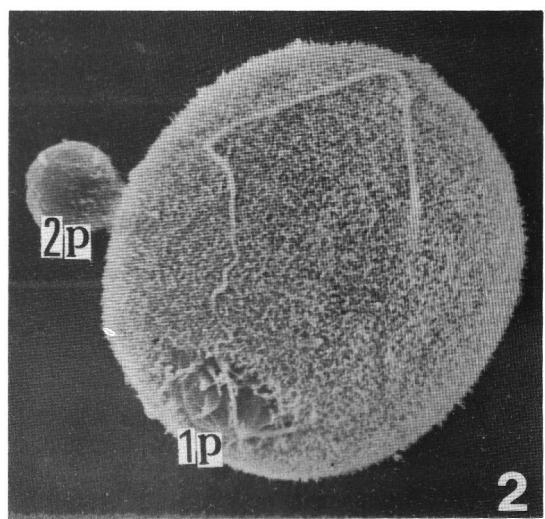
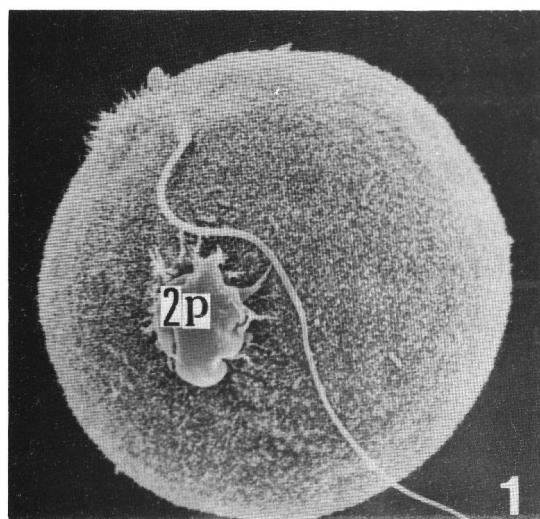
結果：観察は320ヶの卵子について行った。上記の人工媒精によって得られた受精卵はすべてMonospermyの卵子が得られた。

人工媒精後6～7時間で、精子頭部の取り込みはほぼ完了し、長い尾部は卵表外に見られた（Figs 1～2）。この時期には第2極体が放出中か、放出がほぼ完了する（Figs 1～2），又第2極体の放出は、いつも第1極体の放出場所とはやや離れたところで起った。第1極体の放出跡は太くて長いMicrovilliが粗に分布することによって特長づけられる（Fig. 2）。精子頭部の侵入点は第1極体放出の近い所や、それとはまったく離れた所で見られ、いずれもMicrovilliの密集するところで起った。しかし頭部の取り込みの所にはIncorporation coneは見られなかった（Figs. 2～3）。頭部の取り込みのあと直ちに頭部は卵細胞質でDecondensationを起した。

人工媒精後8～9時間では、第2極体の放出は完了するが極体はまだ卵表と連らなっている（Fig.3）。又この時期では頭部は卵細胞質中で前核形成が始まっている。卵表外に突き出していた長い尾部は卵表上に波を打つかのような形で卵表に付着する（Fig.3）。卵表を1周するほどの長い尾部は卵の半球上にすっぽり収まるような形で付着する。一見すると比較的等間隔の縫い糸の目のように見える（Fig.4）。これらの目と目の間では、もう既に卵細胞質中に沈んでおり、そこでは卵細胞膜と融合を起していることを暗示している（Figs.4～5）。

人工媒精後10時間で、尾部は次から次へと卵表から消えて行くのが見られた（Fig.6）。尾部の卵細胞質への取り込みは中片から順次その後端に向けて起るが、ほぼ同時期に尾部全域にわたって卵表上から取り込まれた。

考察：本観察を通じて、頭部の取り込みの後で、尾部の卵細胞質への進入が特異的な方法で起ることが明らかになった。これまで、尾部の卵内への進入は頭部の侵入後、その膜融合点から吸い込まれるかのように推測されている。しかしながら卵表上で精子頭部のEquatorial segment及びpost-acrosomal regionで膜融合を起して卵内に取り込まれた頭部は、ただちに卵細胞質中で膨化（Decondensation）が起る。この時光顕で見る限り、中片の前端部は頭部から既に離れている。従って長い尾部が卵細胞質中に進入するにしても、膨化し



た頭部を尾部の推進力でさらに卵内に深く押しやりながら尾部を進入させると考えるには不自然さがある。事実、透明帯を通り抜けた精子の尾は急速に動きが失われることがHamsterやMouseで観察されている(3.9.10)。Yanagimachi(11)によれば、ハムスターの精子がハムスター卵の透明帯を通過した後、囲卵腔中の精子尾部は急速に動きを失い、小さな震動するような動きに変わる。そして頭部がDecondensationを起したあとに、尾部はその基部から先端に向けてゆっくりと、しかも速やかに卵内に取り込まれるという。本観察では、頭部がほぼ完全に取り込まれたあと、長い尾部は卵表外に突き出していた。恐らく囲卵腔中でゆっくりbeatしていることを予測させる。ところが次の1時間で、尾部の一部が卵表上のMicrovilliによって捕えられ、卵の半球上に波状に付着するのが観察された。それぞれの付着したところでは、尾部の一部は卵細胞質中に沈んでいるのが見られた。この様な状態では、一見すると縫い糸で卵表を縫い付けた糸目のように比較的規則的な配列を示した。このような付着は尾部の基部からその後端に向けて順次起るのではなく、尾部の全域にわたってほぼ同時に起った。又付着点からの取り込みも、尾部の基部から先行して起るが、ほとんど同時にその全域にわたって起った。このように卵表の半球上に尾部の全域が波状にヘパリ付くことによって、それぞれの付着点で卵膜と融合して卵内に取り込まれるのは、長い尾部をスピーディーに取り込ませるに最も合理的な方法で行われていると云える。

一方 in vitroで、Zona freeのハムスター卵を受精させた時、精子の前核が形成されたあとでも、尾部の大部分は卵の外に残され、尾部の取り込みが遅れる。このことはYanagimachi(11)によっても指摘されている。しかし in vivo での受精では例外なく精子尾部はその全長にわたって取り込まれた。このことは透明帯によって形成される囲卵腔と関係があるのかも知れない。即ち囲卵腔に侵入した尾部はその中でゆっくりとbeatしながら、囲卵腔の最も狭いところで、尾部の一部が卵のMicrovilliに接し、その結果Microvilliによって捕えられると、尾部の動きは制限され、その動きは小さな振巾に変わり、卵表上で次々に捕えられ波状に付着することが予想される。ところが囲卵腔を持たない裸の卵では、卵表外に突き出た尾部の動きはその振巾も大きく、いつまでたっても卵表上で捕えられ難く、その取り込みも大巾に遅れるものと思われる。

主要文献

1. Yanagimachi, R. and N. Noda, 1972. *Experientia*. 28:69-72.
2. Shalgi, R., D. M. Phillips and P. F. Kraicer, 1978. *Gamete Res.* 1:27-37.
3. Sato, K. and R. J. Blandau, 1979. *Gamete Res.* 2:295-304.
4. Shalgi, R. and D. M. Phillips, 1980. *J. Ultrastruct. Res.* 71:154-161.
5. Phillips, D. M. and R. Shalgi, 1980. *J. Ultrastruct. Res.* 72:1-12.
6. Suzuki, S., H. Kitai, R. Tojo, K. Seki, M. Qba, T. Fujiwara and R. Iizuka, 1981. *Fertil. Steril.* 35:142-128.
7. Phillips, D. M. and R. Yanagimachi, 1982. *Develop., Growth and Differ.* 24(6):543-551.
8. Ebensperger, C. and C. Barros, 1984. *Gamete Res.* 9:387-397
9. Yanagimachi, R., 1966. *J. Reprod. Fertil.* 11:359-370.
10. Yang, W. H., L. L. Lin, J. R. Wang and M. C. Chang, 1972. *J. Exp. Zool.* 179:191-206.
11. Yanagimachi, R., 1981. *Mechanisms of fertilization in mammals*, In, "Fertilization and embryonic development in vitro" (L. Mastroianni and J. D. Biggers eds.), pp.88-182, Plenum Press, New York.

The ability of hamster follicular oocytes
to form male pronuclei

ハムスター卵胞卵子の雄性前核形成能について

Yoshie Suzuki and Kahei Sato

鈴木 淑恵・佐藤 嘉兵

Laboratory of Animal Reproduction, College of Agriculture
and Veterinary Medicine, Nihon University

日本大学農獸医学部・家畜繁殖学教室

ハムスター卵胞卵子の雄性前核形成能について検討を加えた。成熟雌ハムスターに30IUのPMSG投与を行い、52-55時間後に30IUのHCGを投与し、10,12,13あるいは15時間後に卵胞卵子を採取した。この卵胞卵子を前培養した精子を用いて体外受精を行った。その結果、受精した精子の頭部膨化及び雄性前核形成の割合は卵子の成熟が進むにつれて増加した。また、上記の時間に採取した卵胞卵子を2時間培養した後に体外受精した結果、それらの雄性前核形成率は培養しなかったものに比べ有意に増加した。

Abstract: Using in vitro fertilization, the ability of sperm pronucleus formation in hamster follicular oocytes was examined. Female golden hamsters were given 30IU PMSG followed by 30IU HCG injection 52 to 55hs later. The oocytes were recovered at various times (10, 12, 13 or 15h) after HCG injection. The proportion of the head of penetrating spermatozoa to swell and form the pronucleus were gradually increased as maturation of oocytes advanced. When the follicular oocytes were cultured in a chemically defined medium for 2hs before insemination, cultured oocytes were more capable of forming the pronuclei to non-cultured oocytes.

The ability of immature follicular oocytes in mammals to undergo maturation under various in vitro conditions has been reported (Biggers, 1973; Yanagimachi, 1981). However, it has been shown that errors in fertilization process in follicular oocytes matured in vitro occur (Thibault et al., 1975). This error of fertilization is an inability of the head of penetrating spermatozoa to swell and form a normal pronucleus. These results indicate that the in vitro matured oocytes lacks such factors for decondensation and formation of sperm nucleus. At the present time, however, informations about the mechanisms on sperm pronucleus development are few. The present study was performed to examine when hamster follicular oocytes become capable of forming the male pronucleus.

MATERIALS and METHODS

The mTALP medium(Bavister and Yanagimachi,1977) was used for the sperm preincubation and in vitro fertilization. The medium was the following composition: 101.02mM NaCl, 2.68mM KCl, 1.80mM CaCl₂, 0.49 mM MgCl₂·6H₂O, 0.36mM NaH₂PO₄·H₂O, 35.70mM NaHCO₃, 4.50mM D-glucose, 0.09mM Na-pyrubate, 9.00mM Na-lactate, 0.50mM Taurine, 0.05mM L-epinephrine, 75IU/ml K-penicillin-G, 100ug/ml Streptomycin-SO₄, and 15.0 g/l bovine serum albumin (BSA). The medium for oocyte culture was including 4 amino acids(0.2mM L-Isoleucine, 1.0mM L-Glutamine, 0.05 mM L-Methionine, 0.1mM L-Phenylalanine) and 0.5g/l Polyvinyl-pyrrolidone in mTALP medium. The pH of both chemically defined media were adjusted to 7.2. Mature female golden hamsters(100-120g) were given 30IU pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) by i.p. injection on Day1(day of proestrous discharge) prior to 1200h followed by i.p. injection of 30IU human chorionic gonadotropin (HCG) 52 to 55 hs later. Animals were killed at various times(10,12,13 and 15hs) after HCG injection, and excised ovaries were placed on a watchglass containing M2 medium(Quinn et al., 1982) without BSA. Large preovulatory follicles near the ovarian surfaces were broken with a sharp needle to release oocytes from the follicles. The oocytes were placed to disperse cumulus cells in mTALP medium containing 0.2% bovine testicular hyaluronidase(Sigma.) for 3-5 min. Cumulus-free oocytes were rinsed 3 times in the incubation medium followed by insemination with spermatozoa preincubated for 3 to 4 hs in mTALP medium, and incubated for 5 hs. The other experiment, the follicular oocytes with surrounding cumulus masses were rinsed 2 times by the oocyte cultured medium, and then cultured for 2 hs. After 2h-incubation, the oocytes were inseminated after dissolution of cumulus cells using hyaluronidase, and incubated in mTALP medium for 5 hs. After incubation for fertilization, all oocytes fixed in 2.5% glutaraldehyde were mounted between slides and coverslips supported by 4 spots of vaseline-parafine mixture, and subsequently examined with the phase-contrast microscope for signs (sperm penetration, sperm head enlargement, and the formation of male pronucleus) of fertilization.

RESULTS and DISCUSSION

The ability of oocytes recovered from the follicles 10 to 13 hs after HCG injection to be fertilized was assessed by preincubated spermatozoa. As shown in Table 1, after 10 to 13 hs of HCG injec-

tion, the proportion of oocytes recovered from the follicles formed male pronuclei increased gradually as maturation advanced. Ovulation was seen between 12 to 15 hs after HCG injection. While, pronucleus formations were observed in 54.5-85.1% of oocytes recovered from the oviducts after 13 and 15 hs of HCG injection respectively. In order to examine a relationship between ovulation and the ability of oocytes to form male pronuclei, and then fertilized follicular oocytes cultured for 2 hs prior to insemination and examined about morphological changes occurring in the sperm heads 5hs after insemination. As shown in Table 2, 40.8-56.3% of oocytes recovered after 10 to 13 hs of HCG injection formed male pronuclei in their cytoplasm. While, pronucleus formations were observed in 85.7% of ovulated oocytes recovered after 13hs of HCG injection.

Usui and Yanagimachi (1976) have reported the presence of a factor necessary for decondensation of the sperm nucleus in the cytoplasm of immature hamster oocytes. This factor was called 'sperm nucleus-decondensing factor (SNDF)' by them. They also have observed the SNDF begins to appear in the cytoplasm after the germinal vesicle breakdown, increases with the advancement of nuclear maturation, and reaches a maximum at the time of ovulation. In our study, the ability of oocytes to decondense and develop the sperm nuclei was a maximum 2hs after ovulation. Similar results were found in 2h-cultured follicular and ovulated oocytes recovered after 10 to 13 hs of HCG injection. Judging from these results, we estimated that the egg cytoplasm was activated by stimulation of ovulation, and some factors like the SNDF necessary for development of the male pronucleus increased during a short period after ovulation.

REFERENCES

- Bavister, B.D. and R. Yanagimachi (1977): Biol. Reprod., 16:228-237.
- Biggers, J.D. (1973): The regulation of mammalian reproduction. S.J. Segal, ed. Fogarty International Center Proceedings. pp.273-283.
- Hirao, Y and R. Yanagimachi (1979): Zool. Mag. (Tokyo), 88:24-33.
- Quinn, P., C. Baross and D.G. Whittingham (1982): J. Reprod. Fertil., 66:161-168.
- Thibault, C., M. Gerard and Y. Menezo (1975): Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 15:705-714.
- Usui, N. and R. Yanagimachi (1976): J. Ultrastruct. Res., 57:276-288.

Yanagimachi, R. (1981): Fertilization and embryonic development in vitro. L. Mastroianni, Jr. and J. D. Biggers, ed. Plenum Press, New York, pp. 81-182.

Table 1: In vitro fertilization of hamster oocytes at various stages of maturation

Time after HCG injection (hr)	No. of eggs inseminated	No. (%) of penetrated oocytes with		
		Total	enlarged	male
		sperm head		pronucleus
follicular oocytes				
10	42	35(83.3)	13(37.2)	0
12	41	39(95.1)	21(53.9)	3(7.6)
13	29	24(88.9)	17(70.8)	3(12.5)
ovulated oocytes				
13	13	11(84.6)	4(36.4)	6(54.5)
15	56	47(83.9)	6(12.8)	40(85.1)

Table 2: In vitro fertilization of hamster oocytes cultured for 2hr in a chemically defined medium

Time after HCG injection (hr)	No. of eggs inseminated	No. (%) of penetrated oocytes with		
		Total	enlarged	male
		sperm head		pronucleus
follicular oocytes				
10	32	27(84.4)	4(14.8)	11(40.8)
12	45	42(93.3)	12(28.6)	20(47.6)
13	16	16(100.0)	7(43.7)	9(56.3)
ovulated oocytes				
13	8	7(87.5)	1(14.3)	6(85.7)

体外成熟培養牛卵胞卵子への精子注入に関する研究

II. 凍結乾燥精子頭部の注入

Freeze-dried sperm head injection into bovine eggs
matured in vitro.

亀山賢次，浜野光市，菅原七郎，正木淳二

Kameyama, K., Hamano, K., Sugawara, S.
and Masaki, J.

東北大学農学部家畜繁殖学教室

Dept. of Anim. Sci., Fac. of Agric., Tohoku Univ., Sendai

Bovine sperm head stored by freeze-drying was injected into bovine oocytes matured in vitro by microsurgery. All the sperm successfully injected were decondensed and 13.0 percent of them (6/46) developed into male pronucleus in egg cytoplasm. The result indicate that bovine freeze-dried sperm heads may be available for in vitro fertilization if injected into bovine oocytes.

緒言：哺乳動物における体外受精研究は、受精現象の解明に貢献している。家畜では、精子および卵子の受精能の検査、不妊および切迫屠殺雌の卵子の利用などの観点から、体外受精法の確立が待たれている。もし受精能を有する精子を人為的に直接卵子内に注入して受精および発生に導くことができれば、最少の精子数で目的を達することになる。また、自力で受精し得ない精子、例えば奇形精子、死滅精子、さらには異種精子の注入による受精試験も可能となる。また、受精の各過程の重要性や意義などを解析するためにも役立つと考えられる。

哺乳動物卵子の精子注入の研究は、1976年、初めてハムスターで試みられた。すなわち、上原と柳町は、排卵直後のハムスター未受精卵に精子核を注入し、雄性前核への発達を認めた。¹⁾また、精子核の機能は比較的安定しており、超音波処理により尾部や先体の一部を除去したハムスター精子頭部²⁾や凍結乾燥した人精子¹⁾でも、ハムスター卵細胞質内で雄性前核に発達し得ることが報告されている。その後、マウス精子を注入したラット卵子は2細胞期へ³⁾また、マウス配偶子を用いた実験では胚盤胞期まで発生⁴⁾したことが報告されている。本実験では、体外で成熟させた牛卵胞卵子内に凍結乾燥後4°Cに保存した牛精子頭部を注入し、興味ある知見を得たので報告する。

方法：牛卵胞卵子の採取と成熟培養の方法は菅原ら⁵⁾の方法に従った。成熟培養後の卵子は、顆粒層細胞を除去するために、0.1%ヒアルロニダーゼを含むHam's F-12に移し培養した。30分後、顆粒層細胞は、実体顕微鏡下で針を用いて除去した。その後、卵子は5%牛胎児血清、0.05 mMピルビン酸ナトリウム、

21.5 8 mM乳酸ナトリウムを含むHam's F-12に移し, 精子頭部の注入を行った。この培養液は, 顕微操作後の培養にも用いた。

注入精子は, 人工授精用の凍結ストロー精液を融解して用いた。生理食液で洗浄後, インジェクション・ピペットで1個の精子を吸出し卵子に注入する操作を容易にするため, 超音波処理によって尾部を除去し, 頭部のみとした。凍結乾燥処理は, 超音波処理液を生理食塩水で2回洗浄したのち, 0.1 mlずつ分注し, 凍結乾燥機に1時間かけた。凍結乾燥した精子頭部は4°C下で1週間から6か月間保存したものを使用した。使用時には0.1 mlの蒸留水を加えたのち, さらに3%ポリビニルピロリドンを含む生理食塩水1 mlを加え, よく振とうして用いた。

顕微操作終了20時間後に卵子を固定し, 注入した精子頭部の発達段階を調べた。また, 対照区の卵子には, 同様の機械的刺激により雌性前核の形成が見られるかどうか調べるために, 生理食塩水+3%ポリビニルピロリドンを注入した。

結果および考察: 卵子への注入に成功した凍結乾燥精子頭部はすべて膨化し, 13% (6/46) が前核に発達した。対照区では, 前核形成は1例も観察されなかった。このことは, 精子を直接卵子内に注入する場合, 凍結乾燥後保存した精子を利用できる可能性を示している。卵細胞質に注入した精子頭部がすべて膨化し得たことは, 牛卵細胞質にはこれを誘起する因子が存在することを示唆している。さらに前核への発達に必要な因子は, 卵細胞質の活力と密接に関係しているものと思われる。

屠場材料の卵巣から吸引採取した卵胞卵子は, 性状が不安定であるが数多く得られるため, 本実験のようなマイクロ・マニピュレーションの実験材料および予備実験の材料としては適切と考えられる。しかし, 長時間の体外成熟培養によって卵子の活力が低下するとみられるので, 体内成熟卵子に比べて条件が劣るかも知れない。さらに, 注入操作による損傷が多少とも加わるため, 卵子の活力は特に重要な因子になってくる。そのため, 注入技術を向上させることにより, 卵子の損傷を少なくする必要がある。

当研究室では, 本実験と同様の屠場材料からの牛卵胞卵子を用いて, 同様な体外成熟培養を行ったのち体外受精を試み, 8細胞期までの発生に成功している⁵⁾。卵子に直接精子を注入した場合でも, 注入後の培養を継続し, 技術的問題点を解決していくことにより, 卵割の誘起が起こり得るものと期待される。

Table 1. Development of bovine sperm heads 20h after injection into bovine oocytes

Substance injected	No. of oocytes	Sperm head development	
		Decondensation	Pronuclei
Freeze-dried sperm head	46	40 (87.0%)	6 (13.0%)
3% PVP-saline (Control)	49	-	-

文 献

- 1) Uehara, T. and R. Yanagimachi (1976) Biol. Reprod., 15, 467-470.
- 2) Uehara, T. and R. Yanagimachi (1977) Biol. Reprod., 16, 315-321.
- 3) Thadani, V.M. (1980) J. Exp. Zool., 212, 435-453.
- 4) Markert, C.L. (1983) J. Exp. Zool., 228, 195-201.
- 5) Sugawara, S., K. Hamano, A. Miyamoto, K. Kameyama, T. Horiuchi and J. Masaki (1984) Proc. 10th Int. Cong. Animal Reprod. and AI, III., Vol. 3, No. 382.

内視鏡によるブタ卵胞内卵子の採取法

Laparoscopic procedures for collection of follicular oocytes in gilts.

菅原七郎, 亀山賢次, 橋本伸二, 浜野光市, 宮本明夫, 渡辺伸也,
佐々田比呂志, 梅津元昭, 正木淳二, *武田光彦, *菅野興文

Sugawara, S., Kameyama, K., Hashimoto, S., Hamano, K., Miyamoto, A., Watanabe, S., Sasada, H., Umezawa, M., Masaki, J., *Takeda, M. and *Sugano, O.

東北大学農学部家畜繁殖学教室
*昭和産業総合研究所, 第7研, 水戸市

Dept. of Anim. Sci., Fac. of Agric., Tohoku Univ., Sendai,
*Central Research Laboratory, Showa Sangyo Co. Ltd., Mito.

The studies were attempted to innovate a procedure for collection of follicular oocytes using the techniques of laparoscopy.

The immature gilts aged from 120 to 165 days were treated with PMSG, hCG and GnRH to induce follicular growth and maturation. Three animals underwent laparoscopic examination and follicular oocytes were recovered from two of them. The rate of ovum recovery was very low.

From the results obtained in the present experiments, we concluded that laparoscopic techniques via transabdominal approach will be effective for the recovery of follicular oocytes in swine, if the instruments of the laparoscopy for animals is improved. The bore size of the needle and the vacuum pressure influenced the proportion and quality of oocytes obtained from the follicular aspirates.

内視鏡術は医学獣医学の分野で広く利用されている。¹⁾ 近年内視鏡術は生殖生理の研究にも応用されてきている。家畜では極く最近ヒツジとウシで下垂体-生殖腺機能の解析^{2,3)}、卵巣機能の周期的変化^{4~8)}、妊娠鑑定^{9,10)}、人工授精（子宮角への精液注入）^{11,12)}、卵胞内卵子の採取^{13,14)} や卵子の移植¹⁵⁾ などに利用され始めている。

内視鏡術は手術法と比べて術中、術後も極めて安全であり、卵子の採取や移植などに応用できれば従来の方

式では移植できない発生段階の卵子の移植、また繁殖生理の研究に極めて有効な手段となる。

しかし、本邦では家畜用の内視鏡術は研究が少なく、殆んど実用化の段階に至っていない。それ故、各種家畜に至適な内視鏡術の開発が望まれる。

本研究は幼若ブタにおける内視鏡術による卵胞内卵子の採取法について検討したのでその成果について報告する。

材料および方法

動物：4.0～5.5ヶ月齢の大ヨークシャー、ランドレス、ハンプシャー、スポットなどの各雑種で体重が70～90Kgの3頭を用いた。

排卵誘起処理：各個体は1,000 IUのPMSGを筋注し、96時間後に500 IUのhCG、または500 μ gのGnRH（コンセラール）を筋注した。

内視鏡術の実施：①装置と器具—本研究ではヒト用（直径1.0mm、長さ30cm曲型、オリンパス）で光源（CLE-F型、オリンパス）および内視鏡カメラ（SC16-3 R、オリンパス）を用いた。卵胞内採取針として卵巣実質注射針（外径1.5mm）または針の先端を45°に切った外径1.8mmの注射針をステンレス管（長さ34cm）にアロソアルファーで接着させたものを用いた。

②術式—前記誘起排卵処理したブタをhCGまたはGnRH投与後38～42時間後にドロレプタノ（2.5mg/10～13Kg）、またはストレスニール（4mg/Kg）の筋注による前麻酔をし、ハロセン（3.0%ハロセン+9.2.5%酸素）の麻酔下で行った。

③卵子の検査—採取した卵子は成熟卵子か否かを判定するために常法に従い核の検査を行った。

結果

結果は表1に示した如く、内視鏡での観察の結果、排卵誘起法による幼若ブタの反応性は良好ではないが卵胞の発育と排卵に至るものがみられた。

Table 1. Ovarian response and oocyte recovery in the immature gilts induced follicular growth by the treatment of PMSG, hCG and GnRH

No. of gilts	Ovulatory hormone	Ovarian response				Recovery of oocytes	
		No. of Follicles		Blood Points		No. of aspirates	No. of oocytes
		L	R	L	R		
1	hCG	3	3(1)	0	2	3	1
2	GnRH	-	2(1)	-	1	1	0
3	hCG	4	4(1)	1	1	4	1

Paranthesis indicate the number of the large follicles

これら細胞のうち吸引可能なものについて内視鏡下で吸引操作を行った結果、卵胞吸引数に対する採卵率は低いが卵胞内卵子を採取できた。すなわち、2頭の個体から、それぞれ1コづつの卵胞内卵子を得た。採取された卵胞内卵子のうち、1コは殆んど卵胞細胞がなく、他の1コもそれが非常に少なかった。

採取された卵子の組織学的な検査の結果、1コはM-I、他の1コは第1極体がある成熟卵子であった。

考 察

本研究はブタにおける最初のものであり、得られた成果について比較するものがなく方法論の是非について論求できない。しかし、採卵率こそ低かったが内視鏡操作によるブタ卵胞内卵子の採取の可能なことが明らかになった。今後の検討課題としてまず採卵率をあげるためにには術者の技術的熟達は当然のことであるが、その他の最も大きな要因として採取器具、材料の改良工夫が基本と考えられた。とくに、卵巣の個定器具と採取針、および吸引法（吸引圧力）などの開発工夫が必要である。

また、幼若ブタからの安定した良質の成熟卵子を得るための動物の処理法の改良および安定した麻酔法などの工夫を必要とすることが明かになった。

文 献

- 1) Dukelow, W.R. & Ariga, S. (1976) *J. Med. Primatol.*, 5:82-99.
- 2) Thimonier, J. & Mauleson, P. (1969) *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, 9:233-250.
- 3) Bernard, C. et al. (1984) *Theriogenology*, 22:143-149.
- 4) Holland, E.J. et al., (1981) *Anim. Reprod. Sci.*, 4:127-135.
- 5) Lamond, D.R. & Holmes, J.H.G. (1965) *Aust. Vet. J.*, 41:324-325.
- 6) Moriana, J.C. (1969) *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, 9:657-659.
- 7) Seeger, K. (1977) *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, 72:1037-1044.
- 8) Wishart, D.F. & Snowball, J.B. (1973) *Vet. Rec.*, 92:139-143.
- 9) Phillippe, M. et al., (1971) *J. Reprod. Fert.*, 27:129-132.
- 10) Synder, D.A. & Dukelow, W.R. (1974) *Theriogenology*, 2:143-148.
- 11) Roberts, E.M. (1968) *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, 7:192-194.
- 12) Killen, I.D. & Caffery, G.J. (1982) *Aust. Vet. J.*, 59-95.
- 13) Rioux, J.E. et al., (1980) *Un. Méd Can.*, 109:535-546.
- 14) Lambert, R.D. et al., (1983) *Theriogenology*, 20:149-161.
- 15) Schiwe, M.C. et al., (1984) *Theriogenology*, 22:675-682.

Plate
Aspiration of oocytes by laparoscopy

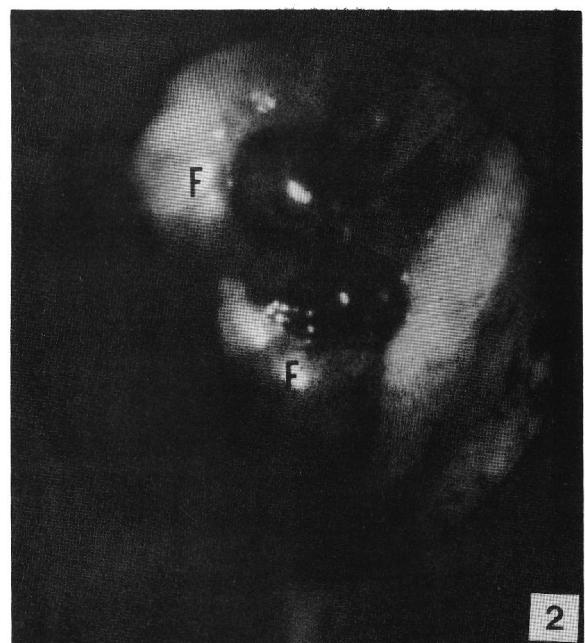
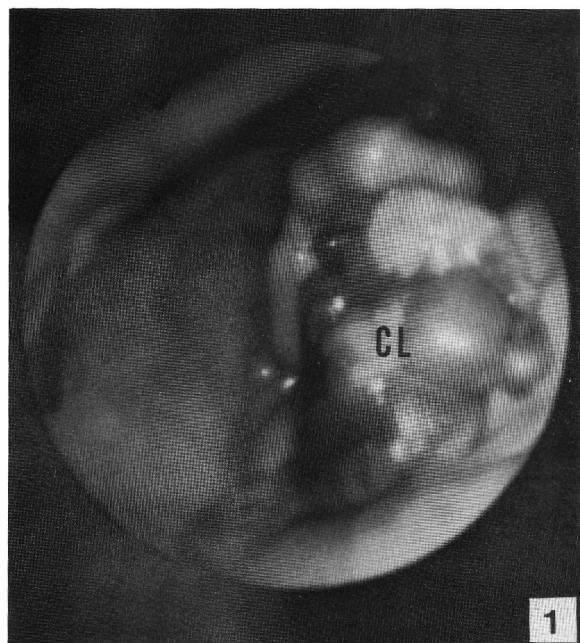


Fig. 1 and Fig. 2. Ovary, F: Follicle CL: Corpus luteum .
Arrow: Blood points .

Fig. 1. No good responded ovary

Fig. 2. Large follicles in ovary

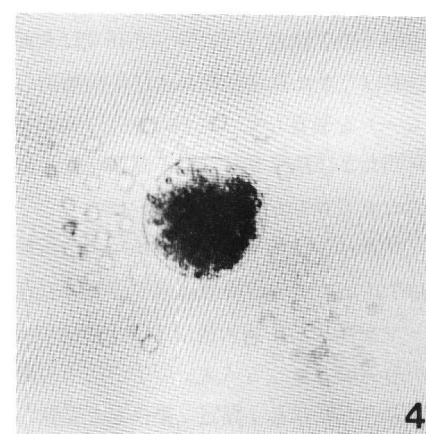
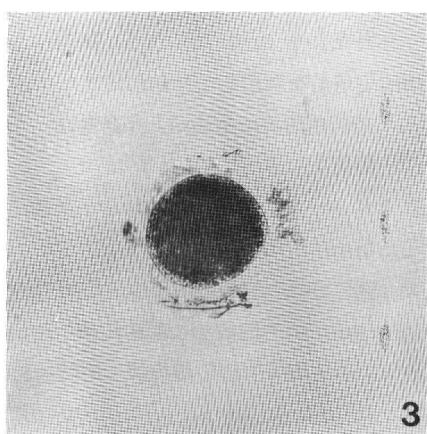


Fig. 3 and Fig. 4. Oocytes recovered by aspiration

Fig. 3. Premature oocytes

Fig. 4. matured oocytes with expanded cumulus cells

カニューレ経由子宮内 incubation ヤギ精子の透明帶
除去ハムスター卵子への侵入

Penetration of goat spermatozoa incubated in
uterus via cannulae into zona-free hamster eggs.

浜野光市，佐々田比呂志，菅原七郎，正木淳二

Koichi Hamano, Hiroshi Sasada, Shichiro Sugawara
and Junji Masaki

東北大学農学部家畜繁殖学教室

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

Washed or unwashed goat spermatozoa were injected into estrous and non-estrous goat uteri via cannulae. The spermatozoa were recovered from uterus after 1-7h incubation and inseminated with zona-free hamster eggs. After 5h incubation in estrous and non-estrous goat uteri, spermatozoa previously washed with BO medium, penetrated into eggs at a rate of 93.8 % and 76.6 %, respectively. The penetration rates of spermatozoa unwashed and washed with physiologsical saline were 45.7% and 64.7%, respectively, after 5h incubation in estrous uterus.

緒言：家畜精子の受精能獲得に関する研究は大部分，体外条件下で行われており，体内における受精能獲得についての観察は，主に異種動物および実験動物の摘出雌生殖道を利用して行われてきた。本実験では，ヤギ子宮にカニューレを装着して，精子の注入，回収を試み，発情周期特に発情期と非発情期，子宮内における incubation 時間および精漿成分の精子受精能獲得に及ぼす影響をしらべた。

方法：正常な発情周期をくり返す成熟雌ヤギの子宮にカニューレを装着し，これを腹部側位より体外に出し，プラスチックカバーで覆った。成熟雄ヤギから採取した射出精液は生理食塩水および BO (Brackett & Oliphant: 1975) 液による洗浄処理区，非洗浄処理区の 3 区に分け，発情期および非発情期の各期のヤギ子宮内にカニューレを経由して注入後，1-7 時間の incubation ののち回収し，媒精に供した。過排卵処理成熟ハムスターから採取したハムスター卵子（透明帶除去ハムスター卵子）は，媒精後 4 時間または 1-6 時間の incubation ののち回収し，固定，染色して受精の判定を行った。

結果：非発情期の子宮内で incubation 後の精子のハムスター卵子への侵入率は，生理食塩水洗浄処理区では，5 時間 incubation 区で，同区 1, 7 時間区に比べ有意に高い 46.4 % を示し，BO 液洗浄処理区でも，5 時間 incubation 区で同区 1, 3, 7 時間区よりも有意に高い 76.6 % の値を示した。非洗浄処理区では各 incubation 時間に有意な差を示さず，6.7-24.1 % の侵入率にとどまった。発情期の子宮内での incu-

bation では、各処理区とも5時間の incubation 後、最も高い侵入率を示し、非洗浄処理区で 45.7%， 生理食塩水および BO 液洗浄処理区で、それぞれ 64.7% および 93.8% の侵入率を示した (Table. 1)。また、全処理区を通じて最も高い侵入率を示した BO 液洗浄処理後、発情期子宮内で5時間 incubate した精子は媒精3時間後に 61.2% の侵入率を示し、4時間目にはピーク (84.8%) に達した。

Table 1. Penetration of goat spermatozoa incubated in estrous goat uterus into zona-free hamster eggs in vitro.

Sperm washing medium	Incu- bation time(h)	No. of eggs	No. of penetrated eggs					Total	%		
			with								
			enlarged sperm head	enlarged sperm heads	male pro- nucleus	male pro- nuclei					
—	1	33	1	0	2	0	3	9.1 ^a ^{**}			
	3	31	0	0	7	0	7	22.5 ^b			
	5	35	2	1	12	1	16	45.7 ^c			
	7	32	1	0	5	0	6	18.8 ^d			
Physio- logical saline	1	29	1	1	3	1	6	20.7 ^e			
	3	30	0	2	9	1	12	40.0 ^f			
	5	34	1	3	16	2	22	64.7 ^g			
	7	32	1	1	7	1	10	31.3 ^h			
B O	1	31	1	0	3	1	5	16.1 ⁱ			
	3	28	1	1	11	2	15	53.6 ^j			
	5	32	2	1	26	1	30	93.8 ^k			
	7	30	1	0	7	2	10	33.3 ^l			

* Eggs were examined 4h after insemination. Examination was repeated three times.

**Significant differences were noted as follows; k > a,b,d,e,f,h,i,l ($p < 0.01$)
g > a,d,e,i ($p < 0.01$) c > a ($p < 0.01$) j > a ($p < 0.01$)

考察：精子の受精能獲得のための incubator としての雌生殖道の利用は、実験動物および屠場材料の入手が容易な牛、豚を中心に行われてきた。本実験で行ったカニューレの装着による子宮内 incubation 法によれば、同種動物の雌体内での精子の incubation が可能となり、さらに、発情周期に伴う子宮内環境の変化、incubation 時間および精漿成分の精子に及ぼす影響などの検討も可能となる。非洗浄処理区に比べ、生理食塩水洗浄処理区および BO 液洗浄処理区の精子で、子宮内 incubation 後、高い侵入率を示し、精子受精能に及ぼす洗浄の効果が認められた。また、非洗浄処理精子では、子宮内 incubation にもかかわらず、侵入率は低く、精漿成分による精子受精能の阻害作用が推察されたが、一方、発情周期に伴う子宮内環境の変化も、無視できないと思われた。BO 液洗浄処理精子の発情期子宮内での5時間の incubation 後の媒精では、約3時間後に侵入を開始し、4-5時間目にピークに達したが、これは体外におけるヤギ精子の経時的侵入能の変化にみられた傾向とほぼ一致するものであった。以上、ヤギ精子は、カニューレを経由した子宮内 incubation により、十分に受精能を獲得できることが明らかとなった。

主要文献

1. Iritani, A. & Niwa, K. (1977) J. Reprod. Fert., 50, 119.
2. Hanada, A. & Nagase, H. (1981) Japan. J. Anim. Reprod., 27, 113.
3. Iritani, A., Niwa, K. & Imai, H. (1978) J. Reprod. Fert., 54, 379.
4. Dandekar, P. V. & Fraser, L. R. (1976) J. Reprod. Fert., 46, 77.

透明帯除去ハムスター卵子を用いた
精子受精能力検査と体外受精の比較

Correlation of Human In Vitro Fertilization with
Zona-free Hamster Egg Sperm Penetration Test

井上正入・小林善宗・本田育子・金子みつ恵・藤井明和

Masato INOUE, Yoshimune KOBAYASHI,
Ikuko HONDA, Mitsue KANEKO and
Akikazu FUJII

東海大学医学部産婦人科学教室

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

We have developed a reproducible and highly sensitive zona-free hamster egg sperm penetration test (ZSPT) by the use of ionophore A23187 which is useful for the assessment of fertility potential of men with abnormal semen parameters. In the present study, we compared ZSPT with the in vitro fertilization of human eggs, to further assess the accuracy of this bioassay. Forty-six men participating in an in vitro fertilization program were included in this study, and 82 inseminations were performed after routine ZSPT.

Thirty-two men with normal ZSPT ($\geq 70\%$) gave a high penetration rate of 95.7 ± 1.6 (Mean \pm S.E.) %, and fertilized most of their wives' eggs in each trial, resulting in an overall fertilization rate of 88.6% (101/114 eggs). In 7 men with subnormal ZSPT (30~70%), 3 failed to fertilize human eggs, but their overall fertilization rate was also high as 80.8% (21/26 eggs). Seven men with abnormal ZSPT ($\leq 30\%$), whose mean penetration rate was $5.3 \pm 4.3\%$, ranging from 0% to 28.1%, showed a very poor fertilization performance, and only 1 (3.4%) of 29 eggs was fertilized in 12 inseminations.

These results indicate that ZSPT correlates highly with the fertilization of human egg in vitro.

緒言：不妊症の診断、治療において、精子に受精能力があるか否かは最も基本的な問題である。1976年
Yanagimachi¹らは capacitation したヒト精子が透明帯除去ハムスター卵子内に侵入することをはじめて報告し、異種間受精を用いて精子の受精能力を検査することが可能であることを示唆した。以来 zona-free hamster egg sperm penetration test (ZSPT) については数多くの研究が行われている。²しかし正常精子についても受精率に大きなバラツキがあり、false negative も少くなく、その臨床的意

義についてはまだよく分っていないのが現状である。²一般的には、Z S P Tは原因不明不妊の診断には有効であるが、乏精子症や精子無力症といったいわゆる男性不妊の診断にはあまり有効でないといわれている。³我々はionophore A 23187を用いて化学的に先体反応を誘起することにより、高感度かつ安定した受精系を確立し、Z S P Tが男性不妊の診断にも非常に有効であることを、549例の分析から明らかにしてきた。⁴本研究では、同一患者におけるZ S P Tと体外受精の成績を比較することにより、Z S P Tがどの程度正確に精子の受精能力を反映するかを検討した。

方法：対象は東海大学産婦人科不妊外来受診中の体外受精予定患者46例で、38例は高度の卵管性不妊であった。残りの8例は男性不妊で、このうち4例は卵管因子と合併していた。

Z S P T

6～8週令の成熟ゴールデンハムスターに過排卵処置をほどこし、H C G 注射後16～17時間で卵管膨大部より卵子を採取した。卵子はただちに0.1% hyaluronidaseで顆粒膜細胞を除去し、ついで0.1% trypsinにて透明帯を溶解、除去した。透明帯除去ハムスター卵子は培養液で3回洗浄後実験に供した。培養液はB W W液に3mg/mlのBSA(Calbiochem)を加えたものを使用し、卵子の操作は流動パラフィン(半井化学)下に行った。

精液は3日以上の禁欲期間において用手的に採取し、検査は3時間以内に行った。まず通常の精液検査を行い、残りの精液に培養液を加えて10mlとし、よく攪拌後、ティッシュペーパーで濾過してから2回遠沈、洗浄した(400g, 5分間)。沈渣に1mlの培養液を加えて1時間前培養し、10μMのionophore A 23187(Calbiochem)を加えてさらに1時間培養した。もう一度洗浄後、1mlの精子浮遊液を作成し、培養器(37°C, 5% CO₂, 95% 空気)内に約30分間静置した。0.2mlの精子浮遊液をculture dish(Nunc)に移し、約30個の透明帯除去ハムスター卵子を加えて3時間培養した。最終精子濃度は3×10⁶～1×10⁷/mlであった。培養終了後卵子は2% glutaraldehydeおよび10% formalinで固定した。95% ethanolで脱水してから0.25% lacmoidで染色し、受精率を算定した。受精の判定は膨化精子頭部あるいは雄性前核の存在により行った。受精率が50%以下の場合は再検した。

体外受精－胚移植

48例の不妊患者に計82回の体外受精を行った。月経周期の5日目よりclomiphene 100～150mg/日を5日間内服させ、10日目より超音波(日立EUB40)にて卵胞の発育を観察した。主席卵胞の最大径が20mm程度に発育した時点で患者を入院させ、H C G(持田)5000単位を筋注した。採卵はH C G注射後35～36時間で行った。67回は腹腔鏡下に、15回は超音波誘導下に卵胞を穿刺して卵子を採取した。卵子の成熟度は卵丘、放射冠の状態から判定した。成熟卵子はorgan culture dish(Falcon 3037)に移し4～5時間前培養した。卵子の前培養および受精にはHam F 10に7.5%の非動化臍帯血血清を加えたものを使用した。

精液は媒精の2時間前に採取し、室温に30分間静置した。液化した精液に培養液を加えて15mlとし、2回遠沈、洗浄した(400g, 5分間)。洗浄精子に1mlの培養液を加えて1時間培養器内に静置し、上方に遊出した運動性良好の精子を媒精に用いた。

前培養した成熟卵子に $1 \times 10^5/ml$ の運動精子を加えて 14~16 時間培養した。受精の有無は雌雄前核の存在により判定した。受精卵は Ham F10 に 15% 非働化臍帯血血清を加えた growth medium に移して、さらに培養し、媒精後 30~48 時間すなわち 2 分割卵から 4 分割卵に発育した時点で子宮腔内に移植した。

結果: Z S P T の成績から不妊患者を受精能力正常群 (受精率 $\geq 70\%$)、受精能力異常群 (受精率 $\leq 30\%$)、中間群 (受精率 30~70%) の 3 群に分けて体外受精のそれと比較した。

Z S P T 正常群 32 例の受精率は $95.7 \pm 1.6\%$ (Mean \pm S. E.) であった。この 32 例の不妊患者に計 58 回の体外受精を行った。体外受精の平均受精率は $93.5 \pm 2.6\%$ で、Z S P T のそれとほぼ同じであった。この群では合計 114 個の成熟卵子を体外受精に用いたが、101 個 (88.6%) が受精した。

一方、Z S P T で受精能力異常と判定された 7 例の受精率は $5.3 \pm 4.2\%$ で、このうち 2 例は受精率 0% であった。7 例はいずれも乏精子症か精子無力症で、うち 3 例は両者を合併していた。この群では 12 回の体外受精を試みたが、平均受精率は $1.8 \pm 1.9\%$ と非常に低く、受精したのは 29 個の卵子中わずか 1 個 (3.4%) であった。Z S P T で中間群とした 7 例の受精率は $48.5 \pm 4.8\%$ であった。7 例に対して計 12 回の体外受精を行ったが、平均受精率は $56.1 \pm 21.5\%$ で Z S P T 正常群と異常群の中間の値を示した。個々の受精率は両極端を示し、4 例は 92.9~100% であったが、3 例は受精率 0% であった。この群では合計 26 個の成熟卵子を使用し、21 個 (80.8%) が受精した。

考察: 体外受精の臨床応用により、不妊の治療範囲はかなり拡大されてきた。卵管の機能障害だけでなく、乏精子症や精子無力症といったいわゆる男性不妊に対しても体外受精が積極的に適用されている。しかしこの場合でも精子に受精能力のあることが不可欠の条件である。男性不妊の治療方針を決める上で精子に受精能力があるか否かは最も基本的な問題といえよう。精子の機能検査には通常精液検査が用いられている。しかし極端な場合を除けば、精液検査で男性の妊娠性や精子の受精能力を判定することは不可能に近い。

Z S P T は、透明帯を除去すると capacitation した精子は異種の精子でも卵子内に侵入できるというハムスター卵子の特性を使用した新しい精子受精能力検査法である。² しかし Z S P T が精子のどのような機能を反映するかについてはまだよく分っていない。また精子を培養液中で capacitation させる通常の方法では、妊娠性の確立された正常精子についても安定した高い受精率を得ることはかなりむづかしく、false negative の問題も少くない。これは Z S P T を臨床検査として用いる上で重大な問題である。精子の受精能力が実際に問題となるのは乏精子症や精子無力症であり、これら精子の受精能力を判定するためには Z S P T が高感度かつ安定したものでなければならないからである。通常の Z S P T において受精率に大きなバラツキがあるのは精子の capacitation にかなりの個人差があるためと説明されている。² しかし精液検査が正常な場合は、今回の我々の成績からも明らかのように体外受精ではほぼ 100% 近く受精する。Z S P T における capacitation の個人差はあくまでも異種間受精における差であり、同種間受精である体外受精ではほとんど問題にならないといえよう。

我々は ionophore A 23187 で化学的先体反応を誘起することにより、Z S P T に内在するこれらの問題を解決し、高感度かつ安定した検査法を確立した。従来の Z S P T が原因不明不妊の診断には有効であ

るが、いわゆる男性不妊の診断にあまり有効でないといわれているのに対し、ionophoreを用いたZ S P Tは、男性不妊特に乏精子症の診断に非常に有効である。⁴ Z S P Tにより乏精子症や精子無力症の予後をかなり正確に判定できると我々は考えている。男性の妊娠性と精子の受精能力は必ずしも同じではない。Z S P Tが精子の受精能力をどの程度正確に反映するかを知るために、体外受精の成績と比較すればよい。しかしこれまでZ S P Tと体外受精を同一患者について比較した研究はきわめて少ない。Wolfら(1983)⁵は、精液検査正常の18例の不妊患者にZ S P Tと体外受精を同時に併せて行い、両者の関係を検討した。Z S P T 10%を正常とすると、16例(89%)が一致し、Z S P Tのfalse negativeは2例(11%)であったという。また彼らは6例の乏精子症患者について同様の検索を行い、Z S P Tのfalse negativeが2例(33.3%)、false positiveが1例(16.7%)であったと報告している。³一方、Foremanら(1984)⁶は体外受精で受精しない不妊患者15例についてZ S P Tを行ったところ、9例が5~94%(平均19.9±8.0%)の受精率を示したと報告し、Z S P Tではfalse positiveが大きな問題であると指摘している。

今回我々の分析では、Z S P Tと体外受精の成績とはよく相関した。Z S P Tが正常(≥70%)の32例は、体外受精でも全例に受精が認められ、114個の卵子のうち101個(88.6%)が受精した。両者の平均受精率を比較するとZ S P Tは95.7±1.6%，体外受精は93.2±2.6%とほとんど同じであった。Z S P Tの中間群(30~70%)では7例中3例は体外受精で受精しなかった(いずれも1回の体外受精)。しかし全体としては26個の卵子中21個(80.8%)が受精している。Z S P Tが30%以上の場合はその他の条件がよければ、体外受精でも十分受精するのではないかと思われる。これに対して、Z S P T異常群(≤30%)では7例とも乏精子症または精子無力症で、Z S P Tそれ自体が平均で5.3±4.2%と低く、12回の体外受精で受精したのはわずか1回、全体としては29個の卵子中1個(3.4%)だけであった。Z S P Tがコンスタントに30%以下の場合は、体外受精を行っても受精する確率は非常に低いといえよう。しかしZ S P Tが異常値を示しても自然に妊娠するケースがまれにはある。Z S P Tで受精能力なしと判定する基準については今後さらに検討する必要があると思われる。

主要文献

1. Yanagimachi, R., et. al. : Biol. Reprod., 15: 471, 1976
2. Yanagimachi, R. : Gamete Res., 10: 187, 1984
3. Wolf, D. P. & Sokoloski, J. E. : Human in vitro fertilization and embryo transfer. pp 297, Plenum, 1984
4. 井上正人, 他: 日産婦誌. 36: 1695, 1984
5. Wolf, D. P., et. al. : Fertil. Steril., 40: 53, 1983
6. Foreman, R., et. al. : J. Vitro Fert. Embryo Transfer. 1: 166, 1984

豚精子により体外受精した透明帯除去ハムスター
卵子の融合について

Fusion of Zona-Free Hamster Eggs Fertilized by
Boar Spermatozoa In Vitro

吉田光敏、番場公雄、小島義夫

Mitsutoshi Yoshida, Kimio BAMBAA

and Yoshio KOJIMA

静岡大学農学部家畜繁殖学教室

Laboratory of Reproductive Physiology, Faculty of
Agriculture, Shizuoka University

The present study was concerned with in vitro penetration of zona-free hamster eggs by epididymal and ejaculated boar spermatozoa and the fusion of these eggs in the course of penetration.

The hamster zona-free eggs were penetrated with a high proportion by both epididymal and ejaculated spermatozoa, which had been preincubated in the medium (pH 7.8) for 2 and 4 hrs, respectively. The fusion of two or more eggs occurred only in penetrated eggs; the fusion was not observed in unpenetrated eggs with and without spermatozoa. The proportion of fused eggs increased with the passage of the time and the eggs fusion were observed in half the number of penetrated eggs at 24 hrs after insemination.

緒言：透明帯除去ハムスター卵子はその特異的性質から異種精子の侵入を許し、精子の受精能力を評価する手段などに利用されてきている¹⁾。一方、細胞の融合は一般に受精時における精子と卵子の結合にみられるが、さまざまな研究目的で体細胞、受精卵、あるいは卵子をHVJやポリエチレンギリコールを用いて人为的に融合させる試みが行われている²⁻⁴⁾。本研究では透明帯除去ハムス

タ一卵子への豚精子の侵入および精子侵入卵にみられた卵子の融合現象について報告する。

方法：培養液はTCM-199に0.91mMピルビン酸Na、2.92mM乳酸Ca、3.05mMグルコース、ジベカシン⁵⁾ (100ug/ml) および10%の割合で牛胎児血清を加えた培地⁵⁾を基本とした。精子受精能獲得のための培地は基礎培地のpHを7.8に高めたものを用い、受精用の培地は基礎培地に2mMカフェインを添加したものを使用した。ゴールデンハムスター (6~12週齢) にPMSG60IUを注射し、その56~58時間後にHCG60IUを投与して過剰排卵を誘起し、HCG投与後16~18時間に卵子を採取した。ハムスター卵子は0.1%ヒアロニダーゼ溶液で卵丘細胞を分離し、0.1%トリプシン溶液で透明帯を除いた後、流動パラフィン下の受精用培地 (0.4ml) へ15~20個を導入した。豚精子はト場材料としての精巣上体尾部精子およびランドレース種雄豚から採取した射精精子を使用した。精子はBSA (1mg/ml) を加えた生理食塩水で数回洗浄後、 2×10^8 /mlの濃度となるように2mlの精子受精能獲得培地に加えた。精子の前培養は尾部精子で2時間、射精精子で4時間行った。前培養終了後、最終濃度が 2×10^6 /mlとなるように精子を卵子の入っている受精用培地に加えた。培養は38.5°C、炭酸ガス恒温器内で6および24時間行った。培養終了後、卵子を固定 染色し精子頭部の膨化ならびに雄性前核の形成を中心に位相差および微分干渉顕微鏡下で精子侵入の判定を行った。

結果：授精6時間後における豚精子の透明帯除去ハムスター卵子内への侵入および卵子の融合数を表1に示した。精子は尾部および射精精子ともに高率にハムスター卵子内へ侵入した。卵子の融合は授精後3時間前後で観察され始めた。2個あるいはそれ以上の卵子が互いにまず接着し、しだいに卵子の融合が観察された(図1)。対照として精子を添加しなかった場合に卵子の融合は全く観察されなかつたが、

精子を添加した場合に

卵子の融合が認められ

た。融合した卵子にお

ける精子侵入を調べた

ところ、全ての卵子に

侵入が認められた。反

対に精子の侵入しなか

った卵子に融合はみら

なかつた。授精24時間

後における融合した卵

子の割合は6時間後のそれに比べて大きくなっていた(表2)。図2に授精24時間後における融合した卵子内の侵入精子を示した。侵入精子数についてみると、融合した卵子および融合しなかつた卵

Table 1. Penetration and eggs fusion with and without boar spermatozoa.

Spermatozoa	No. of* eggs examined	No. of eggs penetrated (%)	No. of** eggs fused (%)
—	78	—	0 (0)
Epididymal	96	82 (85.2)	30 (36.6)
Ejaculated	92	78 (84.8)	32 (41.0)

* : 6 hrs after insemination

** : % from penetrated eggs

子において、侵入した卵子1個当りの精子数は授精6および24時間後ともに前者が後者に比べてやや多いことが認められた。

Table 2. Penetration results and eggs fusion at 6 and 24 hrs after insemination.

Duration of culture (hrs)	No. of eggs examined	No. of eggs Penetrated (%)	No. of eggs Fused (%) [#]	Total No. of penetrated sperm Not fused eggs	Total No. of Fused eggs
6	188	160 (85.1)	62 (38.8)	338 (3.5) [£]	301 (4.9) [£]
24	173	163 (94.2)	88 (54.0)	272 (3.6)	408 (4.6)

#: % from penetrated eggs

£: Per one egg

考察：透明帯除去ハムスター卵子内への豚精子の侵入は摘出雌生殖器道内⁶⁾あるいは合成培地内⁷⁾で前培養された精子についてみられるが、その報告例は少い。今回、Cheng & Polge (1983)が豚の体外受精に使用した培地を用いて精子の前培養を行い透明帯除去ハムスター卵子内への精子侵入について検討したところ、豚精子の高率な侵入が認められるとともに侵入の過程で卵子の融合が観察された。本法は精子の前培養時に培地のpHを上昇させ、受精培地にカフェインを添加することに特徴がみられる。精子の前培養における培地のpHは先体反応の進行に関連し、その上昇は反応を促進するという。また、カフェインは精子の活力の維持に役割をはたし、受精を促進するものと思われる。一方、透明帯を除去した卵子の体外受精時点における融合現象はPavlokら (1982)により報告されている⁸⁾ すなわち、ハムスターおよび豚の透明帯除去卵子は豚精子との体外受精時に同種あるいは異種の卵子間で融合が観察されることを示した。今回、観察された卵子の融合も精子侵入卵にのみ認められ、また、融合の割合も経時に上昇したことは彼らの報告と一致していた。しかし、精子侵入数と融合率に関して正の相関があったとしているが、今回の観察では精子侵入卵のうち非融合卵子に比べて融合卵子への侵入精子数はやや多いことが認められたものの、いずれも多くの精子の侵入がみられた。融合の機構に関しては今回の観察で明らかにすることができなかったが、少なくとも本実験で精子侵入のみられなかった卵子においては融合起らなかった事実から、融合には精子の存在と精子の侵入が必要であることが明らかにされた。

のことから、今回観察された卵子の融合には精子先体反応後の産生物質、あるいは精子侵入による卵膜の変化や卵子の産生物質が要因となっているものと推察された。

主要文献

- 1) Yanagimachi, R.: Gamete Res., 10, 187 (1984)
- 2) Eglitis, M. A.: J. Exp. Zool., 213, 309 (1980)
- 3) Fulka, J. Jr.: Exp. Cell. Res., 146, 212 (1983)
- 4) Soupart, P: In Vitro Fertilization and Embryo Transfer, pp.51
Eds. Hafez, E. S. E. & K. Semm., MTP press, (1982)
- 5) Cheng, W. T. K. & Polge, C.: ARC Meeting at Nottingham, (Personal
communication) (1983)
- 6) Imai, H., Niwa, K. & Iritani, A.: J. Reprod. Fertil., 51, 495
(1977)
- 7) Pavlok, A.: Int. J. Fertil., 26, 101 (1981)
- 8) Pavlok, A., Trávnik, P., Kopečny, V. & Šťastna, J.: Gamete Res.,
6, 189 (1982)

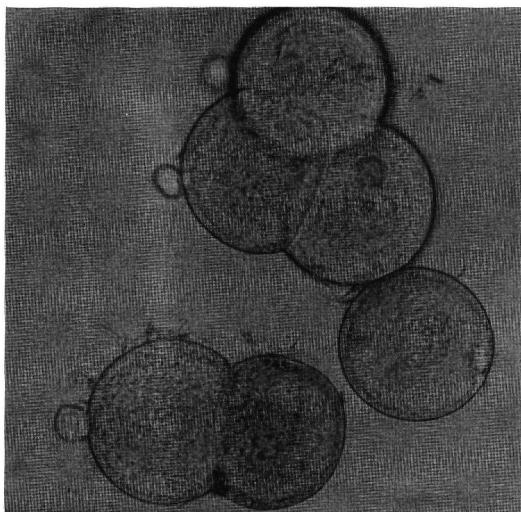


Figure 1. Fusion of zona-free hamster eggs (X250)

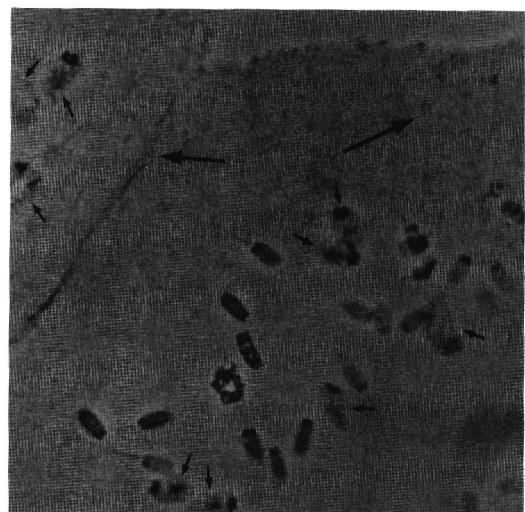


Figure 2. Swollen sperm heads (small arrow) and surface of fusion (large arrow) (X500)

Effect of Zn^{2+} on the preimplantation development
of mouse embryos fertilized in vitro

鈴木宏志・東貞宏・山田秀一・豊田裕

Hiroshi SUZUKI, Sadahiro AZUMA, Shuichi YAMADA and Yutaka TOYODA

北里大学獣医畜産学部 家畜育種繁殖学教室

Department of Animal Breeding and Reproduction, School of Veterinary Medicine
and Animal Sciences, Kitasato University

Preimplantation development in ICR embryos was inhibited severely by the addition of $ZnCl_2$ to Whitten's medium supplemented with 10 μ M EDTA. No embryos were developed to the 2-cell stage when the embryos were transferred to the medium containing 100 μ M $ZnCl_2$ at 6h after insemination. In the presence of 10 μ M $ZnCl_2$, 95% of the embryos were developed to the 2-cell stage but further development was not observed. Development to the blastocyst stage at 120h after insemination was lower (28%) than that in control group (69%) when embryos were cultured in the presence of 1 μ M $ZnCl_2$.

緒言：培地への微量の EDTA (Na_2) の添加により、ICR 体外受精由来胚の4細胞期以降への発生が改善され、高率に胚盤胞に発生することが知られている¹⁾が、その作用機序は明らかでない。筆者らは胚盤胞への発生に対する種々の金属-EDTA キレートの効果を検討した結果、Zn-EDTA においては4細胞期への発生が、完全に抑制されることを知ったので²⁾本実験においては、着床前の体外受精胚の発生に対する種々の濃度の Zn^{2+} の影響について検討した。

方法：実験には Jcl:ICR系マウスを用いた。卵子はPMSGおよびhCG 各 5i.u.を48時間間隔で腹腔内注射して過排卵処理を施した雌マウスの卵管膨大部から、hCG 注射後15~16時間に採取した。精子は雄マウスの精巣上体尾部より採取し、2時間のブレインキュベート後卵子を含む0.4ml のWhitten's 培地³⁾へ添加して体外受精を行った。次いで、授精後5~6時間に第2極体の放出の認められた前核期の卵子を、種々の濃度 (0 ~ 100 μ M) の $ZnCl_2$ を含む10 μ M EDTA 添加 Whitten's 培地に移し換え、授精後 120時間まで培養に供した。胚の発生段階は、授精の時刻を基準として12時間毎に、倒立顕微鏡下で観察した。

結果：授精後24時間における2細胞期への発生率では、 $ZnCl_2$ 0 ~ 10 μ M 添加区および対照区が95

～100%と高率に発生したのに対し、100μM 区では2細胞期への発生が認められず、以後すべての卵が変性退行した。授精後48時間における4細胞期への発生率は、0 μM区の95% に対し10μM区、1 μM区および0.1μM 区でそれぞれ、0%、67% および100%と濃度が低くなるに従い発生率は高くなる傾向が認められ、0.1μM ZnCl₂ では4細胞期への発生に対する影響は認められなかった。授精後120 時間に胚盤胞へ発生した胚の割合は、0μM 区、0.1μM 区および1μM 区でそれぞれ、69%、56% および28% であった。10μM区および100μM 区においては、4細胞期以降の発生は全く観察されなかった。

Table 1. Effect of Zn²⁺ on the preimplantation development of ICR mouse embryos fertilized in vitro

EDTA ¹⁾ in medium	Conc. of ²⁾ ZnCl ₂ (μM)	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to :		
			2-cell ³⁾ (24hr) ³⁾	4-cell ³⁾ (48hr) ³⁾	Blastocyst (120hr) ³⁾
+	100	28	0	0	0
+	10	37	35(95)	0	0
+	1	36	36(100)	24(67)	10(28)
+	0.1	18	18(100)	18(100)	10(56)
+	0	37	36(97)	35(95)	25(69)
-	0	32	32(100)	6(19)	3(9)

1) 10μM EDTA.

2) ZnCl₂ was added at 6 hours after insemination.

3) Hours after insemination.

考察：授精後6時間からの10μM EDTA 添加培地への100μM ZnCl₂ の添加は、2細胞期への発生を完全に阻止した。このことは、Aonumaら⁴⁾ による授精後1.5 あるいは 5時間におけるZnCl₂ (250μM)の培地への添加が、2細胞期への発生を抑制したとする報告を基本的に確認するものであった。1 μM以下の濃度のZnCl₂ の存在下においては、胚の発生に対する顕著な影響は認められず、ZnCl₂ が第2卵割を抑制したのは、10μM以上の比較的高い濃度であったことから、培地内の微量のZn²⁺ の存在が、直接 ”2-cell block” の原因とはなり得ないと考える。

文献

1. Suzuki,H., Hoshi,M., and Toyoda,Y. Effect of EDTA on the preimplantation development of mouse embryos fertilized in vitro. Proc. Intern. Symp. on Mammal. Reprod. and Early Dev. Aug. 1984, Tokyo. pp38 (1984)
2. 鈴木宏志、東貞宏、大島秀代、上林晃彦、平百合子、山田秀一、豊田裕 体外受精由来胚の発生に及ぼす金属-EDTAキレートの影響、 日畜学会第76回大会講演要旨 pp27 (1984)
3. Whitten,W.K. Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro. Adv. Biosci. 6,129-141. (1971)
4. Aonuma,S., Okabe,M., Kawaguchi,M., and Kishi,Y. Zinc effects on mouse spermatozoa and in vitro fertilization. J. Reprod. Fert. 63,463-466. (1981)

マウス受精卵の体外培養法の検討

The Culture of Mouse Zygotes in Vitro

木村資亜利¹・小島博子²・横山峯介²・勝木元也^{1,3}

Shiari Nozawa KIMURA¹, Hiroko KOJIMA²
Minesuke YOKOYAMA² and Motoya KATSUKI^{1,3}

1. (財)実験動物中央研究所発生工学研究室
2. (財)実験動物中央研究所生殖研究室
3. 東海大学医学部細胞生物学教室

1. Developmental Biotechnology Laboratory 2. Animal Reproduction Laboratory, Central Institute for Experimental Animals
3. Department of Cell Biology, School of Medicine, Tokai University

Strain differences were observed in the efficiency of culture of mouse one-cell zygotes in vitro. More than 90% of C57BL/6N zygotes developed into blastocysts in modified Whitten's medium, while less than 55% for BALB/cA and 5% for ICR, respectively. The culture of zygotes were improved by addition of β -mercaptoethanol (β -ME) or EDTA in the culture medium. At the optimum concentration of β -ME, the successful development was enhanced to 70.7% for BALB/cA, to 29.1% for ICR; and at that of EDTA, to 72.7% for BALB/cA, to 87.5% for ICR. Normal fetuses were developed to term after the cultured embryo transfer.

緒言：マウス受精卵（1—細胞期）の培養では、ある種の近交系または近交系間のF1交雑系以外は2—細胞期で発生を停止する系統が多く、さらに発生が進んでも胚盤胞を形成する割合は低い。^{1~3)}そのため培養液中に微量のEDTAを加えたり、4—細胞期以降の胚の細胞質を受精卵に注入するなどの試みがなされている。³⁾

演者らは、各系統マウスの受精卵をin vitroで培養することのできる方法を確立するために種々の検討を行なっているが、本実験では培養成績の低い系統を用いて、培養液中に低濃度の β -メルカプトエタノール (β -ME)，またはEDTAを加えたときの効果について調べた。さらに、in vitroで胚盤胞にまで発生した胚が、形態ばかりでなくその後の発生能に関しても正常であること

を確認するために、培養胚盤胞の子宮への移植を行なった。

方法：本実験には8-20週齢のC57BL/6N, BALB/cA およびJcl : ICR (ICR) 系のマウスを用いた。受精卵の回収は、自然交配またはホルモン処理による過排卵によった。培養液はmodified Whitten 培地を用い、5%O₂, 5%CO₂, 90%N₂ の気相中で受精卵を培養した³⁾。培養を開始した日を培養1日目として4日間培養し、5日目までに胚盤胞を形成した受精卵の百分率を求めて胚盤胞への発生率とした。BALB/cA と ICRについて、培養液中にβ-ME (1, 5, 10, 20, 50, 100 μM) またはEDTA (10, 20, 40, 80, 100, 200 μM) を添加して培養し、胚盤胞への発生率を求めた。培養胚盤胞の一部は偽妊娠状態にしたICR レシピエントマウスの子宮内に移植した。レシピエントマウスは分娩予定日の前日に帝王切開し、産仔および着床痕の数などについて調べた。

結果：β-ME またはEDTA を添加しない培養液を用いた場合、C57BL/6N の受精卵は培養5日目に、90-100%の受精卵が形態的には正常と思われる胚盤胞を形成した。BALB/cA の受精卵では胚盤胞への発生率が低く、平均55%以下であった。ICRの場合はほとんどの胚が2-細胞期のままで、胚盤胞になるのはわずか5%であった。

培養液中にβ-ME を添加すると、BALB/cA, ICR共に胚盤胞への発生が改善された。β-ME の濃度はBALB/cAでは10 μM, ICRでは20 μMが最も効果があり、それぞれ平均70.7%および29.1%の受精卵が胚盤胞を形成した。EDTAを添加した場合には、BALB/cA, ICR共に100 μM の至適濃度で、それぞれ平均72.7%および87.5%となり、特にICRで著しい効果がみられた。

培養胚の移植成績はBALB/cA と ICRの系統間で大きな差がみられた。BALB/cA 受精卵の仔への発生率は、β-ME (1~20 μM) およびEDTA (20~80 μM) 存在下でそれぞれ平均4.9% (0-10.3%), 6.7% (0-13.3%) で、いずれも低い値となった。それに対してICRでは、β-ME (1~100 μM) およびEDTA (10~100 μM) 存在下で、それぞれ平均55.1% (40.0-77.8%), 70.4% (62.5-83.3%) と高い値を示した。

考察：培養液中に加えた低濃度のβ-ME およびEDTAは受精卵の胚盤胞への発生に効果的に働いた。しかし、BALB/cAではβ-ME もEDTAも同じ程度の効果を示したのに対し、ICRではEDTAの方が特に著しい効果を示した。これらの薬剤の詳しい作用についてはさらに検討を要するが、β-MEに関しては細胞内のSHタンパク質の酸化を防ぐこと、EDTAに関しては培養液中に混入するCa²⁺, Mg²⁺ 以外の重金属を除去することが考えられる。また、β-ME, EDTA存在下で培養した胚盤胞が正常に発生したことは、子宮への移植によって産仔を得たことで証明された。

- 主要文献**
1. Biggers, J.D., Whitten, W.K. and Whittingham, D.G.: The culture of mouse embryos in vitro. Methods in Mammalian Embryology. J.C. Daniel, Jr. and Company, San Francisco 1971
 2. 妹尾佐知丸他(編) : 哺乳動物の初期発生; 基礎理論と実験法, PP. 215-227, 理工学社, 1981
 3. 勝木元也: マウス初期胚の培養と顕微操作, 生体の科学, 35 (20) 90-95, 1984

Influence of water quality on mouse embryos
cultured in vitro

福田愛作・津久井伸一・辰巳賢一・松本 央・野田洋一・森 崇英

Aisaku Fukuda, Shinichi Tsukui, Kenichi Tatsumi
Hisashi Matsumoto, Yoichi Noda, Takahide Mori

京都大学医学部婦人科学産科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology Faculty of Medicine
Kyoto University

The influence of water quality on mouse embryonic development (ICR) was assessed in vitro using five types of water preparation, which had been characterized by the electric conductivity value (μs) and the pattern of organic compounds eluted from a column ($\mu\text{Bondapak}$) by high performance liquid chromatography.

When 8 cell embryos were cultured, 80~90% of them reached the stage of expanded blastocyst using BWW medium prepared with ion exchanged ($0.6\mu\text{s}$), 1 time ($1.2\mu\text{s}$) and 3 times ($0.8\mu\text{s}$) distilled water and Milli-Q ultra pure ($0.06\mu\text{s}$) water respectively. Essentially the same results were obtained (55~62%) under the same conditions starting from 2 cell embryos, but a difference was noted in hatching process. Thirty-five percent of expanded blstocysts showed the hatching using Milli-Q BWW medium, but 16~22% were marked in other conditions. This phenomenon was augmented when the culture was started from the fertilized single cell (F1).

The effect of tap water ($160\mu\text{s}$) was deleterious throughout all the experiment performed. The elution profile of organic compounds from a $\mu\text{Bondapak}$ column showed both a high quality of Milli-Q water and unexpected contamination possibly be added from silicone rubber duct, glasswares or from room air during the preparation of glass distilled water. Taking account these results, it seems essential for embryo culture to use ultra pure water preparation ($0.06\mu\text{s}$) as evidenced in this study, and in addition, the hatching seems to be an appropriate indicator to assess the environmental conditions and developmental potential of the

embryo cultured in vitro.

緒言：1978年7月25日 Steptoe と Edwards による世界で最初の体外受精児の誕生以後、ヒト IVF ET は我が国を含め世界各国で広く臨床応用され体外受精児の数は現在既に500人を超えており、ヒト IVF 並びに胚培養に於いて、培養液の組成、ガス分圧等については詳細な検討が行なわれているが、培養液の基本溶媒である水については水質の一定の基準は見当たらず、それぞれの施設に於いて3回蒸留水や5回蒸留水などが経験的に用いられているのが現状である。今回、我々はマウス胚培養をモデルとしてヒト IVF 後の胚培養に及ぼす水質の影響について検討したのでその結果を報告する。

方法：培養液は BWW (Biggers Whitten Whittingham) とし、その作成には以下の5種類の水を用いた。

1. 水道水；京都大学医学部附属病院の自家精製水を用いた。
2. イオン交換水；1.の水道水をオルガノ株式会社製G-10イオン交換器を通し作成した水。
3. 1回蒸留水；2.のイオン交換水をイワキガラス社製STILL-2蒸留装置を通し作成した水。
4. 3回蒸留水；3.の1回蒸留水を当研究室にてカブラ型ガラスフラスコによる蒸留を更に2回行なって得た水。
5. ミリQ超純水；2.のイオン交換水を日本ミリポアリミテッド製超純水製造装置に通し作成した水。

以上の水について水質の評価は無機物については導電率を測定し、有機物については高速液体クロマトグラフィーにより検索した。

マウス胚の採取はICR または F1 の4週令雌マウスにPMSG 5~7.5 単位を腹腔内投与し48時間後にHCG 5~7.5 単位を同様に投与して過排卵誘起を行なうと共にICRの10週令雄マウスと同居させ自然交配を試みた。翌朝に腔栓 (Vaginal Semen Plug) が認められたものを胚提供マウスとし、同日をDay 1とした。Day 1 には1細胞期胚を、Day 2 には2細胞期胚を、Day 3 には8細胞期胚をそれぞれ Flushing Method により採取して培養に供した。培養液は 400 μl で流動パラフィン下にスポットを作り 37°C, 5% CO₂ in air の条件で培養を行なった。培養マウス胚は倒立型ノマルスキー微分干渉顕微鏡で観察し Expanded Blastocyst, Hatched Blastocyst の判定をした。

結果：1. 水質の検索

イオンが主と考えられる無機物について導電率を測定すると、表-1の如く水道水では190と極端に大きな値であるが、イオン交換水、1回蒸留水、3回蒸留水ではそれぞれ0.6, 1.2, 0.8と大きな差は認められなかった。ミリQ超純水では0.06と非常に小さな値で、これは水道水の約3000分の1、1回蒸留水の20分の1に相当する。次に、有機物については図-1のような Chromatogram を得た。最下段のミリQ超純水では左右に小さなピークを認めるがほぼ平坦な曲線となっている。

使用した各水の導電率

導電率 (μs / cm)	
水	導水
	190.00
イオン交換水	0.60
1回蒸留水	1.20
3回蒸留水	0.80
ミリQ超純水	0.06

$$s(\text{siemens}) = \mathfrak{D}(\text{Mho}) = \frac{1}{\Omega}$$

表-1.

3回蒸留水では右方に非常に大きなピークと中央部に巾広く複数の中等度のピークを認めた。1回蒸留水では全体に汎る中等度のピークを4個、イオン交換水では左方と中央部にやや高いピークを、そして水道水では左方に非常に大きなピークを1個認めた。5個のChromatogramを比較すると、水道水、イオン交換水そして1回蒸留水では主としてそのピークは左方即ち親水性側にあり、3回蒸留水とミリQ超純水では右方即ち疎水性側に偏位する傾向が認められた。

2. マウス胚培養の成績

マウス1細胞期胚の培養結果では表-2のようにExpanded Blastocystへの発育率は3回蒸留水、ミリQ超純水では51.5%, 52.0%と差は認められなかったがHatched Blastocystへの発育、更にはExpanded BlastocystからのHatch率では15.2%と36.0%，更に29.4%と69.2%とその差は著明となった。

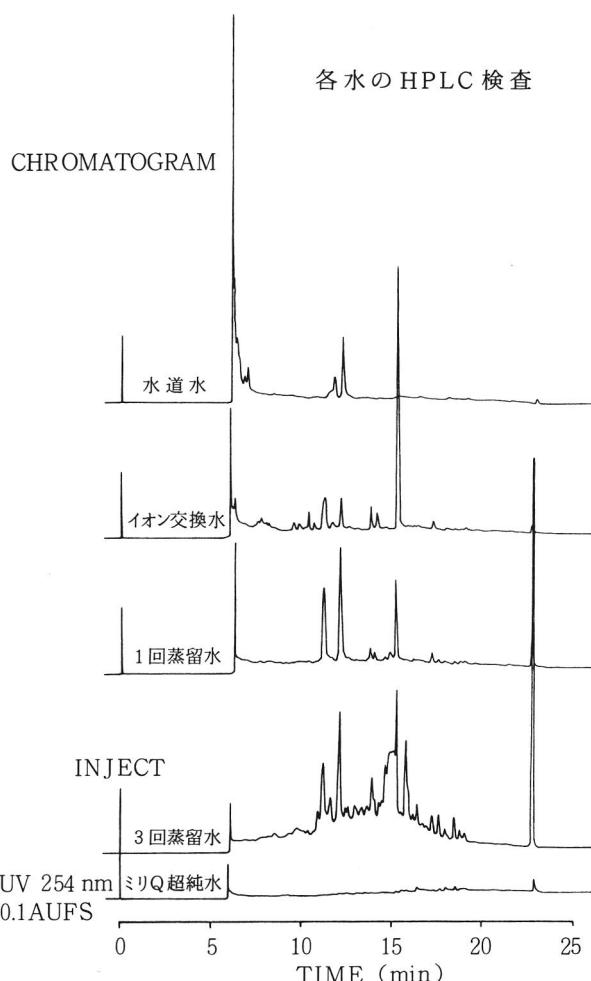


図-1

マウス1細胞期胚培養に及ぼす水質の影響

1 cell Embryos $F_1 \text{♀} \times ICR \text{♂}$
(F_1 ; C3H $\text{♀} \times$ C57BL ♂)

	1 cell Embryos	Expanded Blastocysts (%)	Hatched Blastocysts (%)	Hatched / Expanded %
水道水	34	6 (17.6)	0 (0)	0
イオン交換水	24	8 (33.3)	1 (4.2)	12.5
1回蒸留水	27	7 (25.9)	2 (7.4)	28.6
3回蒸留水	33	17 (51.5)	5 (15.2)	29.4
ミリQ超純水	25	13 (52.0)	9 (36.0)	69.2

Medium BWW (BSA 1 mg/ml)
37°C 5% CO₂ in air
実験回数 3回

表-2

次にマウス2細胞期胚の培養では表-3のようにExpanded Blastocystへの発育率ではイオン交換水からミリQ超純水に至るまで差はみられなかったがHatched BlastocystまでみるとミリQ超純水が34.2%と最も良い成績を残し、Hat./Exp.率ではその差は更に拡大した。

マウス2細胞期胚培養に及ぼす水質の影響

	2 cell Embryos	ICR ♀ × ICR ♂	
2 cell Embryos	Expanded Blastocysts (%)	Hatched Blastocysts (%)	Hat./Exp. %
水道水	48	19 (39.6)	8 (16.7)
イオン交換水	29	16 (55.2)	6 (20.7)
1回蒸留水	32	20 (62.5)	7 (21.9)
3回蒸留水	75	42 (56.0)	17 (22.7)
ミリQ超純水	38	21 (55.3)	13 (34.2)

Medium BWW (BSA 1mg/ml)
37°C 5% CO₂ in air
実験回数 9回

最後にマウス8細胞期胚

表-3

の培養では表-4のように
Expanded Blastocystまでの発育率は水道水でやや劣るが、Hatched Blastocystへの発育率やHat./Exp.率では1回蒸留水以下ミリQ超純水まで特に差は認められなかった。

マウス8細胞期胚培養に及ぼす水質の影響

	8 cell Embryos	ICR ♀ × ICR ♂	
8 cell Embryos	Expanded Blastocysts (%)	Hatched Blastocysts (%)	Hat./Exp. %
水道水	22	15 (68.2)	1 (4.5)
イオン交換水	16	15 (93.8)	3 (18.8)
1回蒸留水	17	14 (82.4)	6 (35.3)
3回蒸留水	18	17 (94.4)	8 (44.4)
ミリQ超純水	27	24 (88.9)	11 (40.7)

Medium BWW (BSA 1mg/ml)
37°C 5% CO₂ in air
実験回数 5回

表-4

- 考察： 1. 5種類の水の水質に関して無機物並びに有機物についての検索を総合すると、明らかにミリQ超純水が最もきれいな水であった。
2. 当研究室で作成した3回蒸留水は、ある意味でイオン交換水や1回蒸留水よりも不純な水である事が判明した。このことはガラス器具による蒸留過程での蒸留器、導管パイプ、貯水びん、空気等の汚染の増強が懸念される結果となった。
3. マウス胚培養ではExpanded Blastocystまでの発育率が現在のところその胚の生存の指標とされているが、今回の実験より以後の着床を考えるとHatched Blastocystまで観察することが有意義であると思われた。
4. ヒト体外受精後の胚培養についても以後の着床率を考える時、いかなる水を選択するかということは非常に重要な問題である。今回の実験よりミリQ超純水または同程度の水を用いることの重要性が明らかとなった。

Developmental Ability of the Model of Induced
Delayed Implantation in Mouse Blastocysts.

久保春海・安部裕司・林鴻程・片山進

Harumi KUBO, Yuji ABE, Kotei RIN,
Susumu KATAYAMA

東邦大学第1産婦人科学教室

1st Department of Obstetrics & Gynecology, Toho
University School of Medicine

To study the developmental ability and protein synthesis of induced delayed implantation, mouse blastocysts(D4) were cultured in the medium (BME+AA) with proteinase inhibitors(NPGB+STI). Cell division is depressed in the culture which contains proteinase inhibitors: Delayed blastocysts showed no increase in number after 5 days culture. Mitotic figures were absent 120 hours after culture. On the other hand, most of the blastocysts showed a substantial increase in number in the first few days following the onset of delay. The DNA synthesis of nuclei in delayed blastocysts were measured by autoradiography incorporating ^{3}H -TdR. Although the incorporation rate was 5.4 ± 8 cells/embryo($83 \pm 7\%$) on the first day of culture, it was decreased to 3.6 ± 5 ($24 \pm 1\%$) on the 10th day of culture. Protein synthesis was measured with the incorporation rate of ^{35}S -methionine. The incorporation rate of delayed blastocysts declined sharply on the 5th day of culture(1.6 ± 0.4 pmol/embryo/hr.) in contrast to that of normal implanted blastocysts(2.5 ± 0.3 pmol/embryo/hr.). Qualitative change in synthesized protein were estimated by SDS-PAGE. About 110 of the autoradiographic bands on 1-D gel were observed in the 4th day blastocysts, and actin is the major protein synthesized, located between 50,000 and 55,000 daltons. No differences in these bands were seen between normal and delayed blastocysts. However, 2-D gels showed that the qualitative patterns of protein synthesis of delayed embryos are significantly different from those of normal implanted blastocysts. In delayed blastocysts, trophoblastspecific spots varied versatile. The delayed blastocysts were transferred to recipients at 2.5 days of pseudopregnancy. Number of fetuses was decreased (4.0 ± 1.7 or lower) in the case of transfer of 5 and more days delayed embryos, though most of 4 and 4.5 days embryos were developed to fetuses(70.8 ± 12 , 74.2 ± 9).

緒論： インビトロにおける実験的着床遅延胚は Gwatkins, R. B. L.¹⁾ によって培地中のアミノ酸組成よりアルギニン, ロイシンを除去し, 透析血清を添加することにより, 最高 7 日間, 胚の接着が遅延し, これらのアミノ酸を補うことにより遅延胚は接着を開始したという報告がある。また, Sherman, M. I., et al²⁾ はアガロースをコーティングすることによって, 胚の接着を阻止し, 72 時間後に, これ等の遅延胚をコーティングしていない培養皿に移すと, 数時間以内に殆んどの胚が接着してしまうことを認めている。著者³⁾らは蛋白分解酵素阻害剤を組み合わせて用いる方法により, 遅延接着が起こり, 阻害剤を含まない培地に移してやると, ただちに接着し, トロホプラストの伸展, ICM の 2 層形成 (ectoderm, endoderm) を遂げることを認めた。今回, この方法による遅延胚の合成系および細胞増殖能について, 正常接着胚および Sherman らの方法による遅延胚と比較し, 発生遅延の正常性に対する影響を生化学的に考察し, さらに遅延胚を移植することにより, 着床率, 胎存率を各時期において観察した。

方法： 胞胚の回収は ICR 系雌マウスを用いた。PMS 5 IU, 48 時間後, HCG 5 IU 注による過排卵処置後, 個別に成熟雄ケージ中に入れ, 自然交尾させた。腔栓確認を受精第 1 日 (D1) とした。胞胚は D4 の妊娠子宮から flushing により回収した。培地には修正イーグル (BME+AA)⁴⁾ に 10% 牛胎仔血清を添加したものを基本培養液とした。

蛋白分解酵素阻害剤は著者らが前回報告したごとく, p-nitrophenol-p'-guanidino benzoate (NPGB) は dimethyl sulfoxide (DMSO) 中に 10 mM 濃度に溶解, また Soybean trypsin inhibitor (STI, type 1) は BME+AA に 1 mg/ml (W/V) 溶解し, 各々保存溶液とした。これらは使用時稀釀し, 各々最終濃度 10^{-4} M, および $350 \mu\text{g}/\text{ml}$ として培養液中に添加した。

胚の接着遅延培養は D4 より D6.5 まで実施し, この間 0.5 D (12 時間) 間隔で移植実験を行った。recipients は同系精管結紮雄による偽妊娠雌 (D2.5) を各実験区画ごと 4 匹ずつ作製し, 胚をそれぞれ片側 5 個ずつ, 両側計 10 個, 子宮内移植 (McLaren'69) した。反復実験を全区画 5 回ずつ行い, 着床率, 着床痕, 胎仔数, 発育形態などにつき, 着床遅延の影響を実体顕微鏡下に観察した。

その他の方法： 細胞数算定は Tarkowski 変法を用いた。DNA 合成能測定には $10^{-2} \mu\text{Ci}$ [3H]-TdR を取り込ませた autoradiograph を作製した。蛋白合成能の測定には L-[35S]methionine を tracer として, TCA 不溶分画におけるメチオニンの取り込み率をシンチレーションカウンターで計測し, 更に, ポリアクリルアミドゲル 2 次元電気泳動法によって蛋白合成能の質的変化を観察した。これらの方は別報に詳述した。

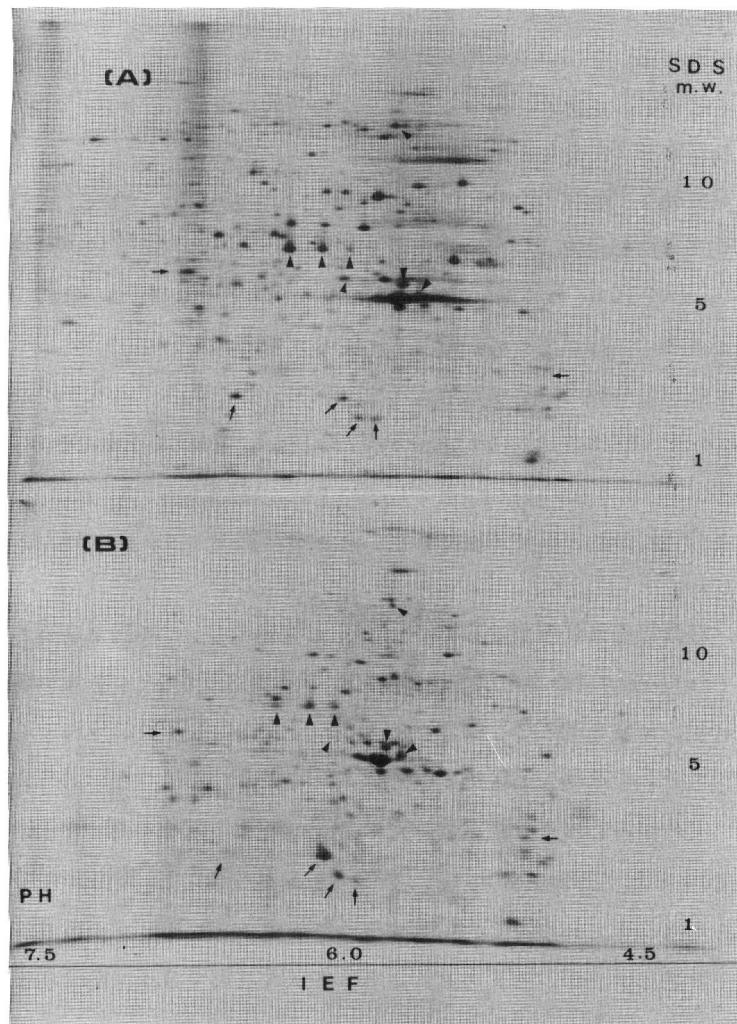
結果： 胞胚構成細胞数は P1 を含まない基本培地中では D6.5 まで直線的に増加し, それ以後, 増殖率はやや鈍化するが, 直線的増加傾向は変らなかった。一方, NPGB:STI 法による遅延胚は D6 までは直線的増加傾向を示したが, その後, むしろ減少傾向を示した。

次に NPGB:STI 法による遅延胚の DNA 合成能は, D4 では 54 ± 8/胚 (83 ± 7%) の核に取り

込みが認められたが、D6.5では45±3(31±5%)と減少した。一方、蛋白合成能に関しては遅延胚はD8まで直線的な増加傾向(2.5±0.3 pmol/embryo/hr.)を示し、対照群と比較して殆んど差を認めなかった。しかし、D8以降になると急激に低下し、D9では1.6±0.4 pmol/embryo/hr.)と対照群に比較して有意差($P < 0.01$)を認め、D11では0.6±0.3 pmol/embryo/hr.になった。SDS-PAGEによる一次元電気泳動ではペプタイドのM.W.は $1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ 帯域に分布し、各々110のバンドが観察され、正常胚、遅延胚間に蛋白質の差異は認められなかった。しかし、2次元泳動では各々300のペプタイドスポットに分離し、6つのトロホブラスト Specificなポリペプタイドは正常胚(A)では著明な radioactive spots(黒三角印)として認められたが、遅延胚(B)ではweakly radioactiveであり、トロホブラストにおける合成能の質的変化が認められた。しかし、ICM-specificなペプタイド(黒矢印)は正常胚で strong radioactiveであったが、遅延胚ではweakly radioactiveであった(写真1)。

一方、胚移植成績は、各4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5日胚の胎仔数/着床数(m±S.E.)ではそれぞれ 70.8 ± 12 , 74.2 ± 9 , 40 ± 17 , 6.9 ± 5 , 0.2 ± 0 , 0% となり、D5より胎仔数の急激な減少が認められた。また、移植後、D12.5での胎仔頭尾長は7.5±0.4 mm(D4 & 4.5), 7.2±0.6 mm(D5 & 5.5), 7.3±0.2 (D6 & 6.5)と低下傾向であったが、培養初期胚(D4 & 4.5)と他群間に有意差は認められなかった。着床痕には変性円筒期胚が観察され、胚-子宮内膜不相関の結果、変性、吸収過程にあると思われた。

考察： 胚胎期以降の哺乳類胚では着床することが発育分化にとって、必須条件となる。必然的着床遅延を起こす哺乳類を除けば、その他の動物では偶発的なものである。今回、我々はマウス胞胚の



インビトロ接着を人為的にコントロールする事によって、誘起着床遅延モデルを作製し、この遅延胚の合成能、移植後の発育、分化能を検討した。接着遅延により、細胞増殖が抑制されるということは細胞増殖に必要な細胞内合成系に対する影響が考えられる。この点から我々はアミノ酸およびチミジンに対するアイソトープの取り込みをマーカーとして、遅延胚の核酸、蛋白合成系について正常胚との比較検討を試みた。この結果、接着遅延後のDNA合成系の低下が認められ、さらに、蛋白合成能の低下とDNA合成能の低下には24時間のずれが認められた。また、胚の細胞増殖能の低下もD9頃より起つてくることから、遅延接着によるDNA合成能の低下が引き金となり、細胞内蛋白合成を減少させ、細胞増殖を抑制すると思われる。また、移植実験の結果からは核酸、蛋白合成能が抑制されるより、もっと早期D5から、接着遅延が胚発生に影響を与えることが示唆され、胎仔形成が阻害されることが確認された。

文献：

- 1) Gwatkins, R. B. L. : Nutritional requirements for post-blastocysts development in the mouse. *Int. J. Fert.*, 14 : 101, 1969
- 2) Sherman, M. I. : Implantation of mouse blastocysts in vitro. In *Methods in Mammalian Reproduction*, (ed. D. Daniel), 247. Academic press, N.Y., 1978
- 3) Kubo, H., Spindle, A. I. and Pedersen, R. A. : Inhibition of mouse blastocysts attachment and outgrowth by protease inhibitors. *J. Exp. Zool.*, 216 : 445, 1981
- 4) Spindle, A. I. : An improved culture medium for mouse blastocysts. *In vitro*, 16 : 669, 1980

Blocking Effect of Monoclonal Antibodies to Hamster
Oocytes on In Vitro Fertilization in Hamster

繁田実、松田孝之、香山浩二、磯島晋三
Minoru SHIGETA, Takayuki MATSUDA, Koji KOYAMA & Shinzo ISOJIMA

兵庫医科大学産婦人科学教室
Department of Obstetrics & Gynecology, Hyogo Medical College

Immunological inhibition of fertilization was demonstrated by conventional antibody to zona pellucida (Z.P.) in different species of animals, but the mechanism of its effect has not been well defined. In this study, we have established monoclonal antibodies (Mabs) against hamster eggs and analysed their blocking effects on fertilization in vitro in hamster. One of the Mabs to hamster Z.P. (GHO-11) impaired the fertilization of denuded eggs but not zona free eggs. On the other hand, these Mabs to egg plasma membrane (GHO-4, 8, 13) impaired both denuded and zona free eggs. From these results, it possibly be assumed that antigen epitopes recognized by these Mabs are associated or closely located to sperm receptors in the surface of Z.P. or egg plasma membrane.

緒言：哺乳動物受精現象の調節機構の中で、卵細胞膜及び透明帯は種特異性の決定や、多精子受精の阻止など、種保存の為の重要な役割を担っている。細胞膜又は透明帯表面には種特異的精子レセプターの存在が推定され、一方、ヒトやハムスターでは多精子受精防御機構は主に透明帯反応に依存すると言われているが、詳細は明らかではない。本実験では、これら精子レセプターの同定や、透明帯反応の解析を目的として、卵細胞膜及び透明帯に対するモノクロナール抗体(Mab)を作製しこれら抗体及び対応抗原の受精における影響を検討した。

方法：成熟Golden Hamsterの卵巣ホモジネート(5mg)を完全フロイントアジュバントと共にBalb/cマウスに免疫し、免疫脾細胞とマウスMyeloma cell line (P3U1)を定法に従って細胞融合、HAT selection, cloningを行い、ハムスター卵細胞膜又は透明帯に対するMabを作製した。⁽¹⁾ Mabのscreening及び臓器特異性の検定にはハムスター卵巣の他各臓器に対する酵素抗体法を用い、種特異性の検定にはマウス、ラット、ブタ、ヒト卵に対する蛍光抗体法を用いた。ハムスターのin vitro受精実験は、PMS-hCGにて過排卵処理したハムスター卵管卵に成熟雄ハムスター副睾丸精子をmodified Tyrode液中で5時間preincubateしcapacitateさせた後、inseminationしCO₂ incubator内にて培養後、固定染色を行い受精の有無を判定した。

結果：6種のMabの内、2種(GHO-4及び8)は透明帯と卵黄膜に反応し、3種(GHO-11, 26及び27)は透明帯とのみ、他の1種(GHO-13)は卵黄膜とのみ反応した。GHO-8はハムスター肝、脾、腎細胞とも反応したが他は交叉反応性を認めなかった。GHO-11と13はmouse未受精卵と反応するが、ラット、ブタ及びヒト卵とは反応を示さなかった。さらに、ハムスター受精卵及び2分割卵に対してもこれらGHO-11, 13は反応性を示した。GHO-4は受精卵では反応性が消失し、GHO-13はその減弱が認められた。in vitroの受精系への抗体の影響は、卵丘細胞除去卵に抗体を

反応させた場合、GHO-8, 11, 13 ではいずれも対照に比し受精率の低下が認められたが、GHO-4, 26, 27 は有意ではなかった（表1）。一方、透明帯除去卵に抗体を反応させた場合は、GHO-4, 8, 13は精子侵入を完全に阻止したが、GHO-11は影響を与えたなかった（表2）。

（表1）ハムスター卵受精系に対する抗ハムスター卵
单一クローニング抗体の影響

——卵丘細胞除去卵を用いて——

抗ハムスター卵 抗体	実験回数	受精卵数 （受精率） 使用卵数
抗卵血清	5	2/ 51 (3.9)
正常血清	7	83/101 (82.2)
GHO-4	3	25/ 39 (64.1)
GHO-8	3	12/ 40 (30.0)
GHO-11	4	18/ 64 (28.1)
GHO-13	5	27/ 70 (38.6)
GHO-26	2	17/ 29 (58.6)
GHO-27	2	20/ 29 (70.0)

（表2）ハムスター卵受精系に対する抗ハムスター卵
单一クローニング抗体の影響

——透明帯除去卵を用いて——

抗ハムスター卵 抗体	精子結合卵数 （%） 使用卵数	精子侵入卵数 （%） 使用卵数
抗卵血清	0/5 (0%)	0/5 (0%)
正常血清	9/9 (100%)	6/9 (66.7%)
GHO-4	3/18 (16.7%)*	0/18 (0%)*
GHO-8	5/19 (26.3%)*	0/19 (0%)*
GHO-11	16/16 (100%)	9/16 (56.3%)
GHO-13	6/13 (46.2%)*	0/13 (0%)*

*P<0.01 (χ^2 test)

考察：抗卵透明帯抗体による受精阻害の作用機序については、精子レセプターに対する抗体による精子と透明帯との結合阻害と、レセプターに近接する抗原基に対する抗体により誘起される立体障害(steric hindrance)による結合阻害とが考えられる。マウスにおいて抗透明帯抗体による受精阻害作用が IgGでは認められるが F(ab)では認められないことから、通常の抗透明帯抗体の中には精子レセプターに対する抗体は含まれていないと推定された⁽²⁾。しかしながらブタ透明帯に対する Mabにおいて、種特異的抗ブタ透明帯 Mab が明らかな受精阻害作用を示すのに対し、種交叉性をしめす Mab は部分的阻害作用かまたは全く阻害作用をしめさなかった事、抗ブタ卵透明帯 Mab の中でハムスター卵に反応するものについてハムスターの受精阻害作用を調べた結果、Mab だけでは全く影響せず、第2抗体を加えたときのみ受精障害が認められた事⁽³⁾、さらに、今回ハムスターに対して作製した Mab の中で透明帯とのみ反応する GHO-11は Mab のみで受精阻害を示した事等は、精子レセプター又はこれに近接する抗原基(epitope)を認識している抗体が存在する事を示している。精子レセプターは種特異性があると考えられるため、マウス透明帯とも反応する GHO-11はレセプターというよりはむしろ精子レセプター近接抗原基(epitope)を認識している可能性が高いと考えられる。また透明帯貫通精子が卵原形質膜と融合する場合にも互いの認識が必要と考えられるが、3種の Mab (GHO-4, 8, 13)が単独で受精阻害作用を示したという事は、これらの Mab が認識する原形質膜上の抗原基(epitope)は精子との融合反応に関与している可能性が高い。

- 文献 1. Shigeta, M., Watanabe, T., Maruyama, S., Koyama, K. and Isojima, S.; Sperm immobilizing monoclonal antibody to human seminal plasma antigens. Clin. Exp. Immunol. 42:458, 1980.
 2. Tsunoda, Y., Sugie, T., Mori, J., Isojima, S. and Koyama, K.: Effect of purified zona antibody on fertilization in the mouse. J. Exp. Zool. 271:103, 1981.
 3. Isojima, S., Koyama, K., Hasegawa, A., Tsunoda, A. and Hanada, A.; Monoclonal antibodies to porcine zona pellucida antigens and their inhibitory effects on fertilization. J. Reprod. Immunol. 6:77, 1984.

精子の透明帯貫通に及ぼす精子不動化
抗体の抑制作用

Effects of sperm immobilizing antibodies on zona
penetration test

津久井伸一・福田愛作・野田洋一・森 崇英

Shinichi TSUKUI, Aisaku FUKUDA,
Yoichi NODA and Takahide MORI

京都大学医学部婦人科学産科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Fac. of Med. Kyoto Univ.

The effects of sperm immobilizing antibodies (SIA) on human sperm penetration of human zona pellucida were assessed by in vitro zona penetration test. Sera from infertile women were screened for SIA by sperm immobilization test. Human zonae pellucidae were prepared from human oocytes stored in highly concentrated salt solution for zona penetration test. The penetrating ability of sperm that were preincubated in mBWW medium containing 7.5% SIA positive serum was inhibited as compared with sperm that were preincubated in the same medium containing 7.5% SIA negative serum.

緒言：近年原因不明不妊婦人における抗精子抗体、とりわけ精子不動化抗体の意義が論じられているが、その受精の過程における作用は、なお不明な点が多い。今回我々は、精子不動化抗体が受精の過程に及ぼす作用を検討する目的で、in vitro にて高濃度塩類溶液中に保存したヒト卵に対し、精子不動化抗体陰性血清（以下陰性血清とよぶ）および精子不動化抗体陽性血清（以下陽性血清とよぶ）にて処理したヒト精子を用いて、透明帯貫通試験を行なった。

方法：まず不妊外来通院中の患者より得た血清に対し精子不動化試験を行ない、精子不動化抗体のスクリーニングを行なった。次に子宮癌等の手術にて摘出した卵巣より、患者の同意を得た上でヒト未熟卵を成熟培養し、高度の変形が認められなかった卵を高濃度塩類溶液中に保存した。一方 healthy donor より得られた精液を室温にて液化後、layering method により 7.5% 陰性血清または陽性血清を含むmBWW液中に swim up させた運動性良好精子を用い、sperm suspensionを作製した。上記の sperm suspension を用い、ペトリディッシュ中に 300μl の spot を作製し、そこへ高濃度塩類溶液中に保存された卵を導入し、37°C、

5% CO₂ in air にて24時間培養した。卵は培養終了後、マイクロピペットにて3回洗浄し、ノマルスキー微分干涉顕微鏡にて、透明帯付着精子数および卵胞腔に認められる貫通精子数を算定した。

結果: Table 1 に示すように、3回の実験を通じ、control すなわち陰性血清にて処理した精子の場合は、すべて卵胞腔に貫通精子を認めたのに対し、陽性血清にて処理した精子の場合は、貫通精子をまったく認めなかつた。また透明帯付着精子数に関しても、陰性血清にて処理した場合と比較して、陽性血清にて処理した場合は、減少傾向が認められた。

Table 1 EFFECTS OF SPERM-IMMOBILIZING ANTIBODIES ON ZONA PENETRATION TEST

Case No.	SI ₅₀	Clinical diagnosis	Experiment 1		Experiment 2		Experiment 3	
			No. of sperm attached	No. of sperm penetrated	No. of sperm attached	No. of sperm penetrated	No. of sperm attached	No. of sperm penetrated
		Control	578	4				
75	7.7	Unexplained			309	0		
26	2.5	Unexplained			275	0		
		Control			533	1		
75	7.7	Unexplained					147	0
75	7.7	Unexplained					152	0
		Control					402	6
		Control					295	4
Sperm concentration			$5 \times 10^6/\text{ml}$		$2 \times 10^6/\text{ml}$		$12 \times 10^6/\text{ml}$	

(考察): 我々は、高濃度塩類溶液中に保存した卵を用いたヒト in vitro 受精系で、精子の透明帯貫通が起る事を確認した。さらに精子不動化抗体陽性血清の存在下では、精子の透明帯貫通が阻害される現象を観察した。その結果、従来より主として頸管粘液中で、精子の通過障害をもたらすと言われていた精子不動化抗体が、受精現象そのものに関与する可能性が強く示唆された。

主要文献

1. 香山浩二, 伊熊健一郎, 富田耕三, 鎌田敏雄, 磯島晋三: 定量的精子不動化試験とその臨床応用. 日産婦誌, 31: 1906, 1979.
2. Yanagimachi, R., Lopata, A., Odom, C. B., Mahi C. A. and Nicolson, C. 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.

胚の短期保存を目的とした 非凍結保存方法の検討

Studies of non-freezing storage
for short term on embryos

佐原弘益 金山喜一 遠藤 克 佐久間勇次

Hiroeki SAHARA, Kiichi KANAYAMA, Tuyoshi ENDO and Yuzi SAKUMA

日本大学農獸医学部獸医学科生理学教室

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

Short term non-freezing storage of rabbit embryo was studied. Superovulation was induced by PMSG or FSH. Then, the oviduct and uterus were irrigated to obtain embryos. Obtained embryos were stored at 5~8°C in the storage medium which was 3.5% gelatine solution containing 33% rabbit serum. All of 8~16 cell, which had been storaged for 84 hrs, developed to blastocysts. In the storage for 96 hrs about 50% of them developed and for 240 hrs about 20% of them developed respectively.

緒論：家畜の改良増殖を目的として胚移植が広く応用されるようになり、とくにウシの胚移植に関する多くの実用化技術が開発され、一般に普及されるようになってきた。胚の保存に関して、長期保存を目的とした凍結保存方法がネズミ、ウサギなどの実験動物で成功し、ウシ、ヤギなどの家畜でも凍結胚の移植によって産仔が得られるようになり、家畜の胚移植は急速に普及されるようになってきている。しかし、凍結胚は高額な凍結器材の設備と繁雑な操作が必要であり、またその生存性、移植成績など、まだ改良検討すべき多くの問題が残されている。人工授精における精液は、常時、しかも多量に採取できるので精液の凍結保存は極めて経済的に有効な保存方法であるが、胚移植に用いる胚は、採卵時期が限定され、しかも採取できる胚もごく少數であって、胚移植の実用普及化には必ずしも凍結保存が必要とは言えない。ウシの性周期は3週であり3週以内の保存方法の検討が必要になってきた。著者らは、ウシの胚移植への応用を目的として、ウサギの胚を用いて非凍結簡易保存方法について検討した。

方法：供試動物は、体重2.4~3.0kgの成熟雌ウサギで、PMSG 50IU¹ の静脈内一回注射、PMSG 100IU の皮下一回注射、またはFSH 1AUを1日2回3日間注射し、交配、HCG 50IU 静脈内注射で過排卵した胚を用いた。供試胚のcell stageは、2~4 cellは交配後30hrs、8~16

Survival of Rabbit embryos on non-freezing storage

cellは45hrs、Morula
は70hrsに卵管、子宮
を灌流して採取した。
灌流液は10%の非
効化家兎血清を含む
TCM199を用い
た。冷蔵保存溶液は
生理食塩水を溶媒と
した3.5%ゼラチ
ン溶液と非効化家兎
血清を2:1に混合
したもの用いた。
胚は、室温から直ち
に5~8°Cの冷蔵庫

Storage time (hr)	Cell stage at storage	No. of embryos	No. of cultured embryos to blastocyst	%
48	8-16	20	20	100
72	8-16	36	36	100
84	8-16	26	25	96.2
96	8-16	33	16	48.5
120	8-16	17	10	58.8
144	8-16	25	12	48.0
168	8-16	20	7	35.0
192	8-16	20	8	40.0
216	8-16	20	1	5.0
240	8-16	20	4	20.0

に移し24~240hrs保存した。保存後に取り出した胚は、30%非効化家兎血清を含むTCM199に50IU/mlのペニシリン添加培養液で2回洗浄し、洗浄液と同じ溶液で3日間培養した。胚の生存性は胚盤胞への発生をもって判断した。

結果：胚の保存培養成績は、Tableに示すように、8~16cell胚は84hrsまで全例が胚盤胞、96hrsでは50%前後に低下し、それ以後徐々に低下し、240hrsでは20%であった。2~4cell胚の成績は、72hrsで60%に低下した。Morula胚の成績は120hrsで80%前後であって、2~4、8~16cellに比べるとかなり生存性が高いことが示された。これら生存性を確認するため移植して、その生存性を検討している。胚の保存に関して、Chang(1947)², Hafez(1961)³の報告があり、Hughes(1982)⁴らは、Morula胚を4°Cで保存し、7日間で76%、10日間で15%の生存性を認めており、7日間の保存胚を移植して44%の産仔を得ている。小林(1983)⁵らは、ウシのMorula, Blastocystの胚をPBS 35°Cの輸送用保存器で自動車輸送し採取後2~9hrsに移植しているが、146個の胚を移植して73個(63.27%)の産仔を得ている。

現在、著者らは保存培養後の胚の生存性を、胚移植により検討中であり、さらに最適な保存温度、cell stage、冷蔵液、培養液などについても検討を試みている。

主要文献

- 1) 佐久間勇次, 金山喜一, 遠藤克, 小林軍次郎, 佐藤嘉兵. (1983) PMSGの静脈注射による家兎の過排卵誘起に関する研究 I. -有効投与量の検討- 日不妊会誌, 28, 221-224.
- 2) Chang, M.C. (1947) Normal Development of Fertilized Rabbit Ova Stored at Low Temperature for Several Days. Nature, 159, 602.
- 3) Hafez, E.S.E. (1961) Storage of Rabbit Ova in Gelled Media at 10°C. J. Reprod. Fertil., 2, 163-178.
- 4) Hughes, M.A. and Anderson, G.B. (1982) Short-Term Storage of Rabbit Embryos at 4°C. Theriogenology, 18, 3, 275-282.
- 5) 小林軍次郎, 石島芳郎, 金山喜一, 山田均, 高橋敬一, 佐久間勇次. (1980) 保存・輸送をともなった牛胚の移植に関する二,三の知見. 東京獣畜誌, 28, 1, 19-22.

2段階凍結したマウス胚の生存性におよぼす 予備凍結温度と保護物質の影響

Survival of Mouse Embryos Frozen to -196°C by a Two-Step Procedure
with Reference to Preliminary Freezing Temperatures and Cryoprotectants

宮本 元・宮本庸平・石橋武彦

Hajime MIYAMOTO, Yohei MIYAMOTO and Takehiko ISHIBASHI

京都大学農学部家畜生体機構学研究室

Laboratory of Functional Anatomy of Farm Animals, Faculty of Agriculture, Kyoto University, Kyoto

Mouse embryos were frozen by the two-step procedure in the presence of 2 M glycerol or 2 M DMSO and thawed rapidly. Embryos were transferred to constant temperature baths at $-10\sim-79^{\circ}\text{C}$ and held at that temperature for 20 min before being plunged directly into liquid nitrogen. The higher survival rates for morulae were obtained when frozen to -196°C following preliminary freezing at $-30\sim-60^{\circ}\text{C}$ with glycerol (68~76%) and at -10°C with DMSO (59%). In the presence of DMSO, 21% of 4-cell embryos survived after transfer to -196°C from -10°C but 2-cell embryos did not survive freezing with glycerol or DMSO.

緒言：1972年にWhittinghamら¹⁾によって考案された哺乳動物胚の凍結保存法は、今日世界的に普及し、実験小動物胚および家畜胚の効率的利用に応用されている。当初、各種の動物胚の凍結保存には、緩慢な冷却速度(0.2~0.8°C/分)と融解速度(4~25°C/分)が採用された。これに対して近年、 $-30\sim-40^{\circ}\text{C}$ まで緩慢冷却した後サンプルを液体窒素(LN)へ浸漬したり²⁾、 -30°C 付近のアルコールバス^{3,4)}か -79°C の粉末ドライアイス中⁵⁾にサンプルを直接投入して、この温度に一定時間静置後にLNへ浸漬するといふいわゆる2段階凍結法によって凍結しても、胚を38~40°Cの温水中で急速融解すればかなり高い生存性が維持できることが明らかになった。

胚の2段階凍結法は凍結操作がきわめて簡易であり、凍結所要時間も短かく、高価な凍結機器を必要としないなどの長所があるが、緩慢凍結法に比べ生存性がやや低いという難点がある。

2段階凍結法において、予備凍結温度(胚をLNへ浸漬する前に一時的に短時間凍結する温度)、保護物質、胚の発生段階などが凍結後のマウス胚の生存性におよぼす影響を検討し、2段階凍結法によって最良のマウス胚の生存性がえられる諸条件を明らかにするために本実験を行った。

方法：4～6週齢のICR系雌マウスに5～12iuのPMSGおよびHCGを48時間間隔で腹腔内注射し、同系の雄と交配させた。HCG注射の48～50, 56～60および76～80時間後に修正Dulbeccoリン酸緩衝液(PBS)で生殖器を灌流して、それぞれ2細胞胚、4細胞胚および桑実胚を採取した。0.1mlのPBSを含むガラス試験管に形態的に正常な胚を10～24個ずつ入れた。0°Cでグリセリンまたはジメチルスルフォキサイド(DMSO)を含むPBSを、0.075mlずつ10分間隔で2回添加し、最終濃度を2Mとした。同温度で10分間の平衡を行った後、-7°Cで植氷し5分後にサンプルを凍結した。

実験1では、予備凍結時間が2段階凍結後の桑実胚の生存性におよぼす影響を検討した。すなわち、グリセリン存在下では-40°Cで、DMSO存在下では-10°Cでそれぞれ5～90分間の予備凍結を行い、その後LNへ浸漬した。

実験2では、各種の予備凍結温度が2段階凍結後の胚の生存性におよぼす影響を明らかにするために、-10～-79°Cの温度域で、10°C間隔のアルコールバスを作製し、これら各種の温度で20分間の予備凍結後にLNへ浸漬した。

LN中に1時間から3日間凍結後、サンプルを40°Cの温水中で振とうして急速融解(450～500°C/分；-70～-10°C)した。室温下で融解胚を最初、2M保護物質(グリセリンまたはDMSO)と0.5Mショ糖含有のPBSに移し、3分後に0.5Mショ糖含有のPBSに移し、さらに3分後に新鮮なPBSで2回洗浄した。これらの胚を炭酸ガス培養装置内で培養した。凍結時の胚の発生段階に応じて、40～72時間培養後に胚盤胞に発生した胚を生存胚と判定した。同一実験を2～4回くり返して行った。

結果：グリセリン存在下の桑実胚(32～51個)を-40°Cで5, 10, 20, 30, 60, 90分間予備凍結後にLNへ浸漬したときの生存率は、それぞれ88, 89, 74, 68, 71, 61%であり、DMSO存在下で、-10°Cで同時間予備凍結したときの生存率は、それぞれ50, 68, 53, 50, 42, 53%であった。

2Mグリセリンまたは2M DMSOの存在下で、-196°C～2段階凍結した胚の生存性をTable 1に示した。グリセリン存在下で-10～-79°Cのいずれの予備凍結温度から-196°Cへ急冷しても、2細胞胚はすべて死滅した。これに対して桑実胚は、-10～-79°Cのいずれの予備凍結温度でも超低温における生存能力を獲得した。-30～-60°Cの予備凍結温度から-196°Cへの急冷によって最良の生存率(68～76%)がえられた。これらに比べて-10(35%), -20(41%), -70(60%)および-79°C(58%)の予備凍結温度で桑実胚の生存性は低下した($P < 0.05$)。

2M DMSOの存在下で、-10～-79°Cのいずれの予備凍結温度から急冷しても2細胞胚は生存できなかった。4細胞胚の場合には、-10°Cの予備凍結温度からの急冷で21%の生存率がえられたが、-20～-79°Cの予備凍結温度で生存率(0～12%)は低下した。これらの胚に比べ、桑実胚の生存率はいずれの予備凍結温度においても高かった。-10°Cの予備凍結温度で桑実胚の最良の生存率(59%)がえられた。-20°Cの予備凍結温度で生存率(34%)が低下し($p < 0.01$)、-30～-70°Cの予備凍結温度で生存率(6～12%)がさらに低下したが($p < 0.01$)、-79°Cでは生存率(27%)が若干高くなった。

考察：凍害のおもな原因是、凍結過程での細胞内氷晶の形成および融解過程でのそれらの成長と再結晶化で

Table 1. Survival of mouse embryos when frozen abruptly to -196°C after preliminary freezing for 20 min at the temperatures indicated in the presence of 2 M glycerol or 2 M DMSO

Temperature drop ($^{\circ}\text{C}$)	% Survival				
	2 M glycerol		2 M DMSO		
	2-cell	Morula	2-cell	4-cell	Morula
-10 \longrightarrow -196	0 (34)	35 (66)	0 (41)	21 (58)	59 (75)
-20 \longrightarrow -196	—	41 (46)	0 (33)	12 (66)	34 (68)
-30 \longrightarrow -196	0 (38)	73 (66)	0 (28)	5 (44)	12 (66)
-40 \longrightarrow -196	0 (42)	76 (67)	—	2 (49)	9 (55)
-50 \longrightarrow -196	0 (33)	68 (57)	0 (35)	1 (38)	6 (62)
-60 \longrightarrow -196	—	72 (71)	—	0 (46)	7 (57)
-70 \longrightarrow -196	0 (27)	60 (57)	0 (32)	3 (37)	8 (53)
-79 \longrightarrow -196	0 (35)	58 (71)	0 (45)	8 (51)	27 (66)

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

あるといわれている⁶⁾。2段階凍結された胚内に存在する氷晶を観察した報告はまだないが、 -40°C に緩慢冷却後にLNへ急冷したマウス胚を緩慢融解すると、胚内に氷晶の存在することが観察されている⁷⁾。DMSOまたはグリセリン存在下で2段階凍結したマウス胚を急速融解すると高い生存性がえられたが、緩慢融解では胚は生存できないか急速融解に比べて生存性が低かった³⁻⁵⁾。緩慢融解では胚の生存性が低く、急速融解でのみ高い生存性がえられるというこれらの報告は、胚の2段階凍結によって細胞内氷晶が形成されたことを示唆している。

従来、マウス³⁻⁵⁾、ウサギ⁸⁾およびウシ胚⁹⁾を2段階凍結するさいの予備凍結温度として、 $-20 \sim -30^{\circ}\text{C}$ か -79°C が用いられてきたが、本実験でえられた成績によって、これら以外の予備凍結温度でもマウス胚は超低温における生存能力を獲得できることが明らかになった。この場合、最良のマウス胚の生存性がえられる予備凍結温度は、2Mグリセリン存在下では $-30 \sim -60^{\circ}\text{C}$ 、2M DMSO存在下では -10°C であり、両者間には差が認められた。

1M DMSO中のマウス未受精卵を緩慢冷却すると、 -10 、 -20 、 -30 および -40°C において卵は凍結前の正常卵体積の97~100、67、62および57%に収縮した¹⁰⁾。1.4Mグリセリン中のウシ胚盤胞を緩慢冷却すると、 -7 、 -16 、 -21 および -37°C において凍結前の正常胚体積の74、64、66および58%であった¹¹⁾。すなわちこれららの胚(卵)を冷却したとき、 -10°C では凍結前の正常なものの体積に比べてほとんど収縮しないか比較的わずかな収縮がおこるにすぎないので、この温度では胚はほとんど脱水されていないと思われる。本実験で、グリセリン存在下では $-30 \sim -60^{\circ}\text{C}$ の予備凍結温度で最良の生存性がえられたのは、これらの温度域でマウス桑実胚は十分に脱水され、その後の急冷によっても細胞内氷晶がほとんど形成されなかつたためと思われる。これに対して、DMSO存在下では脱水が不十分な -10°C の予備凍結温度で最良の生存性がえられたが、この理由については今後の研究が必要である。

緩慢冷却によって、マウスの1細胞胚と2細胞胚は比較的高い生存性が維持された¹⁾。一方、本実験の2段階凍結法では、桑実胚は生存できたが2細胞胚は死滅した。2段階凍結法は緩慢凍結法に比べ脱水のための時間が

短かく、十分に脱水されなかつたためであろう。また、胚の発生段階が進むにつれて割球の膜の透過性¹²⁾や浸透圧衝撃に対する抵抗性が増すために、凍結過程で胚が脱水されやすくなるとともに保護物質も割球内に透過しやすくなることも関係していると思われる。

胚の2段階凍結法において、生存性に影響をおよぼす要因には、予備凍結温度、その温度での静置時間、保護物質の種類と濃度などが考えられるが、これらの要因の相関については今後の検討が必要である。

主要文献

1. WHITTINGHAM, D. G., LEIBO, S. P. and MAZUR, P.: Survival of mouse embryos frozen to -196° and -269°C. *Science*, 178, 411-414, 1972
2. WHITTINGHAM, D. G., WOOD, M., FARRANT, J., LEE, H. and HALSEY, J. A.: Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196°C. *J. Reprod. Fert.*, 56, 11-21, 1979
3. WOOD, M. J. and FARRANT, J.: Preservation of mouse embryos by two-step freezing. *Cryobiology*, 17, 178-180, 1980
4. KASAI, M., NIWA, K. and IRITANI, A.: Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J. Reprod. Fert.*, 59, 51-56, 1980
5. MIYAMOTO, H. and ISHIBASHI, T.: Solid CO₂ freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 67, 107-111, 1983
6. MAZUR, P.: Cryobiology: The freezing of biological systems. *Science*, 168, 939-949, 1970
7. RALL, W. F., REID, D. S. and FARRANT, J.: Innocuous biological freezing during warming. *Nature*, 286, 511-514, 1980
8. RENARD, J. -P., BUI-XUAN-NGUYEN and GARNIER, V.: Two-step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J. Reprod. Fert.*, 71, 573-580, 1984
9. BOUYSSE, B. and CHUPIN, D.: Two-step freezing of cattle blastocysts with dimethylsulfoxide (DMSO) or glycerol. *Theriogenology*, 17, 159-166, 1982
10. LEIBO, S. P.: Introduction to embryo freezing. In *Frozen Storage of Laboratory Animals* (ZEILMAKER, G. H. 編). pp. 1-19, Gustav Fisher, Stuttgart, 1981
11. LEHN-JENSEN, H. and RALL, W. F.: Cryomicroscopic observations of cattle embryos during freezing and thawing. *Theriogenology*, 19, 263-277, 1983
12. MAZUR, P., RIGOPOULOS, N., JACKOWSKI, S. C. and LEIBO, S. P.: Preliminary estimates of the permeability of mouse ova and early embryos to glycerol. *Biophys. J.*, 16, 232a, 1976

蛍光色素 D A P I による凍結融解後の マウス胚盤胞の生存性判定

Boon-Guan Low, Yoshiyuki Takahashi and Hiroshi Kanagawa

ロー・ブーングラン、高橋芳幸、金川弘司

Department of Veterinary Obstetrics, Faculty of Veterinary
Medicine, Hokkaido University, Sapporo 060.

北海道大学獣医学部家畜臨床繁殖学講座

Abstract

Detection of dead cells in frozen-thawed mouse blastocysts was done on embryos stained with DAPI under the fluorescence microscope. Embryos classified as morphologically good under the light microscope had significantly less dead cells and higher developmental potential than the fair and poor embryos. The developmental potential of the good embryos decreased as the number of dead cells increased ($P<0.01$). Only 7.1% of the good embryos which had more than 5 dead cells per embryo developed to expanded blastocysts. These results suggest that the DAPI-fluorescence test can be used as a method of culling frozen-thawed embryos which contain a large number of dead cells and have low developmental potential.

Introduction

Inaccurate culling of non-viable embryos has been a major cause of low successful rate with the transfer of frozen-thawed embryos in farm animals. Frozen-thawed embryos usually contain dead cells. It has been suggested that the proportions of dead cells in an embryo could affect its viability¹⁾. In the present study DAPI was used to detect dead cells in frozen-thawed mouse blastocysts and the relationship between the number of dead cells and the viability of the embryos was examined.

Materials and Methods

Female Slc:ddY mice, 4-5 weeks of age, were induced to superovulate by 5 IU PMSG and 5 IU HCG given 48 hours apart. They were paired with male of the same strain immediately after the injection of HCG. Blastocysts were flushed from the excised uteri about 90 hours post-HCG with Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS). The blastocysts were transferred through increasing concentrations of DMSO in PBS supplemented with 20% calf serum (0.5M, 10 min; 1.0M, 10 min; 1.5M, 20 min), and loaded into 0.25 ml straws. The straws were placed in a programmable freezer (Cryoembryo-SP, Hoxan) and cooled to -6°C at -1°C/min. Seeding was induced at -6°C and the straws were cooled further to -40°C at -0.5°C/min before they were plunged into liquid nitrogen. Thawing was carried out in warm water at 37°C. DMSO was diluted out of the embryos in a step-wise manner.

The frozen-thawed blastocysts were examined under the light microscope and grouped into apparently good, fair and poor embryos by their gross morphology. They were then incubated with 10 µg/ml DAPI for 1 minute and examined under a reflected-light fluorescence microscope. Dead cells with fluoresced nuclei were counted. The embryos were cultured in microdrops of BMOC-3 medium in humidified air with 5% CO₂.

Results

Nuclei of dead cells fluoresced bright yellow under the fluorescence microscope. Even dead cells that overlapped with the embryo proper were easily detected. Morphologically good embryos had significantly fewer dead cells than the fair and poor embryos ($P<0.001$) (Table 1). However, some good embryos which appeared to have only slight degeneration were found to contain as many as 10-14 dead cells.

The percentage of good embryos that developed to expanded blastocysts after 24 hours of in vitro culture was 70.8%. None of the embryos in the fair and poor groups developed to expanded blastocysts (Table 1). However, some degree of re-expansion of the blastocoel did occur in 6 out of 19 fair embryos. Development to disorganized cell masses with vesicles or complete degeneration occurred in all the other embryos.

Developmental potential of morphologically good embryos that were further classified into 4 groups according to the number of dead cells per embryo was found to decrease as the number of dead cells increased ($P<0.01$). Embryos which contained more than 5 dead cells had very low developmental potential (Table 2).

Table 1 Number of dead cells and developmental potential of frozen-thawed mouse blastocysts

Gross morphology	No. of embryos examined	Average no. of dead cells	No. & (%) developed to expanded blastocysts
Good	96	2.71±3.02 ^a	68 (70.8)
Fair	19	9.26±3.21 ^b	0 (0.0)
Poor	11	11.55±5.66 ^b	0 (0.0)

a,b ($P<0.001$)

Table 2 Relationship between the number of dead cells and the developmental potential of morphologically good embryos

No. of dead cells per embryo	No. of embryos cultured	No. & (%) of embryos developed to expanded blastocysts
0-1	44	44 (100.0) ^a
2-3	23	17 (73.9) ^b
4-5	15	6 (40.0) ^c
≥6	14	1 (7.1) ^d

a,b ($P<0.01$), c,d ($P<0.01$), b,c ($P<0.05$), b,d ($P<0.01$), c,d (N.S)

Discussion

Frozen-thawed mouse blastocysts which contained a larger number of dead cells was observed to show a higher incidence of embryos not developing to expanded blastocysts and of embryos which developed to disorganized cell masses. The number of dead cells present in an embryo can thus cause a retardment or disturbance in its embryonic development.

With the use of DAPI-fluorescence test, presence of dead cells in frozen-thawed embryos could be detected more easily than with the light microscope. Culling of embryos which contain many dead cells and have low developmental potential can be carried out accurately. Thus, DAPI-fluorescence test can be used as a useful supplemental to morphological evaluation of embryos by the light microscope as proposed by Schilling et al.²⁾.

References

- 1) Tervit, H.R. and Elsden, R.P. : Development and viability of frozen-thawed cattle embryos. *Theriogenology*, 15, 395-403, 1981.
- 2) Schilling, E., Niemann, H. and Smidt, D. : Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. In: *In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, 349-355, Ed. Hafez, E.S.E. and Semm, K., MTP Press Limited, England, 1982.

要 約

D A P I 蛍光染色法を用いて、凍結融解後のマウス胚盤胞における死亡細胞の検出を試みた。光学顕微鏡下で形態的に良好と判定された受精卵は、やや不良および不良な受精卵より死亡細胞数が低く、体外培養における発育能が高かった。形態的に良好な受精卵の発育能も死亡細胞数の増加によって低下し、死亡細胞数が6個以上の場合、発育能が7.1%と極めて低かった。

これらの結果より、凍結融解後の受精卵の生存性判定方法として、D A P I 蛍光染色法の有効性が示唆された。

卵操作におけるマイクロマニュプレーションの応用

Application of micromanipulation for ovum research

鈴木秋悦・倉澤滋明, 北井啓勝, 小宮優子, 飯塚理八, 小松節子*, 橋本孝雄*,

Shuetu SUZUKI, Shigeaki KURASAWA,
Hirokatsu KITAI, Yuko KOMIYA, Rihachi IIZUKA,
Setsuko KOMATSU*, Takao HASHIMOTO*

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室
明治薬科大学第1薬物学教室*

Dept. of Ob. & Gyn., Keio Univ., Sch. of Med.
Dept. of 1st Pharm., Meiji College of Pharmacy.*

To approach a study of reproductive toxicology, application of micromanipulation for ovum research was carried out.

Exp. 1—We investigated the role of oocyte cAMP in the regulation of oocyte maturation by microinjection of anti cAMP rabbit serum. The reaction might result in the decrease of oocyte cAMP and oocytes were induced to resume meiosis. This result indicated that the decrease of cAMP triggers oocyte maturation.

Exp. 2—To characterise the mechanism of action of mitomycin C (MMC) and colchicine (COL), microinjection at various concentration of MMC and COL into the 2 cell embryos was carried out. The effect of COL through microinjection into the cytoplasm was considerably lower than the presence of COL in the medium, but the effect of MMC was not lower.

緒言：最近, 生殖毒性学 (Reproductive Toxicology) の重要性が強調されている。しかし, 母体内諸条件の複雑な関与が原因となって, その因果関係の解明は, 未だ, 十分に行われておらず, 日常このような場合に用いられる, 初期胚の培養系を用いた実験においても, 化学物質添加の時期, 時間, 量, あるいは, 卵細胞膜への透過性, 細胞質内での分布の問題など, 多くの問題点が残されている。われわれは, このような生殖毒性学へのアプローチの1つとして, マイクロマニュプレーターによる

卵操作を行っているが、本研究会では、2・3の具体例を上げてマイクロマニュプレーターの応用を報告する。

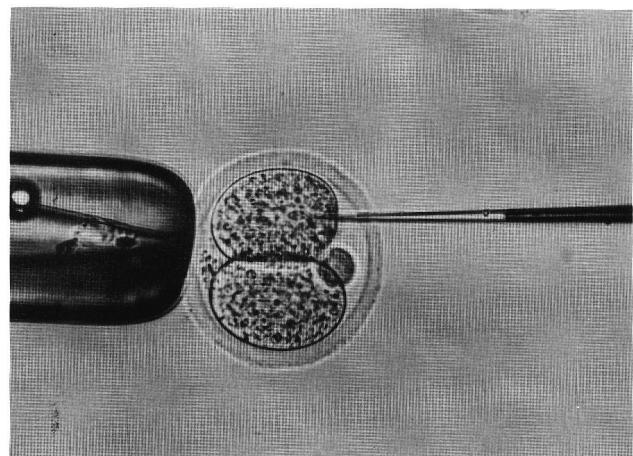
方法：

実験 1. 未受精卵操作

未成熟卵細胞は、減数分裂再開とともに、細胞内 cAMP が減少することが知られている。卵成熟制御機構における卵細胞内 cAMP の役割を検討する目的で、卵へのマイクロインジェクションを試みた。すなわち、発情前期のゴールデンハムスターに、PMSG 25 単位を投与し、48 時間後に卵巣を摘出した。卵胞を穿刺して、胚胞 (GV) をもつ未成熟卵を採取した。一連の操作は、GH-2 培養液に 0.2 mM の 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX) を加えたものを用いた。IBMX は、phosphodiesterase inhibitor で、cAMP の分解を阻止するとともに、卵の成熟を抑制する。採取した卵に、マイクロインジェクション法を用いて、抗 cAMP ウサギ血清 5 p ℓ を注入したのち培養して、成熟動態を観察した。対照として、1) マイクロインジェクションを行わない卵、2) マイクロピペットを穿刺する操作のみを行った卵、3) ウサギ血清を注入した卵の 3 群についても、培養・観察を行った。

実験 2. 受精卵操作

mitomycin C と colchicine のマウス初期胚の発育過程に及ぼす影響と毒性発現機構をマイクロインジェクション法を用いて検討した。すなわち、実験動物として、slc-ICR 系マウスを用いた。使用薬物は、mitomycin C (協和醣酵, MMC) と colchicine (半井化学, COL) で、溶媒対照としては BWW 培養液を用いた。受精卵は発情期雌マウスの交尾臍栓確認後 30 時間の卵管から 2 細胞期受精卵を採取した。2 分割卵の 1 側の割球の細胞質内に、マイクロインジェクション法で、各種濃度の薬物の 2 p ℓ を直接注入 (写真) 後、培養し、24, 48, 72 時間後に、微分干涉顕微鏡下にて観察した。 別途、薬物添加培養液中で受精卵を培養し、薬物を直接注入した場合と比較検討した。



結果：実験 1 の結果は、IBMX を含まない培養液では、ハムスター未成熟卵胞卵は、培養 1.5 時間後に 84% に胚胞消失 (GVBD) が見られ、減数分裂を再開する。また、IBMX 中で 1.5 時間培養後の GVBD は、操作を行わない卵 (対照 1) では 0%，マイクロピペットを穿刺する操作だけの卵 (対照 2) で 20%，ウサギ血清を注入した卵 (対照 3) で 13% であった。一方、抗 cAMP 血清を注

入した実験では、54%にGVBDがみられた。

実験2の結果は、対照群として、培養液注入群の実験を行ったが、受精卵分割速度は受精卵培養時とほぼ同速度で、マイクロインジェクションによる発生過程に及ぼす影響はみられなかった。表1, 2は、夫々、MMC, COLを細胞質内にマイクロインジェクションした実験結果を示した。その結果、細胞質内注入群の細胞分裂抑制作用は、MMCでは $10^2 \mu\text{g}/\text{ml}$, COLでは $10^{-1} \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。また、in vitro 添加群においては、MMCでは $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, COLでは $10^{-5} \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

表1. In vitro development of late 2-cell staged embryo after injection MMC into cytoplasm of one-blastmere. N shows the number of 2-cell staged embryo used. deg:Degeneration of embryo, 2:2 cell stage, 3-4:3-4 cell stage, 5-8:5-8 cell stage, M:Morula stage, EB:Early blastocyst stage, LB:Late blastocyst stage, HB:Hatching blastocyst stage.

Mitomycin C ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	N	Culture time after micro injection																									
		24 hr.					48 hr.					72 hr.															
												deg	2	3-4	5-8	M	EB	LB	HB	deg	2	3-4	5-8	M	EB	LB	HB
10^2	19	11	6	2								12				7				19							
10	39	6	2	16	15							6	2			28	3			20				6	13		
1	54	2		37	15							14	1	9	3	26	1			27				7	20		
10^{-1}	25	3			22							3				21	1			10				4	11		
Control	25			25												21	4			2				23			

表2. In vitro development of late 2-cell staged embryo after injection COL into cytoplasm of one-blastmere. N shows the number of 2-cell staged embryo used. deg:Degeneration of embryo, 2:2 cell stage, 3-4:3-4 cell stage, 5-8:5-8 cell stage, M:Morula stage, EB:Early blastocyst stage, LB:Late blastocyst stage, HB:Hatching blastocyst stage.

Colchicine ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	N	Culture time after micro injection																									
		24 hr.					48 hr.					72 hr.															
												deg	2	3-4	5-8	M	EB	LB	HB	deg	2	3-4	5-8	M	EB	LB	HB
1	10	10										10								10							
10^{-1}	34	6	20	8								12	19	3						34							
10^{-2}	35	1		6	28							1			26	8				14				21			
10^{-3}	19			9	10							2			14	3				4				14	1		
Control	24			4	20										15	9				2				22			

考察：卵の成熟抑制に cAMP が関与することは、以前から知られており、 dibutyl cAMP, phosphodiesterase inhibitor, adenylate cyclase activator を加えた培養液中では、 GVBD は抑制される。また、卵の成熟、 GVBD にともなって卵細胞内 cAMP が減少することが確認されている。本実験では、細胞内 cAMP を減少させることにより、 GVBD が起こることを、直接に証明したものであり、 cAMP の減少は、卵の成熟再開の trigger となることが明らかとなった。

次に、細胞分裂抑制作用などを指標とした毒性発現量の差から、 COL の作用機序は細胞膜への作用、あるいは、細胞膜との結合によって生ずると考えられた。しかし、 MMC については、両群の間に著しい濃度差が認められないこと。細胞質内投与と核質内投与との間に変性率の差が認められないことなどにより、作用発現機構としての膜の重要性は少ないと考えた。

結び：遺伝子導入技術の進歩に伴い、初期胚のマイクロマニュプレーションに関する報告が散見されるが、マイクロインジェクション法の応用は、細胞膜および核膜の機能解明、化学物質などの膜透過性、初期胚に対する毒性発現の機序解明に有用な手技方法である。

主要文献：

1. Muggleton-Harris, A., Whittingham, D.C. and Wilson, C. : Cytoplasmic control of preimplantation development in the mouse., Nature, 299, 460, 1982.
2. Schultz, R. M., Montgomery, R. R. and Belanoff, J. R. : Regulation of mouse oocyte meiotic maturation, Implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis., Dev. Biol., 97, 264, 1983.

汎用マイクロコンピューター制御による
受精卵及び初期胚への注入・切断の顕微操作

Micromanipulation by personal computer for microinjection
and microbisection of fertilized eggs and early embryos.

尾川昭三・高橋 一[†]・水野仁二・柏崎直巳・山根雅巳^{*}・成茂栄一^{**}

Shyoso OGAWA, Hajime TAKAHASHI[†], Jinji MIZUNO, Naomi KASHIWAZAKI,
Masami YAMANE^{*}, and Eiichi NARISHIGE^{**}

明治大学・家畜繁殖学研究室

Lab. of Animal Reproduction, Meiji University

[†] 早稲田大学・機械設計研究室

Lab. of Machine Design, Waseda University

^{*} 成茂科学器械研究所

Narishige Scientific Instrument Lab.

ABSTRACT

An operation for the micromanipulation of a fertilized egg and embryo in an early stage of development was attempted using the program control of a personal computer. The micromanipulator employed combines the X axis which is modified to be of the stepping hydraulic type, with the Y and Z axes that are each modified to be of the stepping gear type all of which are driven by pulse motors. The pulse signal that controls these three pulse motors was designed to be controlled by a computer program. As a result, the following were found:

- 1) it is possible to operate in the X-Y plane on a specimen previously suctioned and retained by a retaining pipet. A microtube is inserted into a fertilized egg to obtain the male-pronucleus and the morula is cut using a metallic micro-blade from the side face.
- 2) An unfixed specimen (morula) was able to be divided in half by the use of the up-and-down motion of a glass microneedle in the Z axis.
- 3) Micromanipulation in three dimensions (X-Y-Z axis) was possible, which is very difficult by manual operations.

緒言：ホ乳動物の受精卵へのマイクロインジェクションおよび初期胚の切断分離などの顕微操作は、新しい家畜繁殖の手段としてのポテンシャルティを有している。この様な顕微操作には手動式のマイクロマニピュレーターが用いられているのが現状である。またこの様なマイクロマニピュレーターにより目的を達するためには、マニピュレーターのセッティング並びに操作にかなりの熟練を要するようである。この操作がマイクロコンピューター制御により簡単に行ない得るものであろうか。例えばマイクロマニピュレーターのX・Y・Z軸の動きが電動パルスモーター駆動に置きかえることができるならば、その駆動を汎用パソコンにて制御し得る可能性がある。その得られた制御システムは、受精卵および初期胚の顕微操作に適用し得るものと思われる。我々は、この様なコンピューター制御による受精卵へのマイクロインジェクション、並びに初期胚の切断分離の操作を試みたので報告する。

材料および方法：

1. 受精卵および初期胚の採取

受精卵（前核期）および桑実胚は、ICR系未経産マウス（7-16週齢、体重20-30g）およびWistar系未経産ラット（10-20週齢、体重230-300g）から採取した。マウスには5IU・PMSと5IU・HCGを48時間間隔で腹腔内注射（午後4時）し、HCG投与後C57BL系雄と交配せしめた。HCG投与後16-20時間に前核期受精卵を卵管より、72-76時間に桑実胚を子宮より、採取した。ラットでは腫瘍像が発情前期を示した日の夜ACI系雄と交配せしめ、翌日（腫瘍を確認した日）をday 1として、その日の夜に前核期受精卵を、そしてday 4の午後早くに桑実胚を採取した。

2. マイクロマニピュレーター

使用したマイクロマニピュレーターは、大別して2つの部分から構成されている。すなわちそのひとつ（本体部分）は、市販されているところの、Z軸がパルスモーター駆動のステッピングギア方式の電動マイクロマニピュレーター（成茂科学 ELECTRONIC MICROMANIPULATOR MODEL SM-21）をさらにY軸の動きもパルス信号で駆動するように、パルスモーター、ギアボックスを取り付けたものである。他のひとつは、パルスモーター駆動のステッピング油圧方式のマイクロマニピュレーター（成茂科学 STEPPING HYDRAULIC MICRO-DRIVE MODEL-M0-83）であって、その駆動先端のシリンドラー部を、前記改造電動マイクロマニピュレーターの作動アームに取り付け、X軸方向にも駆動するようにしたものである。これによりX・YおよびZ軸方向の動きがそれぞれ3個のパルスモーターの駆動によって行なわれることになる。なお、Y・Z軸駆動部にはそれぞれ $10^4 \mu\text{m}$ のリミットスイッチが取り付けられている。

3. コンピューター制御によるマイクロマニピュレーションシステム

X・Y・Z軸に取りつけてある3個のパルスモーターの駆動を支配するパルス信号は、汎用マイクロコンピューター（NEC PC 8801）によって制御するようにした。このシステムの構成図をFig. 1に示す。すなわち顕微T.Vカメラからの倒立顕微鏡載物台上の試料（マウス・ラット受精卵および初期胚を直径10cmのプラスチックシャーレの中央部に0.5mlの培養液とともに置き、その上面を25mlの流動パラフィンにて被覆したもの）およびマイクロマニピュレーターに取り付けたマイクロトゥール（微細ガラス針、微細金属刃、注入用微細管など）の像とCPU（コンピューター本体）からの画像信号をスーパーインポーラーによって合成し、それがCRTディスプレイT.Vに映像する。この映像情報にもとづいて作製したコンピュータープログラムに従ってマイクロマニピュレーターのパルスモーターへの駆動信号を制御するシステムを用いた。

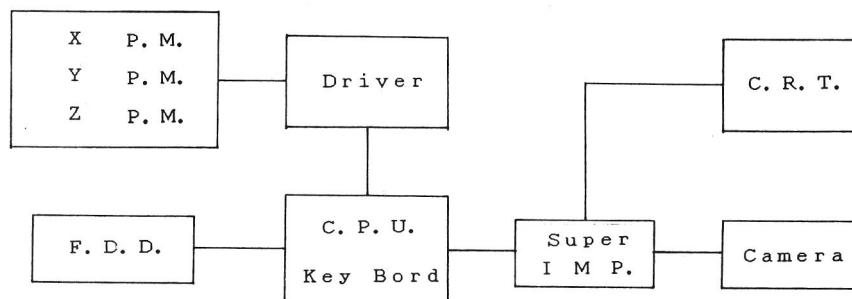


Fig. 1 Micromanipulation System.

4. コンピューター制御による受精卵および初期胚の顕微操作の実施

受精卵の雄性前核への微細ガラス管の挿入並びに桑実胚の微細金属刃、微細ガラス針による切断などのマイクロトゥールの動き自体は、既報^{1, 2, 3, 4)}の手動によるマイクロマニピュレーションに準ずるようにして、これをパーソナルコンピューター制御したものである。

注入および切断のいずれの操作においても、まず最初にディスプレイ T.V 画面の右上端にマイクロトゥールの先端が現われるまで Key 操作を行なう。同時に受精卵および初期胚に対するマイクロトゥール先端部の最終到達点：スーパーインポーラーによる×マークの部位と同一平面上にくるように Key 操作を行なう（すなわち術部とマイクロトゥールの先端の像の焦点を合わせる）。次にこれを出発点とし、以下プログラムに従って、まず目的部位の Y 軸の位置まで移動し、さらに X 軸方向の×マークの中心点を最終目標到達点としてマイクロトゥール先端が移動する。このようにしてそれぞれマイクロインジェクション用の微細ガラス管の挿入、側方からの微細金属刃の切り込みが可能となる。なお処置後のマイクロトゥールの後退運動もプログラムによって制御され操作開始の際の出発点にもどるようとした。微細ガラス針による上方からの切断方法は、まず、微細ガラス針の先端がペトリディッシュの底面から 200~300 μm くらいにもってくるようにプログラムし、次いで 1) 胚の中心点を通る X 軸の延長線上に胚の外側から 200~400 μm 過ぎた位置まで移動せしめ、2) Key 操作により微細ガラス針を下降して胚を固定する。3) さらに Key 操作し微細ガラス針により胚を圧迫し分離圧断した。

処置受精卵および切断分離胚は、マウスでは Whittingham の SCM 液⁵⁾、ラットでは H.E.R. 液⁵⁾（3 cm のプラスチックシャーレの中央部に 0.3 ml の培養液を置きその上面を流動パラフィンにて被覆したもの）中にて、CO₂ 5%，37°C、湿度飽和条件下で培養を行なった。

結果および考察：

1. 受精卵雄性前核への注入操作について

注入用微細ガラス管の挿入・抜去操作においては、一度の連続的な動きでスムーズに注入用微細管の先端が確実に雄性前核の核膜内に到達したもので、その処置卵が抜去後 3 時間の培養の後、正常形態を保持しているものを手術が成功したものと判定した。この挿入操作の際、蛍光物質 (FITC 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PBS) の注入により雄性前核の膨化が認められた。注入したもののうち 3 時間後に正常形態を保持したものは、さらに培養を続け 24 時間後に 2 細胞期胚への発達を調べた。後述するように蛍光顕微鏡による観察も行なった。

雄性前核内への微細ガラス管先端の挿入・抜去操作の成功例と判断されたものは、ラット・マウス受精卵とともに供試 10 例中 9 例であった。蛍光物質の注入後、培養により、ラ

ットでは 5 例中 4 例が、マウスでは 7 例中 3 例が翌日 2 細胞期胚に発達した。なお蛍光物質を注入したものでは、注入直後、並びに 2 細胞期胚に発達した時点で蛍光顕微鏡により観察した結果、前者では、雄性前核内に蛍光物質の存在が、そして後者では、両細胞質へ蛍光物質が分布していることが認められた。

2. 桑実胚の切断操作について

ラット・マウス桑実胚に対する側方（水平方向）からの微細金属刃の切り込みによる切断、並びに上方（垂直方向）からの微細ガラス針による圧迫切断のいずれの操作も円滑に行なうことができた。この側方からの微細金属刃による切断では桑実胚実質が 2 つに分離されても Z.P.（透明帯）の一部（保定用ピベットの吸引部）が切断されず、ブリッジを形成するものもあったが、これらは一応手術が成功したものと判定した。また微細ガラス針による切断（無保定）の際にプロネース処理による Z.P. の脆弱化の不足が原因で微細ガラス針による胚の固定ができなかったものは例数から除外した。上方からの微細ガラス針の移動により胚の切断二分に成功したもの（胚が完全に切断され、ほぼ均等な二片に分離）は、ラットでは 16 例中 13 例、マウスでは 8 例中 5 例であった。側方からの微細金属刃の移動により胚の切断二分に成功したものは、ラットでは 7 例中 5 例、マウスでは 6 例中 5 例であった。切断後分離胚の双方が、正常形態を保持したものは、培養し 18 時間後の発達を調べた。その結果、微細ガラス針による切断で得られた分離胚は、ラットでは 13 組中 11 組、マウスでは 5 組中 4 組が、微細金属刃による切断で得られた分離胚は、ラットでは 5 組中 4 組、マウスでは 5 組中 3 組が、初期～中期胚盤胞に発達した。

本研究で用いたマイクロマニピュレーションシステムでは、挿入操作、切断分離操作は共に高い率で成功するのみならず受精卵および初期胚へのマイクロマニピュレーターのコンピューター制御によるこれらの顕微操作も可能なことを示すものである。また、このマイクロマニピュレーションシステムは、手動では非常に困難な種々の複雑な操作、例えば側面（水平方向）から微細金属刃をもって桑実胚を切断する切り込みの際に、Z軸方向に3~5 μmの上下運動をしながらのX軸方向への移動など、が可能なことが確かめられた。このようなシステムでは、顕微操作の経過がモニター T.V に像映されるのでマイクロマニピュレーションの練習・教育にも有効であると考えられる。

この実験では、最初にマイクロトゥールの先端を顕微鏡の視野に入れるべくコンピューターの Key 操作をもっぱら用いた。これは必ずしも完全なコンピューター制御を意味しないかも知れない。しかしながら先述のごとく、直接マイクロマニピュレーションを行う操作がコンピューター制御を受けている点で意義がある。なお、部分的に手動により行なわれる顕微操作の内、例えば受精卵および初期胚の保定操作は、保定用ビベット内に生ずる陰圧に対するセンサーを組み込ませることによって、このマイクロコンピューター制御も可能であると推定される。現在、試作品によって実験・検討中である。

我々が用いたマイクロマニピュレーターは2つの異なったタイプのマイクロマニピュレーター（歯車式と油圧式）を組み合わせ、改良を加えたものである。従って、いくつかの部分品が 90° または 180° の角度のネジ止めにより固定されている。このためパルスモーター駆動による振動によって、円滑な動きが得られなくなることが考えられる。より安定したパルスモーター駆動によるマイクロマニピュレーションを行なうために、既存の油圧式3次元マイクロマニピュレーターにパルスモーターの組み込みを行ない、現在試験中である。

文献

- 1) 長嶋比呂志・尾川昭三：家畜繁殖誌. 27.12-19.1981.
- 2) Ogawa,S.,K.Miyake,N.Seike and H.Kanagawa.Jpn.J.Anim.Reprod. 29.198-207. 1984.
- 3) Ogawa,S.,A.Mizuno,T.Hirashima and J.Mizuno.Jpn.J.Anim.Reprod. 30.186-193. 1984.
- 4) 尾川昭三・水野仁二：家畜繁殖誌. (印刷中).
- 5) Whittingham,D.J.J.Reprod.Fefrt. (Suppl.) 14.7.1971.
- 6) Ogawa,S.,K.Satoh and H.Hashimoto.Nature.233.422.1971.

ラット前核期卵における核移植法に関する
基礎的研究

The Basic Study on Nuclear Transplantation in Rat Zygote
by HVJ-mediated cell fusion of karyoplast.

舟橋弘晃・内海恭三・湯原正高
Hiroaki FUNAHASHI, Kyozo UTHUMI and Masataka YUHARA

岡山大学農学部家畜繁殖教室

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

We had already reported that the UV-spot irradiation on pronucleus made use of non-surgical enucleation in zygote nuclear transplantation technique. In the present study, the first, we showed that the 1min UV-spot irradiation on pronucleus could inactivate one of rat zygote, which became the non-surgical enucleation technique. the next, we found that purified HVJ as number as 2000 HAu/ml was required for the fusion of a karyoplast and enucleated zygote, according to the injection and fusion technique described by McGrath and Solter.¹⁾ And the last, we examined the developmental ability of these nuclear transplant to be resulted in the cleaved stage.

緒言：近年、マウス前核期卵の雌雄両前核を微量の原形質膜および細胞質とともに (Karyoplast) にとりだし、同様の方法で除核された卵 (Cytoplast) の卵腔中に注入し HVJ を用いて細胞融合させることによって核移植を行う技術が、マウスにおいて確立された。¹⁾ また、我々はラット前核期卵の核を紫外線でスポット照射することによって細胞質に影響を与えることなしに、非外科的に核のみを不活性化することが可能で、それは有効な除核手段となり得るということを既に報告している。²⁾

核移植は、最近、突然変異動物におけるその変異の由来を解明することに多大な成果を提供しただけでなく、今後、核-細胞質間の相互作用、および細胞の分化など解明されねばならない基礎分野に対して、又、クローラン動物作成などの応用分野に対しても、明るい話題を提供しうることが期待されうるものであり、その効率的な方法を模索することは有益なことと思われる。

本研究では、ラット前核期卵の前核へのUV-spot照射の照射量と卵の発育性、karyoplastと受核卵とのHVJによる融合能、さらには、UV-spot照射によって前核を不活性化し、その卵胞腔へ他の卵からとりだしたkaryoplastを注入し、HVJを用いて両者を融合させるという核移植法を検討した。

方法：まず、前核を不活性化するためのUV-spot照射時間と前核期卵の発育性との関係について調べられた。Wistar系雌ラットは精子確認の翌日殺され卵管を灌流することによって前核期卵が採取された。顆粒膜細胞は、0.5%ヒアルロニダーゼによって除去された。採取された卵は、既報の方法に従って雄性前核に対して顕微分光測光装置 (DMS-P-11, オリンパス光学) をもちい、キセノンランプノ253.7nm波長の紫外線の5.3J/m² のスポット照射が行われ、前核への紫外線照射量は照射時間によって変られた。被照射卵は、偽妊娠第1日目雌ラット卵管へ移植後3日目に回収され、卵の発育状態が調べられた。

次に、McGrath & Solterによって報じられた核移植法によるkaryoplastと除核卵のHVJによる融合能が調べられた。採卵、顕微操作、培養などの一連の操作のmediumに、生食血清 (2:1)、Dulbecco's PBS、或いはWhitten Mediumがそれぞれ使用された。核供与卵は、前もってサイトカラシンB処理 (5μl/ml, 40min) された。スライドガラス上に3つの点滴が作られ (第1の点滴はサイトカラシンBを5μl/mlに含むmedium、第2の点滴はβプロピオラクトンで不活性化されたHVJ液、そして第3の点滴はmedium)、それぞれの点滴の間は流動パラフィンによって区切られた。サイトカラシンB処理された核供与卵は第1の点滴に、そしてUV-spot照射された受核卵は第3の点滴に置かれ、すみやかに顕微操作が行われた。まず第1の点滴において、核供与卵から僅かな原形質膜及び細胞質とともに雌雄両前核がピペット中に吸出され、karyoplastが作成された。ついで第2の点滴中にピペットが移され、微量のHVJ液がピペット内に吸引された。最後に第3の点滴中でkaryoplastとHVJ液は受核卵の卵胞腔に注入された。注入を終られた卵は3回洗浄後、流動パラフィン下点滴medium中に戻され、37°C、5%CO₂ in air 培養器中で培養された。これらの卵は、培養開始後60分に融合の有無が観察され、更に翌日までin vitroで培養された。このようにして、融合、発育に必要なHVJの量が検討された。

最後に、得られた核移植卵のその後の発育能がin vivo系で調べられた。受核卵は、雌雄両前核に対して各1分間UV-spot照射が行われ、上述の方法により核移植が行われた。核移植卵は翌日までin vitro培養され、2cellまでの発育が見られたものは、23日令雌ラット卵管に

移植され、3日後に回収されその発育性が調べられた。コントロールとして、cytoplasmが、karyoplastのかわりに注入された卵、及び、雄性前核への1分間UV-spot照射卵の同様の発育性が調べられた。

結果及び考察 実験1：ラット前核期卵の前核への紫外線スポット照射は、5つの実験区(0, 1, 3, 5, 10分照射)において行われた。卵管移植後回収された卵の発育は、Table 1. に示すとおりであった。このことから、5分以上の前核へのUV-spot照射のような高線量の照射は、前核卵を非増殖死させ、3分以下のような低線量の照射は、それらを1-2回の卵割をして増殖死させるということが示され、ラット半数体は発育能を持たないということからも、ラット前核期卵の雄性前核は、1分間のUV-spot照射によって不活性化されているということが示された。

Table 1. In vivo development of embryos after UV-spot irradiation onto male pronucleus for different time.

Irradiated time (min)	No. of exp.	No. of embryos transferred	No. of embryos recovered	Embryos		
				1-cell	2-4cell	morula frag.
0	2	10	5	0	0	5
1	3	13	11	2	6	1
3	3	16	11	7	2	0
5	3	17	7	6	0	0
10	3	19	9	9	0	0

実験2：精製及び濃縮されていないHVJで β -プロピオラクトンで不活性化されたHVJ液とともに注入されたkaryoplastは、生食血清(2:1)液、Dulbecco's PBS、及びWhitten Mediumのいずれのmedium中においても受核卵と凝集はおこすが融合はしなかった。一方、精製及び濃縮(5倍)³⁾、及び β -プロピオラクトンで不活性化されたHVJ(>2000 HAu/ml)とともに注入されたkaryoplastは、Whitten Medium中において37°C 5%CO₂ in air 培養開始後約30分で融合を完了した(Table 2) (図 1, 2, 3,)。また、培養開始60分に観察された時、凝集はしているが融合はしていない卵は、翌日観察された時に融合していたという例は一例もなかった。以上のことから、karyoplastと受核卵の融合については、精製及び濃縮をすることによって効率的に融合したので、HVJ液の濃度及び精製が大きく融合に関係しているということ、つまり、HVJの濃度がある程度以上(>2000 HAu/ml)に精製、濃縮されたとき、karyoplastと受核卵が融合反応を起こし得たということが示された。

Table 2. Efficiency of fusion in the nuclear transplantation technique

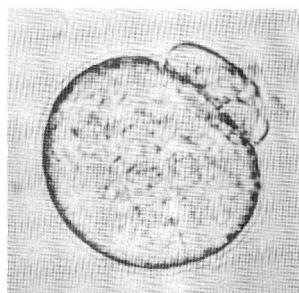
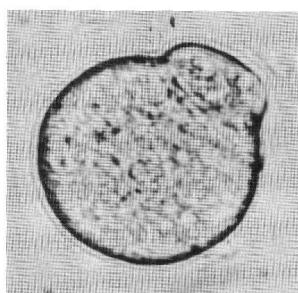
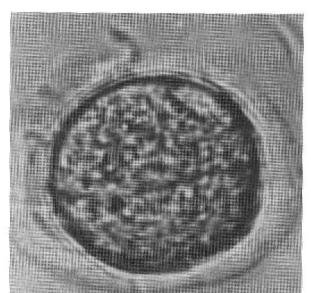
HVJ (HAu /ml)	Medium	No. of exp.	No. of zygote pair	No. of karyoplast	No. of fusion
2000	PSS & Serum	9	67	40	0
2000	Dulbecco's PBS	3	23	2	0
2000	Whitten Medium	5	26	11	0
2000	Whitten Medium	4	26	8	7

Table 3. In vivo development of the nuclear transplanted zygote.

No. of exp.	No. of embryos transferred	Embryo recovered			
		Total	1-cell	2-4cell	8-16cell frag.
N.T.	4	2	0	0	1
control	1	2	1	1	0

N.T. : Nuclear Transplantation

control : Cytoplasm was transplanted.

Fig.1
as soon as
injectedFig.2 at
15min after
injectionFig.3 at
60min after
injection

実験3：回収された卵は、cytoplasmが、karyoplastのかわりに注入された卵は、例数は少ないが、総て1-2回の卵割の後分割を止てしまったり、雄性前核へのUV-spot照射卵の殆どが、同様に1-2回の卵割をして分割死するのに対して、更なる発育を示した (Table 3) これは核移植によって新たな核が注入されたことにより、その核が卵の発育に何らかの寄与をし、卵は更なる発育を示したということが考られる。

以上のように、ラット前核期卵の核の不活性化に両前核への1分間のUV-spot照射が有効であるということ、また、karyoplastと受核卵の融合には、約2000 HAu/ml以上の濃度のHVJが必要であろうこと、さらに、我々の非外科的除核法を用いた核移植法がその技術として有効となりうることが示唆された。

References

- 1) McGrath, J. and Solter, D. : Nuclear Transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. Science, 220, 1300-1302, 1983
- 2) 尾公一、舟橋 弘晃、内海 恭三、湯原 正高: J. Mamm. Ova Res. Vol. 1 No. 1. 85-89 1984 (Japanese)
- 3) 石浦 正寛、岡田 善雄: 感染、炎症、免疫、Vol. 9 (9) 38-50, 1979

染色体検査によるマウス 2 分割胚の性別判定

Sexing of Bisected Mouse Embryos

by Chromosomal Analysis

中川 明・高橋芳幸・金川弘司

Akira NAKAGAWA, Yoshiyuki TAKAHASHI
and Hiroshi KANAGAWA

北海道大学獣医学部家畜臨床繁殖学講座

Department of Veterinary Obstetrics, Faculty of Veterinary
Medicine, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan

Abstract

Different culture length after bisection and length of colcemid treatment were examined to determine the optimum culture condition for sexing of bisected mouse embryos using chromosomal analysis. About 54% of bisected mouse embryos examined were satisfactorily sexed between 15–18 hours of in vitro culture followed by 3 hours of colcemid treatment. After sexing using first halves of the bisected mouse embryos, 36 of the other halves were transferred to 9 recipients. Fourteen fetuses (38.9%) were obtained with expected sex at Day 18 of pregnancy.

緒言：雌雄の生み分け、あるいは胚の性別判定をする方法としては、胚の一部の細胞による染色体検査や H-Y 抗原を利用した免疫学的方法などが研究されている。本実験では、顕微操作により 2 分割したマウス 桑実胚を用いて、染色体検査により性別判定を行う方法について検討した。

方法：PMSG (7.5 IU) および HCG (10 IU) を投与し過剰排卵処理を施した ICR 系成熟雌マウス (8 週齢) から、交配後 HCG 投与から 76 時間 後に採取した桑実胚 (およそ 16 細胞) を供試した。0.5% プロナーゼ液で透明帯除去後、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} free-PBS 中で decompaction 処理を行い、ガラス微細針により胚をほぼ中央部で 2 分割した。Whittingham (1971)¹⁾ のマウス胚培養液を用いて、37°C 5% CO₂、95% 空気の気相下で一定時間体外培養した 2 分割胚は、さらに 0.04 μg/ml のコルセミドを含む培養液中で培養し、

Table II. Effect of length of colcemid treatment on sexing percentage of bisected mouse embryos

Length of * treatment (hrs.)	No. of embryos treated	No. (%) of embryos with metaphases	Mean no. of metaphases **	No. (%) *** of embryos sexed
0	23	3 (13.0) ^a	1.33 ± 0.58	0 (0)
2	48	26 (54.2) ^b	3.00 ± 2.43	17 (35.4) ^d
3	74	57 (77.0) ^c	3.37 ± 2.31	40 (54.1) ^e
4	64	50 (78.1) ^c	3.16 ± 2.15	35 (54.7) ^e
6	24	20 (83.3) ^c	4.50 ± 2.44	14 (58.3)
8	30	24 (80.0) ^c	6.58 ± 3.40	16 (53.3)

*: This treatment was carried out at the rate of 0.04 ug/ml colcemid after 18 hours of culture.

**: The mean was taken only from embryos with metaphases.

***: No. of embryos sexed / No. of embryos treated

a vs b & c ($P < 0.01$), b vs c ($P < 0.05$) and d vs e ($P < 0.05$)

上昇する傾向を示したが、体外培養6時間以上の群では有意な差は認められなかった。分裂指数（中期核板数／核数）は、培養時間0時間の群で最低値11.5%を示したが、3時間以降は15.7～22.8%の間を上下した。15時間および18時間体外培養した群の分裂指数は、0時間の群と比べて有意に高かった（ $P < 0.05$ ）。

実験Ⅱ コルセミド処理時間 (Table II)

コルセミド処理の時間を増加させて、中期核板をもつ胚の平均中期核板数は増加の傾向を示した。しかし、中期核板をもつ胚の割合および性別判定可能な胚の割合は、0、2および3時間の3群では、処理時間を延長するにつれて増加する傾向を示したが、処理時間3時間以上の4群では、それぞれ有意な差は認められなかった。

実験Ⅲ 2分割胚の性別判定と移植

染色体検査により性別判定できた胚は、56.2%（59/105）（♂：♀=33:26）であった。体外培養30時間で正常な胚盤胞に発育した2分割胚は87.6%（92/105）であり、このうち性別が明らかなものは50.5%（53/105）（♂：♀=29:24）であった。

移植は受卵マウス9匹（雄胚移植用5匹、雌胚移植用4匹）に計36個の2分割胚を移植した結果、着床数19（52.8%）、生存胎仔数14（38.9%）であり、染色体検査で判定した胚の性別は、剖検結果と100%一致した。

考察：今実験では、桑実胚を2分割して移植するまでの間に、2分割胚の一方で、染色体検査により性別判定するための最適条件について検討した。

2分割時のマウス桑実胚はおよそ16細胞と細胞数が少ないため、コルセミド処理を施しても、2分割胚1個あたりの中期核板数は少ない。またコルセミド処理時間を長くすると、中期核板数は増加する傾向を示したが、細

染色体検査に供した。胚の染色体標本は美甘 (1977)²⁾ の方法に準じて作製し、核数、中期核板数および染色体数を観察・記録し、Stich と Hsu (1960)³⁾ の方法に従って性別を判定した。

実験 I マウス 2 分割胚 349 個を用いて、コルセミド処理前の体外培養時間の検討を行った。0 ~ 27 時間、3 時間ごとに 10 種類の体外培養時間について培養を行った。各々の群について 3 時間のコルセミド処理を施した。

実験 II 分割胚 263 個を用いて、コルセミド処理時間の検討を行った。供試胚はコルセミド処理前に 18 時間体外培養した。処理時間は 0, 2, 3, 4, 6 および 8 時間の 6 種類について行った。

実験 III 桑実胚 105 個について 2 分割処理を行い、同一胚に由来する 2 分割胚は対にして体外培養を行った。対の一方は、18 時間体外培養後に 3 時間コルセミド処理を行った後、染色体標本を作製し性別判定を行った。対のもう一方は 30 時間体外培養を行い、正常な胚盤胞に発育し、対の一方の染色体検査により性別判定がついた 2 分割胚を移植に供した。偽妊娠 4 日目の受卵マウスの左右子宮角の片方に 2 個ずつ計 4 個、雌雄の性別を揃えて移植した。受卵マウスは妊娠 18 日目に剖検し、着床数、生存胎仔数および性別を観察・記録した。

結果

実験 I コルセミド処理前の体外培養時間 (Table I)

体外培養 0, 3 および 6 時間の 3 群においては中期核板をもつ胚の割合は、培養時間を増加させるにつれて

Table I. Effect of length of culture before colcemid treatment on number of embryos with metaphases and mitotic indices of bisected mouse embryos

Length of culture* (hrs.)	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos with metaphases	Mitotic index** (%)
0	32	12 (37.5) ^a	11.5 ± 18.7 ^d
3	31	15 (48.4)	19.1 ± 26.1
6	30	20 (66.7) ^b	15.7 ± 14.7
9	26	17 (65.4) ^b	16.7 ± 16.9
12	33	22 (66.7) ^b	18.0 ± 20.5
15	26	20 (76.9) ^c	22.6 ± 18.3 ^e
18	74	57 (77.0) ^c	22.8 ± 21.9 ^e
21	38	28 (73.7) ^c	16.7 ± 14.6
24	38	26 (68.4) ^c	17.7 ± 17.8
27	21	16 (76.2) ^c	17.6 ± 14.8

*: Cultured in mouse ova culture medium¹⁾

**: No. of metaphases / Total number of nuclei

a vs b ($P < 0.05$), a vs c ($P < 0.01$) and d vs e ($P < 0.05$)

胞は分裂中期の状態で長時間経過すると、染色体が収縮する傾向がみられ、コルセミド処理を3時間以上行つても、性別判定可能な胚の割合は増加しなかった。

コルセミド処理前の培養0時間の群の分裂指数が最低であったことから、採卵から2分割に至る一連の作業はマウス胚の細胞分裂を一時的に抑制したものと思われる。中期核板をもつ胚の割合および分裂指数を考慮すると、2分割処理後、コルセミド処理前の培養は6時間以上必要であると思われた。

コルセミド処理前の培養時間が3時間以上の各群において、分裂指数が大きな変化を示さなかったことから、マウス桑実胚を構成する割球の細胞周期の相は一致しておらず、その周期相のずれは、割球間および各分割胚の間でほぼ均等に分布していると思われた。

○ 以上の結果から、マウス桑実胚を2分割して染色体検査により性別判定を行うためには、2分割後15~18時間体外培養し、その後3時間のコルセミド処理を行うことにより、2分割胚の性別判定を行うのが適当と考えられた。

文献：

- 1) Whittingham, D.G. (1971) : Culture of mouse ova. J. Reprod. Fert., Suppl. 14, 7-21.
- 2) 美甘(和) (1977) : 哺乳類卵子および未着床胚の染色体観察と分析. 臨床産婦人科, 31, 1137-1141.
- 3) Stich, H.F. & Hsu, T.C. (1960) : Cytological identification of male and female somatic cell in the mouse. Exp. Cell Res., 20, 248-249.

発生速度の差異によるマウス初期胚の
性判別の試み

Different sex ratio of live young after transfer of the fast-
and slow-developing mouse embryos

徳永智之・角田幸生・杉江 信

Tomoyuki TOKUNAGA*, Yukio TSUNODA and Tadashi SUGIE**

農林水産省畜産試験場・宇都宮大学農学部・家畜改良事業団

National Institute of Animal Industry

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

**Livestock Improvement Assoc. Japan Inc.

It is usually observed that the developmental stages of mouse embryos, recovered at definite times after mating vary a great deal. Such variation may be due to three factors as proposed by Gates¹: (1) the time of fertilization, (2) the developmental arrest or cessation, (3) the rates of cleavage of embryos. Gates cultured 2-cell mouse embryos up to blastocyst stage, divided them into fast- and slow-cleaving groups, and then transferred separately to the recipients. He observed that the proportion of live fetuses in fast cleaving embryos was significantly higher than that in slow cleaving embryos. Such difference of viability in fast and slow cleaving embryos was also reported in the rabbit². We report here that the fast-developing mouse embryos had a tendency to develop into male, and the slow-developing embryos to develop into the female.

緒言：交配後一定の時期に回収したマウス胚の発育ステージは一様でないことが一般に観察される。その理由についてGates¹は次の3点を挙げている。すなわち、1) 受精時期の違い、2) 胚の発生が中止又は阻止された場合、3) 胚の分割速度の違いである。同氏は

マウス2細胞期胚を体外で胚盤胞期まで培養し、それらを急速分割胚と遅速分割胚とに分け Recipient に移植したところ、胎児生存率が急速分割胚で有意に高いことを示した²。またこのような違いはウサギでも報告されている。

著者らは予備実験において、マウス8細胞期胚を体外で胚盤胞期まで培養し、発生速度を胞胚腔形成形成の時期によって2群に分け、それらの胚の移植によって得られた産子の性比を調べたところ、発生速度の早い群における性比は71%(15/21)であった。本実験では、同腹のマウス8細胞期胚を培養して胞胚腔形成の時期によって3群に分け、群別にRecipient に移植して、各群における生存胎児の性比が異なるか否か調べた。

方法：実験に供したCD-1系雌マウスは人工照明により明期12時間(8:00-20:00)の下で飼育し、雄1頭に対して雌4頭を同居させ、毎朝膣栓の有無を検査し交配を確認した。

交配した雌マウスを、膣栓を発見した日を1日目として、3日目の午前10時にと殺し、培養液M2を用いて³8細胞期胚を個体ごとに回収した。回収した胚は流動バラフィンで被覆した6X10穴のマイクロプレートの1列目のウェル内で⁴M16を用いて培養した。翌朝から30分間隔で実体顕微鏡で観察し、胞胚腔を形成した胚を2列目以下の各ウェルに順次移した。すべての胚が胞胚腔を形成した後、胞胚腔形成の時期によって早い群、中間群、遅い群の3群に分けた。ついで、これら3群の胚を偽妊娠1日目の卵管、あるいは偽妊娠3日目の子宮に別々に移植し、妊娠19日目にと殺して生存胎児数を調べるとともにその外部生殖器から雌雄を判定した。⁵

結果：実験はDonor 21頭について行い、平均11.8個(9~15個)、総数247個の8細胞期胚を回収して培養に供した。その結果236個(95.5%)の胚が胚盤胞期に達し、これらの胚は胞胚腔形成の早い群83個、遅い群65個、中間群88個に分けられた。各群の胚移植によって得られた胎児の性比は早い群で71%(29/41)であり全体の性比49%(49/100)に比べて有意($P<0.05$)に雄側への偏りを示した。これに対して遅い群では20%(5/25)で有意($P<0.001$)に雌側への偏りを示した。中間群では44%(15/34)で有意な偏りは認められなかった。各群の生存胎児率は早い群で49%(41/83)であり、遅い群38%(26/65)、中間群39%(34/88)に比べて高い傾向を示したが、有意な差ではなかった。以上のように、胚盤胞期に速く到達した胚、すなわち発生速度の早い胚から雄が、遅い胚からは雌が多く生まれる傾向がみられた。

発生速度の差異を利用したマウス胚の性判別

発生速度	移植胚数	産子数 (%)	
		雄性胎児	雌性胎児
急速群	83	29 (71)	12 (29)
中間群	88	15 (44)	19 (56)
遅速群	65	5 (20)	20 (80)
TOTAL	236	49 (49)	51 (51)

考察：本実験の結果から、胚の発生速度の差によって、ある程度雌雄を判別できる可能性が示された。胚を発育ステージの違いによって分け、その胚の移植によって得られた胎児の性比を調べた報告は著者らの知る限りでは Hafez のウサギにおける報告のみである。同氏によればウサギでは胚の分割速度の早い群と遅い群の間に性比の差は認められなかった。しかしながら Hafez は実験に過排卵処理を施したウサギを用いており、その結果自然排卵に比して排卵時間の変動が大きくなっていると考えられる。本実験では、排卵の時間的差の少ないと考えられる自然排卵の同腹胚を用い、発生速度の差異によって選別し、それから生ずる胎児の性別を調べた。その結果、発生速度の早い胚からは雄が多く、遅い胚からは雌が多く生まれる傾向がみられた。この原因は未だ推論の域をでないが、X-精子の運動性などの差による受精時間の違い、あるいは精子の持ち込むゲノムの違いによって卵子の発生速度が異なること等が考えられる。なお、現在同法によって選別したマウス胚の雌雄を染色体分析を用いて判定する実験を行っている。

1. Gates, A.H., in *Preimplantation Stages of Pregnancy* (edit. by Wolstenholme, G.E.W.), 270 (Churchill, London, 1965).
2. Hafez, E.S.E., *Proc. Soc. exp. Biol.*, 110, 142 (1962).
3. Falton, B.P., and Whittingham, D.G., *Nature*, 273, 149 (1978).
4. Whittingham, D.G., *J. Reprod. Fert.*, Suppl. 14, 7 (1971).
5. Tsunoda, Y., Wakasu, M., and Sugie, T., *Jap. J. Zootech. Sci.*, in press.

繁殖障害の治療と 卵子移植のときに!

プロスタグラジンF_{2α}製剤

要指示医薬品

動物用医薬品

パナセラン・F液[®]

共済薬価基準表収載品

〔効能・効果〕

牛：性周期の同調

黄体退行遅延に基づく卵巢疾患の治療

馬：性周期における黄体期の短縮

黄体退行遅延に基づく卵巢疾患の治療

豚：無発情の治療（黄体の退行遅延ないし遺残に基づくもの）

〔用法・用量〕

牛：本品は子宮内注入または筋肉内注射します。

〈子宮内注入法〉……従来通り。

〈注射法〉

性周期の同調及び卵巢疾患の治療には

通常ジノプロストとして12～15mgを1回筋肉内に注射します。

馬：黄体期の短縮及び卵巢疾患の治療には

通常ジノプロストとして3～6mgを1回筋肉内に注射します。

豚：無発情の治療には

通常ジノプロストとして6mgを1回筋肉内に注射します。

〔貯法〕 室温・しゃ光保存

〔包装〕 12mg/6ml×5V・30mg/15ml×5V

○ 詳細は商品添付の説明書をご参照ください。

発売元



第一製薬株式会社

東京都中央区日本橋三丁目14番10号



製造元

富士薬品工業株式会社

富山県高岡市長慶寺530番地

H-Y 抗体によって性判別された山羊、
牛受精卵の受胎例について

Development of Sexed Goat and Cow Embryo by H-Y Antibody

佐藤英介・田 誠・内海恭三・湯原正高・山田雅保*

Eisuke SATOH, Makoto DEN, Kyozo UTSUMI, Masataka YUHARA
and Masayasu YAMADA

岡山大学農学部家畜繁殖学教室・*重井医学研究所

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

We found the fact that rat embryos could be separated immunologically either male or female at the morula stage by rat H-Y antibody. We already found that rat H-Y antibody could classified mouse, rabbit, goat and cow embryos as developed blastocyst(female) and arrested morula (male). This study is designed to examine whether the sexed embryos can be developed into young or not and to estimate the optimal timing of embryo stage for H-Y antibody exposure. The results were as follow;
1. Goat and cow embryos at the morula stage can be classified morphologically as unaffected blastocyst and affected morula by rat H-Y antiserum which was absorbed with both rat and goat or cow female spleen cell.
2. When goat and cow embryos were exposed to H-Y antibody at the compacted morula stage, they could be classified best.
3. Those classified embryos by rat H-Y antibody can be pregnant.

緒言：受精卵の雌雄を分別しようとする試みは、細胞組織学的に性染色体を調べる方法がなされてきた。しかし、近年H-Y抗体による免疫学的方法による分別法が開発されつつある。著者らは、ラットにおいて作製したH-Y抗血清によりラット桑実期胚の約半数が抗体に感作し、胚盤胞期胚への分化が抑制され、抗体除去後に胚盤胞期胚へと発育し約90%が雄となるが、一方、他は抗体の存在に拘らず桑実期胚から胚盤胞期胚へとそのまま発育し約80%が雌となることを明らかにしている。¹⁾

このように精巣決定遺伝子の産物であるH-Y抗原に対する抗体を作製し、着床前胚を免疫学的に分別可能なことが明らかにされたが、マウスにおいても、桑実期胚をマウスH-Y抗体による補体依存性細胞毒性試験、^{2) 3)} 或いは蛍光標識第2抗体を使った間接蛍光試験によって雌雄分別が可能なことが報告され家畜胚での試みもなされている。著者らはさらに、ラットH-Y抗血清のラット胚に対する形態学的な分別能が、マウス、兔および山羊、牛胚に対しても、吸収操作を行うことにより同様に形態学的に2種に分別する能力があることを示した。^{4) 5) 6)}

本研究では、このラットH-Y抗血清によって山羊、牛胚が、マウス、兔胚と同様に分別し、分別能の *in vitro* 発育性と、その胚の移植後の発育性が検討された。

方法：Wistar系或いはDA系ラットの新生児精巣をホモジネイトし同系雌ラットの腹腔内へ週1回6週連続注射し、ブースターの1週間後に採血した血清を抗血清とした。PMSG或いはFSHとPGF2 μ によって過排卵処理されてえられた山羊5日目胚、牛6日目胚が実験に供された。これらの胚は、ラットH-Y抗血清のヤーグロブリン分画あるいは熱不活化(56°C, 30min)後、山羊あるいは牛雌臍で吸収されたラットH-Y抗血清のヤーグロブリン分画を含んだ20%仔牛血清加m-KRB培養液中で5%CO₂ in air の条件下でドロッププレット培養された。さらに、抗体へのさらし時の最適胚発育段階をきめるため、それぞれの胚を8cell, 16cell-後期桑実期胚、compactionがかなり進んだ桑実期胚の段階で抗体を含む培養液で培養し、その分別発育性を調べた。

結果と考察：マウス、兔の場合と同様に山羊、牛の桑実期胚は、未処理ラットH-Y抗血清では、すべての胚が発育を阻害され退行した。しかし、それぞれの動物の雌臍で吸収したヤーグロブリン分画での培養では、ラット胚の場合と同様に、桑実期胚の胞胚化を抑制されるものとそうでないものに約半数ずつに分別された(表-1)。それゆえに、ラットH-Y抗体は、マウス、兔胚のみならず山羊、牛胚に対しても同様に作用することが示唆された。マウス、兔胚の場合、分別された胚のうち抗体の感作を受け胞胚化を抑制された桑実期胚をTarkowskīの風乾法によって染色体を検索し、Y染色体が確認された。山羊、牛胚の分別された胚の1部が移植され妊娠継続中である。胎児の雌雄はまだ確認されてないが、家畜の雌雄の生み分けにラットH-Y抗体の使用が可能であることが示唆された。各ステージの胚の抗体中の培養の結果は、表-2に示す。ラット胚の場合は、16cell-後期桑実期胚において5-6時間の抗体中の培養で胚を分別した。山羊、牛胚の場合8cellおよび16cell-後期桑実期胚では、胚を分別し得たが、培養時間が24時間以上になり、しかも8cell期胚においては、抑制された胚が抗体除去後、発育せず退行した。compactionがかなり進行した桑実期胚では、ラット胚は、抗体中でも2-3時間で、すべて卵巣胞期胚へ

Table-1. Development of goat and cow morula exposed to rat H-Yantibody

species	treatment of exp.	No. of eggs	Development after expose.		blastocyst(%)	/ morula(%)
			No. blastocyst	No. morula		
goat	A	1	1	0	1	0/100
	B	8	14	6	8	42.9/57.1
cow	A	1	2	0	2	0/100
	C	9	56	21	35	37.5/62.5

A)globulin fraction of H-Y antiserum

B)globulin fraction of H-Y antiserum which was heat-inactivated and absorbed with rat and goat female spleen

C)globulin fraction of H-Y antiserum which was heat-inactivated and absorbed with rat and cow female spleen

Table-2. Blsatulation of rat,goat and cow embryos exposed to H-Yantibody

stage	species	No. exp. eggs	Development after expose.		No. recover. embryos (blastocyst)
			No. blastocyst	No. morula	
8cell	rat	5	42	11(26.2)	31(73.8)
	goat	1	1	0(0)	1(100)
	cow	1	1	0(0)	1(100)
16cell	rat	50	433	248(57.5)	185(42.7)
	goat	2	10	4(40)	6(60)
	cow	3	21	7(33.3)	14(66.6)
32cell	rat	5	28	28(100)	0(0)
	goat	3	4	2(50)	2(50)
	cow	5	35	13(37.1)	22(62.9)
compac.	rat	5	28	28(100)	0(0)
	goat	3	4	2(50)	2(50)
	cow	5	35	13(37.1)	22(62.9)
morula	rat	5	28	28(100)	0(0)
	goat	3	4	2(50)	2(50)
	cow	5	35	13(37.1)	22(62.9)

と発育し、胚を分別しえないが、山羊、牛胚は、6-10時間で胚を約半数ずつ胚盤胞期胚と桑実期胚とに分別しえた。このように山羊、牛胚では、ラット胚の場合と違いcompactionが進んだ桑実期胚の段階が最適な処理時期であることが示された。これは、in vitroでの発育の速さが、ラットでは速いが、山羊、牛胚では遅いことにも関連しているようにおもえるが、ラット胚よりさらに発育の速いマウスや兔胚においてもcompactionの進んだ桑実期胚で胚を2分できることから、in vitroでの胚の発育の速さと分別最適段階とは関係のないことと考られた。抗体を採取した動物と異なる動物の胚においてこのことが観察されるので、抗体の異種動物に対する何らかの作用が存在するものと考られる。現在、作製したラットH-Yモノクロー

ナル抗体を用いて、これら雌雄判別の機構の解析を試みている。更に、それによる異種動物、特に山羊、牛胚の雌雄判別能を検索中である。

なお研究遂行にあたり協力をいただいた各県畜産試験場、米国テキサス大学Richardson博士、Granada Genetics社、およびEmtrans社に謝意を表します。

「主要文献

- 1) 内海 恭三, 秋山 靖, 湯原 正高 : 第22回卵子談話会, 講演要旨, 1981
- 2) White, K. L., Linder, G. M., Anderson, G. B. and BonDurant, R. H. : Theriogenology, 18(6), 655-662, 1982
- 3) Shelton, J. A. and Goldberg, E. H. : Transplantation, 37(1), 7-8, 1984
- 4) White, K. L., Linder, G. M., Anderson, G. B. and BonDurant, R. H. : Theriogenology, 19(5), 701-707, 1983
- 5) 佐藤 英介, 内海 恭三, 湯原 正高 : 第74回日本畜産学会, 講演要旨, 1983
- 6) Utsumi, K., Satoh, E. and Yuhara, M. : Proc. of 2nd Intern. Cong. of Reproductive Immunology, Suppl. 59, 1983
- 7) Tarkowski, A. K. : Cytogenetics, 5, 394-400, 1966

ヒツジの切断二分離胚移植による受胎例

Viabilities of bisected hatched blastocyst in sheep

吉羽宣明・大竹通男・塩谷康生*

Nobuaki YOSHIBA, Michio OHTAKE and Yasuo SHIOYA*

埼玉県畜産試験場・*農水省畜産試験場

Saitama Prefectural Livestock Experiment Station. * National Institute
of Animal Industry.

The viabilities of bisected hatched blastocysts in sheep were examined by transferring them to recipients. Embryos were collected surgically on day 7 (onset of estrus : day 0) from a superovulated ewe. Hatched blastocysts were bisected using a micro-blade made from a razor. Four embryos were successfully bisected into 4 pairs of identical half embryos.

These embryos were then transported from National Institute of Animal Industry to Saitama Prefectural Livestock Experimental Station and transferred to recipient ewes immediately or after frozen storage.

Two pairs of fresh half embryos were transferred to 2 recipients and both of them were diagnosed pregnant at day 60 by ultrasonic methods. A pair of frozen thawed half embryos were transferred to a recipient but she returned to estrus.

総論：哺乳動物の初期胚を顕微的に分離する技術は、優良個体の複製すなわち種々の試験に貴重な研究材料となる—卵性多胎仔の生産を可能とし、また、染色体検査による胚の雌雄鑑別技術に応用できる。ヒツジ胚については既に2~8 cellを二分離または四分離して移植後に—卵性の双仔や四生仔が生産されたことが報告されている。^{1,2)}しかし、この手法はcompaction以前の桑実胚を用い複雑な技術を要するものである。最近、より簡便な方法によりヒツジの胚盤胞から—卵性双仔の作出例が報告された。今回我々はカミソリの

刃で作製したナイフを用い、ヒツジのhatched blastocystを簡易な手法で切断二分離し、移植して受胎例を得たので報告する。

方法：農水省畜産試験場で飼養しているヒツジ（雑種）に過排卵誘起のためにFSH（アントリン、デンカ製薬K.K.）を朝夕2回3.5日間にわたり総量17.5AUを分割して筋肉内に注射した。6回目と7回目のFSH注射時にPGF2 α アナログ（ONO-1052、小野薬品工業K.K.）200 μ gを筋肉内に注射した。発情発見時及び発情発現中12時間間隔で自然交配した。胚の回収は7日目（発情発現日：0日）に開腹し、子宮角を下向性に灌流して行った。灌流液にはDulbecco's PBSに牛血清アルブミンを1mg/ml、ペニシリン200単位/ml、ストレプトマイシン200mcg/mlを添加したものを用いた。採取した胚のうちhatched blastocystをパラフィンオイル下の10%牛胎児血清加Ham-F10のドロップに入れ、切断に供した。

カミソリの刃（フェザーS両刃、フェザー安全剃刀K.K.）を小さく折って接着剤（アロンアルファー、東亜合成化学）でガラス毛細管の先端につけ、切断用のナイフを作製した。これをマイクロマニピュレーター（成茂製作所製）に装着した。切断二分離の方法は、まず胚を内部細胞塊がナイフの先端の方に来るような向きにし、ナイフを下げ胚に近づけた。そして胚が二等分されるような胚の部位にナイフを軽く当て、胚を数秒間圧定した後さらにナイフを下げシャーレの底面に押しつけて切断した。完全に分離できなかった場合は、分離されるまでナイフを下げたまま水平に引いた。切断二分離した胚の一組は牛の卵胞内卵子から得た空の透明帯に注入した。その際には外径約125 μ の注入針を用いた。残る3組は注入操作を行わなかった。これらの胚は各組毎にそれぞれ10%牛胎児血清加Ham-F10とともに試験管に入れ、試験管を輸送者の体に密着させた状態で、約2時間半を要して埼玉県畜産試験場に輸送し、受卵ヒツジ（コリデール種）に移植した。移植は切断胚1組ずつを受卵ヒツジの子宮角内に同時に移植した。

当日に移植できなかった2組の胚は、Bilton⁴⁾の方法に準じて凍結保存し、融解後同様の方法で移植した。妊娠診断は超音波断層撮影装置および超音波ドップラー式妊娠診断器により移植後40～60日目に行った。

結果：4個のhatched blastocystを切断二分離し、4組の切断二分離胚を作製した。これらの胚は輸送後鏡検したところ、すべて胚盤胞腔を再形成し、内部細胞塊を有していた。空の透明帯に入れた切断二分離胚1組と、透明帯のない切断二分離胚1組を2頭の

受卵ヒツジに移植した結果、2頭とも受胎していることが確認された。同一角に移植したため現時点では双胎であるか否かは不明である。凍結保存した2組の二分離胚のうち1組を融解後培養し、正常な形態に回復したことを確認後、移植したが不受胎であった。

Table 1. Transfer results of pairs of bisected embryos

No. of recipient*	Synchronization of recipient (day)	Zona pellucida present (+) or absent (-)	Transfer result***
1	-2	+	pregnant
2	0	-	pregnant
3 **	0	-	non-pregnant

*: A pair of bisected embryos was transferred to each recipient.

**: Frozen-thawed embryos.

***: Diagnosed on day 60 by ultrasonic methods.

考察: 発育ステージが進み compaction した後の胚は、細胞間の結合が強く分離するのが困難になる。我々は胚盤胞をガラス針で二分離しようと試みたが、いわゆる cellular bridge ができてしまうことが多く、これを切断しようとして胚の損傷を大きくしてしまうことを経験した。また hatched blastocyst は球型でなくガラス針による切断は困難であった。そこで今回カミソリの刃を用い胚を切断二分離したが、cellular bridge ができることもなく簡単に切断二分離することができた。このカミソリの刃は道具の作製も容易であるので応用性が高いと考えられる。この方法は胚を保定期間もなく Willadsen & Godka³⁾ のガラス針で胚盤胞を切断する方法よりも簡易であった。

顕微操作に hatched blastocyst を用いた場合、切断後 3 時間後には内部細胞塊と胚盤胞腔が再形成され、切断の良否が簡単に判定できた。その点でこの時期の胚は顕微操作に適していると考えられる。

透明帯に再注入しないままの切断二分離胚で受胎例が得られたことは、この時期の胚は実質的に透明帯が必要でないことを意味している。そしてこのような切断二分離胚よりヒツジの双仔が得られている³⁾。これらのことから、胚を切断するだけならば顕微操作器具なしでも不可能ではないので、ウシ胚盤胞などを簡単に切断二分離して利用できる可能性も

あると考えられる。

凍結保存した切断二分離胚を移植しても受胎しなかったが、融解後の培養では正常な形態に戻ったことから、正常な胚と同様に凍結融解ができるものと考えられた。しかしこの点に関して更に追究が必要であろう。

なお今回の試験では胚の回収から移植まで約8時間要したが受胎性は損なわれなかつた。このことは胚の輸送は比較的容易であることを示しており、試験場間の協力などに重要な示唆となっている。

主要文献

1. WILLADSEN,S.M.: A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature*,227,298-330,1979.
2. WILLADSEN,S.M.: The developmental capacity of blastomeres from 4- and 8-cell sheep embryos. *J.Embryol.exp.Morph.*,65,165-172,1981.
3. WILLADSEN,S.M. & GODKA,R.A.:A simple procedure of identical sheep twins. *Vet.Rec.*, 114,240-243,1984.
4. BILTON,R.J.:Preservation of embryos of the large domestic species. 9th Int.Cong.Anim.Repro.A.I., Madrid,2,245-253,1980.

切断二分離した胚盤胞からの子牛生産

Calf Production from Micromanipulated "Half" Blastocyst.

塩谷康生・花田 章・小林 仁*

Yasuo SHIOYA, Akira HANADA and Jin KOBAYASHI *

農水省畜産試験場 *東北大学農学部

National Institute of Animal Industry, *Faculty of Agriculture,
Tohoku University.

Holstein heifers were superovulated with follicle stimulating hormone administered twice daily by intermuscular injection. Embryos were non-surgically collected on day 7 post estrus. Eight blastocysts were selected for micromanipulation.

While the embryos were in holding medium, Ham-F10 supplemented with 10% bovine fetal serum, a fine glass needle was pressed down to bisect the whole embryo on a vertical plane. Six pairs of identical halves and two halves were injected into bovine empty zonae. They were placed in 0.25ml French straws with fresh holding medium and non-surgically transferred into the uterine horn of 8 recipient females, ipsilateral to the corpus luteum.

Just one pregnant recipient was obtained and a female calf was normally born, weighing 36 Kg.

著者言：二～数個に分離された哺乳動物の初期胚はそれが個体に発育する能力を有していることが明らかにされており、初期胚を二～八分割することによって、一卵性のヒツジの双仔、四生仔、ウシの双仔、三生仔、ブタおよびウマの双仔が得られている^{1,2)}。更にヤギの双仔や³⁾ヒツジの五生仔⁴⁾の生産も報告されている。これらの一卵性多胎仔の作出はCompaction前の2～8割球期の桑実胚を分離することによって行われている。このような一卵性多胎仔は家畜のいろいろな研究に役立つものと期待される。しかしこの方法は初期胚の体外培養技術の不十分さのために一時的に仮の雌の卵管内で培養することを必要とする。

一方これらの時期以降の発育の進んだ桑実胚や胚盤胞を二つに切断して直ちに受卵雌に移植すること

によって一卵性の双仔がウシ^{5,6,7)} やヒツジ⁸⁾ で得られている。この方法は現在のウシの非手術的採卵・移植技術と合致しており応用性が高く、商業的な胚移植に用いられている。⁹⁾ そして同様なことが雪印乳業受精卵移植研究所や農水省日高種畜場でも試みられ、産仔の生産が報道されている。

本実験ではウシの7日齢の胚盤胞を切断二分した後、非手術的に受卵牛に移植して分娩例を得たので、1例ではあるがあえて報告する。

方法：過排卵誘起のためにホルスタイン未経産牛に36 mg のFSH（アントリン、デンカ製薬K.K.）を4日間にわたり減少させながら投与した。FSH投与第3日目にプロスタグランジンF2 α アナロゲ（ONO 1052、小野薬品工業株式会社）を600 μ g ずつ朝と夕に投与した。発情の日の午後と翌日午前に液状精液を人工授精した。

胚の回収は7日目（発情日=0日）に入用尿道カテーテルを用い非手術的に行った。子宮の洗浄にはぶどう糖、ピルビン酸ナトリウムを加えたDulbecco's P B S 1 Lに20ccの牛血清を加えたものを使用した。切断には良好な胚盤胞に発育しているものだけを使用した。

胚はパラフィンオイル下の10%牛胎児血清加Ham-F10に移し、顕微操作に供した。倒立顕微鏡に組み合わせた球面式油圧マイクロマニピュレーター（成茂製作所、M0 102、R, L）を用い胚の切断、注入を行った。胚を切断する針、内容空の透明帯を保定する保定用針および切断胚を透明帯に注入する注入針の3種の微細器具は直径1mmのガラス毛細管（成茂製作所）から微小電極製作器（成茂製作所）を使用して作成した。切断針は既報¹⁰⁾のとおりで、保定針は先端の開口部を直径20~30 μ 以下に溶融した。注入針は先端の外径を約70~90 μ のものを使用した。これらの器具の作成にはマイクロフォージ（成茂製作所）を用いた。

内容空の透明帯は卵胞卵や未受精卵を先端を細くしたバストールピペットで吸引、排出することによって得、あるいは脱出した透明帯を用いた。まず胚盤胞を切断針で圧して二分した後、内容空の透明帯を保定用針に吸引固定し、一方注入針に切断胚を吸引し、透明帯の中に注入した。透明帯の保定にはインジェクター（成茂製作所 IM 4B）を、胚の吸引、注入には油圧マイクロマニピュレーター（成茂製作所 M0-8）とマイクロシリンジ（Hamilton 500 μ l、ガスタイル1750 LT）を組み合わせて用了。

注入胚は新鮮な培養液で洗浄後0.25mlストローに入れカスーの移植器でホルスタイン種の未経産である受卵牛の黄体側の子宮角に1あるいは2個ずつ移植した。

結果 : 8個の胚を切断して15個の二分胚を得た。そのうち内容空の透明帯に注入したものは14個で6組の一卵性の二分胚と2個の二分胚を得た。これらを供卵牛より1日早く発情した牛1頭、完全に同調した牛3頭、1日遅れて発情した牛4頭の計8頭に移植した。受胎例は発情の同調した牛に1組の二分胚を移植した1頭のみであった。移植後275日目に分娩したが、産仔は雌1頭（生時体重36Kg）であった。現在（1985年2月）順調に発育している。

考察 : 胚盤胞はガラス針でそのまま比較的容易に切断できた。この点については透明帯の軟化を必要とする桑実胚とはことなった。

今回非手術的に採取した胚盤胞を二分したものから1例であるが出産例がえられた。この方法による子牛の生産はすでにいくつか報告されている。Ozil et al.⁵⁾は5本の微細針を使用し、Williams et al.⁶⁾は金属製のナイフを使用している。本報は3本の微細針で行う簡便なものである。Lambeth et al.⁷⁾は同様に3本の針で一卵性の双仔を作出している。胚の生存性を損なはなければ装置や道具は簡便なもののが望ましいのでさらにこの点の追究が必要である。

顕微操作に適した胚の段階であるが桑実胚⁶⁾あるいは胞胚形成の始まった胚⁵⁾のみを使用して高率の一卵性双仔が生産されている。一方Williams et al.⁶⁾は5~7日齢の胚を多数使用して二分胚の生存性を検討して7~7.5日齢の胚が好ましいとしている。今回使用した胚は完全に胚盤胞腔が明瞭なものであった。著者らは6日齢の桑実胚は二分割した後体外でよく発育するが、その後移植しても産仔への発育は得られなかたことを経験している。6日齢の胚は切断後直ぐに移植しても受胎率がよくなかったことが報告⁶⁾されている。これらのことから7日齢の胚盤胞は桑実胚よりは好ましいと考えられる。

更に脱出した胚盤胞を切断したものから一卵性の双仔のヒツジの生産も報告⁸⁾されており、顕微操作の時期や方法にはまだ未解決の問題が多い。今回の例でも受胎率が低かったこと、一卵性双仔が得られなかたことなどさらに解決することが多く残された。非手術的採卵や移植に対応した効率的な一卵性双胎仔の生産技術確立のために、より多くの研究が望まれる。

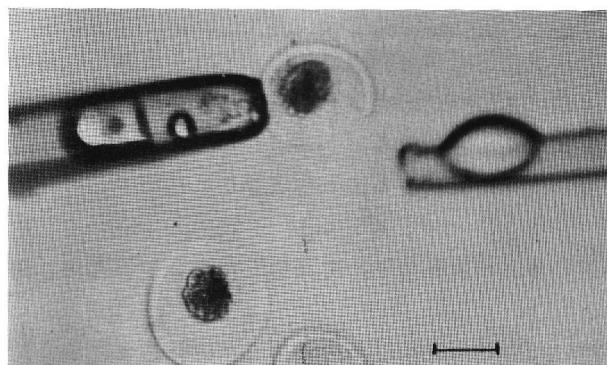
主要文献

- 1) Willadsen, S.M. : Nature, 277, p.298-299. 1979.
- 2) Willadsen, S.M. : In Mammalian Egg Transfer. Ed. C.E. Adams. p.185-210, 1982.

- 3)角田幸生・安井 司・杉江 信: 日畜会報 55, p.643-647, 1984.
- 4)Willadsen, S.M. & C.B. Fehilly.: In Fertilization of the human egg in vitro. Ed. H.M. Beier & H.R. Linder. p.353-357, 1983.
- 5)Ozil, J.P., Y. Heyman & J.P. Renard.: Vet. Rec., 110, p.126-127, 1982.
- 6)Williams, T.J., R.P. Elsden and G.E. Seidel Jr.: Therio. 21, p.276, 1984.
- 7)Lambeth V.A., C.R. Looney, S.A. Voelkel, D.A. Jackson, K.J. Hill and R.A. Godke.: Therio. 20, p.85-95, 1983.
- 8)Willadsen, S.M. and R.A. Godke.: Vet. Rec. 114, p.240-243, 1984.
- 9)Baker, R.D. & B.F. Shea.: Therio. 23, p.3-12, 1985.
- 10)塩谷康生・花田 章: 家畜繁殖誌 29, p.71-73, 1983.

切断二分離後透明帯に注入した牛胚

(黒線は長さ100 μ)



哺乳動物卵子研究会会則 (昭和59年4月5日制定)

- 第1条 本会は哺乳動物卵子研究会と称する。
- 第2条 本会の事務局は会長もしくは幹事のもとにおく。
- 第3条 本会は哺乳動物の卵子に関する研究およびその成果の応用促進や会員相互の連絡を図ることを主な目的とする。
- 第4条 この目的を達成するために次の事業をおこなう。
- 1) 研究発表会の開催
 - 2) 機関誌『哺乳動物卵子研究会誌』の発行
 - 3) 研究に関する情報の交換
 - 4) その他本会の目的達成に必要な事項
- 第5条 本会は哺乳動物の卵子に関する研究に実際に従事しているものおよび本会の主旨に添うものをもって組織する。
- 第6条 本会に入会しようとする者は、会員の推薦を得て事務局に申し込むものとする。
幹事会は前記申し込みに対して可否を決定する。
なお、入会に際しては入会費を納入するものとする。
- 第7条 会員は下記事項に該当する時は会員たる資格を失う。
- 1) 本人の意志による退会。
 - 2) 会費未納の場合。
 - 3) 会員として不適当と幹事会が認め総会がこれを承認した場合。
なお、第1項により退会しようとする時は幹事会に届け出るものとする。
- 第8条 本会に賛助会員をおくことができる。
賛助会員は本会の主旨に賛同する法人およびこれに準ずるもので幹事会が認めるもの。
- 第9条 名誉会員は、本会に多大の貢献のあった会員で幹事会で推薦され総会の賛同によって定められる。
- 第10条 年会費は総会においてこれを定め、その徴集方法は幹事会において決定する。
- 第11条 本会には、役員として会長および幹事若干名をおき役員の任期は3年とする。
ただし重任は妨げない。
- 第12条 幹事の選出は会員からの推薦により選出し、会長は幹事の互選によって選出する。
幹事および会長の承認は総会の議を経るものとする。
- 第13条 会長と幹事は幹事会を組織して会務を審議するとともに会の運営にあたらなければならない。
- 第14条 毎年1回総会を開催し事業に関する協議を行なうものとする。ただし、会長が必要を認めた時は臨時に総会を開催することができる。
- 第15条 本会の会務は毎年4月に始まり翌年3月に終了する。
- 第16条 本会の会則の変更は幹事会の決議を経て総会の承認も得なければならない。

事務局 神奈川県藤沢市亀井野1866

日本大学農獣医学部獣医生理学研究室内哺乳動物卵子研究会

編 集 後 記

昨年の4月に哺乳動物卵子研究会誌の第1巻第1号を発刊して以来、早いもので1年が経過し、第2巻第1号をお届けすることとなりました。会誌の発刊に関しましては、年2回(4月、10月)を目標に努力を重ねておらず、第1号は研究会の講演抄録を掲載し、第2号には会員からの投稿論文を掲載したいと考えております。第2巻第1号には、毛利教授の特別講演の要旨と、一般講演29題の抄録を掲載いたしました。この号には、卵子に関する多方面の研究が掲載されておりますのでご一読下さい。

(遠藤克)

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

第2巻 第1号 Vo 1.2 No. 1

昭和60年3月25日 印刷

昭和60年4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
Tel 0466-81-6241(内332)
郵便振替 横浜 8-20350

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

日本薬局方 注射用胎盤性性腺刺激ホルモン

動物
専用

ブベローゲン®

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

ビーメックス®

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

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.) 溶液液付



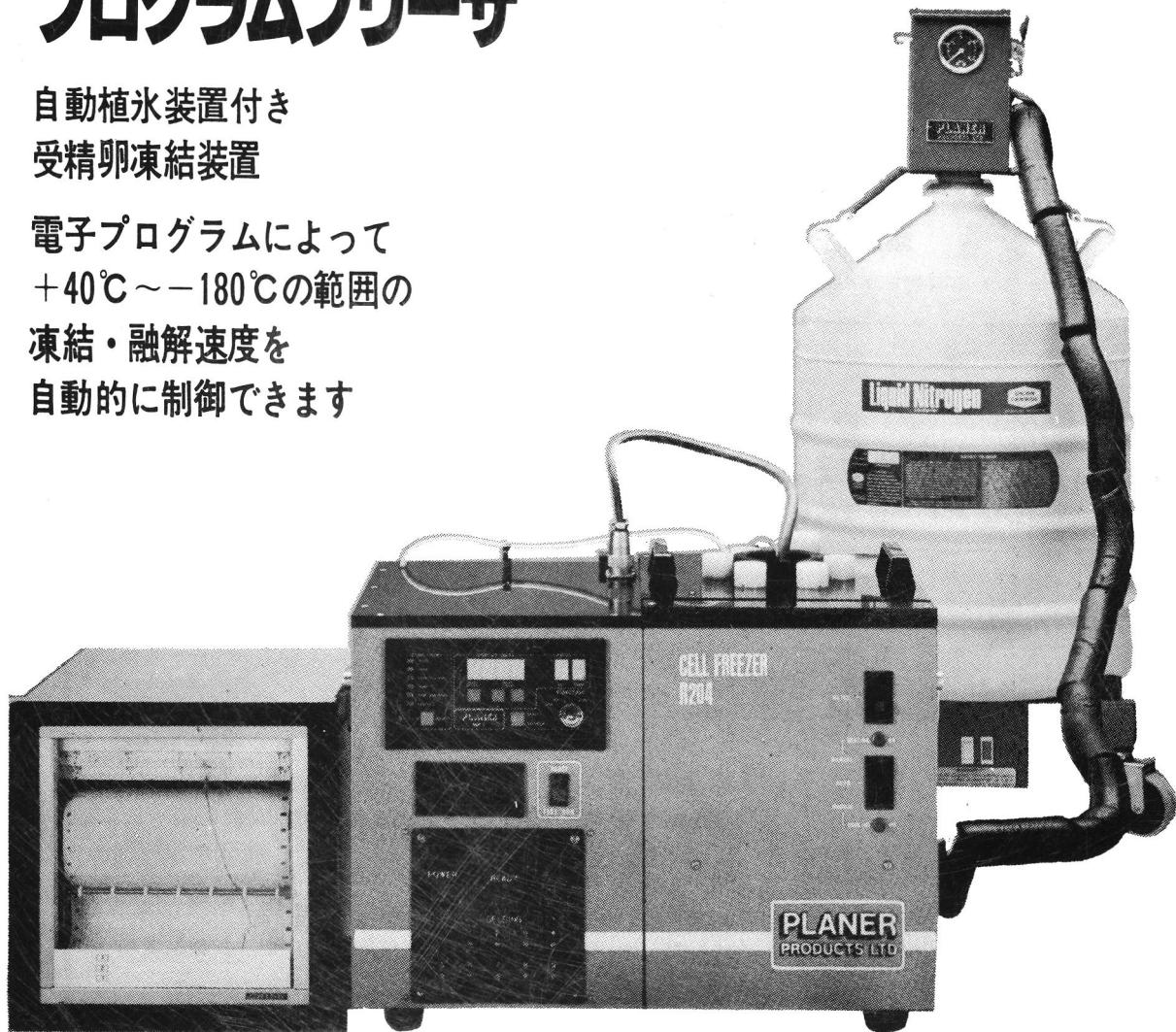
テンカ製薬株式会社
(旧東芝製薬株式会社)

神奈川県川崎市川崎区中瀬3-19-11
☎(044)288-1391(代) 〒210

PLANER CELL FREEZER R204 プログラムフリーザ

自動植氷装置付き
受精卵凍結装置

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



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

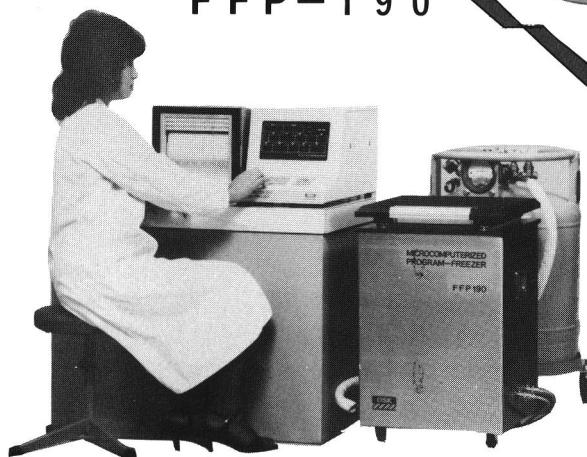
輸入 朝日ライフサイエンス株式会社
〒102 東京都千代田区二番町9番地3
電話(03)265-5031(代)

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)

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
F F P - 1 9 0



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)
電話 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
丸亀営業所 丸亀市西平山町128番地
(研虎ビル内)
電話 丸亀(0877)23-1371~2 〒763



受精卵・精子の保存に
ダリック
D A L I C

〔実用新案出願中〕

製造元

OSK **大阪酸素工業株式会社**

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

東大星