

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.2
October 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。
また便性もさらに母乳栄養児に近づきました。
●ビタミンKについても増強しました。
また便性もさらに母乳栄養児に近づきました。

●ビフィズス菌が増えやすく母乳栄養児の腸内
菌叢に更に近づきました。
●ビフィズス菌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。



●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。



森永乳業

森永 BF-T ドライミルク

第27回 哺乳動物卵子研究会のお知らせ

哺乳動物卵子研究会

会長 佐久間 勇 次

第27回 哺乳動物卵子研究会

下記により第27回哺乳動物卵子研究会および総会を開催いたします。多数の会員の
ご参加をお願いいたします。

・日 時：昭和61年4月2日（水） 9:00より

・場 所：日本大学会館 大講堂

東京都千代田区九段南4-8-24

TEL 03-262-2271

・一般講演：前回の大会と同様に講演内容をオフセット印刷し、哺乳動物卵子研究会誌
第3巻 第1号に講演要旨として掲載いたします。各演題は2ページにお
まとめいただきます。

発表時間は1題につき10分、討論5分を予定します。

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

・演題申込：締切 昭和60年1月15日必着

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

講演原稿の〆切は昭和60年2月15日（厳守）とさせていただきます。

〒252 神奈川県藤沢市亀井野1866

日本大学農獣医学部獣医生理学教室

遠 藤 克 宛

TEL 0466-81-6241 内332

哺乳動物卵子研究会誌

第2卷 第2号

昭和60年10月

目 次

総 説

X精子Y精子	毛利秀雄	98
--------	------	----

原 著

種特異ブタ透明帯抗原に対する単一クローニング抗体 (B11C8) の性状分析と抗体による受精阻害実験 香山浩二, 長谷川昭子, 繁田 実, 磯島晋三, 永井 卓, 角田幸生	107
---	-----

下垂体抽出液投与によるラットの過排卵誘起と初期胚発生の観察 高橋寿太郎, 伊藤 敦, 安田泰久	115
--	-----

キメララットの作出 亀山賢次, 菅原七郎, 小島 勝, 正木淳二	123
-------------------------------------	-----

ゴールデンハムスター8細胞期胚の体外発育に及ぼすEDTAの影響 石島芳郎, 小野寺政一, 加賀谷明子	129
---	-----

マウス・ラット異種間反復移植血清がマウス胚盤胞の着床におよぼす影響について 辻井弘忠, 伊藤 伸	133
---	-----

卵巣灌流法の手技と成績 北井啓勝, 大庭三紀子, 鈴木秋悦, 飯塚理八	137
--	-----

修正タイロード溶液中で受精能獲得した射出精子によるウサギ卵子の体外受精について(英文) 佐藤嘉兵, 鈴木淑恵	149
---	-----

体外受精における非受精卵の走査型電子顕微鏡による観察 井上正人, 小林善宗, 本田育子, 淡路英雄, 金子みつ恵, 藤井明和	157
---	-----

Contents

Review

- X-sperm and Y-sperm. MOHRI, H. 9 8

Originals

- Characterization of the Monoclonal Antibody (B11C8) to a Species-specific Antigen of porcine Zona pellucida and blocking Experiments of Fertilization by the Antibody. KOYAMA, K., A. HASEGAWA, M. SHIGETA, S. ISOJIMA, T. NAGAI and Y. TSUNODA 10 7

- Observation of Early Development of Fertilized Ova Superovulated by pituitary Extract Injection in Rat.

- TAKAHASHI, J., A. ITOH and Y. YASUDA 11 5

Chimaera Rats from Aggregated Embryo

- KAMEYAMA, K., S. SUGAWARA, M. KOJIMA and J. MASAKI 12 3

- Effect of EDTA on Development of 8-cell Golden Hamster Embryos in Vitro. ISHIJIMA, Y., M. ONODERA and T. KAGATANI 12 9

- Effect of Rat Serum Collected with Transfers of Mouse Eggs into Rat Uterus Repeated on the Implantation of Mouse Blastocysts.

- TSUJII, H. and S. ITO 13 3

- Procedure and Results of in Vitro perfusion of the Rabbit Ovary.

- KITAI, H., M. OHBA, S. SUZUKI and R. IIZUKA 13 7

- In Vitro Fertilization of Rabbit Eggs by Ejaculated Spermatozoa Capacitated in a Modified Tyrode's Solution.

- SATO, K. and Y. SUZUKI 14 9

- Scanning Electron Microscopy of Nonfertilized Oocytes in Human IVF.

- INOUE, M., Y. KOBAYASHI, I. HONDA, H. AWAJI, M. KANEKO and A. FUJII 15 7

総 説

X 精 子 と Y 精 子

東京大学教養学部生物学教室

毛 利 秀 雄

動植物の性比が1:1になるのが戻し交雑と同じようなしくみによるのであろうと云うことは、既に1870年にMendelがNägeliへの手紙の中に書いていていると伝えられる。性の決定に関与する性染色体の発見は、1891年にHenkingによりホシカメムシの精母細胞でなされているが、彼はこれを核小体と考えた。しかしその後のツユムシ精母細胞を用いたMcClungの研究により、これが特別な染色体であることが認められ、1902年にはこの性染色体により性の決定が行われることが明らかにされた。このような昆虫や哺乳類では雄がヘテロであり、小さい方の性染色体はY染色体と呼ばれる。したがって減数分裂の結果生じる精子には、X染色体をもつX精子とY染色体をもつY精子が1:1で存在することになる。

ところで男女、雌雄の産み分けについては古くから多くの人々が興味を抱いており、HippocratesやAristoteles等もその方法について述べている。最近の技術も考慮に入れると、その方法は次の三つに大別されよう。

- (1) 雌の体内でXまたはY精子のみが卵と受精するように調節する方法
- (2) 雌または雄の胚のみを育てる方法
- (3) 予めXおよびY精子を分離して、それぞれを用いて人工授精する方法

最後の方法については後で詳しく述べるので、ここでは前二者について簡単に触れておこう。まず第一の方法としては腔内を重曹でアルカリ性にすれば男児、乳酸などで酸性にすれば女児を得るということが1930年頃よりいわれており、食事による男女の産み分け方法も同じような発想、つまりX精子は酸に強くY精子は弱いという考えにもとづいている。月経周期との関係も同様である。またリン・カルシウム剤により男児の産まれる確率が高まるという。第二の方法としては、たとえば雄の細胞の表面にはH-Y抗原があるという考えにもとづき、抗H-Y抗体を用いて雌の胚のみを残す、または胚を分断してその一部を雌雄の判定に用い、望みの性の残りの部分を胚移植するといったことが試みられつつあるようである。しかし予めX精子とY精子を分離することができれば、これがもっとも容易で確実な方法となろう。

I. X精子とY精子の差異

雄ヘテロの場合にY染色体は小さい方と定義されているから、これを含むY精子はたとえ僅かであってもX精子より小さな頭部（核）を持つはずである。事実統計的にみて両者の頭の大きさに二つのピークがあるという報告は数十年前から出されている。^{1,2)}

1960年代の初めになるとShettlesがヒト精子の位相差顕微鏡による観察から、X精子は頭部が細長く大きいのに対してY精子の頭部は丸くて小さく、子供の性比がどちらかに片寄っている父親の精液中には一方の形の精子が多く見られると報告した。^{3,4)}しかしこの結果は上下および左右方向から見た精子頭部の形をX、Yの違いと誤認したものと思われる。

最近ではFlow cytometryによって、蛍光色素で染められた精子DNA量がやはり二つのピークに分れることがGledhillらの5ループにより示されている。^{5, 6)}たとえばウシの精子では両ピークの差は4%位である。この方法では数千の精子のDNA量を測定できるが、固定した試料を用いる為に生きたX, Y精子の分離はできない。ただし分離したものの検定には有用である。

ところでヒトの細胞、たとえば分裂中期のリンパ球などを蛍光色素のキナクリン・マスターで染めると、⁷⁾Y染色体の長腕が特に強く染まる。⁸⁾また間期の男性の細胞では蛍光のスポット (F-body) が1個観察される。1970年にBarlowとVosaは精子においても頭の中央にF-bodyを持つものがほぼ半数見いだされることを観察し、⁹⁾さらにSumnerらはDNA含量よりF-bodyを持つ精子がY精子であることを示した。¹⁰⁾この結果によりヒトの精子に関する限り、人工授精による出産を待つことなく、X, Y精子の判定が顕微鏡下で行い得ることになった。これまでのところ、キナクリン・マスターによる判定はヒトとゴリラに限られるとされているが、¹¹⁾固定・染色方法の改良によっては他の哺乳類精子にも応用されうる可能性がある。

X精子の方がY精子より大きいとすれば、遠心力によって前者の方が早く沈降する可能性がある。この点に関する数十年前から研究が行われており、賛否両論が出されてきた。たとえばLindahlは向流遠心機 (co-
unter-streaming centrifuge) を開発してウシのX, Y精子の分離を試み、最初これに成功したと報じたが後に自から否定的な結果を得た。¹²⁾この種の実験結果については後述する。なお両者の大きさの違いを利用してゲルろ過法で分離しようという試みもなされている。^{13, 14)}

精子の大きさとも関連して、両者の運動性に差異があるのではないかという考えも出されている。たとえばY精子の方が身軽で速く動くのではないかといった類である。実際Y精子の方がX精子よりも子宮頸管粘液中¹⁵⁾をより速やかに通過するという報告がある。しかしこれが事実であるとしても、走化性の違いとか頸管粘液のあみ目を切断するための酸素活性の違い等、いろいろな可能性が考えられる。EricssonらはY精子の方が速かにアルブミン層の中に入るので、これを繰返すことによってX, Y精子を分離できるとしているが、他の研究者の追試の結果は否定的である。鞭毛運動において、頭の大きさの僅かな違いが大きな影響を与えることは考え難い。

X, Y精子の両者の中に、その細胞表面の性状に何らかの差異が存在するのではないかという考えも古くから出されている。1930年代の初めにSchröderらは、ウサギ精子の電気泳動の結果、陽極に集った精子から^{17, 18)}雌が、陰極に集った精子から雄の仔ウサギを得たと報告した。この結果は両者の表面荷電に差異のあることを示唆している。しかしその後の結果は後述するように、必ずしもこの初期の報告を支持するものではなかった。^{19, 20)}とはいえわれわれの得た結果は、やはり両者の表面荷電に差異がある可能性を強く示している。

表面性状の違いという点になると、H-Y抗原の存否も有力な候補者となり得る。H-Y抗原はもともとY染色体に位置する遺伝子によって発現し、未分化の生殖巣を精巣に分化させ、雄としての特徴を顕現させる重要な因子として知られている。²¹⁾しかしX, Y精子の分化に関してこの抗原、ないしはその遺伝子が関与しているという可能性は薄い。その発現にはX染色体の共存が必要なようである。もちろん両者の細胞表面に免疫学的な差異が存在する可能性に関しては否定できない。この点に関しては今后の研究の発展を待つ必要がある。

II. X精子とY精子の分離

これまで述べてきたような差異を利用して、X精子とY精子を分離する試みがなされてきた。その主なものは遠心分離法と電気泳動法である。分離の判定には前述のキナクリン・マスター染色によるF-bodyの有無や、flow cytometryによるDNA量の測定が用いられている。

1. 遠心分離法

初期の試みについてはその一端を既に紹介したが、いわゆる分画遠心法かそれを改良した方法であり、成果はあがっていない。むしろこれによる分離は不可能という結論であった。しかしそれより細かな分画が可能である密度勾配遠心法の導入により、ある程度の分離がなされるようになってきた。

たとえばRohdeらはヒト精子をショ糖密度勾配遠心にかけ、密度の小さい分画にはY精子が多く、密度が大きくなるほどX精子の割合が増加すると報告した。²³⁾また遠心はしていないが(つまり $1 \times g$)、冷却したウシ精子をスキムミルクや卵黄などで作製した勾配中に浮上または沈降させ、下方の分画の精子を用いて高率に雌の産仔を得たという報告もある。²⁴⁾さらにFicollの密度勾配中の遠心でも、重い方の分画にX精子の割合が高まる傾向がある。²⁵⁾ただし前述のように、Ericssonはアルブミンを重層してその上に精液をのせて静置した場合には、¹⁶⁾Y精子の方が下に来るという結果を報じているが、運動性(走化性)の違いのようなことであろうか。いずれにせよ彼の結果は他の研究者によっては支持されていない。

ところで上記の諸方法に用いられた密度媒体は、何れも密度を高めると浸透圧も高まるので、高浸透圧の精子に対する影響も無視できない。これに対してPercollは浸透圧を変えることなく密度をあげることができ、また細胞に対して無害であることが知られている。Kanekoらはヒト精液を密度を異にする(1.11~1.06)6層のPercollの上にのせて250gで20分間遠心したところ、やはり密度の高い分画にX精子が集まり、密度の低い分画ではY精子の比率が高くなるという結果を得た。²⁵⁾しかしこの方法でX、Y精子をそれぞれ純粹に得ることはできなかった。そこでわれわれは、まず後述のような理由でより重要と思われるX精子をできるだけ高純度に得ることを目標とし、Percollの層をより細かく12層に増して種々の遠心条件で検討を加えた結果、図-1のように250g、30分間の遠心でおよそ25%の精子が沈殿し、その約94%がX精子となることをみいだした。²⁶⁾いずれにせよX精子はY精子よりも沈降速度が大きいことになる。

どうしてこのような差が生じるかについては、両者の密度の違い、形や大きさの違い、表面性状の違いなどが原因として考えられる。しかしやはりPercollを用いての沈降平衡法では、図-2のように1つのピークし

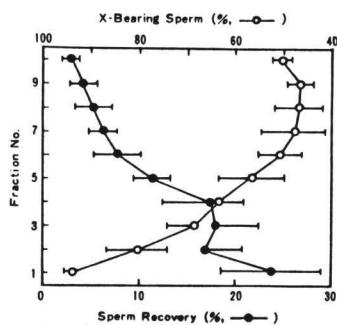


図-1

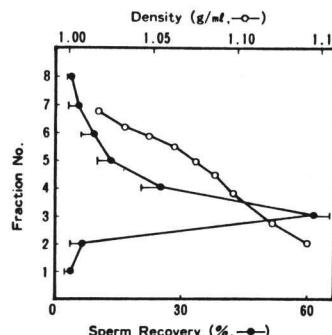


図-2

か得られず、このピークのX, Y精子の比はほぼ1:1であった。いいかえれば両者の密度はほとんど同じで²⁶⁾あった。ということは他に原因を求めるなければならないことになる。

なおEricssonの実験の直接的な反証とはいえないが、Percollの上に精液をのせて静置した場合には、下層にY精子が集まるという結果は得られなかった。

2. 電気泳動法

X精子とY精子の間には表面荷電に違いがあり、そのために電場に置かれるとそれぞれ異なる挙動を示すのではないかという考えも古くからなされており、数多くの分離実験が試みられている。前述のように Schröder^{17,18)}による電気泳動の結果は、X精子が陽極に、Y精子が陰極に移動するというものであった。しかし、その後たとえばNevoらはウサギとウシの精子で電気泳動を行い、精子の等電点は3.4ほどで、すべての精子が同じ挙動を示すと報告している。一方Battacharyaによって開発されたconvection counter streaming galvanination法によると、X精子は陰極側に、Y精子は陽極側に集まるという。わが国でも白井らによってヒト精子の^{28,29)}分離が試みられており、同様な結果が得られている。³⁰⁾

われわれは先にヒトのX精子はY精子よりも沈降速度が早いと云う結果を得たが、両者の密度は同じであつ²⁶⁾た。そこで両者の表面性状の違いを見いだそうという目的で、無担体電気泳動法を試みた。最初に用いたのは Bender&Hobein社のElphor VaP—5型であったが、泳動の結果2つのピークが陽極側に得られ、より陽極に近いピークは100%X精子よりなり、もう1つのピークは85%近くがY精子よりなるという結果を得た¹⁹⁾(図-3)。Y精子のピークが100%にならないのは、X精子のピークの裾や未成熟精子が含まれているためと思われる。同様な結果はより少量のサ

ンプルですむHirschmann社製のACE²⁰⁾710型でも得られた。つまりX, Y精子共その表面はNevoの結果のように負に荷電しているが、X精子の方がよりその程度が高く、陽極への移動度が大きいということになる。

次にこのような表面負荷電の差が何に起因するかが問題になる。細胞表面の負荷電は糖衣(glycocalyx)に含まれるシアル酸や硫酸に負うことが多い。そこで精液をシリカダーゼで処理して電気泳動にかけたところ、図-4に示したように、X, Y両精子のピーク共次第に移動度を減じ、ついには1つの²⁰⁾ピークになることを観察した。

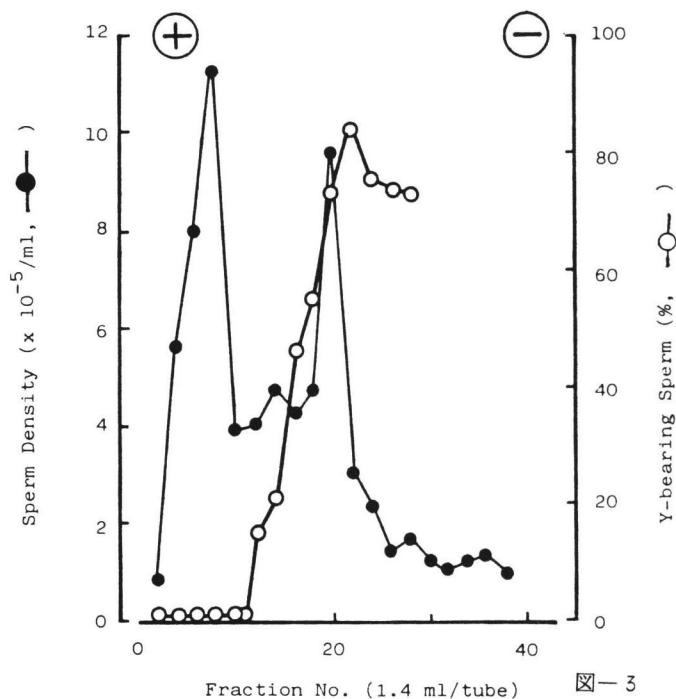


図-3

このピーク中のX, Yの比はほぼ1:1であった。

故に両者の表面負荷電の差は、少くとも表面のシアル酸含量の違いによるものと考えられる。より定量的な実験結果が望まれるが、この違いが頭の表面積の差によるとは考えにくいので、haploidでのgene expressionの結果かも知れないし、またたとえば精巣上体等での表面の修飾のされかたの違いによるのかも知れない。なおX, Y両分画の精子のSEM像³¹⁾では明らかな形態的な違いは認められなかった。

なお枠田らはウシ精液を無担体電気泳動にかけ、陽極側に得られたピークの前の方の分画を用いて人工授精し、雌9頭、雄4頭の胎児を得たと報告している。³²⁾

3. その他の方法

精子の大きさの違いに関連してSephadexを用いたゲルろ過が試みられており、X精子に富んだ分画が得られる^{13,14)}という。しかし前述のアルブミン法同様に結果はまちまちであり、否定的な報告も出されている。³³⁾

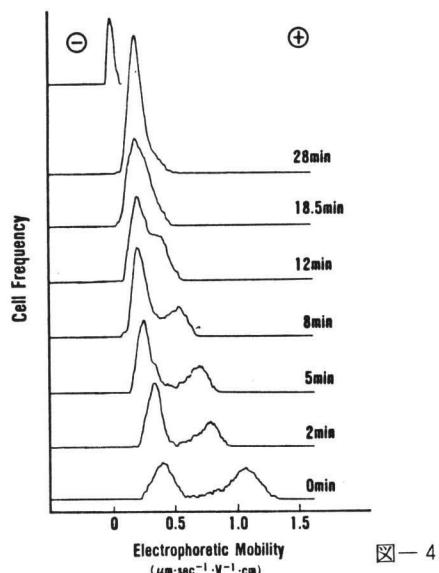
RohdeらはY精子の方が子宮頸管粘液を早く通過すると述べているが、先端に到達するY精子の数は少く実用的ではない。¹⁵⁾またShettlesもミリポアフィルターを通してY精子のみが頸管粘液中に移動すると報じてはいる。³⁴⁾実際のところ陰および子宮で回収された精子のX, Yの比はほとんど違わずほぼ1:1で、頸管粘液の影響は見られない。³⁵⁾頸管粘液中でヒト精子の運動様式が変化し、鞭毛運動の拡幅が小さくなることは確かであるが、X精子とY精子の間に差が生じるとは考えにくい。

X, Y精子の細胞表面に免疫的な違いがある、つまり両者が異なる抗原を持つ可能性については既に述べた。その中でもH-Y抗原は本来Y染色体上に位置する遺伝子によって発現するので、Y精子にもあるのではないか³⁶⁾という考えが出され、従って抗H-Y抗体を用いればY精子を除けるのではないかという発想がなされている。しかしこれを支持する結果は得られていない。抗H-Y抗体は、もっぱら受精後の雄胚の判定ならびに性選択に利用されているのが現状である。とはいっても免疫的な方法による分離が全く無効であるとは断言できない。

この他にも色々な方法が試みられているが、肯定的な結果が得られていないので省略する。

III. 問題点と展望

男女の産み分けは昔からの人類の夢の一つであった。それ故に色々な方法が試みられてきたが、これまで科学的に確かな結果は得られていなかった。ヒトを含む哺乳類のX, Y精子の分離に関しては、1982年に出版されたProspects for Sexing Mammalian Sperm (Colorado Associated University Press) にもむしろ悲観的な見通しが述べられており、またflow cytometryによるDNA量の検討でも、従来成功であったと報ぜられた方法はすべてネガティブな結果に終っている。³⁷⁾一方ショウジョウバエでは突然変異その他による異常性比が知られているし、カメでは僅かな温度の差により雄または雌のみが生じることが明らかにされており、



図—4

性の人為的支配が試みられてきている。しかしひでの性の選択が実現性を帯びてくると、にわかにその社会的影響が浮彫りにされてきた。最近の中国農村部における異常に高い男児の比率は、一人っ子政策の結果ある種の行為が行われたことを推測させるし、同様な事例は我が国でも徳川時代にあったようである。従ってX, Y精子の分離も、その応用には十分過ぎる程の規制が必要である。

ただし200近くに及ぶ致死的な伴性遺伝病（そのほとんどはX染色体上の遺伝子により男児に発現する）に関しては、遺伝子操作をも含む各種の治療法と共に、両親が望むのであればたとえば女児を産むことが許されてもよいのではなかろうか。事実最近におけるヒト精子を用いたX, Y分離の試みは、F-bodyによる顕微鏡下での判定が可能であることと共に、このことを第一の目的としている。何れにしても死の問題と並んで生（産むこと）の問題も、今後生命倫理の上から色々と論議されることになろう。

これとは対照的に、ウシなどの家畜における雌雄の産み分けは、経済的な観点からむしろ歓迎され待ち望まれている。すなわち乳牛では雌を、肉牛では雄を得ることが利益をもたらすことになる。それ故に畜産の分野では熱心にこの線に沿った研究が行われてきた。また水産の分野でも魚の種類によって雄または雌が経済的な価値を持つので、ホルモン投与や細胞生物学的な手法によって何れかの性を得ようとする試みがなされている。何れにおいても精子段階での選別は、成功すればもっとも簡単で確実な方法であることは間違いない。ただしこのような場合にも、gene bankなど将来へ向っての配慮が必要であろう。自然科学で得られた結果は両刃の剣となることが多い。X精子とY精子の分離も、人類と地球上の動物のために役立つことを望みたい。

本文中のわれわれの実験は、慶應義塾大学産婦人科教室（飯塚理八教授・小林俊文助教授）の兼子智、ならびに当教室の押尾茂の両氏が主に行ったものであり、また無担体電気泳動装置を用いた初期の実験には、東京医科歯科大学難治研の中島教授のお力添えを得たことを付記する。なお10年以前のこの種の研究に関しては、
36) 西田による総説を参照されたい。またわれわれの5ループによる幾つかの総説も参考にして頂ければ幸いである。
31, 38-40)

3.1 用 文 献

- 1) Wodsedalek, J. E. : Biol. Bull. 25, 8 (1913), 27, 295 (1914)
- 2) Zeleny, C. & Faust, E. C. : J. Exp. Zool. 18, 187 (1915)
- 3) Shettles, L. B. : Obstet. Gynecol. 16, 10 (1960)
- 4) Shettles, L. B. : Fertil. Steril. 12, 502 (1961)
- 5) Gledhill, B. L. et al. : J. Cell Physiol. 87, 367 (1976)
- 6) Pinkel, D. et al. : J. Anim. Sci. 60, 1303 (1985)
- 7) Zech, L. : Exp. Cell Res. 58, 463 (1969)
- 8) Caspersson, T. et al. : Exp. Cell Res. 61, 472 (1970)
- 9) Barlow, P. & Vosa, C. G. : Nature [Lond] 226, 961 (1970)

- 10) Sumner, A. T. et al. : *Nature [Lond]* 229, 231 (1971)
- 11) Bhattacharya, B. C. et al. : *Int. J. Fertil.* 24, 256 (1979)
- 12) Lindahl, P. E. : *Nature [Lond]* 178, 491 (1956)
- 13) Steeno, O. et al. : *Andrologia* 7, 95 (1975)
- 14) Quinlivan, W. L. et al. : *Fertil. Steril.* 37, 104 (1982)
- 15) Rohde, W. et. al. : *J. Reprod. Fert.* 33, 167 (1973)
- 16) Ericsson, R. J. et al. : *Nature [Lond]* 246, 421 (1973)
- 17) Koltzoff, N. K. & Schröder, V. N. : *Nature [Lond]* 131, 329 (1933)
- 18) Schröder, V. N. : *Biol. 2bl.3*, 465 (1934)
- 19) Kaneko, S. et al. : *Proc. Japan Acad.* 59 (B), 276 (1983)
- 20) Kaneko, S. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124, 950 (1984)
- 21) Ohno, S. : *Major Sex-determining Genes*. Springer Verlag, Berlin (1979)
- 22) Hoppe, P. C. & Koo, G. C. : *J. Reprod. Immunol.* 6, 1 (1984)
- 23) Rohde, W. et al. : *J. Reprod. Fert.* 42, 587 (1975)
- 24) Schilling, E. : *J. Reprod. Fert.* 11, 469 (1966)
- 25) Kaneko, S. et al. : *Fertil. Steril.* 40, 661 (1983)
- 26) Kaneko, S. et al. : *Bioned. Res.* 5, 187 (1984)
- 27) Nevo, A. C. et al. : *Exp. Cell Res.* 23, 69 (1961)
- 28) Bhattacharya, B. C. : In *Guide to Pre-arranging the Sex of Offspring*, 10, Action Press, Ralston, Nebraska (1977)
- 29) Daniell, J. F. et al. : *Fertil. Steril.* 38, 233 (1982)
- 30) 白井将女, 松田尚太郎, 日本不妊学会誌 18, 243 (1974)
- 31) 兼子 智, 押尾 茂, 小林俊文, 毛利秀雄, 飯塚理八: 産婦人科の世界, 37, 703 (1985)
- 32) 桢田博司, 高橋政義, 川倉一彦, 副島昭彦: 第75回日本畜産学会講演要旨, P 118 (1984)
- 33) Schilling, E. et al. : *Andrologia* 10, 215 (1978)
- 34) Shattles, L. B. : *J. Urol.* 116, 462 (1976)
- 35) Ishijima, S. & Mohri, H. : *Ganete Res. in press.*
- 36) 西田司一: 畜産の研究, 29, 21 (1975) ~ 31, 906 (1977)
- 37) Amman, R. P. & Seidel, G. E. eds. : *Prospects for Sexing Mammalian Sperm*. Colorado Associated University Press, Boulder, Colorado (1982)
- 38) 兼子 智, 飯塚理八, 押尾 茂, 毛利秀雄: 静電気学会誌, 8, 193 (1984)
- 39) 兼子 智, 押尾 茂: 細胞工学, 3, 605 (1984)
- 40) 毛利秀雄: 科学, 54, 84 (1984)

図 の 説 明

図-1 Percoll密度勾配遠心法によるヒトX精子の選択的分離

図-2 Percoll密度勾配中でのヒト精子の沈降平衡

図-3 無担体電気泳動によるヒトX, Y精子の分離

図-4 ヒト精子の電気易動度に対するシリダーゼ処理の効果

種特異ブタ透明帯抗原に対する单一クローン抗体(B11C8)
の性状分析と抗体による受精阻害実験

Characterization of the monoclonal antibody (B11C8) to a species-specific antigen of porcine zona pellucida and blocking experiments of fertilization by the antibody.

香山浩二¹⁾・長谷川昭子¹⁾・繁田 実¹⁾・磯島晋三¹⁾・永井 卓²⁾・角田幸生²⁾

Koji KOYAMA¹⁾ Akiko HASEGAWA¹⁾ Minoru SHIGETA¹⁾
Shinzo ISOJIMA¹⁾ Taku NAGAI²⁾ and Yukio TSUNODA²⁾

¹⁾兵庫医科大学産科婦人科学教室, ²⁾農林水産省畜産試験場繁殖部

¹⁾Department of Obstetrics and Gynecology, Hyogo Medical College,
Nishinomiya ²⁾National Institute of Animal Industry, Tsukuba

Monoclonal antibodies(Mab) produced from one of the hybridomas (B11C8) which were established by cell fusion of mouse myeloma cells(P3UI) with spleen cells from a mouse immunized with porcine zona pellucida(ZP) were characterized and their inhibitory effect on in vitro fertilization of porcine oocytes by boar spermatozoa was studied. B11C8 Mab was IgG2a and reacted tissue-specifically and species-specifically to porcine ZP. It formed an immune precipitin line against heat solubilized porcine ZP in Ouchterlony's double immunodiffusion test, suggesting that multiple antigen epitopes corresponding to B11C8 Mab were expressed on one antigen molecule. The binding site of the antigen corresponding to the Mab seems to be composed of a peptide-carbohydrate mixed portion. B11C8 Mab, either divalent(IgG) or univalent(Fab) antibody, showed a strong inhibitory effect on the binding of boar spermatozoa to porcine oocytes. This suggests that B11C8 Mab possibly recognized some antigen molecule related to the sperm receptors on porcine ZP.

緒 言

透明帯 (ZP) は、精子の認識、多精子受精の阻止、受精卵の保護といった生殖生理学上大変重要な役割を担っている。この ZP に臓器特異抗原としての強い抗原性があり、抗 ZP 抗体¹⁾²⁾³⁾⁴⁾あるいは ZP 免疫⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾

により受精が強く阻止されることが認められている。抗 ZP 抗体による受精阻害機序として、ZP 表面に存在する精子レセプターに対する抗体が結合することにより、直接、精子の ZP への結合が障害される場合と、精子レセプター以外の ZP 抗原に対する抗体が多量に ZP に結合することにより、精子レセプターが間接的に立体障害を受ける場合とが想定される。しかし、多くの研究は抗 ZP 抗体の IgG 分画では ZP への精子の結合が強く抑制されるが、その Fab 分画ではほとんど抑制されないことから、¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾ 精子レセプターそのものには抗原性がないか、あっても非常に弱いものであろうと考えられている。

著者らは、ヒト ZP とブタ ZP の強い抗原交差性と、これを利用してブタ卵の蛍光抗体染色により不妊婦人の血中に抗 ZP 抗体を検出したという Shivers¹³⁾ らの論文に着目し、ブタ ZP に対するモノクローナル抗体 (Mab) を作製し、これを用いてブタ及びヒト ZP の抗原分析並びに抗体の受精への影響について検討してきた。¹⁴⁾¹⁵⁾ 本論文では、種特異的にブタ ZP とのみ反応する一つの Mab (B11C8)を選んで、その対応抗原の性状分析とブタ卵の in vitro 受精系における抗体 (IgG 及び Fab) の影響について検討したので報告する。

方法・材料

① 抗ブタ透明帯モノクローナル抗体 (B11C8) の作製

B11C8 Mab の作製法についてはすでに報告したが、¹⁴⁾ その概略を示すと、単離ブタ ZP 500個を完全フロイントアジュバントとともに BALB/c マウスに免疫し、免疫マウス脾細胞とマウスミエローマ株化細胞 (P3/X63-Ag 8 U 1 : P3 U 1) をポリエチレングリコール1000の存在下で細胞融合し、型の如く、HAT (hypoxanthine-aminopterin-thymidine) 選択培地にて融合細胞を増殖させた後、限界希釈法にてクローニングを行い、ブタ卵の間接蛍光抗体法によって ZP と反応する 5 種の Mab 産生ハイブリドーマを得た。今回の実験には、この内種特異的にブタ ZP のみと反応する Mab 産性ハイブリドーマ (B11C8) を選んで、大量に培養してその培養上清を集めるか、または前もって腹腔に pristane を注射した BALB/c マウスの腹腔にハイブリドーマ細胞 (1×10^7) を移植することによって腹水を産生させ、これから抗体を分離して用いた。

② 抗体 IgG と Fab 分画の調整

B11C8 ハイブリドーマの培養上清又はマウス腹水より、ProteinA を用いて IgG を分離した。ProteinA は SepharoseCL-4B ゲル 1 ml 当り、2 mg 結合させたものでカラム容量 5 ml (1 × 6 cm) を用いた。0.1 M phosphate buffer (pH8.0) でカラムを平衡化した後、培養上清200 ml 又は腹水 (0.5~1.0 ml) を加え、充分に洗浄後、0.1M glycine-HCl buffer (pH5.0) にて IgG を溶出した。5.12 ml の腹水より OD_{280nm} 吸光度測定にて 29.03 mg の IgG 蛋白が分離され、この内 17.74 mg を Fab の調整に用いた。方法は B11C8 IgG 12.24 mg (凍結乾燥重量) を 0.01M phosphate buffer (pH8.0) にて 20 mg/ml に溶解し、0.01M cysteine-HCl と 0.02M EDTA の存在下で、基質蛋白に対して 1/100 量の papain (Sigma) を加えて 37°C、4 時間反応させた。反応終了後、0.005M phosphate buffer (pH8.0) を外液として 36 時間透析し、これを DEAE cellulose カラム (1 × 13 cm) に添加し、0.005M から 0.3M phosphate buffer の連続的濃度勾配 (linear-

gradient) にて溶出させ Fab 分画 (蛋白量7.26mg) を得た。溶出分画における Fab の確認は SDS-PAGE による分子量 (23 kd) と螢光抗体法による抗体活性の測定によった。

③ 間接螢光抗体法¹⁴⁾

ブタ各臓器の凍結切片 (6 μ m) 及び各種動物の卵丘細胞除去卵を B11C8 培養上清と反応させた後, FITC 標識第二抗体 (抗マウス γ -グロブリン家兎血清 IgG-F(ab')₂ 分画) を加えて反応させ, 洗浄後落射型螢光顕微鏡 (Nikon) で螢光の有無を判定した。第二抗体は前もってブタ卵巣及び肝・腎組織で吸収したものを用いた。

④ 酵素抗体法 (ELISA 法)¹⁵⁾

B11C8 対応抗原の性状を調べるために本法を用いた。加熱処理 (60°C, 60分, 0.05M Na₂CO₃-HCO₃ buffer pH9.6) にて可溶化したブタ ZP 蛋白またはその各種反応試薬による処理産物を100 μ g/ml より倍数希釈し, これを100 μ l/well で micro ELISA プレート (Falcon) にコートし, 3% BSA 溶液で余剰の蛋白結合基をブロックした後, ビオチン化 B11C8 IgG (0.2 μ g/100 μ l/well) を加え室温で1時間反応させた。0.05% Tween 20含有 PBS で充分に洗浄後, horse-radish peroxidase結合 avidin (0.1 μ g/100 μ l/well) を加えて室温で30分間反応させ, 洗浄後, 0.02% H₂O₂含有 ortho-phenylene diamidine (OPD) 溶液 (20 μ g/100 μ l/well) を加えて呈色反応を行った。10分後に10% H₂SO₄を加えて反応を停止させ, microplate photometer (Corona electric) にて吸光度測定 (Δ OD_{500-660 nm}) を行い, 各種反応試薬処理により抗原性の変化が起るか否かを検討した。

⑤ 抗体による受精阻害実験

抗ブタ ZP 抗体 (B11C8) の受精への影響は, ブタ卵胞卵とブタ精巣上体精子を用いたブタ卵の in vitro 受精系¹⁶⁾によって検討した。実験方法は, 未経産ブタ卵胞卵を 5% CO₂ 炭酸ガス培養器内で29~31時間前培養した後, 卵丘細胞をピペットで除去し, 抗体 (IgG 又は Fab) 蛋白 5 mg/ml を含む m-KRB 液内で30分反応させた。抗体処理後, m-KRB 液で3回洗浄した後, 受精用の m-KRB 液に移しかえて精子濃度 2×10^6 /ml で授精した。精子は雄ブタ精巣上体尾部精子を濃度 $4 \sim 8 \times 10^8$ /ml で炭酸ガス培養器内で4時間前培養したものを用いた。授精後20時間で固定 (25% acetic alcohol), 染色 (1% aceto-orcein) し, 位相差顕微鏡下で精子尾部をともなった膨化精子頭部及び雄性前核形成の有無を判定した。

実験結果

① B11C8 抗体とその対応抗原の特徴

ハイブリドーマの培養上清と家兎抗マウス免疫グロブリン (Ig) 各クラス特異抗体 (Miles) とのゲル内沈降反応によって調べた B11C8 Mab の Ig クラスは, 抗 γ 2a 特異抗体と反応を示す IgG_{2a} であった。間接螢光抗体法によって調べた B11C8 Mab の臓器及び種属特異性は表1に示した。ブタ臓器の中では卵巣切片の ZP 部分とのみ反応し, 睾丸, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 脳組織とは反応しなかった。卵胞卵 (ブタ, ヒト) 及び過剰排卵処理による卵管卵 (ハムスター, ラット, マウス) を用いて行った種特異性の検定では, B11C8 Mab は, ブタ ZP とのみ反応し, 他種属の卵とは全く反応しなかった。

表 1

Characterization of the Mab B11C8 to porcine zona pellucida

1. Immunoglobulin class	IgG2a
2. Tissue specificity*	
ovary (zona pellucida)	+
testis	-
liver	-
kidney	-
spleen	-
brain	-
3. Species specificity**	
pig	+
human	-
hamster	-
rat	-
mouse	-

* ; By the immunofluorescent staining of porcine organs

**; By the immunofluorescent staining of oocytes

写真 1

Immunodiffusion test of heat-solubilized porcine zona proteins against conventional (Con.Ab.) and Mab (B11C8 and 1D5-2B7) to zona pellucida

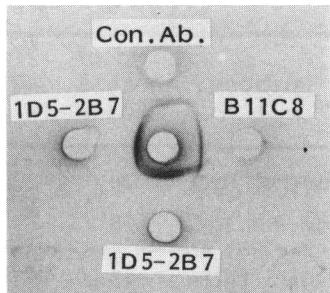


写真 1 は熱処理 (60°C, 60分, pH9.6) にて可溶化したブタ ZP 溶液と抗ブタ ZP 抗体との反応をゲル内沈降反応により調べたものである。ブタ ZP を BALB/c マウスに免疫して作製した通常の抗ブタ ZP 血清 (Con-Ab) との間には、少くとも 2 本の沈降線が形成された。可溶化ブタ ZP に対して作製した Mab である 1D5-2B7¹⁵⁾ と B11C8 は可溶化ブタ ZP との間にそれぞれ 1 本の沈降線を形成し、互いに交差した。Mab で形成された各々の沈降線は、Con-Ab で形成された 2 本の沈降線と部分融合を示した。これは非常に興味ある結果で、通常、Mab は対応抗原に対して沈降線を形成しないが、おそらく 1D5-2B7 Mab と B11C8 Mab の対応抗原は、抗原エピトープが分子上で反復して表現されていて、1 つの分子上に複数の抗原エピトープが存在しているため、ゲル内沈降反応において沈降線を形成したものと考えられる。

B11C8 対応抗原エピトープの性質を調べるため、可溶化ブタ ZP を各種の試薬で処理して、その抗原性の変化を ELISA 法によって検討した。Trypsin 处理 (ZP 蛋白 100 μg/ml + Trypsin 10 μg/ml PBS pH 7.4, 37°C 1 時間 → 4°C overnight), mixed glycosidase 处理 (ZP 蛋白 100 μg/ml + mixed glycosidase 50 μg/ml acetate buffer pH 5.0, 37°C 1 時間 → 4°C overnight) 及び過ヨウ素酸処理 (ZP 蛋白 500 μg/ml + periodic acid 20mM/saline, 4°C overnight, Sephadex G-25) によって有意に抗原性の低下を認めた。

② ブタ卵の *in vitro* 受精系に対する B11C8 Mab の影響

ブタ卵胞卵とブタ精巣上体精子との *in vitro* 受精系における B11C8 Mab (IgG 及び Fab) の受精阻害実験の結果を表 2 に示した。対照実験の正常マウス血清 IgG に比べ、B11C8 IgG 及び Fab 抗体処理卵では有意にブタ卵への精子の進入が阻止された。通常のマウス抗ブタ ZP 抗体 IgG (Con-Ab) を反

応させた場合と同様に B11C8 IgG 抗体処理卵では ZP 表面に免疫沈降帯の形成が認められたが、B11C8 Fab 抗体処理卵では、免疫沈降帯の形成は認められなかった。

表2

**Effect of Mab B11C8 IgG and Fab on fertilization
in vitro of porcine oocytes matured in culture**

Antibody	No. of oocytes examined*	No. (%) of oocytes penetrated** total	No. of oocytes penetrated** with enlarged sperm head	No. of oocytes penetrated** with both sperm head and pronuclei	Mean No. of sperm / oocytes
Control IgG	24	22(92)	21	1	3.0
Con-Ab IgG	26	2 (8)***	2	0	1.0
B11C8 IgG	43	0***	0	0	0
B11C8 Fab	34	7(21)***	6	1	1.4

* Oocytes maturing to metaphase II were examined.

** The oocytes were examined 20 hr after insemination.

*** P<0.005

考 察

B11C8 Mab は種特異的にブタ卵の ZP とのみ反応する抗体 (IgG_{2a}) で、その対応抗原エピトープは抗原分子上に反復して複数個表現されているため、Mab 単独でも可溶化ブタ ZP 蛋白との間に沈降線を形成し、また intact 単離ブタ卵に反応させた場合にも ZP 表面に免疫沈降帯の形成をみた。B11C8 対応抗原は、trypsin 処理、mixed glycosidase 処理、periodic acid 処理によって抗原性の低下を来すところから、おそらくその抗原エピトープは glycoprotein 上に存在し、抗原性の発現には peptide 部分と糖鎖の両者が関与しているものと推定される。

B11C8 Mab は、通常の Con-Ab と同様に強い受精阻害作用を示した。B11C8 抗体の受精阻害作用は、divalent 抗体 (IgG) の場合だけでなく univalent 抗体 (Fab) の場合にも起るところから、単に抗体と ZP との反応によって形成された免疫複合物による精子レセプターの立体障害が原因と考えるよりも、精子レセプターそのものに関与した直接的な精子結合障害が原因と考えられる。

ブタ ZP における精子レセプターの抗原性については、Peterson ら¹⁷⁾は、ブタ ZP に対する Con-Ab の Fab 分画を用いて受精阻害実験を行い、univalent 抗体の場合にもブタ精子のブタ卵への結合が強く障害されるところから精子レセプターそのものに抗原性があると考えている。同様に、Sacco ら¹⁸⁾も彼らが分離した分子量58,000のブタ ZP の精製抗原 (PPZA) に対する抗体 Fab 分画が精子の ZP への結合障害を示すことと、PPZA そのものが、精子に結合し、PPZA 処理精子は、ブタ卵へ結合できなくなる点より、PPZA 分子上に精子レセプターが存在し、これは抗原性を持つと考えている。著者らが本実験で用いた B11C8 Mab の対応抗原エピトープが Sacco らの PPZA 分子上にのっているか否かは、今後 B11C8 の対応抗原を可溶化ブタ ZP から分離精製して調べねばならないが、B11C8 Mab が種特異的にブタ ZP とのみ反応し、

その Fab 分画によって ZP への精子の結合が強く障害されたという結果は、B11C8 抗体が精子レセプター分子上の抗原エピトープを認識している可能性が強い。

文 献

1. Shivers, C.A., Dudkiewicz, A.B., Franklin, L.E. and Fussell, E.N. (1972)
Inhibition of sperm-egg interaction by specific antibody.
Science, 178:1211-1213.
2. Oikawa, T. and Yanagimachi, R. (1975)
Block of hamster fertilization by antiovary antibody.
J. Reprod. Fert., 45:487-494.
3. Tsunoda, Y. and Chang, M.C. (1978)
Effects of antisera on fertilization of mouse, rat and hamster eggs.
Biol. Reprod., 18:468-474.
4. Trounson, A.O., Shivers, C.A., McMaster, R. and Lopata, A. (1980)
Inhibition of sperm binding and fertilization of human ova by antibody to
porcine zona pellucida and human sera.
Arch. Androl., 4:29-36.
5. Sacco, A.G. (1978)
Inhibition of fertility in mice by passive immunization with antibodies to
isolated zona pellucidae.
J. Reprod. Fert., 56:533-537.
6. Gwatkin, R.B.L., Williams, D.T. and Carlo, D.J. (1977)
Immunization of mice with heat-solubilized hamster zonae: Production of anti-
zona antibody and inhibition of fertility.
Fertil. Steril., 28:871-877.
7. Wood, D.M., Liu, C. and Dunbar, B.S. (1981)
Effect of alloimmunization and heteroimmunization with zonae pellucidae on
fertility in rabbits.
Biol. Reprod., 25:439-450.

8. Mahi-Brown, C.A., Huang, T.T.F. and Yanagimachi, R. (1982)
Infertility in bitches induced by active immunization with porcine zona pellucidae.
J. Exp. Zool., 222:89-95, 1982.
9. Sacco, A.G., Subramanian, M.G., Yurewicz, E.C., De Mayo, F.J. and Dukelow, W.R. (1983)
Heteroimmunization of squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) with a purified porcine zona antigen (PPZA): immune response and biologic activity of antiserum.
Fertil. Steril., 39:350-358.
10. Tsunoda, Y., Sugie, T., Mori, J., Isojima, S. and Koyama, K. (1981)
Effect of purified zona antibody on fertilization in the mouse.
J. Exp. Zool., 217:103-108.
11. Ahuja, K., and Tzartos, S.J. (1981)
Investigation of sperm receptors in the hamster zona pellucida by using univalent (Fab) antibodies to hamster ovary.
J. Reprod. Fert., 61:257-264.
12. Aitken, R. J., Holme, F., Richardson, D.W. and Hulme, M. (1982)
Properties of intact and univalent (Fab) antibodies raised against isolated, solubilized, mouse zona pellucidae.
J. Reprod. Fert., 66:327-334.
13. Shivers, C.A. and Dunbar, B.S. (1977)
Autoantibodies to zona pellucida; a possible cause for infertility in women
Science, 197:1082-1084.
14. Isojima, S., Koyama, K., Hasegawa, A., Tsunoda, Y. and Hanada, A. (1984)
Monoclonal antibodies to porcine zona pellucida antigens and their inhibitory effects on fertilization.
J. Reprod. Immunol., 6:77-87.

15. Koyama, K., Hasegawa, A., Tsuji, Y. and Isojima S. (1985)

Production and characterization of monoclonal antibodies to cross-reactive antigens of human and porcine zona pellucidae.

J. Reprod. Immunol., 7:187-198.

16. Nagai, T., Niwa, K. and Iritani, A. (1984)

Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization in vitro of pig follicular oocytes.

J. Reprod. Fert., 70:271-275.

17. Peterson, R.N., Russell, L.D., Bundman, D., Conway, M. and Freund, M. (1981)

The interaction of living boar sperm and sperm plasma membrane vesicles with the porcine zona pellucida.

Dev. Biol., 84:144-156.

18. Sacco, A.G., Subramanian, M.G. and Yurewicz, E.C. (1984)

Association of sperm receptor activity with a purified pig zona antigen (PPZA)

J. Reprod. Immunol., 6:89-103.

下垂体抽出液投与によるラットの過排卵誘起と
初期胚発生の観察

Observation of Early Development of Fertilized Ova Superovulated
by Pituitary Extract Injection in Rat.

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 early development of fertilized ova which were induced superovulation by the administration of pituitary extract to female rat was observed. 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 the pituitary extract injection on ovulation, recovery rate of ova and development of ova in pregnant rat were investigated.

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

2. In most of 3-6 months old rats ovulated, the number of ova ovulated was more than 20 and the average of them was 22.8 ± 8.9 . On the other hand, in most of rats over 7 months old, the number of ova ovulated was less than 20 and the average of them was 13.3 ± 5.8 .

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

4. Recovery rate 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).

5. Large vesicular ovarian follicles were not observed during their early pregnancy.

In conclusion, the pituitary extract acted on ovaries of all treated rats and promoted the growth of their ovarian follicles. Especially, in 3-6 months old rats, administration of the pituitary extract induced superovulation frequently and did not interfere with the early development of fertilized ova in pregnant rats.

緒論

ラットを用いて PMSG と HCG 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。¹⁻⁶⁾しかし、過排卵を誘起しても一般に妊娠率は低く、⁷⁻¹⁰⁾過剰妊娠に導くことは困難であるといわれている。特に多量の PMSG と HCG 处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。^{11, 12)}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、受精率と胚の発育について調べ、過剰妊娠誘起の可能性を検討した。

材料と方法

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 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 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、0.5ml 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スし、2,500 r. p. m. (1,000 g) 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：一個の下垂体から得た抽出液を一匹の雌に投与した。投与する雌ラットは、未成熟、3 ～ 6 ヶ月齢および 7 ヶ月齢以上の 3 群に分類した。未成熟ラットには 28 日齢の 12 時～ 13 時に、他の 2 群のラットは正常な 4 日の性周期を 3 回以上くり返した未経産の動物を用い、腔スメアが発情後期像を示した日の同時刻に、下垂体抽出液を頸部皮下に注射した。未成熟ラットは、毎日腔開口を調べ、開口後は毎日腔スメアを観察した。未成熟ラットは、投与 3 ～ 12 日後および初めて発情期像を示した日に、他の 2 群は、投与 3 日後の発情期の日にエーテル麻酔後、頸動脈切断によって放血し、と殺した。実体顕微鏡下で、卵管膨大部の卵子数を数えた。さらに子宮と卵巣を摘出して、その重量を測定した。一方、妊娠誘起ラットは 3 ～ 6 ヶ月齢の未経産ラットを用い、下垂体抽出液投与 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、受精および胚発生の確認：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 および 5 日の 12 時から 13 時に殺して、排卵数、受精率、回収胚数、黄体数および胚発生を調べた。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。

結 果

3～6ヶ月齢の成熟雌ラットの過排卵誘起に対する雄下垂体数の影響について検討し、表1に示した。下垂体1個分の抽出液投与では投与3日後の発情期の日に19例中14例に排卵し、排卵した動物群の平均排卵数は 22.8 ± 8.9 で排卵数の増加が認められた。2個投与した場合にも7例中4例が排卵し、平均排卵数が増加したが、1個および2個投与いずれにおいても排卵しない個体がそれぞれ5例および3例認められた。3個投与では排卵は認められなかった。この結果から、下垂体1個分の抽

Table 1 Effect of the extract derived from different number of pituitaries on ovulation in 3-6 months old female rats.

	No. of pituitaries				
	1	2	3		
No. of rats examined	19	7	3		
No. of rats ovulated	14	4	0		
Ave. No. of ova recovered \pm S.D.	22.8 ± 8.9	24.3 ± 11.6	-		
	Ovulated	Not ovulated	Ovulated		
Ave. weight of ovary \pm S.D. (mg)	33.3 ± 4.5	28.0 ± 4.3	31.9 ± 4.6	25.7 ± 8.6	30.7 ± 7.1
Ave. weight of uterine horn \pm S.D. (mg)	280.7 ± 59.7	216.7 ± 78.8	274.5 ± 46.5	312.0 ± 116.9	280.5 ± 66.9

Table 2 Effect of the pituitary extract treatment on superovulatory responses in 28 days old, 3-6 months old and over 6 months old rats.

	28 days old	3-6 months old	Over 6 months old		
No. of rats examined	14	19	14		
No. of rats ovulated	3	14	9		
Ave. No. of ova recovered \pm S.D.	9.0 ± 1.2	22.8 ± 8.9	13.3 ± 5.8		
	Ovulated	Not ovulated	Ovulated		
Ave. weight of ovary \pm S.D. (mg)	$9.2 \pm 1.9 \star$	33.3 ± 4.5	28.0 ± 4.3	29.9 ± 5.8	30.0 ± 6.2
Ave. weight of uterine horn \pm S.D. (mg)	$33.7 \pm 17.5 \star$	280.7 ± 59.7	216.7 ± 78.8	351.7 ± 60.3	248.3 ± 43.8

★ Rats that were sacrificed on 31 days old.

出液の投与によって成熟雌ラットに高率に過排卵を誘起させ得ると考えて、以後、すべての処理動物に対して下垂体1個分の抽出液を投与した。

雌ラットの生後日齢の違いによる下垂体抽出液投与の排卵に対する反応性について検討し、表2に示した。下垂体抽出液を投与した未成熟ラットの多くは、投与3~4日後(31~32日齢)に腔開口が認められた。しかし、初回排卵が早められることはなく、投与12日後でも排卵しない例もあった。また、排卵の確認できた未成熟ラットの初回排卵日齢は、40~50日齢で、排卵数の平均は、9.0±1.2であった。排卵した3~6ヶ月齢ラット(14/19例)のほとんどが、20個以上の排卵数を示し、その平均は22.8±8.9であった。これに対し、排卵をした7ヶ月齢以上のラット(9/14例)では20個以上の排卵数となる例はほとんどなく、平均は13.3±5.8で対照群と有意の差は認められなかった(表3)。3~6ヶ月齢および7ヶ月齢以上のラットで、投与3日後に排卵しない例がかかる。

Table 3 Effect of the pituitary extract treatment on ovulation in over 6 months old female rats.

	Control	Treated	
No. of rats examined	6	14	
No. of rats ovulated	6	9	
Ave. No. of ova recovered ± S.D.	12.3 ± 2.7	13.3 ± 5.8	
	Ovulated	Ovulated	Not ovulated
Ave. weight of ovary ± S.D.(mg)	31.8 ± 5.2	29.9 ± 5.8	30.0 ± 6.2
Ave. weight of uterine horn ± S.D.(mg)	302.9 ± 60.7	351.7 ± 60.3	248.3 ± 43.8
Rates of fertilization(%)	85.6	100.0	—

Table 4 Effect of the pituitary extract treatment on ovulation in 3-6 months old female rats on Day-1 of pregnancy.

The day of autopsy	Control	Treated			Day-2	
		Day-1		Day-1		
		Ovulated	Not ovulated			
		Total	19 or more	Less than 19		
No. of rats	5	14	9	5	5	
Ave. No. of ova recovered ± S.D. (Range)	12.4 ± 2.2 (11-16)	22.8 ± 8.9 (6-40)	27.2 ± 7.4 (19-40)	14.8 ± 5.1 (6-18)	—	
Rates of fertilization(%)	92.2	94.6	—	—	100.0	
Ave. weight of ovary ± S.D.(mg)	31.4 ± 7.5	33.3 ± 4.5	33.4 ± 3.9	33.1 ± 5.7	28.0 ± 4.3	
Ave. weight of uterine horn ± S.D.(mg)	249.6 ± 51.5	280.7 ± 59.7	264.6 ± 45.9	309.8 ± 72.6	216.7 ± 78.8	

なりの率でみられた。これらのスメア像はすべて発情期像を示していたが、発情前期に雄と同居させても、交尾しなかった。また、遅れて投与4日後に排卵する例もみられた。排卵しなかったラットの卵巢には、多数の卵胞の存在が確認され、子宮に透明な貯留液が認められた。

妊娠1日目の排卵数は、投与群は表4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

Table 5 Number of embryos in control and treated rats on Day-3 of pregnancy.

No. of rats	Control	Treated		
		Total	No. of embryos recovered	
			19 or more	less than 19
8	8	3	5	
Ave. No. of embryos recovered \pm S.D. (Range)	11.3 \pm 2.9 (5-15)	20.8 \pm 9.1 (11-36)	31.0 \pm 4.6 (27-36)	14.6 \pm 3.0 (11-18)
Ave. No. of C.L. \pm S.D. (Range)	12.5 \pm 1.8 (9-15)	31.9 \pm 15.2 (13-57)	45.7 \pm 9.9 (39-57)	23.6 \pm 11.2 (13-38)
Embryos / C.L. $\times 100$ (%)	88.6 \pm 14.8	68.9 \pm 15.7	68.5 \pm 5.0	69.1 \pm 20.5
Ave. weight of ovary \pm S.D.(mg)	27.7 \pm 3.4	38.1 \pm 11.0	46.3 \pm 12.0	33.1 \pm 7.0
Ave. weight of uterine horn \pm S.D.(mg)	182.9 \pm 36.7	204.1 \pm 27.5	216.3 \pm 41.0	196.7 \pm 12.8

C.L. : Corpora lutea

Table 6 Number of embryos in control and treated rats on Day-5 of pregnancy.

No. of rats	Control	Treated		
		Total	No. of embryos recovered	
			19 or more	less than 19
8	9	6	3	
Ave. No. of embryos recovered \pm S.D. (Range)	12.0 \pm 2.0 (9-14)	18.8 \pm 2.7 (14-23)	20.3 \pm 1.5 (19-23)	15.7 \pm 1.5 (14-17)
Ave. No. of C.L. \pm S.D. (Range)	14.1 \pm 1.9 (12-17)	28.8 \pm 4.9 (23-37)	28.2 \pm 5.0 (23-37)	30.0 \pm 5.3 (24-34)
Embryos / C.L. $\times 100$ (%)	82.7 \pm 8.6	67.0 \pm 15.4	74.0 \pm 13.7	52.8 \pm 5.6
Ave. weight of ovary \pm S.D.(mg)	32.4 \pm 8.0	40.2 \pm 7.2	41.5 \pm 7.9	37.5 \pm 5.3
Ave. weight of uterine horn \pm S.D.(mg)	200.8 \pm 27.1	214.9 \pm 23.1	211.9 \pm 18.0	221.0 \pm 32.3

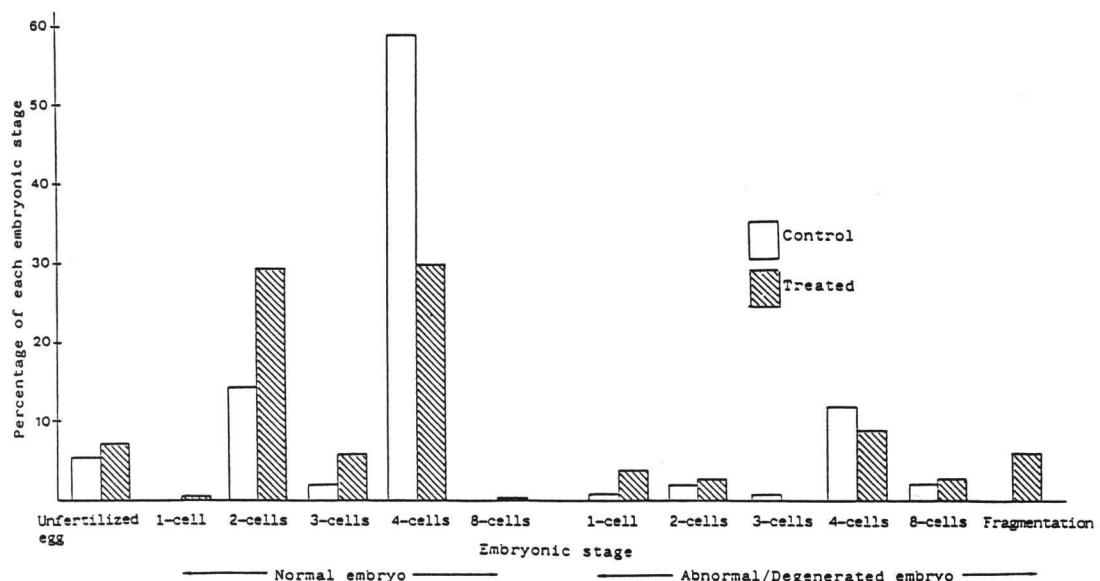


Fig. 1 Morphological classification of embryos of control and treated rats on Day-3 of pregnancy, and percentage of each embryonic stage.

の過排卵が誘起され、受精率も 94.6% 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 4., 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、両群ともすべて卵管から回収された。回収胚の数は、投与群は対照群よりも有意に多かった。(表 5, $P < 0.01$) 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 88.6% であったのに対し、投与群は 68.9% と低い値を示した。胚が 19 個以上回収された個体は 8 例中 3 例であった。対照群では、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 (図 1)。しかし、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 5 日目の胚は、対照群の卵管から 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。回収胚の数は、投与群は対照群よりも有意に多かった (表 6, $P < 0.05$) が、回収率は、対照群が 82.7% であったのに対し、投与群は 67.0% と低い値を示した。対照群から回収された胚の約 90% が胚盤胞へ発生していたのに対して、投与群では胚盤胞への発生率は約 70% を示し、胚の発生に遅延が認められた (図 2)。しかし、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。

考 察

本実験において 3~6 ヶ月齢ラットに雄ラットの下垂体 1 個分の抽出液を投与すると、排卵数が通常のラットの排卵数より多くなることから、下垂体抽出液の投与が PMSG や HCG の投与でみられ

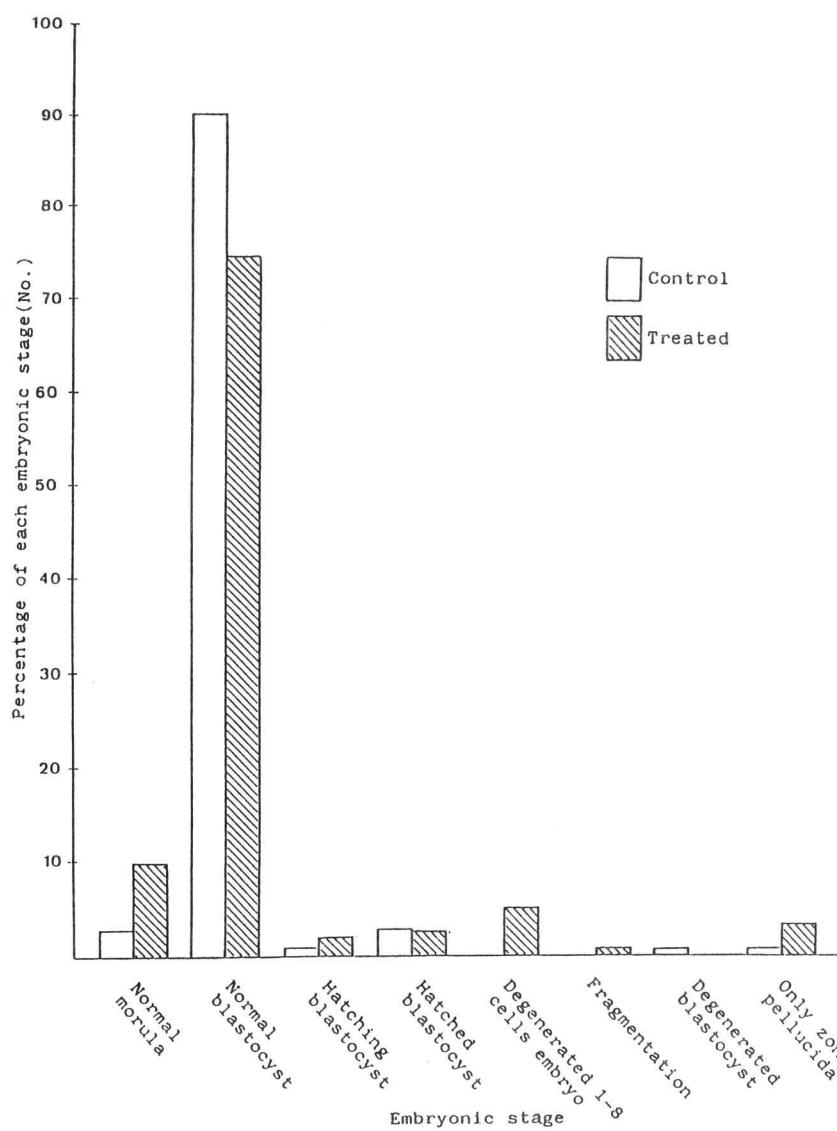


Fig. 2 Morphological classification of embryos of control and treated rats on Day-5 of pregnancy, and percentage of each embryonic stages.

れなかった原因についてより詳細な検討が必要である。

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3~6ヶ月齢の成熟雌ラットの約75%が、投与3日後に排卵し、そのうち58% (18/31例) が19個以上の排卵を示した。
 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回収胚数は多く、回収率も高い。¹²⁾ 石橋は種々の量の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その発育について詳細に検討しているが、その中でPMSG 20IUとHCG 20IU処理された妊娠1日目の回収卵子数が 25.1 ± 1.6

るよう、過排卵を誘起することができるるのは確かである。しかし、排卵数の少ない例や排卵しない例も多く、その効果は確実なものではない。また、卵胞の発育がみられるにもかかわらず排卵しないのは、LHサージの不足や遅延が原因であると思われる。特に、投与4日後まで排卵が遅れた例のあったことから、下垂体抽出液がLHサージの量や時期になんらかの影響を与えていると推測できる。7ヶ月齢以上および未成熟ラットで、過排卵が誘起されないのは、卵巣機能やホルモンに対する感受性などに3~6ヶ月齢ラットと差があると考えられる。¹³⁾ Tayaらは下垂体を未成熟ラットの腎臓近くに移植し、初回排卵時期を早め、過排卵を誘発しているが、本実験では、腔開口時期だけが早まり、初回排卵時期や排卵数に影響がみら

(Mean \pm S. E. M) であることから、本実験における下垂体抽出液投与による過排卵誘起がほぼこの値に近いといえる。PMSG 20 IU と HCG 20 IU 处理妊娠ラットでは妊娠の進行に伴ない回収胚数が減少し、回収率も低下を示しているが、下垂体抽出液投与によって過排卵誘起処理された妊娠ラットでは、妊娠5日目においても、回収胚数の減少および回収率の低下はほとんど認められなかつた。この違いは、多量の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、妊娠初期胚の損失の原因の一つであることを示している。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つた。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、これらは排卵前の卵巣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。

本稿は第25回および第26回哺乳動物卵子研究会において発表した要旨を原著としてまとめたものである。

文 献

- 1) 石橋 功, 田中 宏, 高橋紀代志 (1970) 過排卵ラット卵子の形態的研究 III. 成熟ラットの受精と着床について. 家畜繁殖誌, 16, 14-19.
- 2) 石橋 功 (1972) 過排卵ラット卵子の形態的研究 IV. 成熟ラットの着床ならびに胞胚期におよぼす性腺刺激ホルモンの影響. 家畜繁殖誌, 18, 87-93.
- 3) 石橋 功 (1983) 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.
- 4) 利部 聰 (1983) 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.
- 5) Walton, E. A., Evans, G. and Armstrong, D. T. (1983) Ovulation response and fertilization failure in immature rats induced to superovulate. J. Reprod. Fert. 67, 91-96.
- 6) Walton, E. A. and Armstrong, D. T. (1983) Oocyte normality after superovulation in immature rats. J. Reprod. Fert., 67, 309-314.
- 7) Edwards, R. G. and Austin, C. R. (1959) Induction of oestrus and ovulation in adult rats. J. Endocrinol., 18, 7-8.
- 8) 佐藤晶子 (1962) シロネズミ (*Rattus norvegicus*) における人為多発排卵とその受精に関する二・三の観察. 遺伝学雑誌, 37, 253-259.
- 9) 佐久間勇次, 石島芳郎, 平野公夫 (1965) PMSによるラットの過剰妊娠に関する研究. 日大農獸医報, 20, 59-63.
- 10) Zarrow, M. X., Clare, J. H., Roellig, C. and Denenberg, V. H. (1969) Prolonged gestation in the PMSG-treated immature rats. Biol. Reprod., 1, 387-396.
- 11) 高橋寿太郎, 本郷裕美, 正木淳二 (1982) 過排卵処理された成熟ラットの受精卵の発育に及ぼす卵巣摘出とプロジェステロン投与の影響. 日畜会報, 53, 260-265.
- 12) 高橋寿太郎, 本田和正, 正木淳二 (1982) 過排卵処理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.
- 13) Taya, K., Mizokawa, T., Matsui, T. and Sasamoto, S. (1983) Induction of superovulation in prepubertal female rats by anterior pituitary transplants. J. Reprod. Fert., 69, 265-270.

Chimaera rats from aggregated embryo

亀山賢次・菅原七郎・小島 勝・正木淳二

Kenji KAMEYAMA, Shichiro SUGAWARA,
Masaru KOJIMA and Junji MASAKI

東北大学農学部家畜繁殖学教室

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture,
Tohoku University.

Mammalian chimaeras are used for research on embryology and interaction of distinctive cells in genetic disorder. Though chimaeric mice have been produced on a large scale, there are a few reports concerning chimaeric rats. The present study was attempted to produce chimaeric rats by aggregation between Wistar and Hybrid (Wistar x Brown Norway) embryos. The results obtained are summarised as follow.

1. Aggregated embryos cultured in modified medium (Dulbecco's PBS (→ with Whitten's nutrient saline) or Ham's F-12 with 5% fetal calf serum developed to blastocyst in higher proportion compared with modified medium with 10% bovine serum albumin.
2. A total of 185 aggregated embryos was transferred and eighteen of them developed to chimaeric rats. Fifteen of the chimaeric rats grew up to adult.
3. Sex ratio of chimaeric rats was 2:1 (♂:♀).
4. All of the chimaeric rats had reproductive ability.

緒 言

哺乳動物のキメラは、二つの異なった細胞集団の利用による発生現象の解明や、遺伝的組成の違う細胞の相互作用などの研究に用いられ、さらにキメラ胚の移植は、母体内環境との相互作用の解明などにも利用されている。今後は、家畜における発生機構の解明や、マイクロ・マニピュレーションによる新しい繁殖技術の開発にも役立つと考えられる。これまでのところ、キメララットに関する研究報告は少なく、応用段階での成果は

ほとんど得られていない。したがって、本研究ではラットにおける集合キメラ作出のための胚の発生時期、培養法などの諸条件を調べ、キメラ個体の作出を試みた。

材料および方法

予備実験として、培養液のpH、胚の採取時期等を検討した。培養液のpHに関しては、pHを7.4と7.0に調整した修正培養液を用いた場合、至適pHが7.0であることがわかった。また、胚の採取時期は、妊娠4日目の9:30と13:30を比較した。同じ8細胞期胚でも、早い時期に採取したものは、透明帯処理時に用いるプロナーゼにより、割球が分離しやすく、また集合しにくく思われた。13:30に採取した8細胞期胚は compaction を起こしており、透明帯除去や集合の操作がやりやすかった。

以上の結果を考慮して、次のように実験を行った。

DonorにはWistar系albino成熟未経産雌ラットを用い、一方にWistar系雄ラット、他方にBrown Norway系雄ラット（暗褐色毛：大村実験動物センター産）と交配させ、2種類の胚（Wistar, Wistar × Brown Norway: Hybrid）を得た。胚は、精子を確認した日を妊娠第1日として、妊娠4日目の13:00～13:30に採取し、PBS 0.7mlに0.3mgのプロナーゼを溶解した溶液で5～7分処理して透明帯を除去した。その後、Phytohemagglutinin 0.5%，BSA 0.1%を含むPBS中で2種類の8細胞期胚を集合させた。

本実験に使用した培養液は、1) 修正培養液（Modified medium: DulbeccoのPBS（→にWhittenの栄養塩類を加えたもの。2価の重金属イオンをCa-lactateのみから供給）にBSAを0.1%加えたもの、2) 修正培養液に5%FCSを加えたもの、3) Ham's F-12に5%FCSを加えたもの、であり、pHはすべて7.0～7.1に調整した。

集合胚は、培養約20時間後に観察し、桑実胚または胚盤胞に発生したもののみを移植に供した。RecipientにはWistar系ラットを用い、Donorの交尾確認日に精管結紉雄により偽妊娠を誘起させた。移植は、偽妊娠4日目のRecipientにネンブタール麻酔下で、外科手術によって行った。

結果

胚盤胞への発生率は、修正培養液+5%FCS区の成績が最も良く、退行も少なかった。Ham's F-12+5%FCS区ではやや低下し、修正培養液+10%BSA区ではかなり低く、退行も多かった（table 1）。

移植成績（table 2）については、産子への発生率（産子数/移植胚数）はいずれも低かったが、Ham's F-12+5%FCS区の16.4%が最も良かった。

本実験で産まれた18匹のうち、15匹が離乳までに成育した。このうち被毛の色については、Wistar系の白色毛とHybrid（Wistar × Brown Norway: 腹部に白いスポット、前肢は白足袋状、他の部位は黒色）の黒色毛の混在する個体（キメラタイプ）が9匹、Hybridタイプが6匹であり、Wistarタイプの被毛をもつ個

体は皆無であった。性比は、キメラタイプ、Hybrid タイプともに 2:1 で雄の方が多かった。

考 察

集合キメラ胚の発生率は、FCS を添加した区で良好な成績が得られ、桑実胚あるいは胚盤胞への発生率は、二つの FCS 添加区で 90% を越えた。

移植成績については、培養区とはほとんど関係なく、どの区でも正常な胚盤胞あるいは桑実胚へ発生した集合胚を移植した場合産子が得られており、成功例が得られるものと思われた。しかし、産子への発生率は低かったので、移植技術などにまだ検討の余地があると思われる。産子数は全実験区を通じて平均 2.6 匹と低く、最高で 6 匹であった。産子数についても、移植技術の向上により増加させることができるとと思われる。

離乳までに成育した個体のうち、6 匹は Hybrid タイプであった。このように、片方の胚由来の毛色のみを示すキメラマウスについての報告はいくつかあるが、本実験で得られた Hybrid タイプの個体も、Wistar 胚由来の細胞が体表毛支配細胞群から欠損したのかも知れない。しかし、毛色において Wistar タイプは無く、キメラタイプにおいても Wistar 胚由来の白色毛の占める割合が半分以上の個体は見られず、頭部のみ白色毛の混ざった個体が多かったことから、集合後の Wistar 胚由来細胞と Hybrid 由来細胞の発生能力（速度）に差があることが示唆された。さらに、毛色については、その発現機構や、遺伝子についても検討が必要であると思われる。

性比については、個体数は少ないが、2:1 で雄の方が多かった。これは、XX/XY のキメラが雄になる傾向があるためと思われる。キメラ個体の繁殖能力について戻し交配やキメラ同士の交配を行った結果、すべての個体が生殖能力を有していることが認められた。

Table 1. Effect of culture media on development of the rat aggregation embryo (%)

Culture medium	No. of aggregation embryo	Stage of development 20h after aggregation		
		morula	blastocyst	degeneration
Modified medium +10%BSA	75	30(40.0)	35(46.7)	10(13.3)
Modified medium +5%FCS	79	11(13.9)	66(83.5)	2(2.5)
Ham's F-12 +5%FCS	85	18(21.2)	62(72.9)	5(5.0)

Table 2. Transplantation of the aggregated rat embryo (Wistar embryo ↔ Hybrid embryo (Wistar X Norway Brown)) to Wistar recipient

Culture medium	No. of recipients	No. of transferred	No. of pregnant females(%)	No. of offsprings(%)
Modified medium +10%BSA	5	62	3(60.0)	6(9.7)
Modified medium +5%FCS	4	62	1(25.0)	2(3.2)
Ham's F-12 +5%FCS	4	61	3(60.0)	10(16.4)
Total	13	185	7(53.8)	19(9.7)

Table 3. Coat pattern of the rat chimaeras

Sex	Wistar type	Hybrid type	Chimaera type	Total
Male	0	4	6	10
Female	0	2	3	5
Total	0	6	9	15

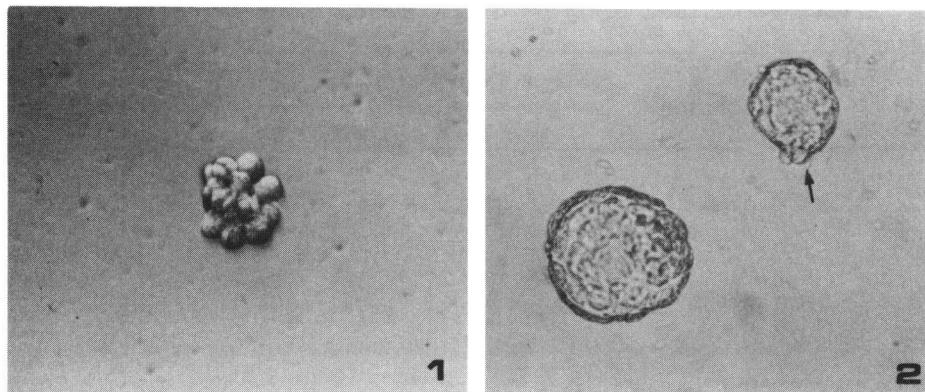


Fig. 1 Rat embryos aggregated (X 100).

Fig. 2 Blastocyst was developed from aggregation embryos 20h after incubation.

Small blastocyst was developed from zona-free non-aggregated embryo for contrast (arrow)(X 100).

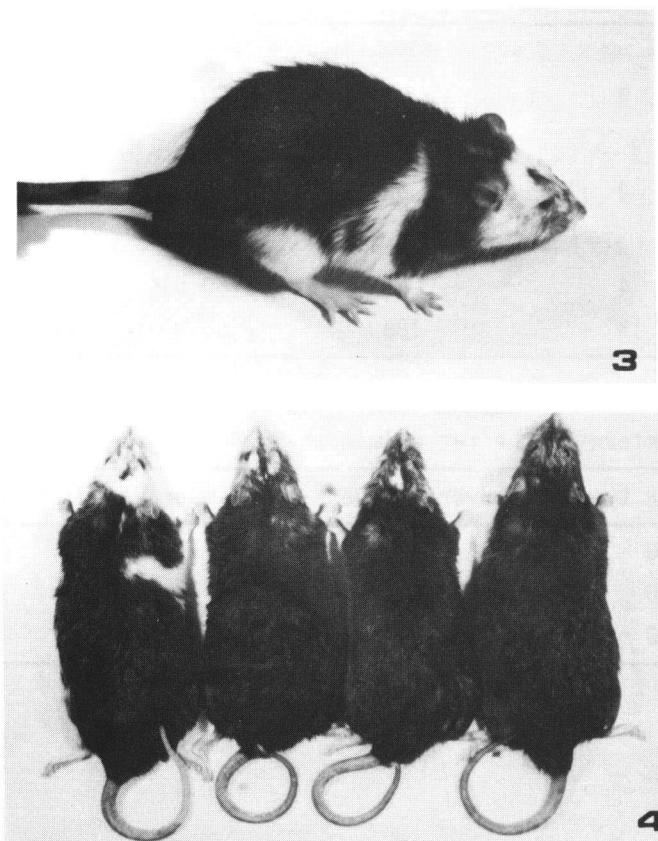


Fig. 3,4 Wistar \leftrightarrow Hybrid(Wistar X Norway Brown) chimaeras showing chimaera type on coat pattern.

文 献

- 1) Mintz, B. (1962) Experimental study of the developing mammalian egg:removal of the zona pellucida. *Science*, 138, 594-595.
- 2) Mintz, B., Gearhart, J.D. and Guymont, A.O. (1973) Phytohemagglutinin-mediated blastomere aggregation and development of allophenic mice. *Dev. Biol.*, 31, 195-199.
- 3) Mayer, J.F. and Fritz, H.I. (1974) The culture of preimplantation rat embryos and the production of allophenic rats. *J.Reprod.Fert.*, 39, 1-9.
- 4) Mullen, R.L. and Lavail, M.M. (1976) Inherited retinal dystrophy:Primary defect in pigment epithelium determined with experimental rat chimaeras. *Science*, 192, 799-801.
- 5) Yamamura, K. and Markert, C.L. (1981) The production of chimeric rats and their use in analysis of the hooded pigmentation pattern. *Develop.Genet.*, 2, 131-146.
- 6) McLarren, A. and Bowman, P. (1969) Mouse chimaeras derived from fusion of embryo differing by nine genotypic factors. *Nature, Lond.*, 224, 238-240.
- 7) Horiuchi, T., Ohta, M., Kojima, M., Takahashi, J., Sugawara, S. and Masaki, J. (1983) In vitro culture of rat eggs from eight-cell to blastocyst in a modified Dulbecco's medium. *Jap.J.Fert. and Ster.*, 28, 319-322.

Effect of EDTA on development of 8-cell golden hamster
embryos in Vitro

石島芳郎・小野寺政一・加賀谷朋子

Yoshiro ISHIJIMA, Masakazu ONODERA

and Tomoko KAGATANI

東京農業大学畜産学科家畜繁殖学研究室

Laboratory of Animal Reproduction, Department of Zootechnical Science,
Tokyo University of Agriculture.

This paper describes the effect of EDTA on development of 8-cell golden hamster embryos to the blastocyst stage in vitro. Eight-cell embryos were recovered from mated hamsters that had been superovulated with PMSG. Embryos were cultured for 48 hours in a modified Krebs-Ringer bicarbonate solution(modified KRB solution) containing various concentration of EDTA. At the end of the culture, the numbers of embryos developing to the blastocyst stage were recorded.

The percentage of 8-cell embryos(approx. 70 hours post coitum) developing into blastocysts was improved by adding EDTA to the medium(38.5 to 85.2% with EDTA vs. 16.7 % without EDTA). A marked effect of 40 μ M EDTA on development were found.

緒 言

ゴールデンハムスターの初期胚の体外培養は極めて困難で、現在、8細胞期から胚盤胞に発達させるのがやっとの現状にある。しかも、その発生率は、遅れた8細胞期胚からの培養ではBavister

et al. (1) が66~69%と比較的高い成績を得ているものの、早期の8細胞期胚からではHashizume et al. (2) が27.9%, Bavister et al. (1) が57%, DeMayo et al. (3) が39.6%, Carney and Bavister (4) が55%と低率の結果しか得ていない。

著者らは、近年、マウスの体外受精由来胚や1細胞期胚を胚盤胞へ高率に発生させるのに有効とされるEDTA添加培養液でゴールデンハムスターの8細胞期胚を培養したところ、高率に胚盤胞に発達させることに成功したので概要を報告する。

材料および方法

1) 供試動物

当研究室において閉鎖集団として維持しているゴールデンハムスターの成熟未経産雌（生後2~4カ月齢）を用いた。

2) 採卵

膣粘液当日 (Day 1) の午前10時に30 IU のPMSGを皮下注射し、Day 4 の午後6時に雄と同居させるPMSG単用過排卵誘起法を用い、交配後約70時間に子宮を常法により灌流して、8細胞期胚を採取した。

3) 培養液

Brinster(1965)の修正KRB液を基礎とし、NaCl量を調節して浸透圧を190m-osmolとした(Table 1)。EDTAはNa₂EDTA（第一化学）を用い、同培養液中に2.5, 10, 20, 40, 100および500μMを添加した。

4) 培養条件および培養法

培養は、炭酸ガス5%、空気95%、湿度100%、温度37°Cの条件下で行った。培養法は、プラスチックシャーレ(35×10mm)に0.5~0.6mlの培養液の小滴を作り、上から流動パラフィンで覆う微小滴培養法を用いた。

5) 観察

いずれの培養胚も48時間後に実体顕微鏡で観察し、発育の程度を記録した。発生率はこの時間に胚盤胞に達した数で算出した。

Table 1 Composition of modified KRB solution

Component	g/l
NaCl	1.904
KCl	0.356
CaCl ₂ · 4H ₂ O	0.311
KH ₂ PO ₄	0.162
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.294
NaHCO ₃	2.106
BSA	1.000
Glucose	1.000
Na-Pyruvate	0.028
Na-Lactate	0.802
Streptomycin	0.050
Penicillin	100(IU/ml)
m-Osmol	190

結果および考察

修正KRB液に各濃度のEDTAを添加し、ゴールデンハムスター8細胞期胚の培養を試みた。その結果はTable 2に示すとおりである。

Table 2 から明らかなように、培養48時間後の胚盤胞への発生率は、EDTAを添加しない場合は16.7%と低率であったのに対し、EDTAを添加した場合は明らかに発生率に改善がみられ、とくに40μM以上の投与で73.3%～85.2%という高率の発生率が得られた。

これまでの報告では、Hashizume et al. (2)が排卵後62～64時間(およそ交尾後70～72時間に当たる)の8細胞期で27.9%，Bavister et al. (1)が精子による卵子活性後の時間で54～55時間のもので57%，同様61～62時間のもので69%，DeMayo et al. (3)が交尾後72時間のもので39.7%，さらにCarney and Bavister (4)が卵子活性後54時間のもので55%というのが、それぞれの報告者の最高の値である。今回得られた発生率はこれらの値を上回るものであった。

従来、EDTAはマウスの1細胞期胚や体外受精由来胚の培養における2-cell blockの解除の目的で利用されていている物質であるが(5,6,7)，今回の実験の結果、ハムスターのような培養の困難なものでは、8細胞期以降の胚発生にも効果のあることが示唆された。こ

Table 2 Effect of EDTA on development of

8-cell hamster embryos in vitro

Concentration of EDTA (μM)	No. of embryos cultured	No. of blastocysts*	(%)
0	66	11	(16.7)
2.5	26	10	(38.5)
10	28	16	(57.1)
20	25	14	(56.0)
40	27	23	(85.2)
100	30	22	(73.3)
500	18	14	(77.8)

*No. of blastocysts scored after 48h in culture



Fig. 1 Blastocyst developed from 8-cell stage cultured in vitro for 48 hours

のようなEDTA添加の効果がどのような作用によるかはこの実験では判然としないが、マウスの場合培養液中に混入する種々の金属の除去が考えられている(7)。

要 約

ゴールデンハムスターの8細胞期胚の体外発育に及ぼすEDTA添加効果を検討した。修正KRB液に2.5～500μMのEDTAを添加し、無添加の対照区と発生率を比較した。その結果、EDTAの添加により胚盤胞への発生率は明らかに改善され(対照区16.7%に対しEDTA添加区38.5～85.2%)、とくに40μMの添加で最大の効果がみられた。

文 献

- 1) Bavister, B.D., Leibfried, M.L. and Lieberman, G. (1983) Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biol. Reprod.*, 28, 235-247.
- 2) Hashizume, R., Ito, M., Dowaki, M., Kashiwabara, H., Tani, S., Aoyama, S., Ishijima, Y. and Goto, N. (1981) Effect of osmotic pressure on the in vitro cultivation of hamster ova. *Nihon Univ. J. Med.*, 23, 33-39.
- 3) DeMayo, F.J., Rawlins, R.G. and Dukelow, W.R. (1985) Xenogenous and in vitro fertilization of frozen/thawed primate oocytes and blastomere separation of embryos. *Fertil. Steril.*, 43, 295-300.
- 4) Carney, E.W. and Bavister, B.D. (1985) Development of hamster preimplantation embryos in vitro. *Biol. Reprod.*, 32 (Suppl. 1), 98.
- 5) Abramczuk, J., Solter, D. and Koprowski, H. (1977) The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. *Develop. Biol.*, 61, 378-383.
- 6) Suzuki, H., Hoshi, M. and Toyoda, Y. (1984) Effect of EDTA on the preimplantation development of mouse embryos fertilized in vitro. *Pro. Intern. Symp. on Mammal. Reprod. and Early. Dev.*, Tokyo, pp38.
- 7) 木村資亜利、小島博子、横山峯介、勝木元也(1985)マウス受精卵の体外培養法の検討、哺乳卵研誌, 2, 43-44.

マウス・ラット異種間反復移植血清が
マウス胚盤胞の着床におよぼす影響について

Effect of rat serum collected with transfers of mouse eggs into rat uterus repeated on the implantation of mouse blastocysts

辻井 弘忠 伊藤 伸

Hirotada TSUJII and Shin ITO

信州大学農学部家畜育種・繁殖学教室

Laboratory of Animal Breeding and Reproduction, Faculty of Agriculture,
Shinshu University.

Present experiments were performed to examine the possibility that the limited development of mouse eggs transferred into rat uterus was due to an immunological rejections. Mature virgin female mice of the ICR strain were used as the donor and recipient. Three kinds of media were used; (1) KRP buffer; (2) 20% rat serum + KRP buffer; and (3) 20% rat serum was after transfer of mouse eggs into rat uterus especially when the transfer was repeated + KRP buffer. Eggs culture and exposure to 3 kinds of media were transfer to the mouse uterus. As summarized in Table 1, exposure of blastocysts to medium (3) caused a significant ($P < 0.05$) inhibition of the implantation rate. It was suggested from the above results that a species-specific antibody appeared after transfer of mouse eggs into rat uterus especially when the transfer was repeated.

緒論：マウスの卵子をラットの生殖器内に移植すると、マウスの卵子は着床し、*egg cylinder*にまで発育するが、それ以降の胚の発育はみられず、退行していくのが観察されている。^{1,2)}この退行の原因が何によって起こるのかは不明である。角田らは、家兎とラ

ットの異種間反復移植において、抗体産生の可能性があることを報告している。そこで、マウスとラットの異種間移植においても抗体産生の可能性があるか否かを検討した。本実験は角田らの方法に基づいて³⁾、マウス胚盤胞をラット子宮内に反復移植したラット血清を、直接マウス胚盤胞にさらし、その後、マウス卵子の着床および着床後の発達におよぼす影響を調べ、抗体産生の有無を検討した。

材料および方法：反復移植には、ICR系処女マウス（生後5～10週齢、体重19.0～29.0g）をDonorに、Wistar系処女ラット（生後3ヶ月齢体重220～250g）をRecipientに使用した。Donorのマウスは、膣垢像が発情前期像を示した夕方雄と一晩同居させ、翌朝、膣栓の有無で交尾を確認し、その日を妊娠1日目とした。採卵ならびに移植にはKRB液（pH7.2）を用いた。妊娠4日目のマウスの子宮を灌流して胚盤胞を採卵した。Recipientのラットは膣垢像が発情前期を示した日の夕方、精管結紮の雄と一晩同居させ、翌朝膣栓を有したものと偽妊娠とし、その日を偽妊娠一日目とした。移植は偽妊娠5日目のラットの子宮上部に、妊娠4日目のマウス胚盤胞を用いて行った。移植3週間後、ラットの性周期が戻ってきたものを再度移植を行った。移植総計4～5回反復後、血清を採取した。この血清を異種間反復移植血清として実験に供した。

異種間反復移植血清の着床阻害作用については、Donor, Recipient共にICR系処女マウスを用いた。灌流、暴露および移植には、（1）KRB液、（2）20%正常ラット血清+KRB液、（3）20%異種間反復移植血清+KRB液、の3群に分けて行った。移植方法は、妊娠4日目のマウス胚盤胞を、精管結紮雄で偽妊娠を誘起した偽妊娠3日目のマウス子宮内に行った。採卵後1時間各液に暴露後移植した。剖検は、偽妊娠7日目に行った。着床部位の判定はポンタミンスカイブルー反応を用い、着床部位を直ちにブアン固定、包埋後、8μの連続切片をつくり、ヘマトキシリン・エオシン重染色を行った。胚の存在の有無については100～400倍の検鏡下で観察を行った。

結果：異種間反復移植血清で暴露した胚盤胞の着床数について表1に示した。（1）KRB群においては、12個体のマウスに155個のマウス胚盤胞を移植し、10個体が妊娠した。ポンタミンスカイブルー反応の結果、88個の着床部位を得、検鏡下で胚の存在数は84個であった。（2）20%正常ラット血清+KRB群において、7個体のマウス子宮内に107個の着床部位を得、検鏡下での胚の存在数は60個であった。（3）20%異種間反復移植血清+KRB群において、8個体のマウスに100個の胚盤胞を移植し、5個体が妊娠した。ポンタミンスカイブルー反応で40個の着床部位を得、検鏡下での胚の存在数は4

Table 1. Effect of rat serum collected with transfers of mouse eggs into rat uterus repeated on the implantation of mouse blastocysts.

Exp. No.	Recipient mouse no.	No. of eggs transferred.	No. of implantations (%)	No. of live fetuses (%)
(1)	12	155	88 ^a (56.8)	84 (54.2)
(2)	7	107	60 ^b (56.1)	60 (56.1)
(3)	8	100	40 ^c (40.0)	40 (40.0)
Total	27	362	188	184

a > c ($P < 0.01$), b > c ($P < 0.05$)

0個であった。

これら3群の着床率を比較すると、(1) K R B 群は 56.7%、(2) 20% 正常血清 + K R B 群は 56.1%、(3) 20% 異種間反復移植血清 + K R B 群は 40% であった。これらの値を X^2 検定したところ、(3) 異種間反復血清群の着床率は (1) K R B 群および (2) 正常血清群の着床率に比べて有意に低かった。

なお、組織標本を観察した結果は、3群共胚は卵黄腔内に位置し、egg-cylinder を形成しており、胚の発生段階においては差がみられなかった。

考察：角田らは、ラットの受精卵を家兎子宮内に反復して移植することによって、種特異抗体が生じたことを推察している。また、同様に K I R B Y e t a l⁴⁾ はマウス胚盤胞の腎臓における発育は Recipient マウスを移植抗原で予備免疫することにより阻害され、また、子宮外における胚盤胞の発育は Recipient の子宮外に繰り返し胚盤胞を移植することにより強くなることから胚盤胞に免疫性を有することを報告している。⁵⁾

本実験において、反復移植血清群は、他の K R B 群およびコントロール血清群に比べ有意に低い着床率で、マウス胚盤胞をラット子宮内に反復移植することによって、マウス卵に対する抗体が、ラット血清中に産生される可能性があることが推察された。

著者らは、マウス卵子をラット生殖器内に移植し、マウス卵子が子宮内で着床し、egg-cylinder にまで発達するが、それ以降胚の発達はみられず退行していくのを観察して

いる。この胚の退行の原因が何によっておこるかについては、まだ不明である。マウス受精卵をラット生殖器内に移植することによって生じた抗体がマウス胚のそれ以降の発育を阻害する可能性のあることが本実験の成績より推察された。

角田らは³⁾、家兎とラットの異種間移植において、家兎およびラット受精卵を移植した家兎の血清とラットの各臓器抽出液間で免疫電気泳動を行った結果、2回目の移植後の血清中に、移植前および1回目の移植後の血清中にみられない新たな沈降線がみられる個体があったことを報告している。しかし、本実験において、免疫電気泳動、抗原寒天板、抗体寒天板、PCA反応などの方法を用いて異種間反復移植血清の抗体の検出を試みたが、現在のところまだ検出できていない、今後さらに、この点について検討する必要があると思われる。

主要論文

1. Tsujii, H., T. Shigeta and M. Yoshida (1980) Jap. J. Zootech Sci., 51, 680-682
2. Tsujii, H. and S. Ito (1985) Jap. J. Fert. Ster., 30, 265-268
3. 角田幸生, 入谷 明, 西川義正, (1978) 日畜会報, 49, 96-103.
4. Kirby, D.R.S., W.D. Billington and D.A. James. (1966) Transplantation, 4, 713-718
5. Kirby, D.R.S. (1968) Transplantation, 6, 1005-1009

卵巣灌流法の手技と成績

Procedure and results of in vitro perfusion
of the rabbit ovary.

北井啓勝・大庭三紀子・鈴木秋悦・飯塚理八

Hirokatsu KITAI, Mikiko OHBA, Shuetu SUZUKI
and Rihachi IIZUKA

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Keio University School of
Medicine

The rabbit ovary were perfused after ligation of branches of the ovarian artery and cannulation of this artery. Perfusion apparatus consisted of a pulsatile rotary pump, an oxygenator and a chamber with circulating medium. Tissue culture medium 199 was supplemented with insulin, heparin and antibiotics, and oxygenated by gas mixture of 95% O₂ and 5% CO₂. Follicle rupture, maturation of oocytes and progesterone production of the perfused ovary were observed after administration of hCG or other agents into the medium. Although maturation of oocytes and synthesis of progesterone of the perfused ovary were shown at the same rate as the in situ ovary, follicle rupture occurred earlier. Prostaglandin, histamine and norepinephrine did not cause maturation of oocytes nor steroid production but made follicles rupture. No sequence of production of histamine and prostaglandin or interrelationship in their activity could be detected in the ovulatory process.

はじめに

排卵は、卵胞卵の成熟、ステロイドホルモンの合成および卵胞壁の破裂より構成される複雑な過程である。最近、性腺刺激ホルモン投与を含む排卵誘発法の進歩により排卵障害の治療率は向上しているが、多胎の頻度の増加および排卵率と妊娠率の解離など、解決すべき問題は多い。このためには、卵巣内部における排卵機序の解明が必要と考えられる。

排卵過程には、ゴナドトロピン刺激により合成されるプロスタグランジンをはじめ、ヒスタミン、ノルエピネフリンなどの中間物質、プラスミノーゲンおよびコラゲナーゼなどの酵素、ステロイドホルモンなどが関与し、毛細血管の透過性亢進、血流の変化、卵胞壁の菲薄化が生じることが知られている。¹⁾

しかし、これらの中間物質は生体内に広く分布し、in vivo の実験では卵巣内の濃度だけを独立に変化させることは困難である。また、卵巣または卵胞を器官培養する手法では、血流および血管透過性の変化に関する因子が検討できない。卵巣灌流法は循環を保ったまま卵巣を体内環境より切り離し器官培養する方法であり、²⁾排卵機序の研究上有力な方法である。また、排卵過程を連続して観察することが可能であり、卵の成熟、ステロイドホルモン合成などの多くの情報を同時に得ることができる。

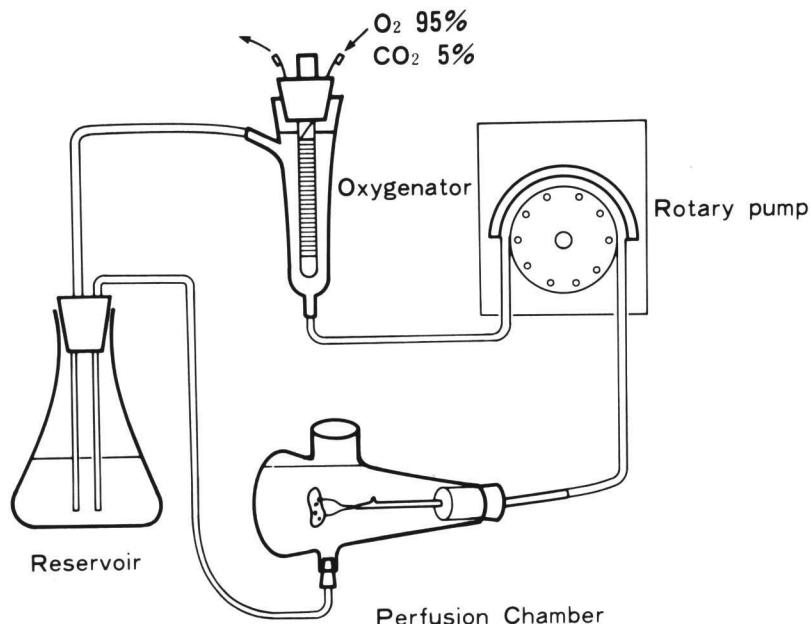
方 法

実験動物：3週間以上隔離飼育した体重3kg以上の成熟雌ウサギを用い、ネンブタール50mg/kg静注にて麻酔、ヘパリン700単位静注後無菌的に開腹する。

灌流装置：灌流用ローラーポンプ（コールパーマー社、マルチポンプPA-41A型）に0.8mm内径のタイゴン管を取りつけ、培養液を律動的に流す。卵巣容器はガラスの三角フラスコを改造し周囲に37°Cの温水を循環させて加温した。酸素化装置は、1mm外径の細いテフロンチューブ10mを試験管に巻き、チューブに95% O₂および5% CO₂の混合ガスを通し、試験管周囲に流した培養液を酸素化した（図1）。これらの器具はガラス管およびタイゴン管にて接続し、試料の注入部および培養液の採取部にはラテックスゴム管を付けた。カニューレへの接続部には点滴注射用のタコ管を取りつけ、卵巣の空気栓塞を防止した。

灌流液：Hanks液組成をもつMedium 199を用い、regular insulin 20IU/l, heparin 200IU/l、

図 1



streptomycin 50 mg/ℓ、penicillin 75 mg/ℓを加えpH 7.4に調製した。灌流量はウサギの平均血液量に相当する150 mlとし、灌流速度は卵巣血流と同じ1.5 ml/分とした。

灌流手技：卵巣は、大動脈より直接分枝する卵巣動脈により栄養されているが、他に側方で後腹膜血管より血流を受ける。4-0号絹糸を用い卵巣子宮間の勒帶を結紮切断後、卵巣動脈の血流を保ったまま、卵巣動脈より卵管および子宮方向に分枝する卵管枝を結紮する。卵巣・卵管系間を切断後、卵巣を後腹膜より持ち上げ、卵巣後腹膜間の血管を脂肪組織とともに結紮切断する。卵巣への循環を確保するため卵巣に付着する腹膜上の小血管を結紮する。

カニューレは、外径3 mmの硬質ガラス管を火炎中で引き、先端を研磨して鋭角とした後、少し焼いて丸みを付ける。先端の径は21G程度とし、急に太くして動脈内に入る部分を短くする。

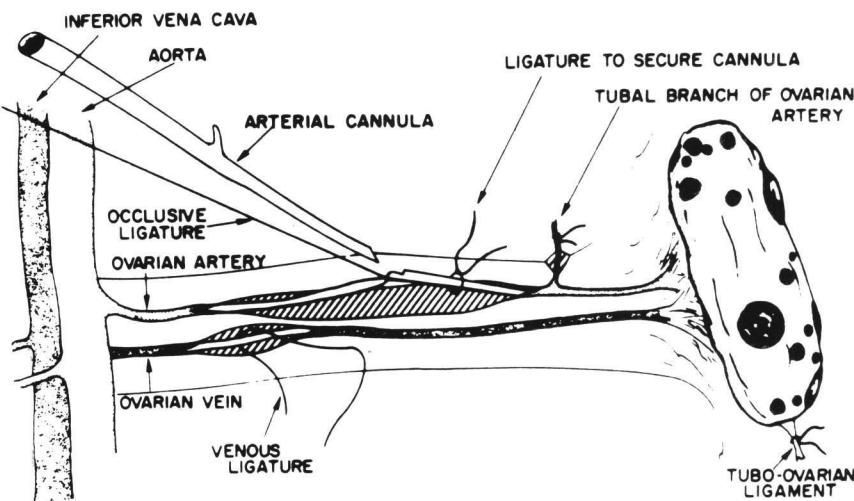
小鋸子にて脂肪組織を除き卵巣動脈を単離し、2%プロカイン液を動脈に滴下し拡張させる。卵巣静脈は、暗赤色で太く拍動性がないが、卵巣動脈は赤色で、壁は白色で厚く拍動する。卵巣動脈の大動脈側を結紮し、糸を引き血管を緊張させ小型曲鉄にて血管壁を一部切開する。灌流液を満たした前述のカニューレにタコ管を取り付け、卵巣動脈にカニューレを挿入し絹糸にて固定する。空気が動脈に流入しないよう、またカニューレが血管に深く入り卵管枝に侵入しないよう注意する(図2)。カニューレに接続した注射器より培養液を注入すると、卵巣は脱血され均一に白色となる。

観察：灌流開始後、hCG 50単位または他の排卵刺激物質を投与して、その後10または12時間灌流する。灌流卵巣の排卵は平均6時間でおこり、12時間の観察中に排卵は完了する(図3)。³⁾

排卵の際には、卵胞の増大、卵胞頂部の壁の菲薄化、頂部の突出すなわち stigma 形成および卵胞の破裂が経時的に観察できる。卵胞破裂にともない卵丘細胞に包まれた卵が卵巣表面に浮かび、粘稠性の卵胞液により卵巣表面とつながれ、容器底に落下することはまれである。時に顆粒膜細胞のみが卵巣表面に突出し、卵放出が遅れる場合があり、卵が卵胞外に出た時刻を排卵時刻とする。

灌流液中に出て卵を、パストールピペットにて吸引し、0.1%ヒアルロニダーゼ(シグマ社)を含む培養液

図2



中で顆粒膜細胞を除く。卵より少し細い口径のガラスピペットによる機械的除去も併用する。四角にワセリンとワックスの混合物を付けたカバーガラスにてスライドグラス上に卵を静置後、2%グルタルアルデハイドを含むPBSにて1分間固定し、10%ホルマリンを含むリン酸後衡液中で保存する。水洗後、90%エタノールにて脱水し、45%酢酸にて溶解した0.25%ラクモイド色素(GIBCO)にて染色する。

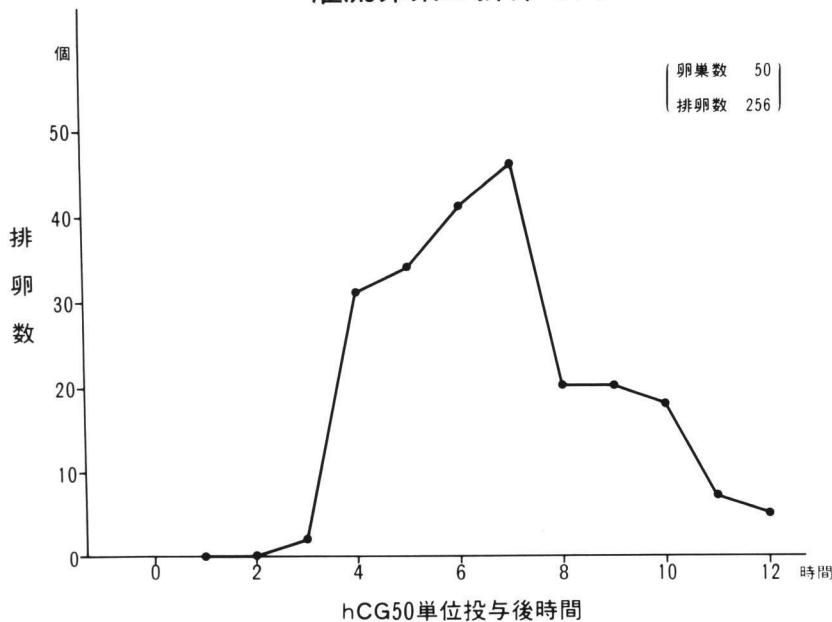
減数分裂の再開にともない、染色質の凝集、核小体消失、卵核胞の核膜消失、染色体出現、染色体の赤道面への配列(第1減数分裂中期)、染色体の分裂と第1極体の形成、染色体の凝集、そして第2減数分裂中期に到る一連の変化がみられる。変性した卵には、細胞質の変形または不均一化、細胞質内空胞、染色体の分散などの変化がみられる。

排卵時刻および排卵数の他、各卵巣の排卵効率を計算する。排卵効率は、排卵数を排卵数と灌流後卵巣に残存する直径1.5mm以上の成熟卵胞数の合計により除してパーセント表示したものである。各卵巣ごとに成熟卵胞数が相違しているが、排卵効率により卵巣間の排卵の比較が可能になる。卵巣は6個を一群とし、その平均値を求めた。

灌流卵巣のホルモン産生を測定するため、経時に灌流液を採取する。灌流装置は、タイゴン管が用いられ灌流液には血清が含まれないため、極性の少いステロイドは吸着されやすい。プロゲステロンは最も吸着されやすく、半減期は約7時間であり、灌流液に牛血清アルブミン1mg/mlを加えた場合にも有意差は認められなかった。プロスタグランジンF₂αは、このような吸着ではなく灌流液中に存在することが確認されている。

図3

灌流卵巣の排卵時間



結 果

1) hCG投与

排卵はhCG 50 単位投与後6時間を中心に分布し、平均排卵時間5.7時間となった(図4)。排卵卵は33%が卵核胞期、65%が第1減数分裂中期、2%が第2減数分裂中期となり、変性卵は25%に認められた。図6の成熟率は、卵核胞を持たない卵の割合を示す。排卵効率は、同一個体の左右卵巢ではよく相關

図4

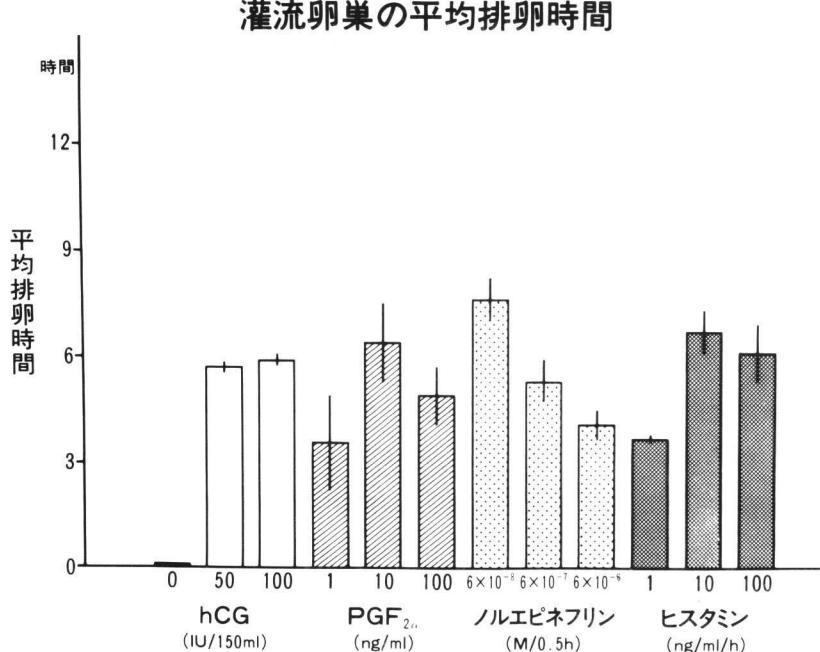
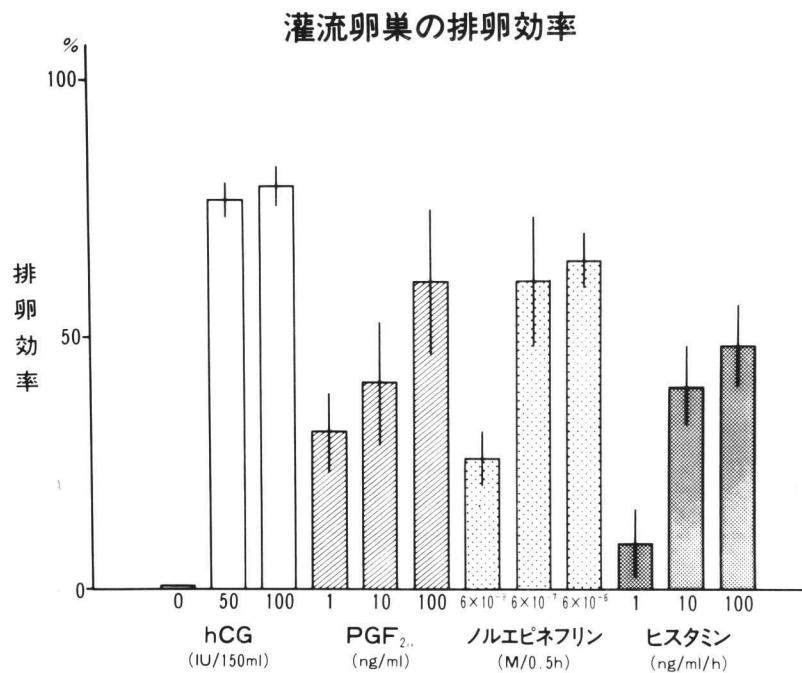


図5



し、hCG 50単位では平均79%となった(図5)。

2) プロスタグランジン $F_2\alpha$ 投与

灌流液に $1\text{ng}/\text{ml}$ を一回投与しただけで排卵がみられ、 $100\text{ng}/\text{ml}$ 投与時の排卵効率は66%となった。後者の排卵時間は4.9時間となり100%の排卵卵が卵核胞をもっていた。 $10\text{ng}/\text{ml}$ 投与では排卵効率41%、 $1\text{ng}/\text{ml}$ 投与では排卵効率32%となり、低濃度では排卵効率が減少したが、卵核胞をもつ排卵卵はそれぞれ82%および100%と高率にみられた。

3) ヒスタミン投与

ヒスタミンを毎時間 $1\text{ng}/\text{ml}$ 、 $10\text{ng}/\text{ml}$ および $100\text{ng}/\text{ml}$ の濃度で灌流液に投与した時、それぞれの排卵効率は、9%、40%および46%となり、ヒスタミン濃度の増加とともに排卵効率の増加が認められた。排卵時間は $100\text{ng}/\text{ml}$ 時のヒスタミン投与では平均6.1時間となり、排卵卵の91%に卵核胞が認められた。

ヒスタミン拮抗剤のうち、 H_1 ブロッカーであるクロルフェニラミン $67\mu\text{g}/\text{ml}$ の投与では、ヒスタミンにより誘発された排卵は抑制されなかった。 H_2 ブロッカーであるシメチジンを毎時間投与すると、 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1.0\mu\text{g}/\text{ml}$ および $10\mu\text{g}/\text{ml}$ と濃度を濃すにつれ $100\text{ng}/\text{ml}$ のヒスタミンの排卵効率は抑制された。

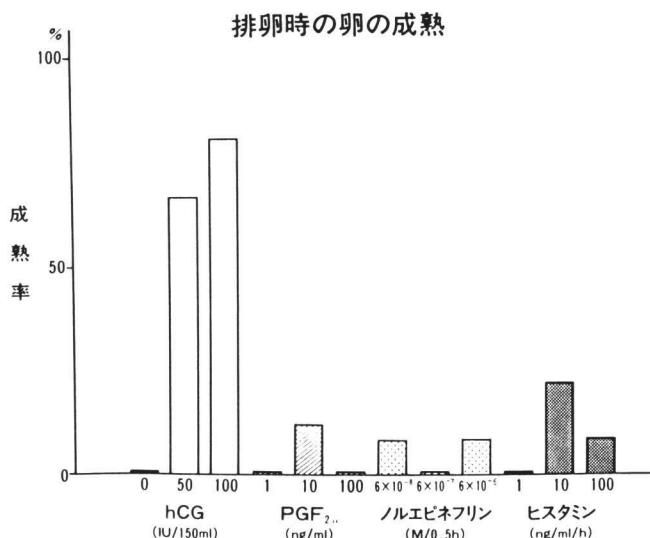
4) ノルエピネフリン投与

6×10^{-8} 、 6×10^{-7} および 6×10^{-6} M濃度のノルエピネフリンを0.5時間毎に投与後、灌流卵巣は排卵した。排卵効率は高濃度ほど高く 6×10^{-6} Mでは65%となり、また排卵時間は高濃度になるほど短く、 6×10^{-6} Mでは4.0時間であった。卵の成熟は、プロスタグランジン $F_2\alpha$ またはヒスタミンと同様に認められなかった。

5) シメチジンおよびインドメサシン投与による排卵の抑制(表1)

プロスタグランジン $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 投与後に、シメチジン $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 時の投与を追加すると、排卵時間は4.9時間より6.3時間に延長したが有意の差はなく、また排卵効率、卵の成熟および変性にも変化はみられなか

図6



った。

ヒスタミン $100 \text{ ng}/\text{ml}$ 時の投与に加えて、インドメサシン $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ を1回投与した場合には、排卵の制はみられず、卵の成熟には変化はなかった。排卵時間は6.1時間から8.1時間に延長したが有意の差はみられなかった。

6) hCG投与後のステロイド産生 (図7)

hCG を投与せずに成熟卵胞をもつ卵巢を灌流した時には、灌流液のプロゲステロン濃度は $10 \text{ ng}/\text{ml}$ 以下で増減はみられず、プロゲステロン産生は認められなかった。hCG を50単位または100単位灌流液に投与すると、投与後4時間に採取した灌流後のプロゲステロン濃度が最高値となった。hCG 5単位を投与した群では6個中4個の卵巣が排卵したのみで、排卵効率は26%であり、プロゲステロン産生は50、100単位に比較して低値であった。

7) プロスタグラランジンほか投与時のステロイド産生 (図8)

プロスタグラランジン $100 \text{ ng}/\text{ml}$ 1回投与またはヒスタミン $100 \text{ ng}/\text{ml}$ 每時間投与をすると、卵胞破裂はみられたがプロゲステロン濃度は上昇せず、灌流液のみの群との有意差は認められなかった。

ノルエピネフリン $6 \times 10^{-6} \text{ M}$ 10.5 h を投与すると平均 $20 \sim 40 \text{ ng}/\text{ml}$ のプロゲステロン濃度がみられたが、hCG 群に比較して有意に低い濃度となった。

考 察

体外卵巢灌流法は、卵巣を生体内の調節機構より分離し、直視下の観察、各種薬剤投与および産生物質の分析を容易にするため、特に排卵過程の卵巣内機序の検討に有力な手段となる。

ゴナドトロピン投与后排卵までの時間は生体内では、9.8から14.5時間であり、灌流卵巣の排卵時間はこれに比べ短い。⁴⁾ この原因として、hCG が代謝されないために、高濃度で作用することが推測される。また、灌流液の侵透圧は、血液侵透圧の生理的範囲におけるが、高分子物質を灌流液に加えていないためコロイド侵透圧が低く、そのため、卵巣内の浮腫が早期に進行し卵胞壁の破壊を来たすとも考えられる。ほかに、本実

表 1

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

験では灌流速度が一定に設定されているが、排卵時には卵巣血流が増加すると報告されており、灌流圧の変動により排卵が促進される可能もある。

排卵した卵の成熟率は、ゴナドトロピン投与より排卵までの時間に比例して上昇する。Brackettの報告では、hCG投与後10時間に72.7%の卵が第2減数分裂中期に達しており⁵⁾、平均6時間で排卵される灌流卵巣からの卵には未熟卵が多い。灌流卵巣中の卵胞卵の減数分裂を進める過程は、ゴナドトロピン刺激後は生体内

図7

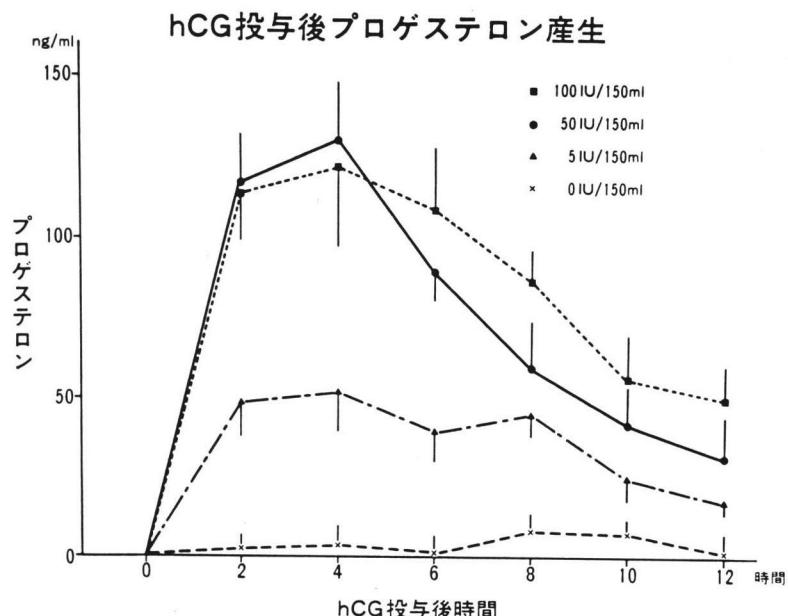
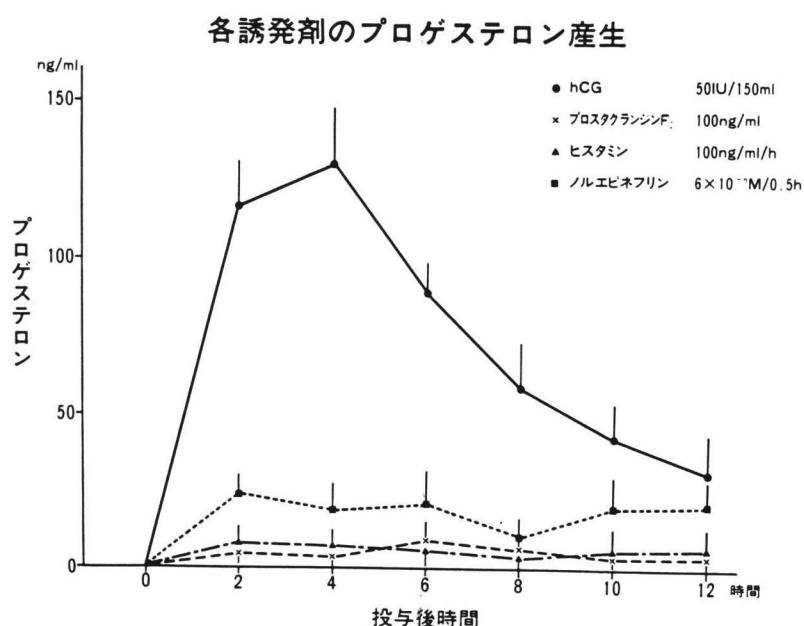


図8



と同様に進行すると推測される。灌流卵巣より排卵された卵は未熟であるが、この卵を hCG 投与後12時間まで培養後、交配したウサギ卵管に移植することにより生仔が得られている。⁶⁾

プロスタグラジン F₂α は、1ⁿg/ml、10ⁿg/ml および 100ⁿg/ml の濃度において灌流したウサギ卵巣の排卵を誘発し、排卵効率は 100ⁿg/ml が最大となる。この排卵効率は、50 あるいは 100 単位の hCG 投与後より低く、排卵を起こす最低の hCG 量である 5 単位の排卵効率よりは高い。プロスタグラジン F₂α が hCG に匹敵する排卵効率を示さないことは、卵巣内にプロスタグラジン以外の排卵を誘発する因子が存在することを示唆する。

サルおよびウサギ卵巣の排卵はプロスタグラジン合成阻害剤であるインドメサシンの投与により抑制され、^{7), 8)} またゴナドトロピン刺激後にプロスタグラジン F₂α および E が合成されるとの報告から、排卵過程にはプロスタグラジンが関与することはほぼ確実である。⁹⁾ プロスタグラジン単独投与による灌流卵巣の排卵は、プロスタグラジンが卵胞破裂に関与することを示す。しかし、プロスタグラジン F₂α は、卵の成熟には作用せず卵は未熟なまま排卵される。卵胞破裂と卵の成熟は別々の機序で進行すると考えられ、生体内でも dihydroxyridazineone¹⁰⁾ 投与により卵核胞期の排卵が見られたとの報告がある。

ゴナドトロピン刺激は、排卵時の卵巣に一連の変化を引きおこし、ヒスタミンを放出することが知られている。¹¹⁾ ヒスタミン投与が灌流卵巣に排卵を起こしたことは、排卵過程にヒスタミンが関与することを示唆している。このヒスタミンによる排卵が、H₂ ブロッカーであるシメチジンにより抑制されることは、排卵過程におけるヒスタミンの作用を示している。プロスタグラジンと同様にヒスタミンも卵の成熟を促進しないと考えられる。ヒスタミン拮抗剤は、灌流卵巣の hCG による排卵を抑制せず、またヒスタミンによる排卵卵胞の形態も hCG による排卵とは異なり、¹²⁾ ヒスタミンは排卵過程においてプロスタグラジンのように一次的な役割は持たないと考えられる。

プロスタグラジンとヒスタミンの排卵過程における相互作用については、インドメサシンはヒスタミンによる排卵を抑制せず、一方シメチジンはプロスタグラジンによる排卵を抑制せず、両者は独立して働くと思われる。しかし、排卵時間には若干延長が見られており、排卵の二次的な調節にヒスタミンが関与する可能性もある。

プロゲステロンの灌流卵巣による合成は hCG 投与後 4 時間にて最高濃度となり、ウサギに hCG を投与後の血中プロゲステロン濃度に類似した変化がみられる。¹³⁾ 6 時間以後にみられるプロゲステロン濃度の減少は、灌流装置への吸着によると考えられる。他の灌流卵巣のステロイド生産の報告では、タイゴン管の代わりにテフロンで内張りしたバイトン管を用いた場合、ステロイド濃度の減少は見られていない。¹⁴⁾ hCG を投与しない卵巣ではプロゲステロンの産生は見られず、プロゲステロン産生は LH 刺激後に誘発される。

ゴナドトロピンの代わりにヒスタミンまたはプロスタグラジン F₂α を投与した場合には、排卵つまり卵胞破裂はおこるがプロゲステロンが産生されない。プロゲステロンがコラゲナーゼを活性化して卵胞壁を破壊するとの報告があり。¹⁵⁾ また、プロゲステロン投与が排卵前期のラットに排卵を誘発することが知られている。¹⁶⁾ ヒスタミンおよびプロスタグラジンはプロゲステロンを介さずに卵胞破裂を起こしており、この過程にはプロ

ロゲステロンは必須でないと推測された。ノルエピネフリン投与時には軽度のプロゲステロン産生がみられる。黄体機能をノルエピネフリンが調節すると推測する報告もあり、排卵前の卵胞のステロイド産生に作用したり、あるいは血管収縮により血流を変化させステロイドの静脈内移行を促進させている可能性がある。¹⁷⁾ ¹⁸⁾

文 献

- 1) Espey L.L. (1980) Ovulation as an inflammatory reaction a hypothesis. Biol. Reprod. 22:73 - 106
- 2) Lambertsen, C.J., Greenbaum, D.F., Wright, K.H. and Wallach, E.E. (1976) In vitro studies of ovulation in the perfused rabbit ovary. Fertil. Steril. 27, 178 - 187
- 3) Kobayashi, Y., Wright, K.H., Santulli, R. and Wallach, E.E. (1981) Ovulation and ovum maturation in the rabbit ovary perfused in vitro. Biol. Reprod. 24:483 - 490
- 4) Harper, M.J.K. (1963) Ovulation in the rabbit. The time of follicular rupture and expulsion of the eggs, in relation to injection of luteinizing hormone J. Endocrinol. 26, 307 - 316.
- 5) Brackett, B.G., Mills, J.A., Jeitles, G.G. (1972) In vitro fertilization of rabbit ova recovered from ovarian follicles. Fertil. Steril. 23, 898 - 909.
- 6) Kobayashi, Y., Santulli, R., Wright, K.H., Wallach, E.E. (1981) Fertilizability of ova ovulated and recovered from rabbit ovaries perfused in vitro. Science 213: 1127 - 1128
- 7) Wallach, E.E., dela Cruz, A., Hunt, J., Wright, K.H and Stevens, V.C. (1975) The effects of indomethacin on HMG-HCG induced ovulation in the rhesus monkey. Prostaglandins 9:645 - 658.
- 8) O'Grady, J.P., Caldwell, B.V., Aluetta, F.J. and Speroff, L. (1972) The effects of and inhibitor of prostaglandin synthesis (indomethacin) on ovulation, pregnancy and pseudopregnancy in the rabbit. Prostaglandin 1:97 - 106.
- 9) LeMaire, W.J., Yang, N.S.T., Behrman, H.H. and Harsh, J.M. (1973) Preovulatory changes in the concentration of prostaglandins in rabbit Graafian follicles. Prostaglandins 3:367 - 376
- 10) Tyler, J.P.P., Matson, P.L., Collins, W.P. and Dukes, M. (1981) Dissociation of oocyte maturation and ovulation in mice pretreated with a derivative of dihy-

- dropyridazinone J. Reprod. Fertil. 62:455 - 458
- 11) Szego,C.M. and Gitin,E.S. (1964) Ovarion histamine depletion during acute hyperaemic response to luteinizing hormone. Nature. 201,682 - 685
- 12) Kobayashi,Y., Wright,K.H., Santulli,R., Kitai,H. and Wallach,E.E. (1983) Effects of histamine and histamine blockers on the ovulatory process in the in vitro perfused rabbit ovary. Biol. Reprod. 28,385 - 392
- 13) Waterston,I.W.,Mills,T.M. (1976) Peripheral blood steroid concentrations in the preovulatory rabbit, J. Steroid. Biochem. 7,15 - 17
- 14) Janson,P.O., LeMäire,W.J., Källfelt,B. , Holwes,P.V. Cajander,S. , Bjersin ,L. , Wigvist,N. , Ahrén,K. (1982) The study of ovulation in the isolated perfused ovary I. Methodology and pattern of steroidogenesis. Biol, Reprod. 26,456 - 465
- 15) Rondell,P. (1974) Role of steroid synthesis in the process of ovulation. Biol. Reprod. 10,199 - 215
- 16) Takahashi,M. , Ford,J.J., Yoshinaga,K. , Greep,R.O. (1974) Induction in hypophysectomized rat by progesterone. Endocrinol. 95,1322 - 1326
- 17) Adashi,E.Y., Hsueh,A.J.W. (1981) Stimulation of β_2 Adrenergic responsiveness by follicle stimulating hormone in rat granulosa cells in vivo. Endocrinol. 108:2170 - 2178
- 18) Ben-Jonathan,N., Braw,R.H., Laufer,N., Reich,R. , Bahr,J.M., Tsafiriri ,A. (1982) Norepinephrine in graafian follicles is depleted by follicle stimulating hormone. Endocrinol. 110:457 - 461

下垂体性性腺刺激ホルモン パーゴナル[®]注75・150

- 強力な卵胞成熟ホルモン (FSH) 作用により、卵胞の発育と成熟を促し、胎盤性性腺刺激ホルモン (HCG) との組合せ投与により排卵を誘発します。
- 更年期婦人尿由来の下垂体性性腺刺激ホルモン (HMG) 製剤であり、反復投与が可能です。
- FSH活性のほかに LH活性を有し、その活性化 (FSH/LH) はほぼ一定です。



【効能・効果】

間脳性（視床下部性）無月経、下垂体性無月経の排卵誘発

【用法・用量】

1日卵胞成熟ホルモンとして75～150国際単位を連続筋肉内投与し、頸管粘液量が約300mm³以上、羊歯状形成（結晶化）が第3度の所見を指標として（4日～20日、通常5日～10日間）、胎盤性性腺刺激ホルモンに切り変える。

【包 装】

パーゴナル注 75：10管
パーゴナル注150：10管



帝國臓器製薬株式会社
東京都港区赤坂二丁目5番1号

【使用上の注意】

1. 一般的注意
 - 1) 本療法の対象は不妊症患者のうちの、間脳又は下垂体前葉の機能・器質的障害に由来する性腺刺激ホルモン低分泌無月経患者であるので次の点に注意すること。
 - ア. エストロゲン・プロゲステロンテストで初めて反応する第2度無月経又は抗エストロゲン療法（クエン酸コロミフェン、シクロフェニル等）が奏効しない第1度無月経の患者に投与すること。
 - イ. 患者の状態（例えばエストロゲン・性腺刺激ホルモン・ブレグナンジオール分泌、頸管粘液、基礎体温等）を詳細に検査し、子宮性無月経の患者には投与しないこと。
 - ウ. 原発性卵巣不全による尿中性腺刺激ホルモン分泌の高い患者、副腎・甲状腺機能の異常による無月経患者、頭蓋内に病変（下垂体腫瘍等）を有する患者、及び無排卵症以外の不妊患者には投与しないこと。
 - 2) 本療法の卵巣過剰刺激による副作用を避けるため、投与前及び治療期間中は毎日内診を行い、特に次の点に留意し、異常が認められた場合には、直ちに投与を中止すること。
 - ア. 患者の自覚症状（特に下腹部痛）の有無
 - イ. 卵巣腫大の有無
 - ウ. 基礎体温の異常上昇の有無（毎日測定させること）。
 - エ. 頸管粘液量とその性状
 - 3) 卵巣過剰刺激の結果としての多胎妊娠の可能性があるので、その旨をあらかじめ患者に説明すること。
 - 4) 妊娠初期の不注意な投与を避けるため、投与前少なくとも1ヵ月間は基礎体温を記録させること。
 - 5) 産婦人科・内分泌専門医師の管理のもとに投与すること。
2. 次の場合には投与しないこと
 - 1) 卵巣腫瘍及び多くのう胞性卵巣症候群を原因とした卵巣の腫大を有する患者
 - 2) 妊婦
 - 3) 次の患者には投与しないことを原則とするが、やむを得ず投与する場合には、慎重に投与すること。
 - ア. 児を望まない第2度無月経患者
 - イ. 多くのう胞性卵巣を有する患者
 4. 副作用
 - 1) 卵巣過剰刺激 卵巣腫大、下腹部痛、下腹部緊迫感、腹水・胸水を伴ういわゆる、Meigs様症候群等があらわれた場合には、直ちに投与を中止するなど、適切な処置を行うこと。
 - 2) その他 ときに恶心、頻尿、しづれ感、頭痛、浮腫があらわれることがある。また尿量が増加することがある。
 5. 相互作用 胎盤性性腺刺激ホルモンとの併用により、卵巣の過剰刺激による卵巣腫大、腹水・胸水を伴ういわゆるMeigs様症候群があらわれることがある。

In Vitro Fertilization of Rabbit Eggs by Ejaculated
Spermatozoa Capacitated in a Modified Tyrode's
Solution

Kahei SATO and Yoshie SUZUKI

Laboratory of Animal Reproduction, College of
Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University
Kameino, Fujisawa 252

Abstract

In the present study, we examined the induction of capacitation of ejaculated rabbit spermatozoa using a modified Tyrode's solution (mTALP) containing taurine and epinephrine. Most of living spermatozoa displayed active movement 5 hours after the start of incubation in mTALP. When cumulus-free rabbit eggs were mixed with spermatozoa preincubated for 3-5 hours, attached to the surface of the zona pellucida immediately. Spermatozoa incubated for 3 or 5 hours penetrated into the perivitelline space within 1 hour after insemination, but 1 hour incubated spermatozoa appeared in the perivitelline space 3 hours after insemination. When spermatozoa preincubated for 5 hours were mixed with rabbit eggs, well-formed male and female pronuclei were seen in the egg cytoplasm 4 to 5 hours after insemination. These results obtained indicate that mTALP can effectively induce capacitation of ejaculated rabbit spermatozoa by a relatively short period.

Introduction

In vitro fertilization in the rabbit was first achieved by using spermatozoa capacitated in uterus (Chang, 1959; Thibault et al.,

1954). At present, however, rabbits are considered to be difficult species in the induction of sperm capacitation (Yanagimachi, 1981). The hamster is frequently used as a model animal for capacitation, the acrosome reaction or fertilization. Recent studies have shown that bovine follicular fluid, oviductal fluid of rabbit and monkey, and spermatozoa of hamster, guinea pig and human all contain high concentration of taurine and hypotaurine (Meizel et al., 1980). It is reported that chemically defined media containing taurine or hypotaurine and epinephrine are effective for in vitro capacitation and the acrosome reaction of hamster spermatozoa (Mursny et al., 1979; Lui et al., 1979; Bavister et al., 1979; Yanagimachi, 1982; Sato and Suzuki, 1985). Thus, it is of interest to examine the induction of capacitation in vitro in a chemically defined medium containing taurine and epinephrine. We report here about the induction of capacitation of rabbit spermatozoa in a modified Tyrode's solution containing taurine and epinephrine supplemented with bovine serum albumin.

Materials and Methods

Medium: The standard medium for in vitro capacitation and insemination was a modified Tyrode's solution containing albumin, lactate and pyruvate (mTALP, Yanagimachi, 1982). The medium used was supplemented with 1% bovine serum albumin (fraction-V, Sigma Inc.). Only effective BSA preparations in supporting capacitation and the acrosome reaction of hamster spermatozoa were used in the present study. The pH was adjusted to 7.4 under pure air. The medium was prepared immediately before use.

Sperm suspension preparations: Semen specimens, collected by an artificial vagina (Sato, 1984), were obtained from 3 fertile bucks of New Zealand White rabbit. An aliquot of semen was diluted with medium and the sample was centrifuged for 8 minutes at 800 rpm. The seminal plasma was discarded and the sperm pellet was resuspended in 2 ml of the medium. And the centrifugation was repeated. Each sperm suspension was diluted serially to obtain the lowest of which ranged from 3 to 4×10^5 motile spermatozoa/ml. An aliquot of the

sperm suspension was placed at the center of a plastic petri dish and covered with mineral oil. For sperm capacitation, the preparations were incubated at 37°C under 5% CO₂ in air for 1-5 hours.

Collection and insemination of eggs: Rabbit eggs were obtained from New Zealand White females by superovulation. Briefly, 75 IU human chorionic gonadotropin (hCG, Teikokuzoki Pharmaceuticals) was injected intravenously 72 hours after 100 IU pregnant mare serum gonadotropin (PMSG, Teikokuzoki) intravenous injection. About 14 hours after hCG injection, the females were killed and their oviducts were removed. Eggs with compact cumulus cell masses were recovered by flushing the oviducts. The eggs were then removed from cumulus cells by 1% bovine testicular hyaluronidase (Sigma) and then the eggs were rinsed thoroughly and placed in the fresh medium for less than 40 minutes.

Insemination was performed by adding 20 ul of the sperm suspension preincubated for 1-5 hours. After insemination, sperm-egg preparations were incubated at 37°C under 5% CO₂ in air for 5 hours. At 1, 3 and 5 hours after the start of incubation the eggs were taken out from the dish, washed in the medium, and mounted between a slide glass and coverslip supported by 4 spots of paraffin-vaseline mixture. The eggs were gently compressed under the coverslip and examined by a phase-contrast microscope for evidence of sperm penetration through the zona pellucida and into the egg cytoplasm.

Results

Survival of spermatozoa in mTALP: the motility of spermatozoa was observed at various intervals after the start of incubation. At starting time of sperm incubation, spermatozoa did not display vigorous (active) movement. However, when examined between 30 minutes to 1 hour after sperm incubation, 40-50% of spermatozoa began active movement. At 1 hour after the start of incubation, some spermatozoa that had been weak movement were agglutinated head to head. Most of motile spermatozoa displayed active movement about 3 hours after the start of sperm incubation. Seventy-75% of spermatozoa were freely

swimming active movement 5 hours after incubation.

Sperm penetration into eggs: When cumulus-free eggs were mixed with incubated spermatozoa, spermatozoa attached to the zona surface almost immediately. As shown in Table 1, spermatozoa incubated for 3-5 hours were able to penetrate ovulated eggs 1 to 5 hours after insemination. While, spermatozoa incubated for 1 hour were very low rate of fertilization at 5 hours after insemination. Zona penetrated spermatozoa were visible in the perivitelline space when eggs were examined within 1 hour after insemination by 5 hour-incubated spermatozoa. But, in 1 or 3 hour-incubated spermatozoa, the penetration of spermatozoa into the perivitelline space. A swollen sperm head was seen in the egg cytoplasm 2 to 5 hours after insemination and well-formed sperm and egg pronuclei in the egg cytoplasm 4 to 5 hours after insemination.

Fertilizing ability of spermatozoa collected from individual bucks: Table 2 summarized results of the fertilizing ability of spermatozoa collected from each bucks used. Fertilizing rates of those spermatozoa were in ranging 90.0-100% when eggs were examined 5 hours after insemination.

Table 1 In vitro fertilization of rabbit spermatozoa incubated in a modified Tyrode's solution (mTALP)

Sperm preincubation time (hrs)	Egg observation time (hrs) after insemination	No. of eggs inseminated	No. (%) of eggs fertilized
1	1	35	0
	3	35	0
	5	35	2 (5.7)
3	1	31	4 (13.3)
	3	38	19 (50.0)
	5	36	26 (72.2)
5	1	29	14 (48.3)
	3	30	22 (73.3)
	5	30	29 (96.7)

Table 2 In vitro fertilization of rabbit eggs by ejaculated spermatozoa incubated in a modified Tyrode's solution (mTALP)

Buck No.	No. of eggs inseminated	No. (%) of eggs fertilized
010	10	10 (100.0)
018	17	17 (100.0)
033	11	10 (97.0)

Discussion

As already described, mTALP is an excellent medium for capacitation of hamster spermatozoa (Yanagimachi, 1982). In the present study also, it was proved that mTALP can induce capacitation of ejaculated rabbit spermatozoa. Although media for the induction of capacitation of the rabbit has been provided to be chemically defined media supplemented with serum albumin or bovine fetal serum (Brackett and Oliphant, 1975; Akurk et al., 1979; Sato, 1984), the procedures described for preparing medium and spermatozoa are complicated. The procedures for preparing medium and spermatozoa and the composition of the medium used in the present study are simple. When 90% or more of the spermatozoa were motile on first being suspended in mTALP before washing, many of the spermatozoa kept their motility at the end of 5 hours' incubation. While, 30-50% of the spermatozoa were motile in mTALP, their motility declined with incubation time and at the end of the incubation the rate of the sperm survival was about 10% or less than 10%. These results indicated the possibility that by suspending ejaculated rabbit spermatozoa into mTALP it would be wise to select males which spermatozoa are "good" quality.

mTALP contains taurine and epinephrine. Epinephrine has been reported to be effect sperm motility and capacitation of hamster spermatozoa (Meizel, 1978). Taurine as described is effective for

sperm capacitation and the acrosome reaction. However, in the present time, it is not clear why taurine or its precursor, hypotaurine stimulate capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. Further studies on mechanism of taurine on capacitation and the acrosome reaction are needed.

References

- Akuruk, S., Humphreys, W. J. and Williams, W. (1979) In vitro capacitation of ejaculated rabbit spermatozoa. Differentiation. 13, 125-131.
- Bavister, B. D., Chen, A. F. and Fu, P. C. (1979) Catecholamine requirement for hamster sperm motility in vitro. J. Reprod. Fert., 56, 507-513.
- Bracket, D. G. and Oliphant, G. (1975) Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. Biol. Reprod., 12, 260-269.
- Chang, M. C. (1959) Fertilization of rabbit ova in vitro. Nature, 184, 466-467.
- Lui, C. W., Mursny, R. J. and Meizel, S. (1979) Procedures for obtaining high percentage of viable in vitro capacitated hamster sperm. Gamete Res., 2, 207-211.
- Meizel, S. (1978) The mammalian sperm acrosome reaction. A biochemical approach, in: Development in mammals, Vol. 3, M. H. Johnson Ed., North Holland, Amsterdam, pp. 1-62.
- Meizel, S., Lui, C. W., Working, P. K. and Mursny, R. J. (1980) Taurine and hypotaurine: their effects on motility, capacitation and acrosome reaction of hamster sperm in vitro their presence in sperm and reproductive tract fluids of mammals. Dev. Growth Diff., 22, 483-494.
- Mursny, R. J., Waxman, L. and Meizel, S. (1979) Taurine maintains and stimulates motility of hamster sperm during capacitation in vitro. J. Exp. Zool., 201, 123-128.
- Sato, K. (1984) In vitro capacitation of ejaculated rabbit sperm cells. Jap. J. Fert. Ster., 29, 179-185.
- Sato, K. and Suzuki, Y. (1985) Effects of epinephrine, taurine and retinol on vitro fertilization in the hamster. Jap. J. Fert.

Ster., (in press).

Thibault, C., Dauzier, L. and Wintenberger, S. (1954) Etude cytologique de la fecondation in vitro de l'oeuf de la lapine. C R Soc. Biol. (Paris), 148, 789-790.

Yamagimachi, R. (1981) In vitro sperm capacitation and fertilization in mammals. In: Fertilization and embryonic development in vitro, edited by L. Mastroianni, Jr. and J. D. Biggers Plenum Press. pp. 81-82.

Yanagimachi, R. (1982) In vitro sperm capacitation and fertilization of golden hamster eggs in a chemically defined medium, in: In Vitro Fertilization and Embryo Transfer, edited by H. S. E. Hafez and K. Semm. MTP Press Limited, UK. pp. 65-76.

修正タイロード溶液中で受精能獲得した射出精子によるウサギ卵子の体外受精について

佐藤嘉兵・鈴木淑恵

日本大学農獸医学部家畜繁殖学教室

タウリン及びエピネフリンを添加した修正タイロード溶液 (mTALP) 中で培養したウサギ射出精子を用いて体外受精を行った。5時間の培養を行った精子では媒精後速やかに卵子透明帯に結合した。さらに、媒精後1時間以内に団卵腔中に精子が侵入した。3時間の培養精子でもその割合は低かったが、類似の傾向を示した。しかし、1時間の培養を行った精子では団卵腔内に侵入したのは媒精後3時間目であった。5時間培養精子による体外受精卵子において、媒精後4-5時間目に雌雄前核を観察できた。これらの結果は mTALPが、ウサギ射出精子に比較的短時間で受精能獲得を誘起できることを示した。

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巣疾患の治療

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巣疾患の治療

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巣疾患の治療には

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巣疾患の治療には

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

Scanning Electron Microscopy of Nonfertilized
Oocytes in Human IVF

井上正人・小林善宗・本田育子・淡路英雄・金子みつ恵・藤井明和

Masato INOUE, Yoshimune KOBAYASHI, Ikuko HONDA,
Hideo AWAJI, 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

Following attempted in vitro fertilization (IVF), 13 nonfertilized oocytes were examined by scanning electron microscope (SEM), in order to determine the cause of failure. Fifty-eight IVF treatments were performed on 32 infertile couples. Semen analysis and the hamster test were normal in all patients. Each husband fertilized most of his wife's oocytes and the mean fertilization rate was $93.2 \pm 2.6\%$: of 114 mature oocytes used 101 (88.6%) were fertilized. Nonfertilized oocytes were first examined by light microscope. They were then fixed, and processed for SEM. No oocytes had spermatozoa in the perivitelline space. The outer surface of the zona pellucida displayed a typical porous, net-like appearance in most cases. Oocytes with a smooth surface of the zona were also seen. Many spermatozoa in early stage of penetration were observed. The spermatozoa fixed on the zona had reacted acrosomes. The surface architecture and the sperm-zona interaction observed on the nonfertilized oocytes were not different from those of fertilized ova. It is clear that fertilization failure in human IVF usually occur at the level of zona pellucida. The subsurface area of the zona seems to be primarily responsible for penetration block.

緒 言

体外受精-胚移植 (IVF-ET) は現在、不妊症の治療にかなり広く用いられている。しかしそ

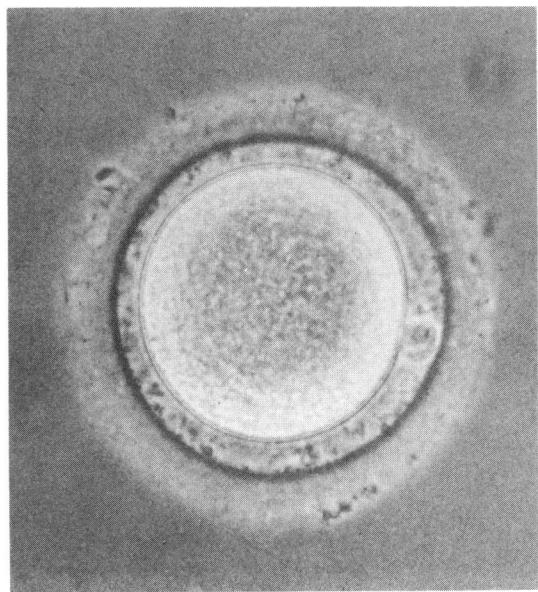


図1 非受精卵、第1極体を認める。

の成績は必ずしも満足のいくものではない。IVF-ETにおいて予後を左右する因子は数多くあるが、最も重要なのはやはり卵子の質である。“卵子がよければ、そのあとのステップもうまくいく”とさえいわれている。発育が早く、しかも形のよい受精卵を数多く子宮腔内に移植することが取りも直さず妊娠率の向上につながる。²このため最近では刺激排卵周期での採卵が中心となっている。しかし排卵誘発剤に対する反応には、かなりの個人差があり、成熟卵子を数多く採取することは必ずしも容易でない。過排卵周期、とくにHMG(human menopausal gonadotropin)-HCG(human chorionic gonadotropin)投与周期では、未熟な卵子や過熟な卵子の出現する頻度が高く、また透明帯の異常や脆弱化が起こることも報告されている。³今後IVF-ETの成績をより一層改善するためには、排卵誘発法についてさらに検討するとともに、卵子の正常性に関する検索が必要である。このような観点から、われわれはIVFで受精しなかった卵子を走査型電子顕微鏡(SEM)で観察し、その

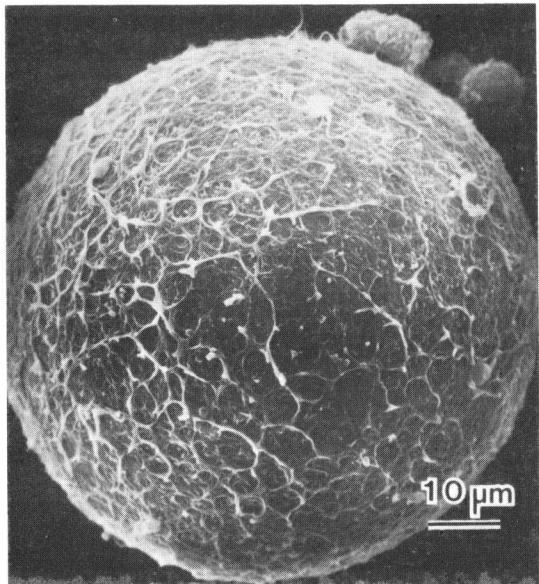


図2 図1のSEM、透明帯表面は多孔性のスポンジ様構造を示す

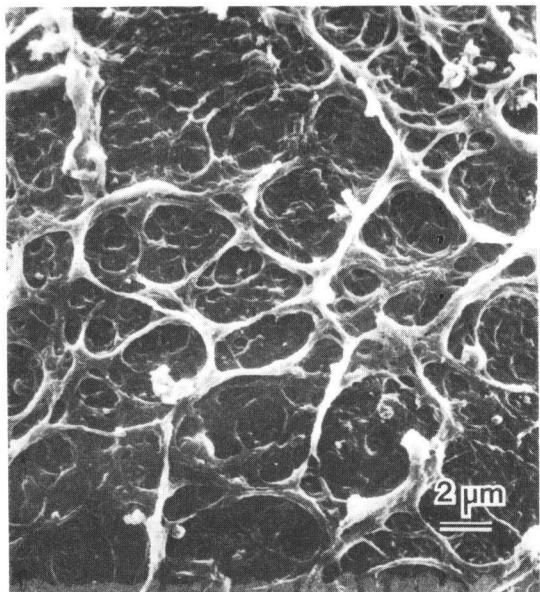


図3 図2の拡大図

表面構造について検討した。

方 法

男性側に異常のない卵管性不妊患者32例に計58回のIVF-ETを行った。男性側因子は精液検査の他に、ionophore A23187を用いた精子進入試験 zona-free hamster egg sperm-penetration test (ZSPT) を行い、精子の受精能力が正常 ($ZSPT \geq 70\%$) であることをあらかじめ確認した。⁴

月経周期の5日目より、clomiphene 100~150 mg/日を5日間経口投与し、10日目より超音波(日立EUB-40)にて卵胞の発育を観察した。^{5,6} clomipheneに対する反応がよくない場合は、次周期よりHMG 150 I.U./日を追加投与し、原則として2個以上の卵胞が発育した場合に採卵した。超音波上、主席卵胞の直径が20 mm程度に発育した時点で患者を入院させ、HCG 5000 I.U.筋注した。採卵はHCG投与後34~36時間で行い、45回は腹腔鏡下に、13回は超音波誘導下に経皮的に卵胞を吸引した。腹腔鏡は直径3.4 mmの針状腹腔鏡(オリンパス)を用い、全身麻酔下にステンレス製single needle(内径1.4 mm, アトム)にて用手的に卵胞を吸引した。⁷

骨盤内癒着が高度なため、直視下の採卵が不可能な症例に対しては、超音波誘導下に経皮的、経膀胱的に卵胞を穿刺した。⁸卵胞液中に卵子を認めない場合は、温かい生理食塩水を用いて何回か卵胞を洗浄した。卵子は実体顕微鏡下に観察し、卵丘および放射冠の状態から成熟の有無を判定した。成熟卵子はただちに3 mlの培養液を含むorgan culture dish (Falcon 3037)に移し4~5時間前培養した。⁹精液は媒精の約2時間前に用手的に採取し、室温に30分間静置した。液化した精液に培養液を加えて15 mlとし、2回遠沈、洗浄した(500 g, 5分間)。沈渣に0.3 ml

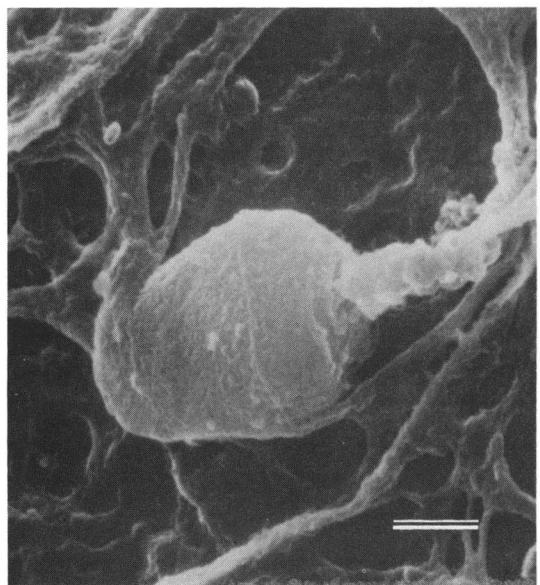


図4 図2の拡大図、結合精子は先体反応を完了

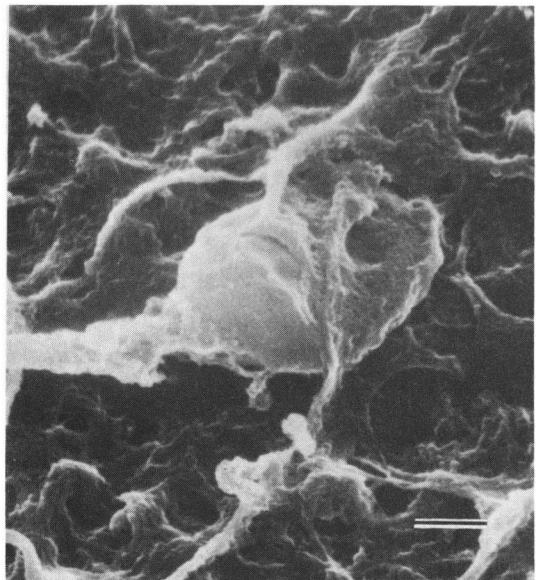


図5 図2の拡大図、侵入開始直後の精子

の培養液を加えて濃縮洗浄精子液を作成し、この上に 0.7 ml の培養液を重積して、培養器内に 1 時間静置した。上層の培養液中に遊出した運動性良好の精子を媒精に供した。前培養した卵子に、運動精子を加え ($0.5 \sim 1 \times 10^5 / ml$), 14~16 時間培養した。卵子の操作はすべてクリンペンチ内で行った。培養は炭酸ガス培養装置（平沢製作所）を用い、37°C, 5% CO₂, 9.5% air の条件下で行った。精子の capacitation, 卵子の前培養および受精には modified Ham F-10 に 7.5% 非働化臍帯血血清を加えたものを使用した。受精の有無は雌雄前核の存在により判定した。受精卵は modified Ham F-10 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。非受精卵はまず位相差顕微鏡下に観察し、第 1 極体の有無、精子の透明帯への結合、卵腔への侵入の有無、等について検索した。ついで非受精卵は 2% glutaraldehyde-0.025M phosphate buffer で 22~24 時間固定した。0.2% poly-L-lysine であらかじめ処理したカバーガラス上に卵子を移し、接着させてから上昇アセトン系列で脱水し、臨界点乾燥を行った。炭素および金で二重蒸着後、日本電子 JSM-35 型走査電子顕微鏡にて観察した。

結 果

32 例の患者に 58 回の採卵を行い、合計 114 個の成熟卵子を採取した。このうち 101 個の卵子 (88.6%) が受精した。患者別の受精率は $9.3.2 \pm 2.6\%$ (Mean \pm S.E.) であった。13 個の非受精卵はいずれも第 1 極体の存在により成熟卵と判定された。（図 1）また固定前の位相差顕微鏡による観察では、卵腔への精子侵入は認められなかった。一部の卵子に卵腔の拡大や、透明帯の膨化

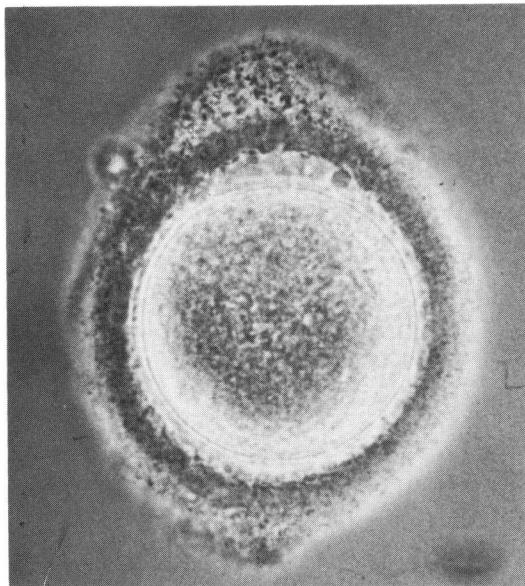


図 6 非受精卵、透明帯の 1 部が膨化

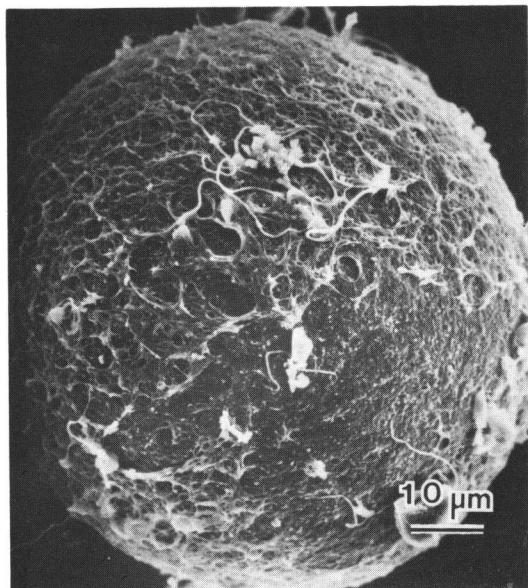


図 7 図 6 の SEM、透明帯の 1 部が平滑

(図6)がみられたが、このような場合でも精子の結合にはとくに差違は認められなかった。SEMによる観察では、非受精卵の透明帯表面は多孔性のスponジ様構造を示し、(図2,3,9)基本的には以前報告した不妊症検査時に採取した卵子のそれと同じであった。透明帯の表面に結合した精子はすべて先体反応を完了していた(図4)，また透明帯上には、侵入開始直後の精子から、頭部を完全に埋没した精子まで、さまざまな精子侵入過程が観察された(図5,10,11,)，位相差顕微鏡で透明帯に膨化の認められた卵子は、SEMではスponジ様構造の一部消失と同部の平滑化として観察された(図7,8,)しかしこの部分においても、頭部を完全に透明帯内に侵入した精子が観察された(図10.)

以上の結果より、ヒト卵子における受精障害は、①その大部分が透明帯の通過障害であること、②精子の通過障害は透明帯の表層下で起こること、が示唆された。しかし、今回のSEMによる観察では非受精卵に特有な透明帯の表面構造は認められなかった。

考 察

IVF-ETはいまや不妊症の重要な治療法の1つになってきている。しかしその成績はまだまだ不十分なものである。¹ヒト卵子のIVFそれ自体はそれほどむずかしくない。精子のcapacitationは *in vitro* で容易に起こり、精子の受精能力に問題がなければ、成熟卵子の約90%は受精する。しかも、媒精時の精子濃度が1×

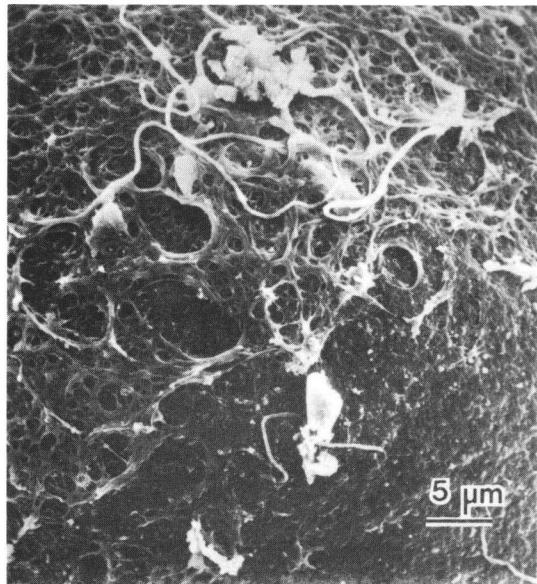


図8 図7の拡大図

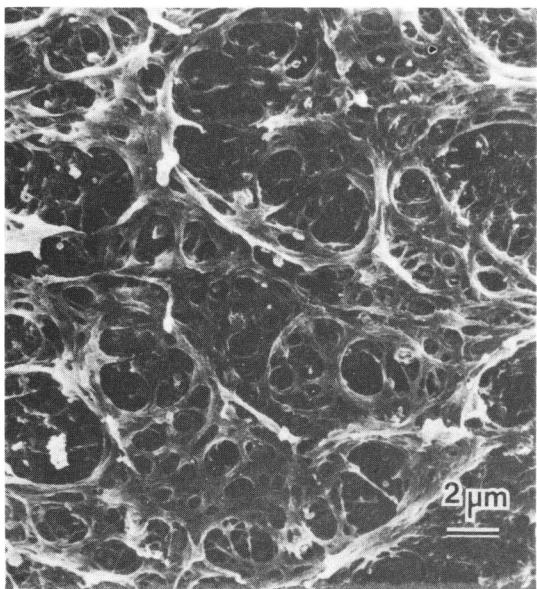


図9 図7の拡大図、典型的なスponジ様構造を示す部分

10^5 / mlとかなり高いにもかかわらず、多精子受精率は約1%と非常に低い。¹¹ヒト卵子のIVFは他の動物に比べてむしろ容易であるといえよう。これに対して、受精卵の培養は必ずしも十分とはいえない。体外受精した卵子は確かに胞胚期まで *in vitro* で発育する。しかしIVF-ETで最も

妊娠率が高いのは、媒精後30~40時間すなわち2分割卵から4分割卵の段階で子宮腔内に移植する場合である。² *in vitro* では受精卵は通常初期桑実期の段階で子宮腔内へ輸送される。したがってこの時期でのETが最も生理的なはずである。しかし実際には、この時期で移植すると妊娠率はむしろ低くなる。受精卵の培養にはまだ問題があり、長期間培養すると受精卵の質が悪くなるためではないかと考えられている。² IVF-ETにおいて妊娠率を左右する最大の因子はやはり受精卵の質である。発育が早く、しかも形のよい2分割卵か4分割卵を数多く移植することが取りも直さずよい成績につながる。このためにはまず質のよい成熟卵子を多数採取することが必要である。排卵誘発剤、とくにHMGの使用は確かに採卵数を増加させた。しかし刺激排卵周期では未熟な卵子や過熟な卵子が多く出現することも事実である。HMG-HCG周期では、透明帯の異常や脆弱化が起こることが報告されている。³ 卵子の成熟度は通常、卵丘と放射冠の状態から判定するが、HMG-HCG周期では外見上は成熟卵でも、実際には未熟卵であることがまれではない。¹² HMG-HCG周期を用いたIVFの受精率が自然周期のそれに比べて低いのは、未熟な卵子を含めたいわゆる“質のよくない卵子”的出現頻度が高いためであろう。今回のわれわれの採卵数は平均2.0で、clomiphene-HCG周期では普通の成績であった。全体の受精率は88.6% (101/114)であったが、これは諸家の報告に比べてむしろ高い

方である。非受精卵の大部分は3個以上採卵した症例からのものであった。採卵が1~2個の場合にはほとんどの卵子が受精した。このため患者別の平均受精率は93.2±2.6%と非常に高かった。非受精卵は第1極体の存在によりすべて成熟卵子と判定された。しかしこれは媒精時に成熟卵子で

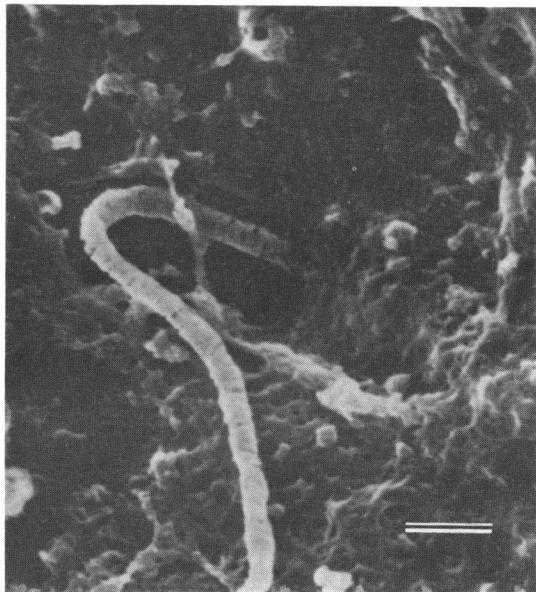


図10 図7の拡大図、表面平滑な部分
侵入精子の尾部を認める。

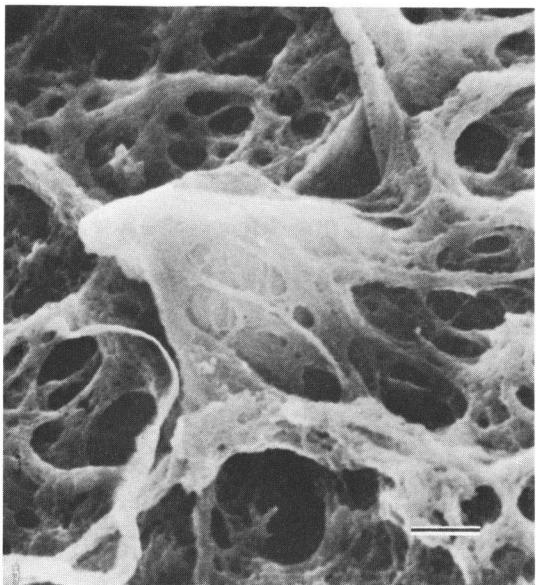


図11. 図7の拡大図、精子頭部は透明帶
におおわれている。

あったという証拠にはならない。未熟な卵子が媒精後に成熟することも十分考えられる。事実、再媒精 *reinsemination* により受精したという報告もある。¹³ しかしこのようなケースは非常にまれなものではないかと思われる。われわれもその後、非受精卵子をさらに24時間培養したり、再媒精を試みたりしたが、1度も雌雄前核を確認することはできなかった。非受精卵子はそれ自体に何らかの異常があると考えた方がより自然であろう。採取した卵子はすべて同一の *organ culture dish* 内で媒精しており、精子濃度や培養条件の微妙な違いによって受精障害が起ったとは考えにくい。しかし今回の SEM による観察では、非受精卵の透明帯表面にはとくに異常所見は認められなかつた。非受精卵の表面は多孔性のスポンジ様構造を示し、基本的には受精卵、すなわち IVF における多精子受精卵や不妊症検査時に採取し検査目的で受精させた卵子、のそれと同じであった（未発表データ）。非受精卵子の表面には先体反応を完了した精子が結合し、また侵入開始直後の精子から頭部を完全に透明帯内に埋没した精子まで、さまざまな侵入過程の精子が観察された。固定前の位相差顕微鏡による観察では卵腔への精子侵入は認められなかつた。非受精卵における受精障害は、精子の透明帯通過障害によるものであり、精子の通過障害は透明帯の表層下で起こるものと思われる。もしわれわれの推測が正しく、透明帯の異常が表層下にあるとすれば、SEM でとくに異常所見が見つかからなくても不思議ではない。非受精卵の1部には、透明帯の部分的な膨化が観察された。しかし、この部分への精子の結合は他の部分と変りなく、その数はむしろ多いぐらいであった。SEM ではスポンジ様構造の消失した平滑な部分として観察されたが、精子頭部の侵入も認められた。受精卵においても、このような透明帯の変化は実体顕微鏡下に時々観察された。透明帯の部分的な膨化と精子の通過障害とは直接関係ないものと思われる。すでに述べたように、現時点において IVF-ET で重要なことはまず質のよい、成熟した卵子を多数採取することである。この意味では、現在用いられている刺激排卵周期は必ずしも満足のいくものではない。排卵誘発剤の使い方や HCG の投与時期については、個別的投与法を含めて、今後さらに検討する必要があると思われる。

文 献

1. Soules, M.R. : The in vitro fertilization pregnancy rate : let's be honest one another. *Fertil. Steril.*, 43: 511, 1985.
2. 井上正人、小林善宗、本田育子、金子みつ恵、藤井明和：受精卵移植。“受精・着床'84”，pp. 77, 学会出版センター, 1985.
3. Beauchamp, P.J. : Human menopausal gonadotropins for follicular recruitment in in vitro fertilization and embryo transfer. in "Human in vitro Fertilization and Embryo Transfer". Worf, D.P. and Quigley, M.M., eds. pp. 99, Plenum, 1984.

4. 井上正人, 小林善宗, 本田育子, 金子みつ恵, 藤井明和: 精子の受精能力検査－透明体除去ハムスター卵子貫通試験, ペリネイタル・ケア, 4 : 247, 1985.
5. 本田育子, 内村道隆, 小林善宗, 井上正人, 藤井明和: 超音波断層法による排卵前卵胞の観察－腹腔鏡所見と対比して, 日産婦誌, 36 : 421, 1984.
6. 本田育子, 小林善宗, 井上正人, 藤井明和: 超音波単独による卵胞のモニタリングースコアリングの試み。“受精・着床’84”, pp 145, 学会出版センター, 1985.
7. 本田育子, 小林善宗, 井上正人, 藤井明和: 針状腹腔鏡による成熟卵子の採取。日産婦神奈川会誌, 20 : 120, 1984.
8. 本田育子, 松浦俊一, 小林善宗, 井上正人, 藤井明和: 超音波ガイドによる卵胞穿刺・卵採取。日産婦誌, 37 : 1007, 1985.
9. 井上正人, 小林善宗, 本田育子, 金子みつ恵, 藤井明和: 体外受精・胚移植法プログラムの実際－東海大学プログラム。“受精・着床’83”, pp 157, 学会出版センター, 1984.
10. 井上正人, 小林善宗, 本田育子, 金子みつ恵, 藤井明和: 卵採取とその取り扱い。産婦人科の世界, 36 : 369, 1984.
11. Trounson, A.O., Mohr, L.R., Wood, C. and Leeton, J.F. : Effect of delayed insemination on in vitro fertilization, culture and transfer of human embryos. J. Reprod. Fert., 64 : 284, 1982.
12. Laufer, N., Tarlitzis, B.C., Decherney, A.H., Masters, J.T., Haseltine, F.P., MacLusky, N. and Naftolin, F. : Asynchrony between human cumulus-corona cell complex and oocyte maturation after human menopausal gonadotropin treatment for in vitro fertilization. Fertil. Steril., 42 : 366, 1984.
13. Trounson, A. and Webb, J. : Fertilization of human oocytes following reinsemination in vitro. Fertil. Steril., 41 : 816, 1984.

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を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

哺乳動物卵子研究会誌投稿規定

1. 投稿論文は、原則として哺乳動物卵子の諸問題に関する未発表の和文または英文の原著 (Full paper) 、短報 (Brief note)、総説 (Review) とし、著者は本会の会員に限る。
2. 投稿論文は、編集委員会で審査し、掲載が決定したものについて受付順に掲載する。
なお、掲載が決定したものについて著者は本会指定の原稿用紙にタイプまたはワープロで印刷し、編集委員会に送付する。
3. 原著論文は刷り上がり 6 頁以内、短報は同じく 2 頁以内とする。超過ページについては実費を著者負担とする。なお、本誌一頁は 400 字詰原稿用紙 4 枚に相当する。
4. 本文が和文の場合、英文の表題、著者名、所属名および要旨を付記する。また、本文が英文の場合、和文の表題、著者名、所属名および要旨 (400 字以内) を付記する。
5. 引用文献の記載方法は下記の例に従う。

雑誌の場合

- a) Bavister, B. D. and Yanagimachi, R. (1982). The effect of sperm extract and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.*, 16, 228~231.
- b) 新村末雄、石田一夫 (1985). ハムスター顆粒層細胞における 17β -Hydroxysteroid dehydrogenase の組織化学的研究、日本不妊学会誌、30, 36~46.

単行本の場合

- c) Yanagimachi, R. (1981). Mechanisms of fertilization in mammals. In *Fertilization and Embryonic Development in Vitro*, Edited by L. Mastroianni Jr, and J. D. Biggers. New York, Plenum Press, P.81.
 - d) 豊田 裕 (1984). 試験管内受精と初期胚培養—マウスを中心に, “哺乳類の発生工学” 大沢仲昭、江藤一洋、館 邦、御子柴 克彦編、ソフトサイエンス社、P. 2.
6. 別刷を希望する時は 50 部単位で受け付ける。
 7. 原稿の送付および投稿に関する照会は、下記宛とする。

〒252

神奈川県藤沢市亀井野 1866

日本大学農獣医学部獣医生理学教室内

TEL 0466-81-6241 内線 332

哺乳動物卵子研究会編集委員会

編 集 後 記

哺乳動物卵子研究会誌の第2巻第2号をお届けいたします。年2回の会誌発行を目標に頑張っております。今号は、毛利教授の総説と8編の原著論文を掲載することができました。第3巻より、これまで1号は研究会の講演要旨のみを掲載してきましたが、原著論文と講演要旨を掲載するように変りましたので、会員の皆様から多数の投稿をお願い申し上げます。

(遠藤克)

編 集 委 員

委員長： 大槻清彦

委員： 岩城 章，石島芳郎，鈴木秋悦，花田 章，遠藤 克

哺乳動物卵子研究会誌

Journal of Mammalian Ova Research

第2巻 第2号

Vol. 2

No. 2

昭和60年9月25日印刷

昭和60年10月1日発行

(会員頒布)

発行者 哺乳動物卵子研究会
代表 佐久間勇次

発行所 哺乳動物卵子研究会
〒252 藤沢市龜井野1866
日本大学農獣医学部獣医生理学教室内
Tel 0466-81-6241(内332)
郵便振替 横浜 8-20350

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

日本薬局方 注射用胎盤性性腺刺激ホルモン

動物
専用

フペローゲン®

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

ヒメックス®

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

FHK 人工授精・受精卵移植用機器

精液・受精卵の

授取・検査・培養・顕微操作・凍結・保管・

移送・融解・移植用機器

発情発見・妊娠診断用機器

器具滅菌用機器・その他関連機器

ご請求に応じて関係カタログの送付または係員が参上いたします

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
TEL 東京 (03)812-2271代表

