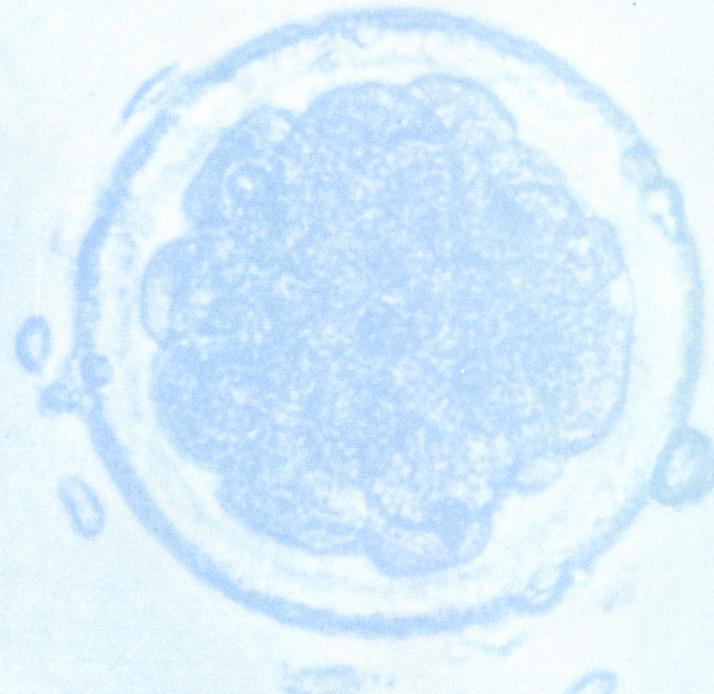


哺乳卵研誌  
J. Mamm. Ova Res.

# 哺乳動物卵子研究会誌

Journal of Mammalian Ova Research



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

Vol. 3 No. 1  
April 1986



# ビライズズ効果 と タウリン配合

## 母乳の理想像にさらに近づけて



- 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、脳神経系の機能をもたらす重要な役割を果してます。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、調乳溶液100mL当たり2.6mgとし、母乳の値に近づけました。

●ビフィズス菌が増えやすく母乳栄養児の腸内菌叢に更に近づきました。

タクチロースをはじめとするビフィズス菌増殖因子の増強と緩衝能、呑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、乳房の腸内のpHを下げると共に高いリソチーム活性を維持して病原菌・有害菌の増殖を抑制します。

また便性もさらに母乳栄養児に近づきました。

森永乳业

森永 **BF-T** ドライミルク



◆牛の繁殖障害の  
分野に新しい可能性――！



タケダのすぐれた合成技術が生んだ  
LH放出ホルモン製剤

動物用医薬品

# コンセラール®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

# 哺乳動物卵子研究会誌

第3巻 第1号

昭和61年4月

## 目 次

原 著

グルタチオンのラット卵子の培養に及ぼす影響について

辻井弘忠 ..... 1

第27回哺乳動物卵子研究会講演要旨集

特別講演

排卵過程に働く凝固線溶系と胎盤蛋白

相馬広明 ..... 6

一般講演

成熟ラットにおける過排卵誘起処理後の卵胞数と排卵数に及ぼす抗LH血清の影響

利部聰 ..... 8

卵胞培養後のウシ卵母細胞の成熟率に及ぼす卵丘細胞層の膨潤化と伸長度の影響

福井 豊、藤井克己、今井 敬、N.M.ALFONSO 、小野 齊 ..... 10

ウシ卵胞液酸性ムコ多糖分画の卵子退行遅延作用

佐藤英明、金山伊吹、石橋武彦 ..... 12

ゴールデンハムスター卵子に見られる第1及び第2極体の形成と放出

平尾幸久 ..... 14

マウス胚における細胞骨格系の透過型電子顕微鏡による観察

藤井好孝、吉岡 保 ..... 16

モノクローナル抗体を用いて分離したブタ透明帯抗原の免疫原性について

長谷川昭子、繁田 実、香山浩二、磯島晋三 ..... 18

受精に及ぼす精子不動化抗体の阻害作用	
津久井伸一、野田洋一、福田愛作、松本 央、矢野樹理、森 崇英	20
1 - 2 Propandiolを用いたマウス受精卵の凍結保存について	
堀内俊孝、沼辺 孝、岸田忠政	22
耐凍剤連続的投与法によるマウス胚凍結保存	
福田愛作、野田洋一、津久井伸一、松本 央、矢野樹理、森 崇英	24
マウスの 2 および 4 細胞期胚から得た分離胚の発生能について	
鈴木宏志、富樫 守、宮井達也、岡本道生	26
哺乳動物卵子のエレクトロフュージョン	
菅原七郎、小松牧俊、石川嘉彦、亀山賢次、橋本伸二、正木淳二	28
ラットとマウスにおける集合キメラ胚の作成	
高橋文明、藤代克彦、高橋寿太郎、安田泰久	30
哺乳動物卵子の細胞工学的研究、前核置換マウスの生殖能力	
安井 司、角田幸生、中村公章、杉江 信	32
哺乳動物卵子の遠心処理と発生能について	
菅原七郎、石川嘉彦、小松牧俊、亀山賢次、橋本伸二、正木淳二	34
染色体検査により Sexing されたマウス二分胚並びにそれらの集合キメラ胚の移植試験、およびそれらの移植で得られたキメラマウスおよび homo-dizygotic (?) キメラ双生仔の繁殖試験について	
長嶋比呂志、水野仁二、柏崎直巳、水野敦子、加納康彦、尾川昭三	36
前核期卵および初期胚に対する効果的なパーソナルコンピューター制御顕微手術システム	
山川宏人、柏崎直巳、水野仁二、高橋 一、山根雅巳、成茂栄一、 友田 仁、尾川昭三	38
スナネズミの体外受精に関する検討	
岡部景子、若田修司、佐藤嘉兵	40
透明帯除去リスザル卵へのチンパンジー精子貫通	
矢野樹理、井田憲司、津久井伸一、福田愛作、松本 央、野田洋一、 森 崇英、K.G.GOULD	42

カニクイザルの体外受精	
井田憲司、矢野樹理、津久井伸一、福田愛作、辰巳賢一、松本 央、 野田洋一、森 崇英	..... 4 4
体外受精一胚移植における多精子受精卵の電子顕微鏡による観察	
井上正人、小林善宗、本田育子、金子みつ恵、藤井明和	..... 4 6
豚受精卵移植技術に関する研究	
1. Allyl Trenboloneによる性周期の同期化と受精卵回収	
塩原広之、久保親二、添田益夫、武田光彦、深谷 守、杉本輝夫、 菅野興文、菅原七郎、亀山賢次、正木淳二	..... 4 8
家兔の卵管内人工授精に関する研究—VI	
山海 直、金山喜一、遠藤 克、佐久間勇次	..... 5 0
配偶子卵管内移植の成績	
小林善宗、本田育子、井上正人、金子みつ恵、藤井明和	..... 5 2

Journal of Mammalian Ova Research

Vol. 3 No. 1

April 1986

Contens

Original

Effect of glutathione on the development of eight-cell rat embryos in vitro.

TSUJII, H. ..... 1

Proceeding of the 27 th Annual Meeting of Japan Society for Mammalian  
Ova Research.

Special report

Coagulo-fibrinolytic system and placental proteins serving in the ovulatory  
process.

SOMA, H. ..... 6

General reports

Effects of anti-LH serum on the numbers of Graafian follicles and ova shed.

KAGABU, S. ..... 8

Effects of expansion and stretchability of the cumulus cell mass on maturation  
rate of bovine oocytes cultured.

FUKUI, Y., K.FUJII, K.IMAI, N.M.ALFONSO & H.ONO. ..... 10

Effects of acid mucopolysaccharide fractions of bovine follicular fluid on  
spontaneous fragmentation of mouse oocytes in culture.

SATO, E., I.KANAYAMA & T.ISHIBASHI. ..... 12

Formations and extrusions of the first and second polar bodies in hamster eggs.

HIRAO, Y. ..... 14

Transmission electron microscopy of cytoskelton in mouse embryo.

FUJII, Y. & T.YOSHIOKA. ..... 16

Immunogenicity of the antigen isolated from porcine zona pellucida using  
monoclonal antibody.

HASEGAWA, A., M.SHIGETA, K.KOYAMA & S.ISOJIMA. ..... 18

Blocking effect of sperm immobilizing antibodies on human in vitro fertilization.

TSUKUI, S., Y.NODA, A.FUKUDA, H.MATSUMOTO,  
J.YANO & T.MORI ..... 20

The survival of frozen and thawed mouse embryos with 1-2 propandiol as cryoprotectant.

HORIUCHI T., T.NUMABE & T.KISHIDA ..... 22

Continuous addition of cryoprotectant for mouse embryo cryopreservation.

FUKUDA,A., Y.NODA, S.TSUKUI, H.MATSUMOTO  
J.YANO & T.MORI ..... 24

Developmental ability of half-embryos divided from 2- and 4-cell stage in the mouse.

SUZUKI, H., M.TOGASHI, T.MIYAI & M.OKAMOTO ..... 26

Electrofusion of mammalian blastomeres.

SUGAWARA, S., M.KOMATSU, Y.ISHIKAWA, K.KAMEYAMA,  
S.HASHIMOTO & J.MASAKI ..... 28

Production of chimeric blastocysts by aggregation of rat and mouse embryos.

TAKAHASHI, F., K.FUJISHIRO, J.TAKAHASHI & Y.YASUDA ..... 30

Reproductive ability of the young produced by pronuclear transprantation in the mouse.

YASUI, T., Y.TSUNODA, K.NAKAMURA, T.SUGIE ..... 32

Development of mammalian eggs centrifuged.

SUGAWARA, S., Y.ISHIKAWA, M.KOMATSU, K.KAMEYAMA,  
S.HASHIMOTO & J.MASAKI ..... 34

On the sexing by direct chromosomal analysis of bisected mouse early embryos and the transfer of the halved embryos and the aggregated chimeric embryos (consisted of one pair of halved embryos),and on a progeny test of the chimeric mice and the chimeric mouse twins(homodizygotic?).

NAGASHIMA, H., J.MIZUNO, N.KASHIWAZAKI, A.MIZUNO,  
Y.KANO & S.OGAWA ..... 36

An improved micromanipulation system controlled by a personal computer for microsurgery of pronucleus stage ova and early embryos.

YAMAKAWA, H., N.KASHIWAZAKI, J.MIZUNO, H.TAKAHASHI,  
M.YAMANE, E.NARISHIGE, S.TOMODA & S.OGAWA ..... 38

In vitro fertilization of mongolian gerbil eggs.

OKABE, K., S.WAKATA & K.SATO ..... 40

Chimpanzee sperm penetration into zone free squirrel monkey eggs. YANO, J., K.IDA, S.TSUKUI, A.FUKUDA, H.MATSUMOTO, Y.NODA, T.MORI & K.G. GOULD	..... 4 2
In vitro fertilization in crab-eating monkeys. IDA, K., J.YANO, S.TSUKUI, A.FUKUDA, K.TATSUMI, H.MATSUMOTO, Y.NODA & T.MORI	..... 4 4
Ultrastructure of polyspermic ova in human IVF-ET program. INOUE, M., Y.KOBAYASHI, I.HONDA, M.KANEKO & A.FUJII	..... 4 6
A study on embryo transfer in swine, 1.Synchronization of estrus in gilts with allyl trenbolone and embryo recovery. SHIOBARA, H., S.KUBO, M.SOETA, M.TAKEDA, M.FUKAYA, T.SUGIMOTO, O.SUGANO, S.SUGAWARA, K.KAMEYAMA & J.MASAKI	..... 4 8
Studies on the tubal insemination in rabbits-VI. SANKAI, T., K.KANAYAMA, T.ENDO & Y .SAKUMA	..... 5 0
Results of gamete intra-fallopian transfer. KOBAYASHI, Y., I.HONDA, M.INOUE, M.KANEKO & A.FIJII	..... 5 2

グルタチオンのラット卵子の培養に及ぼす  
影響について

Effect of glutathione on the development of eight-cell  
rat embryos in vitro.

辻井 弘忠

Hirotada TSUJII

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

Eight-cell rat embryos will develop into blastocysts when glutathione is the only fixed-nitrogen source in the culture medium. The optimum concentration for reduced glutathione is  $10^{-4}$  M and for oxidized glutathione,  $10^{-3.5}$  M. There was no significant difference in the number of blastocysts developing in glutathione or albumin medium.

緒論：近年、家畜および人における体外受精ならびに受精卵の移植に関する研究は、急進歩している。これらの過程において最も重要である卵子の培養は、現在牛、綿羊、山羊、ウサギ、マウス、フェレット、人で一応成功しているものの、牛、人においては合成培地での<sup>1,2)</sup> 培養には成功していない。また、ラット、豚、ハムスターでは培養が困難とされている。

これら卵子の培養の研究は、単に体外受精ならびに受精卵移植を高率にさせるだけでなく、卵子の栄養代謝の面からも探究する必要がある。

現在、ラット卵子の培養は8細胞から初期胚盤胞への発生しか成功していない。<sup>3,4)</sup>そこで、本実験は、マウス卵子の培養で好成績をあげているトリペプタイドのグルタチオンを取り上げ、ラット卵子においても充分窒素源として利用できうるかどうかを検討した。<sup>5)</sup>

材料および方法：当教室で自家繁殖しているWistar系ラット（生後3ヶ月齢、体重

220～250 g) を使用した。腫瘍像が発情前期を示した夕方、雄と一晩同居させ、翌朝交尾を確認した。受精後約74時間目の8細胞期の受精卵を使用した。灌流ならびに培養は、BrinsterのBMO<sub>C<sub>2</sub></sub><sup>1,2)</sup>液を使用した。なお、牛血清アルブミンの代わりにポリビニールピロリドン (1 g/l) を用い、10<sup>-5</sup> Mから10<sup>-1</sup> Mまでの還元型ならびに酸化型のグルタチオンを添加した。卵管を灌流して得た卵子は、卵管液等の影響を少なくするために、毛細管ピペットを用いて2～3回新しい培養液に移し変える操作を行った。培養は、直径6 cmのシャレーを用い流動パラフィン下で、CO<sub>2</sub> 5%、air 95%、37.5 °C 下の培養器内で行った。観察は、培養後24～48時間目における初期胚盤胞への発生数を調べた。

結果：還元型グルタチオンの各濃度における発生数を表1に示した。各実験区の値は、4

Table 1. Effect of reduced glutathione on the development of eight-cell rat embryos.

Molar concentration	Response		
	Exp.1	Exp.2	Total
0	0	0	0
10 <sup>-5.0</sup>	7	3	10
10 <sup>-4.5</sup>	21	19	40
10 <sup>-4.0</sup>	24	29	53
10 <sup>-3.5</sup>	20	21	41
10 <sup>-3.0</sup>	24	19	43
10 <sup>-2.5</sup>	11	10	21
10 <sup>-2.0</sup>	4	3	7
10 <sup>-1.5</sup>	2	1	3
10 <sup>-1.0</sup>	0	0	0

Response is the number of normal blastocysts which developed from 48 eight-cell rat embryos ( twelve in each four drops ) after 2 days in culture.

8個の8細胞から初期胚盤胞への発生数で示した。窒素源無添加において、胚盤胞への発生は全くみられなかつたが、還元型グルタチオン  $10^{-5}$  Mから  $10^{-1}$  Mの間で胚盤胞への発生がみられた。特に  $10^{-4}$  Mが最適濃度であった。

酸化型グルタチオンの各濃度における発生数を表2に示した。各実験区の値は、48個の

Table 2. Effect of oxidized glutathione on the development  
of eight-cell rat embryos.

Molar concentration	Response		
	Exp.1	Exp.2	Total
0	0	0	0
$10^{-5.0}$	3	5	8
$10^{-4.5}$	7	6	13
$10^{-4.0}$	28	30	58
$10^{-3.5}$	34	36	70
$10^{-3.0}$	29	35	64
$10^{-2.5}$	23	23	46
$10^{-2.0}$	22	15	37
$10^{-1.5}$	11	6	17
$10^{-1.0}$	3	6	9

Response is the number of normal blastocysts which developed from 48 eight-cell rat embryos ( twelve in each four drops ) after 2 days in culture.

8細胞から初期胚盤胞への発生数で示した。酸化型グルタチオンは、 $10^{-5}$  Mから  $10^{-1}$  Mの間で胚盤胞への発生がみられた。全体的に酸化型グルタチオンは還元型グルタチオンより胚盤胞への発生が高かった。特に発生が高かったのは、 $10^{-3.5}$  Mと  $10^{-3.0}$  Mであった。

次に牛血清アルブミン存在下におけるグルタチオン添加の影響を調べた。実験群は、1%牛血清アルブミン ( B S A ) 、 $10^{-4}$  M還元型グルタチオン、1% B S A +  $10^{-4}$  M還元型グルタチオン、 $10^{-3.5}$  M酸化型グルタチオン、1% B S A +  $10^{-3.5}$  M酸化型グルタチオ

Table 3. Effect of adding glutathione to the complete culture medium.

Nitrogen sources	Response		
	Exp.1	Exp.2	Total (%)
1% BSA	28	27	55 (57.3)
reduced glutathione ( $10^{-4}$ M)	29	28	57 (59.4)
1% BSA + reduced glutathione ( $10^{-4}$ M)	25	28	53 (55.2)
oxidized glutathione ( $10^{-3.5}$ M)	30	38	68 (70.8)
1% BSA + oxidized glutathione ( $10^{-3.5}$ M)	27	31	58 (60.4)

Response is the number of normal blastocysts which developed from 48 eight-cell rat embryos (twelve in each of four drops) after 2 days in culture.

ンの計5群であった。その結果を表3に示した。1%BSAにおいて55/96 57.3%、 $10^{-4}$ M還元型グルタチオン57/96 59.4%、1%BSA+ $10^{-4}$ M還元型グルタチオン53/96 55.2%、 $10^{-3.5}$ M酸化型グルタチオン68/96 70.8%、1%BSA+ $10^{-3.5}$ M酸化型グルタチオン58/96 60.4%の発生率であった。牛血清アルブミン存在下では、グルタチオン添加の影響は顕著でなかった。

考察：ラット卵子の培養において、8細胞から胚盤胞への発生には窒素源が必要である。また、この8細胞から胚盤胞への発生には、アミノ酸、特にグリシン、グルタミン、グルタミン酸、アラニン、アラギニン、セリン、バリン、アスパラギン酸およびトレオニンが効果的であることを報告している。<sup>4)</sup>今回のグルタチオンは、これら単一アミノ酸添加時の発生率より高かった。

還元型および酸化型グルタチオン添加で初期胚盤胞に発生した卵子を、偽妊娠4日目のラット4匹に移植したところ、還元型および酸化型グルタチオンの双方とも約55%の着床率で、正常に胚形成を行っているのを観察した。

これらのことから、ラット卵子においてもマウス卵子と同様、還元型ならびに酸化型グルタチオンが窒素源として充分利用しうること、また、その発生率は、牛血清アルブミンより高いことが判明した。<sup>5)</sup>

主要文献

- 1) Bedford J.M. (1971): Methods in mammalian embryology.  
J.C. Daniel, Jr.ed. W.H. Freeman. and Company. 37-116.
- 2) Mcgaughey R.W (1978): Methods in mammalian reproduction.  
J.C. Daniel, Jr. ed. Academic press inc. 1-65.
- 3) Folstad L., Bennett J.P. and Dorfman R.I. (1969).  
J. Reprod. Fert. 18, 145-146.
- 4) 辻井弘忠、竹内三郎 (1973) : 日本畜産学会報、44、506-511
- 5) Brinster, R.L. (1968): J. Reprod. Fert. 17, 521-525.



第 27 回  
哺 乳 动 物 卵 子 研 究 会

講 演 要 旨 集

会 期 昭和61年4月2日(水)  
会 場 日 本 大 学 会 館



# 排卵過程に働く凝固線溶系と胎盤蛋白

Coagulo-fibrinolytic system and placental proteins  
serving in the ovulatory process

相馬 広明

Hiroaki SOMA

東京医科大学産婦人科教室  
Department of Obstetrics & Gynecology, Tokyo Medical College

サンディエゴ動物園研究所所員

Fellow of the zoological Society of San Diego

## 1. はじめに

血液凝固過程には線溶、キニン系の產生が関与している。すなわち内因性と外因性の凝固因子がフィブリノゲン形成に参画しているだけでなく、接触因子としてのカリクレイン・キニン系を通して凝固系と線溶系との協調が保たれている。ことにプラスミノーゲンは、アクチベーターによってプラスミンを產生し、それがフィブリノーゲンやフィブリノゲンだけでなく、第V因子、第VIII因子などに働いて、分解産物FDPを作る。これらにはそれぞれインヒビターが存在し、その間のバランスが保たれている。最近排卵や受精、着床などの妊娠の成立や維持に、この線溶現象が関与していることが次第に知られて来ている。一方胎盤から抽出される数々の胎盤蛋白は、妊娠時の免疫抑制や妊娠維持や胎盤機能の表現などに働くと考えられるが、その生物学的性状の不明なものが多い。しかしその胎盤蛋白のあるものは、卵胞液や精漿のなかに出現したりするだけでなく、血液凝固や線溶に関連するものが見出されて来ている。

## 2. 卵胞液中の綿溶と胎盤蛋白

卵胞液の蛋白濃度やその組成は、血清のそれとほぼ同様である。卵胞液中にはフィブリノーゲンが存在する。血漿値より低いが、トロンビンにより凝固する。一方ラット卵巣顆粒膜細胞からプラスミノーゲン・アクチベーターが増生される。顆粒膜細胞はLHの增量と、それにつれてのCyclic AMPの細胞内レベルでの增量に反応して、プラスミノーゲン・アクチベーターを增量する。これにより生ずるプラスミンが卵胞壁を弱体化する。また卵胞液中には、多くのプロテアーゼインヒビターが存在するほか、胎盤蛋白PAPP-A（妊娠合併血漿蛋白一

A) やPP5が含まれているが、これらもまた抗凝固作用を有する。これらは卵胞内での顆粒膜細胞か莢膜細胞による産生が推測されるが、しかも排卵機序に関与すると思われる。

### 3. 精液の線溶と胎盤蛋白

精子頭部の先体は、卵への進入に際して特別なリソゾームをもつことが知られている。なかでもトリプシン様プロテアーゼ(アクロジン)が存在する。その他プラスミンの存在も推定される。とくに精漿には高度の線溶活性が認められているといわれ、プラスミノーゲン・アクチベーターが存在する。そして少量の線溶活性阻止作用しかないといわれているが、最近その精漿中にことにPAPP-AやPP5の胎盤蛋白が検出されている。

### 4. 受精卵の線溶

精子が卵子に進入し受精する際に先体反応が現れるが、これは卵子または卵丘から放出される特定物質によって誘導されると思われる。

その放出物質が何であるかはまだよく判らないが、精子がアクロジンやトリプシン、プラスミンなどの働きで卵の透明層を通過して卵黄膜に付着すると、透明層のこの通過部位はすぐに閉じ、他の精子の進入を許さない。これは卵膜の表層粒のトリプシン様酵素が作用して、透明層から精子のレセプター部位をとり除くと考えられている。この作用に線溶酵素や胎盤蛋白が働かないであろうか。ことにマウスやラットの受精卵周囲には卵管を通過する際に線溶活性が増量し、やがて着床時にはその線溶活性は消失するという報告がある。

### 5. むすび

以上のように排卵から受精、着床に至る過程に、凝固・線溶因子や、通常出現しないと思われる胎盤蛋白が検出されており、それに働いているということが推定される。この講演では、このほかにロンドン動物園研究所で行われているマーモセットサルの人工受精実験や、サンディエゴ動物園で行われている絶滅寸前のカリフォルニア・コンドルの卵の孵化プロジェクトについても紹介したい。

# 成熟ラットにおける過排卵誘起処理後の卵胞数と 排卵数に及ぼす抗LH血清の影響

Effects of anti-LH serum on the numbers of  
Graafian follicles and ova shed

利 部 聰

Satosi KAGABU

山口大学農学部家畜臨床繁殖学教室

Department of Veterinary Reproduction, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University.

**目的：**PMSG を投与すると、排卵ホルモンに反応して排卵に至るための条件をそなえた，“臨界点”以上に発育した大型卵胞が、発情前期には約 110 になる。しかし、この時期に hCG を投与しても排卵に至る卵胞は多くない。この理由として、発情前期に分泌される排卵性 LH により、排卵に至らないまでも卵胞が黄体化するということが考えられる。本研究は、LH の影響を除去して排卵数を増加させるために抗 LH 血清を投与した。また、同血清の卵胞発育に及ぼす影響を調べた。

**方法：**実験には12週齢の Wistar・今道系ラットを用いた。人工昼夜（14時間：照明、10時間：暗）で飼育した正常な4日型発情周期を2回以上くり返したものを使用した。発情後期の9:00時（暗期の中心を0:00時とする。以下同様）に PMSG40i.u. を筋肉内注射し、発情前期の13:00時に抗 LH 血清 0.2ml を静脈内注射した。卵胞の発育を調べるために PMSG 投与後78時間で屠殺し、常法に従って連続切片を作製して観察した。なお、閉鎖卵胞の判定は Hirshfield & Midgley Jr. (1978) によった。

排卵数を調べるために、上記処理ラットに PMSG 投与後78時間に hCG40i.u. を投与し20時間後に排卵数を調べた。対照実験として、抗 LH 血清の代わりにウサギ非免疫血清を静脈内注射した。抗 LH 血清は東北大学農学部家畜繁殖学教室から提供されたものである。

**結果：**抗 LH 血清を投与されたラットにおいて、550μm以上の非閉鎖卵胞は PMSG 投与後78時間にはほとんど消失し、それに代って初期閉鎖卵胞が多数観察された。また、抗 LH 血清を投与した場合、排卵は観察されなかった。

Table 1. Effects of anti-LH serum on follicular development and ovulation

Treatment	No. of follicles $\geq 550\mu\text{m}$ (M $\pm$ SEM)		Rats ovulating/ rats examined	No. of ova shed (M $\pm$ SEM)
	non-atretic	early atretic		
PMSG + Anti serum	16.5 $\pm$ 6.6	81.1 $\pm$ 7.2	—	—
PMSG + NRS	22.7 $\pm$ 8.2	79.2 $\pm$ 6.9	—	—
PMSG + Anti serum + hCG	—	—	0/5	—
PMSG + NRS + hCG	—	—	5/5	25.1 $\pm$ 7.6

PMSG were injected i. m. at 9:00 AM on the day of metestrus and after 51h with 0.2 ml anti-LH serum. Next day rats were injected 40 i. u. hCG at 3:00 PM, and killed 23h after hCG injection.

**考察：**実験に用いた抗 LH 血清は、ヒツジ LH (NIAMDD-oLH22) を抗原としてウサギで作製したものである。この抗 LH 血清は、発情の回帰しているラットに投与することにより、排卵を完全に抑制することができる (Honda et al. 1983)。本実験ではこの抗 LH 血清を PMSG 投与ラットに投与した結果、550 $\mu\text{m}$ 以上の非閉鎖卵胞はほとんど消失し、hCG を投与しても排卵に至らなかった。ラットの LH 分泌には、2種類あることが知られている。1つは排卵直前の周期的分泌 (LHサージまたは排卵性分泌) で、他の1つは持続的分泌である。排卵直前の卵胞に至る急速な発育には FSH とともに LH の持続的存在が不可欠である (Schwartz 1974) ことから、抗 LH 血清で LH の持続的分泌の影響まで除去してしまうと、卵胞の発育は阻止され、排卵に至らなくなるものと推察された。

### 主要文献

1. Hirshfield, A. N. and A. R. Midgley Jr. : Morphometric analysis of follicular development in the rat. Biol. Reprod., 19, 597-605, 1978.
2. Honda, K., Umezu, M., Sugawara, S. and Masaki, J. : Blockade of post-partum ovulation by anti-lutenizing hormone serum in lactating rats. Jpn. J. Anim. Reprod., 29, 63-68, 1983.
3. Schwartz, N. B. : The role of FSH and LH and their antibodies on follicular growth and on ovulation. Biol. Reprod., 10, 236-272, 1974.

# 卵胞培養後のウシ卵母細胞の成熟率に及ぼす卵丘細胞層の膨潤化と伸長度の影響

Effects of expansion and stretchability of the cumulus cell mass on maturation rate of bovine oocytes cultured in intact follicles

福井豊・藤井勝己・今井敬・ノエル・M・アルフォンソ・小野斉

Yutaka FUKUI, Katsumi FUJII, Kei IMAI, Noel M. ALFONSO  
and Hitoshi ONO

帯広畜産大学畜産学部肉畜増殖学教室

Dept. of Meat Animal Reproduction, Obihiro Univ. of Agric. and Vet. Med.

目的：近年、体外で成熟したウシ卵母細胞（卵胞内卵子）を体外受精やウサギ卵管などに移植して受精および発育能に関する研究が盛んに行なわれている。しかし、体外培養後の卵子が成熟（第2成熟分裂の中期）しているか否かを固定、染色しないで判定することは非常に困難である。今回、我々は卵胞培養後の卵胞内卵子を用いて卵丘細胞層の膨潤化と伸長度が成熟卵子を判定する指標になるかどうかを知る目的で、ウシ卵胞内卵子の体外成熟率に及ぼす卵丘細胞層の膨潤化と伸長度の影響を検討した。

方法：と畜場より得たウシ卵巣から直径5mm以下の卵胞を切り出し、正常卵胞と思われるものを実験に供した。卵胞培養は石黒ら<sup>1</sup>の方法により48時間行なった。すなわち、培養液としてTCM 199（阪大微研）+20%ウシ胎児血清を用いた。培養開始時には卵胞刺激ホルモン（FSH：アントリン、デンカ製薬）10μg/mlと黄体形成ホルモン（LH：NIADDK, NIH）5μg/mlを添加し、16時間目にはさらに5μg/ml LHを追加、そして24時間目からはLH 10μg/mlのみを含む培養液で48時間目まで培養を続けた。

培養後、個々の卵子の卵丘細胞層の膨潤化および伸長度の程度をそれぞれ4段階に別れた。すなわち、前者については、卵丘細胞層の>80%が膨潤化しているもの（卅），40～70%が膨潤化しているもの（廿），10～40%が膨潤化しているもの（+），ほとんど膨潤化していないもの（-）に別けた。後者については、>10mmのもの（A），5～10mmのもの（B），1～5mmのもの（C），そして0mmのもの（D）とした。なお、伸長度の測定は、個々の卵子を少量の培養液とともにスライドグラス上に置き、27ゲージの注射針の先で卵丘細胞層の一部を引き上げて、伸長度が最大の位置までの長さを計測した。

分類後、それぞれの卵子は0.1%ヒアルロニダーゼで卵丘細胞を除去し、常法に従い固定、オルセイン染色後成熟分裂の段階を検索した。

結果：Table 1に示すように、卵丘細胞層の膨潤化の程度が廿以上、伸長度が5mm以上の卵子の成熟率はそ

れ以下のものに比較して有意に ( $P < 0.05$ ) 高率であった。さらに、膨潤化の程度が卅であった卵子成熟率は廿のものより有意に ( $P < 0.05$ ) 高かった。卵丘細胞層の膨潤化の程度が廿以上である割合は 67.8% ( $75 + 66 / 208$ ) と高率であったが、伸長度が 5 mm 以上である割合は 44.4% ( $10 + 45 / 124$ ) と低かった。

Table 1. Effects of expansion and stretchability of the cumulus cell mass on maturation rate of bovine oocytes cultured in intact follicles

Degrees of expansion of the cells	No.oocytes examined	No.oocytes matured (%)	Ranks in stretchability of the cells	No.oocytes examined	No.oocytes matured (%)
+++	75	55 (73.3)a	A	10	8 (80.0)a
++	66	36 (54.5)b	B	45	28 (62.2)a
+	51	17 (33.3)c	C	49	16 (32.7)b
-	16	2 (12.5)c	D	20	3 (15.0)c

a,b,c: The figures with different superscripts in each column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

考察：本実験では卵丘細胞層の膨潤化の程度と伸長度を同一の卵子で検査しなかったが、両者は成熟卵子を判定する際の指標になるものと思われた。すなわち、膨潤化の程度が卅で、5 mm 以上の伸長度を有する培養卵子の 60~80% は成熟していると考えられる。今回は卵胞培養後の卵子を用いたが、卵胞から採取後に培養する従来の方法でも同様な結果であった（未発表）。Testart ら<sup>2</sup> はヒト卵母細胞で 30 mm 以上の伸長度を示した卵子の体外受精率はそれ以下の卵子よりも有意に ( $P < 0.001$ ) と高かったと報告している (78.6% と 30.8%)。本実験では 10 mm 以上の伸長度を示した卵子は少なかったが、これは測定方法の違いによるものと思われた。

#### 主要文献

- 石黒明裕, 今井敬, 久万田満, 福井豊, 小野斎 ウシ卵胞培養後の卵子成熟に及ぼす黄体形成ホルモンの添加量, 添加時期について, 第 77 回日本畜産学会の講演要旨, P 73, No. III - 29, 1985.
- Testart, J., Lassalle, B., Frydman, R. and Belaisch, J.C.: A study of factors affecting the success of human fertilization in vitro. II. Influence of semen quality and oocyte maturity on fertilization and cleavage. Biol. Reprod. 28: 425-431, 1983.

# ウシ卵胞液酸性ムコ多糖分画の

## 卵子退行遅延作用

Effects of acid mucopolysaccharide fractions of bovine follicular fluid on spontaneous fragmentation of mouse oocytes in culture

佐藤英明, 金山伊吹, 石橋武彦

Eimei SATO, Ibuki KANAYAMA  
and Takehiko ISHIBASHI

京都大学農学部畜産学科

Dept. of Animal Science, Faculty of Agri., Kyoto University

**目的** 卵丘細胞や顆粒膜細胞の間質および卵胞液中には、酸性ムコ多糖が含まれる。酸性ムコ多糖は、おそらく卵丘細胞や顆粒膜細胞から分泌されると思われるが、その蓄積は卵胞の発達と共に増加することから卵胞の発達に何らかの関連があるものと推測される。一方、第2減数分裂中期の卵胞卵を長期間培養すると最後には細胞は退行し、核の凝縮や分裂像が認められるようになる。しかもこのような退行的分裂像は、卵丘細胞をもたない卵子で高頻度に、かつ早期に出現する。

この研究は分裂像の出現を卵子の退行の指標として酸性ムコ多糖の役割を検討したものである。

**方法** 屠殺場で採取した卵巣から屠体の性周期の時期には関係なく、直徑 2 ~ 15 mm の卵胞から注射器で卵胞液を吸引採取し、直ちに遠沈し、その上澄を卵胞液として凍結乾燥した。抽出に先立ち、卵胞液凍結乾燥粉末を10倍量のアセトンにけん濁し、かくはんした後、遠沈し、沈殿分画を減圧下に放置し、脱脂乾燥粉末を作製した。活性化パパインを含む 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.8, 1 M NaCl, 5 mM システイン塩酸塩, 5 mM EDTA を含む) に脱脂乾燥粉末をけん濁し 65°C で 24 時間反応させた後、トリクロロ酢酸を加え、除蛋白して得た上澄を蒸留水に対して透析してトリクロロ酢酸を除き 2% 酢酸を含むエタノールで酸性ムコ多糖を沈殿させた。ICR系マウス (4 ~ 5 週齢) の卵巣から卵胞を解剖針で破り、遊離した卵胞卵を採取した。ピペット操作により、卵丘細胞を除いて卵丘細胞をもたない卵胞卵を得た。培養液としてピルビン酸 (0.25 mM), ウシ血清アルブミン (1 mg/ml) を含む修正 KRB 液を用い、炭酸ガス培養装置 (5% 炭酸ガス, 37.5°C) 内で培養し、倒立顕微鏡で 24 時間ごとに経時的に観察した。

**結果** 酸性ムコ多糖分画 1 mg/ml を含む培養液でマウス卵胞卵を培養しても、卵胞卵の極体放出は影響されない。その後継続的に培養すると対照区では培養後 72 時間で 44.4%, 120 時間では 72.2% の卵子が退行的分割を誘起した。酸性ムコ多糖分画を含む実験区では培養後 72, 96, 120 時間でそれぞれ 10, 30, 41.1% におい

て退行的分割が誘起されるがいずれの時間においても対照区にくらべ誘起率は有意に低い。

Table 1. Effects of acid mucopolysaccharide fractions (AMSF) of bovine follicular fluid on spontaneous fragmentation of mouse oocytes in culture.

Duration of culture (hrs)	AMSF,	
	0.0 (%)	mg/ml 1.0 (%)
48	0	0
72	44.4 ± 10.5	10.0 ± 4.2*
96	63.9 ± 10.4	30.0 ± 9.8*
120	72.2 ± 3.9	41.1 ± 6.9*

\* Significantly different from the control value  
(P < 0.05, Student t test).

**考察** 成熟した卵子はその周囲に膨張した卵丘を有している。膨張した卵丘には密な卵丘細胞間質が認められるが、その主たる成分はヒアルロン酸を中心とする酸性ムコ多糖である。それは受精に際して精子の先体から分泌されるヒアルロニダーゼによって分解されるが、その生理的役割は明確ではない。小さな卵子を卵丘の膨張によって、見掛けのサイズを大きくし、卵管采のうけとりを容易にしたり、機械的刺激に対する緩衝带になったり、物質の透過性を調節したりする機能をもつことが想像される。卵丘の酸性ムコ多糖は減数分裂の再開始に対応して出現し、その後急激に増加する。卵丘に蓄積する酸性ムコ多糖は卵丘細胞や顆粒膜細胞で産生分泌されたものと考えられ、卵胞液の酸性ムコ多糖と同じ起源をもつと推察される。今回卵胞液の酸性ムコ多糖類が卵子退行遅延作用をもつことが示され、卵丘細胞間質における酸性ムコ多糖の生理機能の一端が示唆されたと思っている。

### 参考文献

- 佐藤英明, 入谷明, 西川義正: 培養ブタ卵胞卵における“核の形成”と“分割”について.  
家畜繁殖誌, 25:95, 1979.
- Sato, E., Ishibashi, T., and Iritani, A.: Meiotic arresting substance separated from porcine ovarian granulosa cells and hypothetical arresting mechanism of meiosis. Advances in Exp. Med. Biol. 147:161, 1982.

# ゴールデンハムスター卵子に見られる 第1及び第2極体の形成と放出

Formations and extrusions of the first and  
second polar bodies in hamster eggs

平 尾 幸 久

Yuki-hisa HIRAO

和歌山県立医科大学生物学教室

Department of Biology, Wakayama Medical College

**目的：**哺乳動物卵のMeiosisに伴って起る極体の形成と放出に関する研究はこれまで多く行われてきた。その中でも、第2極体に関する研究が多いのに対して（1-6），第1極体のそれは少ない（4）。しかも同一動物卵での第1及び第2極体の形成過程を比較した研究も少ない。これは第2極体の形成を観察することが容易であるのに対して、第1極体のそれを観察するのが比較的難かしいことに起因していると思われる。そこでハムスター卵子のMeiosisの第1分裂を、ホルモンでコントロールし、次いで第2分裂を見るために人工媒精を行った。これらの観察には位相差及び電子顕微鏡（SEM及びTEM）を併用しながら行った。

**方法：**ゴールデンハムスター雌の発情周期の第1日目の午前にPMSGを、次いで第3日目の夕方か第4日の午前にhCGを腹腔内に注射した。第1極体の形成を調べるために、hCGの注射時を0時間として、各時間毎に卵巢を切り出し、卵胞から卵子を得た。第2極体の形成を調べるために、hCGの注射後12時間目に雄の精巢上体尾部から取り出した精子懸濁液を子宮に注入して、人工媒精を行った。媒精後5時間目から各1時間毎に、輸卵管を切り出し受精卵を得た。

**結果：**hCGの注射後2～3時間で卵胞中の卵子は、第1減数分裂を開始した。その時間的経過はTable 1に要約される。hCGの注射後7～8時間で、第1分裂の中期の分裂装置が卵表層近くに、しかも表層に対してやや斜めに位置する。卵核胞（GV）から第1分裂中期に至るまで、卵子の表面はMicrovilliが均一に分布するだけで何の変化も見られない。ところがhCGの注射後9時間目になって初めて卵表の一部に変化が生じた。均一に分布していたMicrovilliの一部域に太いMicrovilliが突き出し始め、それらは基部の方で融合し盛り上がる。融合部が殖えるにつれて、表面が滑らかになりながら突き出してくる。この突出部の中には第1分裂中期の分裂装置全体が含まれ、卵表層に対して斜めに位置するか、ほぼ水平に位置する。第1分裂終期と共に第1極体が放出されるが、その方向は分裂装置の位置によって決められ、卵軸に対して斜め方向に又は水平方向に放出

された。

Table 1. Time sequence of the first meiotic division and polar body formation in hamster after PMSG injection.

Hrs after PMSG injection	0 h	2~3 h	5~6 h	7~8 h	9~10 h	11~12 h
Status of egg nucleus	GV	GV break down	I-pro meta	I-me ta	Start of 1st p.body formation	Extrusion of 1st p.body

hCGの注射後12~13時間目に排卵が起り、輸卵管中に送られる。この時期には第1極体は完全に卵表から分離

されるが、その放出跡は円錐状の突起が突き出た特徴的な部域としてかなりあとまで残される。卵内には第2分裂中期の分裂装置が卵表層近くに、斜めに位置する。媒精後5~6時間目に精子頭部が卵表に到達し、取り込まれはじめると第2分裂後期となる。精子の侵入から第2極体の放出までの時間的経過はTable 2に要約される。

Table 2. Time sequence of the second meiotic division and polar body formation in hamster eggs after artificial insemination in vivo.

Hrs after artificial insemination	5~6 h	7~8 h	9~10 h	11~12 h	22~25h
Status of egg nucleus and sperm head	II-ana (Start of sp head penetration)	Extrusion of 2nd p.body	Completion of 2nd p.body extrusion (Penetration of sp tail)	Formation of both pronuclei	2 cell

精子頭部が完全に取り込まれると 第2極体となる部分が盛り上がる。この時は第1極体の時と違って、Microvilliがない滑らかな突出部を形成する。媒精後10時間で、第2極体が放出される。その方向は卵軸に対してやはり斜めに生ずる。更に第1極体放出の位置とはやや離れたところに第2極体が放出されることが判った。

**考察：**第1極体が放出される場所は、予め太いMicrovilliが突出する部域が出来る。これはOkada et al ('86)の観察と一致する。これらのMicrovilliがその基部で融合しながら、滑らかな表面をもつ小さな球体が突出してくる。これは卵細胞質の一部が太いMicrovilli中に移動することを意味する。第2分裂の分裂装置が位置する卵表部は、Microvilliのない滑らかな表面が既に形成されている。これはいつも第1極体放出跡とはやや離れたところに生じた。第1極体の形成には、GVの崩壊から、かなり長時間かけて行われたのに対して、第2極体の形成は精子の侵入と同時に開始するので、短時間で行われる。つまり第1極体形成には、それに必要な膜要素が1ヶ所に集中して用意するに充分な時間があると云える。一方第2極体の場合には、ラットで見られるような方法で放出される(5)。この違いは、減数分裂の第1及び第2分裂の細胞学的な違いに基づくものなのである。

#### 主要文献

- Austin C R (1951) : J.R. Microscop. Soc. 71 : 295~306.
- Oder D L, Blandau R J (1951) : Anat. Rec. 110 : 329~347.
- Oder D L, Renninger D F (1960) : Anat. Rec. 137 : 13~24.
- Okada A, Yanagimachi R, Yanagimachi H (1986) : Submicr. Anat. in press.
- Sato K, Blandau R J (1979) : Gamete Res. 2 : 283~293.
- Stefanini M, Oura C, Zamboni L (1969) : J. Cell Biol. 43 : 138a.

マウス胚における細胞骨格系の透過型電子顕微鏡  
による観察

Transmission electron microscopy of  
cytoskeleton in mouse embryo

藤井好孝・吉岡保

Yoshitaka FUJII, Tamotsu YOSHIOKA

倉敷成人病センター附属医科学研究所

Medical Science Laboratory, Center for Adult Diseases, Kurashiki

目的：マウス胚において compaction は 8 細胞期に起こる。Compaction に伴う割球の形態変化には細胞骨格系が関与している。しかし、microtubule や microfilament は細胞質に比べ電子染色が困難であり、電子顕微鏡による観察をしばしば困難にしている。我々は今回、非イオン性界面活性剤の triton でマウス胚を処理し、細胞質を一部流出させた状態で固定した後、細胞骨格系を電子顕微鏡で観察する方法を試みた。

方法：成熟 ICR マウスを自然交配させ、3 日後の朝に HAM F10 で卵管灌流することにより桑実胚を得た。胚はすぐに 0.2% triton, 0.0012M phenylmethylsulfonylfluoride, 0.003M MgCl<sub>2</sub>, 0.005M PIPES pH 7.0 の可溶化液で前処理し、2.5% glutaraldehyde 液で固定し、1% OsO<sub>4</sub> 液で後固定した。そして 2% uranium でブロツク染色後、ethanol で脱水して spurr に封埋し、超薄切片を二重染色した後、透過型電子顕微鏡で観察した。

結果：低濃度の triton 液による処理によって細胞質の一部は形質膜外に流出したが、全体的な細胞の形態は保持していた。Compaction が進行している桑実胚において microtubules は細胞膜下に存在し、図 1 に見られるように透明帶に面した形質膜下では膜と平行に走っている場合が多かった。一方、図 2 に見られるように胚の中心に近い部分に多数の microtubules 束が存在したが、この束は他の割球には認められなかった。microfilament は細胞質中に random に認められた。

考察：低濃度の triton 液による処理によって全体的な細胞の形を保持したまま、細胞骨格系の分布を電子顕微鏡で確認することが容易となった。今回用いた方法は、今後 compaction に伴う細胞骨格系の変化の解析に有効な手段となりうることが示唆された。

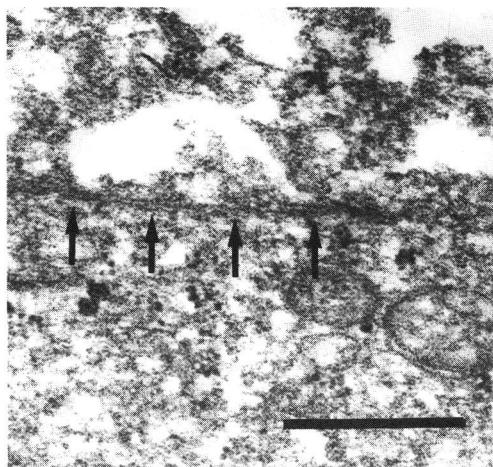


図1. 透明帯に面した形質膜下に存在する microtubule (矢印)。Barは  $0.5 \mu\text{m}$  を示す。

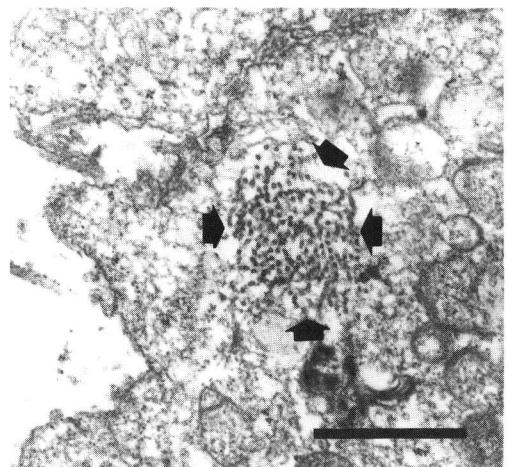


図2. 胚の中心部。下側の割球には多数の microtubules からできた束 (矢印) が見られる。Barは  $1 \mu\text{m}$  を示す。

#### 主要文献

1. Bernard, M. and Susan, P. : Microtubules influence compaction in preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* 84 : 217, 1984.
2. Johnson, M. H. and Maro, B. : The distribution of cytoplasmic actin in mouse 8 cell-blastomeres. *J. Embryol. exp. Morph.* 82 : 97, 1984.

モノクローナル抗体を用いて分離したブタ透明帯抗原  
の免疫原性について

Immunogenicity of the antigen isolated from porcine  
zona pellucida using monoclonal antibody

長谷川昭子・繁田 実・香山浩二・磯島晋三

Akiko HASEGAWA, Minoru SHIGETA, Koji KOYAMA  
and Shinzo ISOJIMA

兵庫医科大学産科婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Hyogo Medical College

目的：我々は、ヒト卵透明帯と共通抗原をもつブタ透明帯に対するモノクローナル抗体(Mab)を作製し、その受精への影響を調べてきた。その結果、特定のMabはブタとヒトの透明帯に結合するにも拘らず、ブタのin vitroの受精は阻害するが、ヒトのin vitroでの精子結合は阻害しなかった。<sup>(1)(2)</sup>しかし、Mabを処理した卵をさらに第二抗体、抗マウスイーグロブリンで処理すると、透明帯表面に沈降帯が形成され、透明帯への精子結合は完全に阻止された。このことから、このMabの透明帯上での結合部位は、精子結合部位そのものでないが、それに近接して存在するものと考えられた。従って、Mabの対応抗原分子を精製し、マウスに免疫してポリクローナル抗体を作製すれば、この抗体は、精子の透明帯への結合を阻止し、しかも透明帯に特異性がより高くなることが考えられるので、これを確認すべく、以下の実験を行った。

方法：1. 抗原の精製法—Mab 3A4-2G1(IgG<sub>1</sub>)は Sepharose4Bとカップリングさせ、免疫吸着体を作製した。結合したIgGはカラム1mlあたり1.5mgであり、カラムサイズは1×8 cmとした。単離ブタ透明帯を60°C 60分 pH9.6にて可溶化し、一回に蛋白量にして1-2mgをカラムに添加した。非結合部分を0.05% SDS含有PBS(pH7.4)で充分洗い流した後、3M NaSCNにて結合分画を溶出した。結合分画は水に対して充分透析した後、SDS-PAGEを行い、3A4-2G1の対応抗原の存在する92kdの位置(Rf 0.18~0.23)を切り出し、0.1% SDSを含む5mM NaHCO<sub>3</sub>で一晩、室温にて抽出した。これを水に対して充分透析後、分析及び免疫に用いた。

2. 免疫法—精製した抗原は2μg蛋白量を完全フロイントアジュバントと共にBALB/cマウスに注射し、2週間後同量を不完全アジュバントと共に注射した。さらに2週間後より、2μgを隔日に3回booster injectionを行った。1週間後に採血し、抗92kd抗血清を得た。

3. ヒト透明帯への精子結合阻止実験—手術摘出卵巣よりヒト卵胞卵を得、48時間前培養して成熟させた後、抗体で30分間処理を行った後、培養液で充分洗浄して実験に用いた。精子は3時間前培養した後、最終精子濃度

$2 \times 10^6/ml$  とし、卵を加えた。18時間後に位相差顕微鏡下に透明帯への結合・進入精子数を算定した。培養液には10% 非動化ヒト血清を含むHam's F10 を用いた。

結果：抗92kd抗血清の抗体力値は、単離ブタ卵を用いた蛍光抗体法で1:4000であり、同じくヒト卵を用いた場合1:2000であった。またこの抗血清はハムスター透明帯とも反応した。

ゲル内沈降反応では、可溶化ブタ透明帯と沈降線を形成しなかった。ヒト精子の透明帯結合に及ぼす影響では、表に示すように、抗単離ブタ透明帯抗血清よりやや弱いものの、抗92kd抗血清でも精子

の結合、進入に阻害作用が認められた。このとき透明帯表面に極くうすい沈降帯の形成がみられた。また、ブタ及びヒトの各組織の凍結切片を蛍光染色した所、抗単離透明帯抗血清(1:100) では透明帯以外の組織とも反応するのに対し、抗92kd抗血清(1:100) では、透明帯とのみ反応し、特異性の上昇が認められた。

考察：ブタ透明帯を用いて作製したMab の中には、第二抗体と共に卵に処理するとヒト精子の透明帯への結合を阻害するものがある。このMabを用いて、ブタ透明帯から対応抗原を分離し、マウスに免疫してポリクローナル抗体を作製した所、この抗92kd抗血清はヒト精子のin vitroでの卵への結合を阻害した。このことからMab 単独では受精阻害が起らない場合でも、精子結合部位に近接するエピトープを含む抗原分子に対するポリクローナル抗体を用いれば、受精阻害が起ることが明かになった。Dunbarらはブタ透明帯蛋白を動物に免疫し、妊娠性に及ぼす影響を調べ、動物が不妊になった場合にはホルモンバランスに関する重大な副作用が、生じることを報告している。<sup>3)</sup> このことからも、透明帯上の精子結合部及びそのごく限られた周辺部に対する抗体を作る必要がある。従って本研究で行ったような方法を利用して、その抗体が受精阻害作用をもち得る最小のフラグメントを分離すれば、より一層、透明帯の精子結合のみを障害する特異性の高い抗体が得られ、免疫学的避妊法への応用も可能と考えられる。

- 主要文献: 1) Isojima,S., Koyama, K., Hasegawa,A., Tsunoda,Y. and Hanada,A. (1984) J.Reprod. Immunol. 6 77-87  
     " Monoclonal antibodies to porcine zona pellucida antigens and their inhibitory effects on fertilization "
- 2) Koyama,K., Hasegawa,A., Tsuji,Y. and Isojima,S. (1985) J.Reprod. Immunol. 7 187-198  
     " Production and characterization of monoclonal antibodies to cross-reactive antigens of human and porcine zonae pellucidae "
- 3) Skinner,S.H., Mills,T., Kirchick, H.J. and Dunbar,B.S. (1984) Endocrinology 115 (6) 2418-2431  
     " Immunization with zona pellucida Proteins results in abnormal ovarian follicular differential and inhibition of gonadotropin-induced steroid secretion "

#### Effect of anti-92kd antiserum on human sperm binding to human zona pellucida

treatment	No. of examined eggs	No. of bound sperm/egg	No. of penetrated sperm/egg
normal mouse serum	4	68.8 ± 36.9	6.3 ± 4.6
anti-iPZP†	3	1.3 ± 1.5*	0.0 ± 0.0
anti-92kd	12	7.4 ± 6.0 **	0.3 ± 0.6

†; isolated porcine zona pellucida

\*; P < 0.02    \*\*; P < 0.001

# 受精に及ぼす精子不動化抗体の阻害作用

## Blocking Effect of Sperm Immobilizing Antibodies on Human In Vitro Fertilization

津久井伸一・野田洋一・福田愛作・松本 央・矢野樹理・森 崇英

Shinichi TSUKUI, Yoichi NODA, Aisaku FUKUDA,  
Hisashi MATSUMOTO, Juri YANO and Takahide MORI

京都大学医学部婦人科学産科学教室

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

**目的：**我々は、精子不動化抗体が頸管粘液中で精子の通過障害を起こすだけでなく、受精現象そのものに対しても阻害的に作用する事を報告してきたが、その作用機序に関しては、なお不明な点が多い。そこで我々は、精子不動化抗体陽性血清より IgG 分画を採取し、これを用いて透明帯貫通試験を施行すると共に、これにて処理した精子を電子顕微鏡にて検査し、先体反応に及ぼす影響を検索した。

**方法：**不妊外来通院中の婦人より得た血清に対し、精子不動化試験を行ない、補体依存性精子不動化抗体の検出を行なった。次に健康男子より得られた精液から“layering method”により運動性良好精子を選別し、7.5%精子不動化抗体陽性血清または陰性血清添加 modified BWW 培養中に suspend し、ペトリディッシュ内に spot を形成した。そこへ高濃度塩類溶液中に保存されていたヒト卵を導入し、24 時間培養した。培養終了後、ノマルスキー微分干渉顕微鏡にて、卵胞腔内の透明帯貫通精子数を算定した。さらに陽性血清または陰性血清より、プロテイン A 法にて IgG 分画を採集し、原血清相当の IgG 濃度に調整した条件下で、上記と同様の透明帯貫通試験を施行した。またこれら陽性血清および陰性血清にて処理した精子は、透過型電子顕微鏡にて検査し、先体反応の有無を検索した。

**結果：**精子不動化抗体は、今回の検査では全検体の 6.1%，また特に原因不明不妊症の場合の 9.1% が陽性であった (Table 1)。陽性血清または陰性血清存在下で透明帯貫通試験を行なった所、陰性血清存在下では精子の透明帯貫通が起ったが、陽性血清存在下では起らなかった (Table 2)。さらに血清の代りに IgG 分画を用いて同様の透明帯貫通試験を行なった所、ほぼ同様の結果が得られた。また陽性血清にて処理した精子は、陰性血清にて処理した精子と比較して、先体反応を起している精子の割合が減少していた。

**考察：**精子不動化抗体陽性血清由来 IgG 存在下では、精子の透明帯貫通が抑制された。これは精子不動化抗体そのものによる作用であると思われる。またその作用機序の一因として、精子の先体反応に対する抑制があ

るものと思われた。

Table 1

INCIDENCE OF SPERM IMMOBILIZING ANTIBODIES  
IN SERA FROM INFERTILE WOMEN

Clinical diagnosis	No. of subjects	No. of positive reaction <sup>a</sup>	% of positive reaction
Unexplained	88	8	9.1
Anovulation	38	1	2.6
Tubal obstruction	35	3	8.6
Uterine abnormality	15	0	0
Sperm abnormality	36	1	2.8
Total	212	13	6.1

a: Screened by sperm immobilization test

Table 2

## EFFECTS OF SPERM IMMOBILIZING ANTIBODIES ON THE PENETRATION OF SPERM THROUGH ZONAE PELLUCIDAE

Supplemented serum	No. of experiments	No. of penetrated ova (%)	Mean No. of penetrated sperm
SIA <sup>a</sup> -negative	6	8/9 (89%)	2.6
SIA-positive	5	0/11 (0%) <sup>b</sup>	0
Absorbed SIA-positive	2	3/3 (100%) <sup>c</sup>	1.7

a: Sperm immobilizing antibody

b: Significantly different from SIA-negative ( $\chi^2=11.7$ :  $p<0.002$ )

c: Significantly different from SIA-positive ( $\chi^2=8.7$ :  $p<0.004$ )

主要文献：

- Isojima S, Tsuchiya K, Koyama K, Tanaka C, Naka O, Adachi H: Further studies on sperm-immobilizing antibody found in sera of unexplained cases of sterility in women. Am. J. Obstet. Gynecol. 112: 199, 1972.
- Yanagimachi R, Lopata A, Odom C.B., Mahi C.A., Nicolson C.L.: Penetration of biologic characteristics of zona pellucida in highly concentrated salt solution: The use of saltstored eggs for assessing the fertilizing capacity of spermatozoa. Fertil. Steril. 35: 562, 1979.

## 1—2 Propandiolを用いたマウス受精卵の 凍結保存について

The survival of frozen and thawed mouse embryos  
with 1-2 propandiol as cryoprotectant

堀内俊孝・沼辺 孝・岸田忠政

Toshitaka HORIUCHI.Takashi NUMABE.

and Tadamasa KISHIDA

宮城県畜産試験場研究第1部

Miyagiken-Exp. Station of Anim. Sci.

目的 ; 1-2propandiol(PrOH) は凍結融解過程で生じる細胞内の氷晶形成を限定する作用があり、受精卵の凍結保存で有効な耐凍剤のひとつである。また、 PrOH の 1段階添加、ストロー内の 1段階希釈による凍結保存によって 高い生存率が得られている。しかし、 PrOH を用いた凍結保存について詳細に検討した報告は少ない。本研究は、マウス受精卵を用い PrOH の濃度、ストロー内の希釈液、植氷温度、液体窒素への投入温度について検討した。

方法 ; 6-7 週令の ICR系雌マウスに 5-10iu の PMSG および hCG を 54 時間間隔で腹腔内注射し、同系の雄と交尾させた。ちつ栓確認を受精第 1 日 (D1) として D4 の朝 PBI で子宮を灌流して Blastocyst を採取した。次に PrOH 溶液に室温で 1段階で移し、30 分間平衡後 0.25ml ストローに卵子を含む PrOH 層の両側をショ糖液層ではさみ封入した。そして 室温から -7 °Cまで 1分間に 1°C冷却し、-7 °Cで植氷、10 分間保持後 1分間に 0.3°C冷却 -30°Cで 10 分間保持し液体窒素 -196 °Cに投入した。凍結受精卵は約 32 °Cの温湯中で融解レストロー内で PrOH 層とショ糖液層を混合して PrOH を 1段階で希釈した。融解した受精卵は 20% 非動化子牛血清添加 Hams F10 を用いた体外培養法 (37°C, 空気下 5%CO<sub>2</sub>) における Expanded Blastocyst または Hatching / ed Blastocyst までの発育を指標として生存率を調べた。実験 1では PrOH の濃度について検討した。希釈液として 0.3M ショ糖液 (20% 非動化子牛血清水溶液使用) を用いた。実験 2ではストロー内の希釈液として 0.3 または 1.0M ショ糖液 (20% 非動化子牛血清水溶液使用), 0.3 または 1.0M ショ糖液 (20% 非動化子牛血清添

加PBI使用)を用い検討した。実験3では植氷温度について検討した。室温から-3°C,-5°Cまたは-7°Cまで1分間に1°C冷却し各温度で植氷した。実験4では液体窒素へ投入する温度-30°Cまたは-35°Cについて検討した。-35°C投入では-7°Cから-35°Cまで1分につき0.3°Cで冷却した。実験5ではPrOHの代りに1.4Mグリセリンを用いて耐凍剤の1段階添加、希釈を検討した。

結果;1.0M,1.2M,1.5M,2.2M PrOHでの生存率は各32%,59%,71%,13%で1.5MPrOHで高かった。0.3,1.0Mショ糖液(20%非働化子牛血清水溶液使用)、0.3,1.0Mショ糖液(20%非働化子牛血清添加PBI使用)による生存率は各71%,83%,96%,90%であった。植氷温度-3°C,-5°C,-7°Cでの生存率は各79%,89%,96%で-7°Cで高かった。液体窒素への投入温度-30°C,-35°Cでの生存率は各96%,32%で、-30°Cで有意に高かった。1.5MPrOHの代りに1.4Mグリセリンを用いると、その生存率は80%でグリセリンの1段階添加、希釈でもPrOHと同様高い生存率が得られた(表1)。

Table 1. The survival of mouse blastocysts after freezing and thawing with 1.5M PrOH or 1.4M Glycerol

Cryoprotectant	No. of embryos frozen-thawed	No. of blastocysts		Survival rates(%)
		expanded	hatching/ed	
1.5M PrOH	46	11	33	96
1.4M Glycerol	94	25	50	80

考察;マウス受精卵を1.5MPrOHに1段階添加し凍結融解後0.25mlストロー内の0.3Mショ糖液(20%非働化子牛血清添加PBI使用)で1段階希釈する方法で植氷温度-7°C、液体窒素投入温度-30°Cで高い生存率が得られた。本研究においてPrOHは受精卵の凍結保存において有効な耐凍剤のひとつであることが確認された。今回用いたマウス受精卵の発育段階はBlastocystであるが今後さらに初期発育段階の受精卵の耐凍性を検討する必要があると思われる。

### 主要文献

- Miyamoto,H.:The protective action of glycols against freezing damage of mouse and rat embryos:J.Reprod.Fert.54:427,1978.
- Renard,J.P. and Babinet,C.:High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straws with 1-2propandiol as cryoprotectant.J.Exp.Zool.230:443,1984.
- Renard,J.P.,Heyman,Y. and Ozil,J.P.:Freezing bovine blastocysts with 1-2propandiol a cryoprotectant:Theriogenology 15:113,1981.

# 耐凍剤連続的投与法によるマウス胚凍結保存

## Continuous Addition of Cryoprotectant for Mouse Embryo Cryopreservation

福田愛作・野田洋一・津久井伸一・松本 央・矢野樹理・森 崇英

Aisaku FUKUDA, Yoichi NODA, Sinichi TSUKUI  
Hisashi MATSUMOTO, Juri YANO, Takahide MORI

京都大学医学部婦人科学産科学教室

Department of Gynecology and Obstetrics Faculty of Medicine,  
Kyoto University

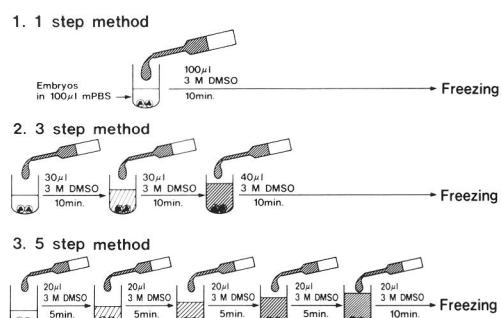
目的: Whittinghamがマウス胚の凍結保存に成功して以来、哺乳動物卵子の凍結保存は著しい発展をとげ、現在ではヒト凍結保存卵子の移植による生児も既に得られている。凍結融解法についてはマウス初期胚を用いて種々の検討が行なわれ、凍結融解後の胚の生存率もマウスでは90%以上となっている。然し乍らマウス胚凍結保存に用いられる胚は非常に状態のよい物が用いられている事はよく知られている。ヒト体外受精による胚の凍結保存では、受精卵の数が非常に少なくまた非常に貴重でありその選別は許されないという特殊な条件の元にある。ヒト受精卵の凍結保存を考えると、凍結保存法には未だまだ改善の余地が残されている。凍結融解法の1段階である耐凍剤の添加法については原法より現在に至るまで段階的添加法が用いられている。我々は耐凍剤の連続的添加法を試み、従来の1段階法、3段階法、5段階法との比較検討を行った。

方法: ICR系4週令雌マウスにPMSとHCGを48時間間隔で投与し、HCG投与後直ちにICR系成熟雄マウスと同居させ、妊娠3日目に卵管より8細胞期胚を卵管灌流法で回収した。凍結に用いた8細胞期胚には compaction以前と以後のものが混在していた。耐凍剤としてはDimethyl Sulphoxide (DMSO)を用い、最終濃度は修正Dulbecco PBS中で1.5 Mとなるよう

に1段階法、3段階法、5段階法と連続法の4つの方法で3 M DMSO溶液を室温(20°C)にて添加した。

段階法はFig. 1に、連続法はFig. 2に図示した。連続法は2mlのmPBSの入ったビーカーに50μmのmeshでできた袋をさげ、このなかに胚を入れビーカーの中でスチーリングバーを回転させ乍ら3 M DMSOをマイクロポンプで連続的に注入した。耐凍剤添加後胚を500μlのプラス

Fig 1



ティックストローに封入し、㈱ほくさん製プログラムフリー

ザー CRYOEMBRYO を用いて凍結した。プログラムは 20°Cより 1°C/min で低下させ -7°Cで 10 分間保持し自動植水、更に 0.4°C/min で低下させて -40°Cまで冷却した後、液体窒素 (-196°C) に投入する 2段階凍結法を用い、30 分から 24 時間液体窒素中に凍結保存した。融解法は 37°Cの温湯に投入する急速融解法を用い、耐凍剤除去には SUCROSE 法を用いた。凍結融解後の胚は、融解直後に倒立顕微鏡下に形態学的正常胚を観察記録した後に BWW medium で 37°C 5% CO<sub>2</sub> in air の条件下に培養し Expanded Blastocyst から Hatched Blastocyst まで観察記録した。統計処理は  $\chi^2$  test にて施行した。

**結果：**凍結融解直後の形態学的正常胚は Fig. 3 に示したように 1段階法では 91 個中 27 個 (29%)、3段階法では 106 個中 64 個 (60%)、5段階法では 133 個中 96 個 (73%)、連続法では 109 個中 85 個 (78%) であった。その後の発育については Fig. 4 に示したように、Expanded Blastocystへの発育率は 1段階法から連続法まで 77%から 82%と差はなかったが、

Hatching 率では、1段階法で 22%と低い成績であったが、3段階法から連続法では 45%から 57%と差はなかった。

**考察：**ヒト受精卵の置かれている特殊な条件を念頭に置き、凍結融解後の胚の生存率を更に高めるために耐凍剤の連続的添加法を試みたところ、連続法で最も良い成績を残したが、統計的有意差は 3段階法との間までしか認められず、5段階法との間には認められなかった。然しながら、連続法での操作のはん雑さ、即ち 50 μm の mesh の袋への胚の出し入れ等による胚への物理的ダメージを考慮すれば、連続法の成績は決して低いものではない。今後、連続法の操作の簡便化や耐凍剤除去時の連続法の応用が凍結融解後の胚の生存率を更に向上させるものと期待される。

#### 主要文献：

- Whittingham, D.G., Leibo S.P. and Mazur P.: Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. Science 1972; 178: 411~414
- Trounson, A. and Mohr L.: Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. Nature 1983; 305: 707~709
- Kasai, M., Niwa K. and Iritani A.: Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. J. Reprod. Fertil. 1980; 59: 51~56

Fig 2

#### 4. Continuous method

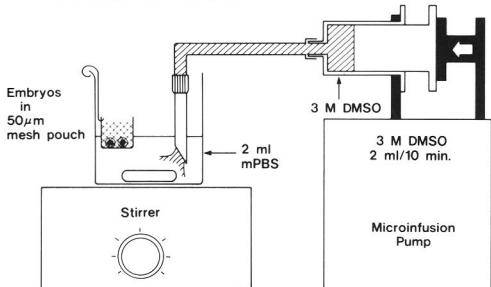


Fig 3

#### Survival rate of frozen-thawed mouse 8 cell embryos

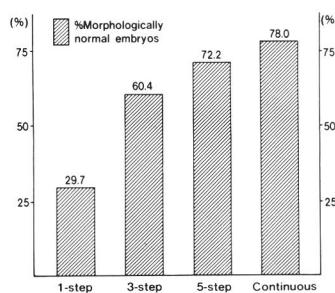
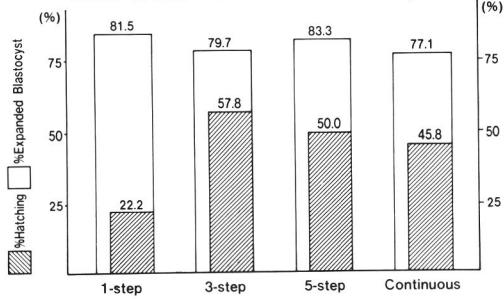


Fig 4

#### Culture of frozen-thawed mouse 8 cell embryos



マウスの2および4細胞期胚から得た  
分離胚の発生能について

Developmental ability of half-embryos  
divided from 2- and 4-cell stage in the mouse

鈴木宏志、富樫守、宮井達也、岡本道生

Hiroshi SUZUKI, Mamoru TOGASHI, Tatsuya MIYAI and Michio T. OKAMOTO

中外製薬 開発研究所

Drug Development Laboratories, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.

目的：透明帯を除去した2細胞期胚の単離割球から産仔を得ることは、胚の体外培養が比較的容易なマウスにおいてさえも極めて困難とされている<sup>1-3)</sup>。しかし、胚の2分離が正確で容易な2細胞期で分離された胚から個体発生を可能にすることは、一卵性双仔作出に大変有効である。本実験では、マウスの2および4細胞期で2分された胚の体外培養および産仔への発生能について検討した。

方法：IVCS系およびF1(C57BL/6J×C3H/He)成熟雌マウスにPMSGおよびhCG 各5i.u. を48時間間隔で皮下投与して過排卵処理を施し、hCG 投与後直ちに同系統の成熟雄と交配させた。hCG 投与後約48時間に、2および4細胞期胚を卵管灌流法により回収し、0.5%プロナーゼを含むHanks液で透明帯の除去を行った。次いで、透明帯除去胚をマルチプレートテラサキ(住友バークライト)内の流動パラフィンで覆われた0.02%EDTAを含むCa<sup>2+</sup>-free またはCa<sup>2+</sup>・Mg<sup>2+</sup>-free BMOC-3培地で10分以内あるいは10～30分間処理した後、ガラス毛細管ビバットで数回のビベッティングにより胚の2分離操作を行った。2分離胚のペアは、BMOC-3培地で72時間培養し胚盤胞までの発生を観察した。移植は、培養後48時間に発生したF1 2分離胚由来の胚盤胞を、偽妊娠2日目(腔栓確認日=Day 0)のIVCS系受容雌の子宮角へ、一侧あたり4～7個注入することにより行った。なお、生存胎仔数および着床数は、Day 17に受容雌を屠殺して観察した。また、一部の1/2 分離胚由来の胚盤胞のペアについては、妊娠雌に移植して分娩を観察した。

結果：割球を損傷することなく、ビベッティングにより2分離することが出来た割合は、2細胞期胚で94～100%および4細胞期胚では、56～88%であった。培養後72時間に、1/2 分離胚のペア双方が胚盤胞に発生した割合は、IVCS胚では23～86%、F1 胚では94～100%であった。また、2/4 分離胚

のペアでは、IVC S胚の83% およびF1 胚の100%が、双方ともに胚盤胞に発生した。F1 1/2胚および2/4 胚から発生した胚盤胞を移植した結果、それぞれ、25%(14/56)および29%(14/49)の生存胎仔への発生が観察された。さらに、1/2 分離胚の移植により、一卵性双子を得ることに成功した。

Table 1. In vitro development to the blastocyst of mouse half(1/2 and 2/4)-embryos separated by pipetting after treatment with  $\text{Ca}^{2+}$ - or  $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -free BMOC-3 medium

Type of half-embryo	Strain of donor	Medium for separation	Duration of treatment (min.)	No. pairs/no. half-embryos cultured	No. embryos developed to blastocyst (%)		No. pairs developed to B. for 72hr <sup>1)</sup> (%)
					48hr <sup>1)</sup>	72hr <sup>1)</sup>	
1/2	IVC S	$\text{Ca}^{2+}$ -free	-10	18/36	2(6)	27(75)	12(67)
			10-30	38/76	3(4)	40(53)	16(42)
	F 1	$\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -free	-10	28/56	3(5)	51(91)	24(86)
			10-30	30/60	1(2)	20(33)	7(23)
2/4	IVC S	$\text{Ca}^{2+}$ -free	-10	29/58	48(83)	57(98)	28(97)
			10-30	33/66	54(82)	63(95)	31(94)
	F 1	$\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -free	-10	19/38	33(87)	38(100)	19(100)
			10-30	34/68	46(68)	66(97)	32(94)

1) Length of culture.

考察：Mullenら（長嶋ら<sup>1)</sup>の引用による）はマウスの2細胞期胚を2分離後、体外培養する方法によって一組の一卵性双子を得たが、Fiser & Macpherson<sup>2)</sup>および角田と杉江<sup>3)</sup>は、この方法で産仔を得ることは困難であることを報告している。本実験においては、ピッティングにより2分離された1/2 および2/4 胚が体外培養により高率に胚盤胞へ発生することが観察され、さらに、発生した胚盤胞のペア双方が産仔への発生能を有していることが示された。

#### 文献

- 1) 長嶋比呂志、加納康彦、尾川昭三 初期胚の顯微手術適応による哺乳類一卵性多生仔の作出実験 哺乳類の発生工学 pp111-124 (1984)
- 2) Fiser,P.S & Macpherson,J.W. Development of embryonic structures from isolated mouse blastomeres. J. Anim. Sci. 56,33-36. (1976)
- 3) 角田幸生、杉江信 マウスおよびヤギにおける一卵性双子の作出、 家畜繁殖誌 30,18-23. (1984)

# 哺乳動物卵子のエレクトロフュージョン

## Electrofusion of Mammalian Blastomeres

菅原七郎・小松牧俊・石川嘉彦・亀山賢次・橋本伸二・正木淳二

Shichiro SUGAWARA, Makitoshi KOMATSU,  
Yoshihiko ISHIKAWA, Kenji KAMEYAMA,  
Shinji HASHIMOTO and Junji MASAKI

東北大学農学部家畜繁殖学教室

Laboratory of Animal Reproduction, Fac. of Agric. Tohoku Univ.

目的：近年，卵子の初期発生における核と細胞質との相互作用の研究や倍数体を作出する目的で細胞融合技術が導入されている。これまでには，不活化したセンダイウイルス<sup>1)</sup>やポリエチレングリコール<sup>2)</sup>を用いた研究が広く行われてきたが，前者は再活性化の恐れが，後者では卵子に対して毒性のあることが指摘されている。そこで，より安全かつ簡便でさらに再現性の高い新技術としてエレクトロフュージョンが考案され，培養細胞に用いられるようになった<sup>3)</sup>。しかし，哺乳動物ではマウス卵子で成功例が報告されているに過ぎず，方法がまだ確立されているとはいえない<sup>4)</sup>。すなわち，この方法での最適融合条件および融合後の発生能については，不明な点が多く残されている。そこで，本研究ではマウスおよびラットの2細胞期胚を用いて，最適融合条件や，処理条件と発生能との関係について検索した。

方法：常法により過排卵処理したICR系未経産マウスにICR系およびC57BL系の雄マウスを交配し，hCG投与から49～51時間後にPBSで卵管を灌流して2細胞期胚を回収した。一方，ラットは発情前期日の夕方雄と同居させ，交尾を確認した翌日（交配後47～49時間）にマウス同様，卵管灌流法により2細胞期胚を回収した。

エレクトロフュージョンのためのチャンバーは，プラスチックシャーレ（径80mm）で作製した。チャンバーの底には白金板（幅2.5mm）を取り付けて固定電極とし，PBSでチャンバーを満たした。一方，白金線（径70μm）の移動電極をマイクロマニピュレーターに取り付け，倒立顕微鏡下で融合操作を行った。

電極間は100μmとし，そこに卵子を保定用ピペットを用いて分割面を電極に対し垂直に保定した。1～2kV/cmの電圧で持続時間100～300μsecの電流を2秒間隔で2回通電した。処理卵子は直ちにWhittenの培養液で培養し，処理後30分，60分における融合状態を調べた。その後，常法に従って96時間まで培養し，発生状態を調べた。なお，通電をしない卵子を対照区とした。

結果および考察：当初，チャンバー内の溶液にCa-freeのPBSを用いてマウス2細胞期胚を融合させ

BMO C-3 中で培養したところ、融合率は50~70%であったが、その後の発生率が低かった。これは、電気刺激が卵子の発生能に回復しがたい損傷を与えたためであろうと考え、以後の実験では PBS に  $\text{Ca}^{++}$  を添加して融合操作を行った。同時に培養液も Whitten の培養液に代えた結果、60~100%の融合率になった。

マウスにおける融合率は、卵子の遺伝子型すなわち純系 (ICR × ICR)、またはハイブリッド (ICR × C57BL) によって全く有意差がみられなかった。しかし、その後の発生率を8細胞期で比較すると、ハイブリッド胚が20~30%純系を上回った。この事実は、 $F_1$  のヘテローンス効果に起因したものであると考えられる。本実験ではグループ1, 3, 5で胚盤胞まで発生したが、グループ5 ( $2 \text{ kV/cm}$ ,  $2 \times 125 \mu\text{sec}$ )において最も発生率が高く、マウスではこの条件が最適と思われる。他方、ラット卵子を用いるエレクトロフェージョンの条件として、 $2 \text{ kV/cm}$  の電圧が必要であることが明らかになった。なお、詳細については引き続き検討を行っている。

Table 1. Intensity and duration of d.c. pulses on the fusion of mouse blastomeres and developmental percentages of fused embryos in the different strains

Group	d.c. pulses		ICR × ICR			ICR × C57BL		
	Intensity (kV/cm)	Duration (μsec)	% of fused embryos	% of embryos developed to 8-cell Blastocyst		% of fused embryos	% of embryos developed to 8-cell Blastocyst	
				8-cell	Blastocyst		8-cell	Blastocyst
1	1	$2 \times 250$	76 (13/17)	8	8	80 (20/25)	35	15
2	1	$2 \times 300$	60 (6/10)	17	0			
3	1.5	$2 \times 250$	100 (10/10)	10	10			
4	2	$2 \times 100$	59 (13/22)	0	0			
5	2	$2 \times 125$	73 (19/26)	0	0	73 (11/15)	45	27
6	2	$2 \times 250$	68 (17/25)	0	0			
7	Control		—	86	76	—	71	64

### 主要文献

- 1) Graham, C. F. (1971) Virus assisted fusion of embryonic cells. In vitro methods in reproductive cell biology, pp. 154~165. Karolinska symp. res. methods reprod. endocrinology (E. Diczfalusy ed.) Stockholm
- 2) Eglitis, M. A. (1980) Formation of tetraploid mouse blastocysts after blastomere fusion with polyethylene glycol. J. exp. Zool., 213, 309~313.
- 3) Zimmermann, U. and Vienken, J. (1982) Electric field-induced cell-to-cell fusion. J. Membrane Biol., 67, 165~182.
- 4) Kubiak, J. Z. and Tarkowski, A. K. (1985) Electroporation of mouse blastomeres. Exp. Cell Res., 157, 561~566.

## ラットとマウスにおける 集合キメラ胚の作成

Production of chimeric blastocysts by aggregation  
of rat and mouse embryos

高橋文明・藤代克彦・高橋寿太郎・安田泰久

Fumiaki TAKAHASHI, Katsuhiko FUJISHIRO  
Jutarou TAKAHASHI and Yasuhisa YASUDA

岩手大学農学部動物育種学教室

Laboratory of Animal Breeding, Iwate University

**目的：**近年，実験発生学的手法としてのキメラ動物の作成が主にマウスを対象として行われている。しかし，ラットキメラ，さらにはラットとマウス間の異属間キメラについての報告例は少なく，ラットとマウス間の成体キメラの作出については，未だ成功をみていない。本実験では，組織培養に一般的に用いられているダルベッコ変法イーグル培地を用いて，同一実験系によるラットおよびマウスの同種間集合キメラ胚の作成，ならびにラットとマウス間の異属間集合キメラ胚の作成を試みた。

**方法：**実験には当研究室において，クローズド・コロニーで継代繁殖している3～6ヶ月齢の，Wistar系ラットおよびICR系マウスを用いた。ラットは妊娠4日目，マウスは妊娠3日目の16:00-18:00に放血屠殺し，子宮灌流により後期8細胞期胚を得た。胚は0.3%pronase含有ダルベッコ修正培養液に7～13分間浸し，透明帯を除去した。次に0.3%phytohemagglutinin P含有ダルベッコ修正培養液中で，ラット間，マウス間，さらにラットとマウス間で胚の接着を行った。培養は0.3%bovine serum albumin含有ダルベッコ修正培養液を用いて，37°C，5%CO<sub>2</sub>，95%空気混合気相中で行い，キメラ胚への発生を観察した。同時に透明帯付きおよび透明帯除去胚の培養を行い，比較対照とした。ダルベッコ修正培養液は，pHを7.4に調整した。

**結果：**Table 1に示すように，対照のラット，マウスの透明帯付きおよび透明帯除去胚の48時間後のexpanded blastocystへの発生率は，ラットでそれぞれ，30/34(88.2%)，20/23(87.5%)であり，マウス

でそれぞれ、19/20(95.0%), 22/23(95.7%) であった。また、集合胚の chimeric expanded blastocyst への発生率は、Table 2 に示すように、ラット間、マウス間でそれぞれ、40/46(87.0%), 38/42(90.5%) であり、ラットとマウス間では、22/29(75.9%) であった。

Table 1. Development of rat and mouse embryos from late eight-cell into blastocyst for 48 hours in culture

Control	No. of embryos cultured	No. of embryos developed from late eight-cell into Blastocyst(%)	Expanded blastocyst(%)	Degeneration(%)
Rat embryos				
with zona	34	4(11.8)	30(88.2)	0(0)
without zona	23	2(8.7)	20(87.0)	1(4.3)
Mouse embryos				
with zona	20	0(0)	19(95.0)	1(5.0)
without zona	23	0(0)	22(95.7)	1(4.3)

Table 2. Development of aggregated embryos into chimeric blastocyst for 48 hours in culture

Type of embryos aggregated	No. of embryos aggregated	No. of embryos developed from aggregated late eight-cell into		
		Chimeric blastocyst(%)	Chimeric expanded blastocyst(%)	Degeneration(%)
Rat↔Rat	46	4(8.7)	40(87.0)	2(4.3)
Mouse↔Mouse	42	1(2.4)	38(90.5)	3(7.1)
Rat↔Mouse	29	1(3.4)	22(75.9)	6(20.7)

考察：本実験において、同種および異属間の胚の接着により、chimeric expanded blastocyst への高い発生率が得られた。したがって、ダルベッコ修正培養液は、ラット、マウスにおける同種間集合キメラ胚の作成ならびに、ラットとマウス間の異属間集合キメラ胚の作成に有効であると考えられる。

### 主要文献

- Yamamura, K. and Markert, C.L. : The production of chimeric rats and their use in the analysis of the hooded pigmentation pattern. Develop. Genet., 2, 131, 1981
- Tachi, S. and Tachi, C. : Electron microscopic studies of chimeric blastocysts experimentally produced by aggregating blastomeres of rat and mouse embryos. Develop. Biol., 80, 18, 1980

# 哺乳動物卵子の細胞工学的研究、 前核置換マウスの生殖能力

Reproductive ability of the young produced by  
pronuclear transplantation in the mouse

安井 司・角田幸生・中村公章・杉江 信  
<sup>1)</sup> <sup>2)</sup>

Tsukasa YASUI・Yukio TSUNODA・Kosho NAKAMURA  
<sup>1)</sup>  
and Tadashi SUGIE  
<sup>2)</sup>

農林水産省畜産試験場・1) 科研製薬安全性研究所・  
2) 家畜改良事業団

National Institute of Animal Industry・1) Kaken  
Pharmaceutical Co.,Ltd.・2) Livestock Improvement  
Assoc. Japan

諸言：1983年に McGrathと Solter<sup>1)</sup>がマウス受精卵間で前核の置換を行い産子を得て以来、前核移植に関する研究が多数行われるようになり、現在いくつかの成功例が報告されている。演者らのグループでも McGrathと Solter の方法を用いてマウス受精卵の前核置換を行い産子を得ることに成功して<sup>2), 3)</sup>いる。<sup>4)</sup>今回、核置換により得られた産子について生殖能力を調べたので報告する。

方法：前核置換はCD1♀×CBA♂、F1(C57BL/6×CBA)♀×CD1♂、F1♀×CBA♂およびBALB♀×BALB♂の交配により得られた受精卵と、CD1♀×CD1♂の交配で得られた受精卵の間で行った操作は既報に順じて行い、まず、受精直後の卵子より雌雄両前核をマイクロマニピュレーターにセッテしたマイクロピペットで吸引除去したのち、別の受精卵より同様な方法で抜き取った雌雄両前核をセンダイウイルスを含む液と共に注入して前核の置換を行った。核置換卵はM16液内で4日間体外培養したのち、桑実胚から胚盤胞期で偽妊娠3日目のマウス子宮内に移植した。前核置換卵から得られた産子は光周期12D:12L、温度24°C、自由給餌、自由飲水で8週齢まで生育させたのち生殖能力検

定に供した。前核の由来が CD1×CBA、F1×CD1 および F1 × CBA の核置換マウスでは、雄については 8 週齢を経た CD1 雌マウスを 3 ないし 4 頭交配し、雌については同じく 8 週齢を経た CD1 雄マウスと交配させた。また、BALB×BALB 由来の雄マウスについては BALB 雌マウスと交配した。各マウスについて臍栓により交尾を確認し、妊娠の有無、産子の数、性および眼色を調べた。

結果：表に示すように、検定した核置換マウス雌雄合わせて 33 頭のうち 32 頭までが繁殖能力を有していたが、BALB×BALB 由来の雄マウス 1 頭が雌 1 頭を妊娠させたのち臍栓の形成が認められなくなり不妊状態となった。その他のマウスでは産子数、性比および眼色の分離比に異常は認められなかった。

前核置換マウスの交配成績

性	前核の由来	検定したマウス数	交配したマウスの系統(数)	繁殖能力		平均産子数	性比	産子の眼色(%)	
				健常	不妊			アルビノ	有色
	CD1×CBA	3	CD1 (11)	3	0	12.8	49.6	48.9	51.1
	F1×CD1	2	CD1 (8)	2	0	12.3	57.1	43.9	56.1
♂	F1×CBA	3	CD1 (11)	3	0	12.7	52.1	0	100
	BALB×BALB	5	BALB (16)	4	1*	6.3	45.5	100	0
<hr/>									
	CD1×CBA	10	CD1 (-)	10	0	10.7	48.6	47.7	52.3
♀**	F1×CD1	4	CD1 (-)	4	0	9.5	60.5	42.1	57.9
	F1×CBA	6	CD1 (-)	6	0	8.2	63.3	0	100

\* 交配途中より不妊状態となった

\*\* 各個体について 1 回の交配を行った

考察：以上の結果に示す通り、前核置換を行い生まれたマウスは、雌雄とも生殖能力には操作による影響は認められず正常であることが確認された。

#### 参考文献

- McGrath J & Solter : Science, 220:1300, 1983.
- Surani M.A.H., S.C.Barton & M.L.Norris : Nature, 308, 548, 1984.
- Mann J.R. & R.H.Lovell-Badge : Nature 310, 66-67, 1984.
- 角田幸生・安井 司・徳永智之・内田 駿・杉江 健・ 家畜繁殖誌 31(3):130, 1985.
- Tsunoda,Y., T.Yasui, N.Nakamura, T.Uchida & T.Sugie : J.Reprod.Fert. (submitted).

# 哺乳動物卵子の遠心処理と発生能について

## Development of Mammalian Eggs Centrifuged

菅原七郎・石川嘉彦・小松牧俊・亀山賢次・橋本伸二・正木淳二

Shichiro SUGAWARA, Yoshihiko ISHIKAWA,  
Makitoshi KOMATSU, Kenji KAMEYAMA,  
Shinji HASHIMOTO and Junji MASAKI

東北大学農学部家畜繁殖学教室

Laboratory of Animal Reproduction, Fac. of Agric. Tohoku Univ.

目的：哺乳動物卵子のうち、細胞質に脂肪滴や不透明物質を多く含む卵子では、核や前核は見えない。このため、それらの卵子に対し顕微操作を行う際は、螢光法<sup>1)</sup>や、遠心法<sup>2)</sup>の導入が試みられている。しかし、螢光法は紫外線を使用する点で、その後の発生を阻害する。一方、遠心法については処理の最適条件や、卵子の発生能との関係について研究が少なく、不明な点が多い。本研究では、牛と豚の卵子で、前核や核の観察を容易にする遠心処理法の最適条件を検索するとともに、マウス卵子をモデルとして、種々の条件下で遠心処理を行い、その後の発生能との関係について検索した。

方法：屠場材料の牛と豚の卵巣から、穿刺吸引により卵胞内卵子を採取した。これら卵胞内卵子は、採卵直後、成熟培養後、体外受精後、それぞれについて、20°Cの条件下で、10,000×g, 12,000×g, 15,000×g の遠心処理を3分間行った。

一方、マウス卵子は、ICR系未経産マウスを用い、PMSGとhCGで過排卵誘起により得た。これらは、hCG処理20時間後および24時間後の未受精卵子、前核期卵子、処理48時間後の2細胞期、4細胞期の卵子であった。なお、受精卵子は、ICR系およびC57BL系の雄との交配によって得たもので、20°Cの条件下で、10,000×g, 15,000×gの遠心処理を3分間行った。処理卵子は、常法によってWhittenの培養液中で120時間培養し、発生を観察した。

結果および考察：牛、豚卵子に対する遠心処理効果を検討した結果、これまで前核等の観察に必要とされた15,000×gをかけなくてよい。すなわち、12,000×gの遠心で不透明物質の片寄り方は、15,000×gの遠心に劣るが、十分前核や卵核胞の観察が可能なことが明らかになった。しかし、10,000×gでは脂肪滴や不透明物質等の片寄りが不十分で、前核等の観察が出来なかった。

一方、マウスの未受精卵子と前核期の卵子の発生能に及ぼす遠心処理の影響を2細胞期以上への発生率で比較した。その結果、前核期の卵子では非処理受精卵子の発生率と比べ、15,000×gの遠心処理後の受精卵子

の発生率は有意に高く ( $P < 0.005$ ) ,  $10,000 \times g$  の遠心処理後の発生率も高かった ( $P < 0.025$ ) 。しかし、3細胞期以上への発生率は、非処理卵子と処理卵子で差がなかった。これに対し、未受精卵子では、遠心処理卵子の単為発生率は、非処理卵子のそれよりも低く、処理卵子の単為発生率には遠心の強さによる差がみられなかった (Table 1) 。マウスの 'in vitro 2-cell block' の影響を受けない2細胞期、4細胞期の卵子の遠心処理では、各処理卵子、非処理卵子とも8細胞期までは、かなり高い発生率を示した。しかし、胚盤胞期までの発生率では、非処理卵子の方が高かった。

Table 1. Development of unfertilized, 1-, 2- and 4-cell mouse eggs<sup>a</sup> centrifuged

Stage of eggs	Centri- fugation	No. of eggs	Percent of cleavaged stage				
			2-cell	3-cell	4-cell	8-cell	Morula
Unfertilized	$10,000 \times g$	85	14	1	1	1	0
	$15,000 \times g$	70	14	1	1	0	0
	Untreated	77	31	5	5	0	0
1-cell	$10,000 \times g$	58	19	7	5	5	0
	$15,000 \times g$	65	35	3	3	3	0
	Untreated	59	5	5	5	0	0
2-cell	$10,000 \times g$	45		82	82	82	73
	$15,000 \times g$	46		83	83	80	37
	Untreated	16		100	100	94	75
4-cell	$10,000 \times g$	45				73	67
	$15,000 \times g$	34				50	44
	Untreated	8				100	100
							88

a : Eggs were collected from ICR strain.

### 主要文献

- 1) Pursel, V. G., Wall, R. J., Hammer, R. E. and Brinster, R. L. (1984) Cleavage of pig embryo after labeling with fluorescent dyes. J. Anim. Sci., 59 (Suppl. 1), 359-360. (Abstr.) .
- 2) Wall, R. J., Pursel, V. G., Hammer, R. E. and Brinster, R. L. (1985) Development of porcine ova that were centrifuged to permit visualization of pronuclei and nuclei. Biol. Reprod., 32, 645-651.

## 染色体検査により sexing されたマウス二分胚並びに それらの集合キメラ胚の移植試験、およびそれらの 移植で得られたキメラマウスおよび homo-dizygotic (?) キメラ双生仔の繁殖試験について

On the sexing by direct chromosomal analysis of bisected mouse early embryos and the transfer of the halved embryos and the aggregated chimeric embryos (consisted of one pair of halved embryos), and on a progeny test of the chimeric mice and the chimeric mouse twins (homo-dizygotic?)

長嶋比呂志\*、水野仁二\*\*、柏崎直巳\*\*、水野敦子\*\*\*、加納康彦\*\*、  
尾川昭三\*\*

Hiroshi NAGASHIMA, Jinji MIZUNO, Naomi KASHIWAZAKI  
Atsuko MIZUNO, Yasuhiko KANO & Shyoso OGAWA

\* 日清製粉（株）中研、 \*\* 明大農、 \*\*\* 雪印乳業（株）生物科学研

緒言：筆者らはこれまでに、マウスの切断二分胚を発達(*in vitro, in vivo*)させるための諸条件を明らかにするとともに、二分胚についての染色体検査法を確立し、胚の性判別を可能にしてきた。これらの研究で得られた技術を用いて、以下の実験を行ったので報告する 1) 性別を判定された二分胚の移植と、その結果得られた産仔の性的確認； 2) 性別の明らかな二分胚同士の集合処置によるキメラマウスの作出； 3) 二組の二分桑実胚（異系統）相互の集合によるキメラ双生仔(homo-dizygotic twin chimera) の作出

方法：ICR C3H および C57BL 系マウスを用いた。桑実胚の採取から切断二分胚の作製、分離胚の培養と移植までの一連の処置は既報に準じた。

実験 1：一卵性の対をなす二分胚の一方を染色体検査に供して性別を判定し、他方を移植した。染色体標本作成法としては、Tarkowski の air drying 法に Katoh & Tanaka の固定法、平島らによる修正を加えたものを採用した。染色体像の解析には TV モニターあるいはポラロイドカメラを用い、性別の判定は Stich & Hsu の基準によって行った。妊娠例では移植後 14～16 日目に剖検を行い、胎仔の実際の性と先に判定した性とを照合した。

実験 2：2 個の二分桑実胚（アルビノおよび有色系）を水野らの方法によって空の透明帯内に収納して 30～36 時間培養し、集合発達させた後移植した。その際、集合に用いたそれぞれの二分胚と一卵性の対をなす二分胚について、実験 1 の方法で性判別を行い、その結果から移植した集合胚を構成する二分胚の性の組み合わせを決定し、得られたキメラマウスの示す性と照合した。

実験 3：2 個の桑実胚（アルビノおよび有色系）に由来する 4 個（2 組）二分胚を、各々由来の異なる二分胚同士の組み合わせで、2 個の集合胚に再構築し、移植した。

なお、実験2、3で得られたキメラマウスをICR系マウスと交配し、その産仔におけるアルビノおよび有色個体出現の割合を調べた。

結果：実験1、2、3の結果を以下の表にまとめた。

表1 性判別された二分胚の移植成績と産仔の性

移植前 判定性別	移植胚数	レシピ エント	妊娠 例数	産仔数 と性
♂	22	9	6	8(♂)
♀	17	9	6	8(♀)

表3 相同的キメラ双生仔の作出結果

移植した 集合胚数	双仔 組数	レシピ エント	産仔数	双仔キメラ 組数
18	9	9	6	2*

\*キメラタイプ毛色バタンの双仔 1組  
単一タイプ毛色バタンの双仔 1組

表4 二分桑実胚の集合により得られたキメラマウスの繁殖試験

キメラ 個体No.	性	被毛色の割合 (白色:有色)	分娩 回数	産仔数	産仔の被毛色タイプ (白色:有色)
1	♂	6:4	19	247	247:0
2	♂	5:5	23	378	378:0
3	♂	4:6	23	389	381:8
4	♂	7:3	8	121	119:2
5	♂	7:3	5	78	78:0
6	♀	8:2	3	42	42:0
7	♀	9:1	2	26	26:0
8	♀	7:3	2	18	18:0

考察：二分胚の移植で得られた産仔の性は、予め判定されたものと全て一致しており、この胚の性判別法は今後生殖繁殖の基礎的研究に利用されることが期待される。雄胚と雌胚の集合により作出されるキメラマウスは、H-Y抗原とキメラ動物の性との関係を追求する上で有効なモデルとなるはずである。実験3で得られた2組の相同的キメラ双生仔が、各々双仔の両方が揃ってキメラタイプおよび単一タイプであった点は興味深い。

#### 主要文献

- 1) Nagashima, H., Matsui, K., Sawasaki, T. & Kano, Y.: J. Reprod. Fert., 70, 357-362, 1984
- 2) Tarkowski, A. K.: Cytogenetics, 5, 394-400, 1966
- 3) Katoh, M. & Tanaka, N.: Jpn. J. Genetics, 55, 55-65, 1980
- 4) Stich, H. F. & Heu, T. C.: Exp. Cell Res., 20, 248-249, 1960

前核期卵および初期胚に対する効果的な  
パーソナルコンピューター制御顕微手術システム

An improved micromanipulation system controlled by a personal computer  
for microsurgery of pronucleus stage ova and early embryos.

山川宏人・柏崎直巳・水野仁二・高橋 一\*  
山根雅巳\*・成茂栄一\*\*・友田仁\*\*\*・尾川昭三

Hirohito YAMAKAWA, Naomi KASHIWAZAKI, Jinji MIZUNO,  
Hajime TAKAHASHI\*, Masami YAMANE\*, Eiichi NARISHIGE\*\*,  
Shinobu TOMODA\*\*\*, and Shyoso OGAWA

明治大学・家畜繁殖学研究室  
Lab. of Animal Reproduction, Meiji University

\*早稲田大学・機械設計研究室

Lab. of Machine Design, Waseda University

\*\*成茂科学器械研究所

Narishige Scientific Instrument Lab.

\*\*\*明治大学・家畜解剖学研究室

Lab. of Animal Anatomy, Meiji University

〔目的〕我々は先に電動 Pulse motor(PM) 駆動のMicromanipulator (MP) をPersonal computer (PC) で制御するSystemを開発し、これによりマウス、ラットの受精卵および初期胚の顕微操作が可能なことを報告した<sup>1, 2)</sup>。その後、これに用いた器具ならびにソフトに改良を加えた結果、microinjection, microdissectionのみならず、さらに複雑な顕微手術をより正確に、しかも安定して行い得るようになったので報告する。

〔方法〕3次元油圧MPの動作を3個の電動PM (1/ $\mu$ m/pulse) で行い得るようにした。MPのX及びY軸の各作動部にGap sensor(位置のセンサー、分解能0.5  $\mu$ m) を組込んだ。そしてPCの指令とMPの動きの誤差が検知されると、その誤差がPCで補正されうるフィードバック機構が働くようにプログラムを作製した。それによりMicrotool

(MT; Microneedle, Microblade, Micropipette) の先端の移動が正確に制御されるSystemを作製した。卵及び胚の保定にはPM駆動による陰圧作製用の保定MPを試作し、その吸引保定用Micropipette接続基部に圧Sensor (-50gf/cm<sup>2</sup> ~ +50gf/cm<sup>2</sup>) を組込み、圧変化信号をPCで読み取り、フィードバック機構により安定した保定を行い得る様にした。圧および位置のSensorは、圧および位置の変化を電圧の変化としてとらえ、この電圧の変化をA/D converterによりデジタル信号に置き換え、PCに読み取られるようにした。以上のMPのPM駆動を支配するPulse SignalをPC(NEC PC-9801F)であらかじめ制作したプログラムにより制御するようにした。顕微手術ではまず、顕微TV画面のX・Y座標軸上の受精卵および胚の映像に対してSuper imposerでMTの先端の出発点(S)及び目標点(T)を表示し、PCによりSとTの距離が演算される。演算結果に基づきPulse Signalが1pulseづつPMに送信される。Gap sensorが各Pulse毎に距離を測定し、その測定値が0となる迄Pulse Signalが送信されるSystemである。主としてマウス前核期卵、および桑実胚について顕微手術を行なった。

〔結果〕 (1) XとY軸、XとZ軸の同時動作を要する複雑な顕微操作(退化萎縮部分の除去、透明帯への割球の還納など)がこのSystemで容易となった。この事実は、このようなPC制御のMPの利用の将来への可能性、Potentialityを示唆している。(2)保定MPに圧sensorを組むことにより受精卵、および胚の保定は極めて安定、確実となった。顕微操作中に試料が保定用Micropipetteから離脱あるいはMTに付着して移動することがなくなった。(3) MT先端の動作が正確に制御される結果；前核期受精卵の核内へのMicropipetteの挿入操作、MicrobladeのX軸進行による桑実胚の側面からの切断操作、この動作にMTがTに到達した地点でZ軸50μm振幅動作を加える操作、およびMicroneedleのZ軸動作による牛桑実胚の切断二分離などの顕微手術(各15例以上)がほとんどの例で安定かつ確実に行い得た。

### 主要文献

1. 尾川昭三、高橋一、水野仁二、柏崎直巳、山根雅巳、成茂栄一：汎用マイクロコンピューター制御による受精卵および初期胚への注入、切断の顕微操作。哺乳卵研誌、2：71, 1985.
2. Ogawa, S., Takahashi, H., Mizuno, J., Kashiwazaki, N., Yamane, M., Narishige, E.: Personal computer-controlled microsurgery of fertilized eggs and early embryos. Theriogenology, 25:335, 1986.

# スナネズミの体外受精に関する検討

In vitro fertilization of mongolian gerbil eggs.

日本大学農獸医学部 家畜繁殖学教室

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

岡部景子, 若田修司, 佐藤嘉兵

Keiko Okabe, Shuji Wakata and Kahei Sato

哺乳動物における体外受精(IVF)はYanagimachi and Chang(1963)が in vitro でハムスターの精巣上体精子のcapacitationに成功して以来、ヒトを含む多くの動物において行なわれ成功している。最近、実験動物として繁殖用され始めたスナネズミ(*Meriones nuguiculatus*)のIVFに関する報告は少なく( Noske, 1971, Niwa, et al., 1983), それらの実験結果では受精成立の証明が不十分か、または受精率が極めて低い。岡部と佐藤(1984)はBSAを含むBrinsterの培養液あるいは修正したBrinsterの培養液を用いて、スナネズミの精巣上体精子にハムスターのzona-free卵子へのIVF実験を行い十分なcapacitationを誘起することに成功した。しかし、この精子を用いたスナネズミの卵子とのIVFでは、極めて低い受精率しか得ることができなかった。今回、我々はより確実なスナネズミのIVFを確立するための培養液について検討を加えたので、その結果について報告する。

材料および方法：実験に用いたスナネズミは当教室で繁殖維持した成熟雌雄である。IVFに用いた卵子は、PMSG 20 IUを皮下注射した後56時間目hCG15IUを腹腔内に注射し、過排卵を誘起して得たものを用いた。一方、精子は精巣上体尾部の一部を切開して、その内容物を押しだして培養液中にけん濁させた。これをCO<sub>2</sub>インキュベーターに静置して精子をswim-upさせて活発な精子を回収し、実験に用いた。精子はcapacitationを誘起するためにCO<sub>2</sub>インキュベーター(5% CO<sub>2</sub>-Air, 37°C)で1時間の培養を行なった後IVFに用いた。尚、培養液は修正Brinster液(MB液)とTALP mediumを用いた(Table 1)。IVFはプラスチックのculture dishに5-7個の卵子を培養液のドロップ中に加え、ミネラルオイルで覆いドロップ中に培養した精子を加えた。媒精後1-6時間に卵子を取り出し、位相差顕微鏡

下で観察を行なった。

結果: 4時間後に観察した場合、mTALP中で培養した精子を用いてIVFを行なった結果、52.0%の卵子に受精がみられた。このmedium中のtaurineを2倍にした場合、受精率は15.4%であった。一方、精子のcapacitation誘起に有効とされているretinol 40 μg/mlを添加した場合、38.5%の受精を示した。以上の結果は、mTALPへのtaurine, retinolの添加がスナネズミ精子のcapacitationに有効でないことを示している。次に、MB液を用いた実験では、特にtaurine 6.3 μg/mlとepinephrine 0.9 μg/mlの添加において優れていた(73.6%)。また、MB液によって培養した精子によるIVF実験において、媒精後1-6時間における受精過程を調べた。その結果はTable 2に示した。媒精後3時間で受精率がピークになり、それ以後、ほぼ一定した受精率を示した。Vitellus内に侵入した精子は、媒精後1時間で頭部が膨化し始め、3時間には雄性前核へと発達した。

Table 1. Chemical composition of MB medium

NaCl	5,545 (mg/l)
KCl	356
CaCl <sub>2</sub>	251
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	162
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	293
NaHCO <sub>3</sub>	2,106
Na-pyruvate	55
Na-lactate	2,255
Glucose	1,002
Streptomycin(ug/ml)	50
Penicillin-G(i.u./ml)	100
taurine	63
L-epinephrine	9
retinol(ug/ml)	30
Mongolian gerbil serum(v/v%)	5

Table 2. In vitro fertilization of Mongolian gerbil eggs in m-Brinster media added with 30μg/ml retinol and 5% ICS(B-2)

Time after insemination (hours)	No. of eggs examined	No. of eggs fertilized(%)	Stage of fertilization of eggs			
			zone penetration of spermatozoa(%)	vitelus penetration of spermatozoa(%)	enlargement of sperm head(%)	pronucleus formation(%)
1	55	19(34.5)	12(63.2)	5(26.3)	2(10.5)	
2	54	21(38.9)	10(47.6)	6(28.6)	5(23.0)	
3	56	39(69.6)	10(25.6)	12(30.8)	11(28.2)	6(15.4)
4	53	39(73.6)	9(23.1)	14(35.9)	10(25.6)	6(15.4)
5	54	40(74.1)	7(17.5)	16(40.0)	11(27.5)	6(15.0)
6	55	42(76.4)	3(7.1)	23(54.0)	11(26.2)	5(11.9)

pH value of the medium used is 7.2.

### 主要文献

岡部景子, 佐藤嘉兵 (1984) : スナネズミ精子のcapacitation誘起に関する検討. 日本不妊学会雑誌 30, 132.

丹羽二, 竹中郁, 今井裕, 入谷明 (1982) : 透明帯除去スナネズミ卵子の体外受精. 日本畜産学会第73回大会講演要旨, pp.77.

Noske I. G. (1971) : In vitro fertilization of the Mongolian gerbil egg.

Experientia, 28 : 1348-1350.

# 透明帯除去リスザル卵へのチンパンジー精子貫通

Chimpanzee sperm penetration into zona free squirrel monkey eggs

矢野樹理・井田憲司・津久井伸一・福田愛作  
松本 央・野田洋一・森 崇英・K.G. Gould\*

Juri YANO, Kenji IDA, Shinichi TSUKUI, Aisaku FUKUDA,  
Hisashi MATSUMOTO, Yoichi NODA, Takahide MORI, K. G. Gould

京都大学医学部婦人科学産科学教室  
エモリー大学ヤーキーズ靈長類研究所\*

Dept. of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, Kyoto University  
Yerkes Regional Primate Research Center, Emory University

緒言：受精現象は、精子の卵透明帯貫通及び精子と卵の融合の2つの過程から成り立っており、異種精子の識別は透明帶上で行なわれることが多い。透明帯は異種精子侵入を防ぐバリヤーとして働いているが、この透明帯を除去すると、卵が異種精子を受け入れるようになることは、多くの動物卵で確認されており、特にハムスター卵は、Yanagimachi<sup>(1)</sup>が、ヒト精子の透明帯除去ハムスター卵への侵入を報告して以来、ヒト精子の受精能を評価する方法として、多くのヒト体外受精施行施設で重用されている。このように、多くの動物（マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ブタ、ウシ、ヒト）の透明帯除去卵に関する研究報告がなされているにもかかわらず、サル卵を用いた研究は少なく、現時点では、我々が透明帯除去リスザル卵を用いて行なったリスザル精子貫通試験<sup>(2)</sup>が報告されているにすぎない。今回、我々は、リスザル精子のかわりに、異種精子であるチンパンジー精子を用いて媒精を行ない、透明帯を除去したリスザル卵へのチンパンジー精子貫通を確認したので報告する。

方法：卵採取には、エモリー大学ヤーキーズ靈長類研究所の成熟雌リスザル21頭を使用した。pure FSH 5 iu/日を7日間投与して卵胞発育を促進し、HCG 500 iu 投与後18時間後に、腹腔鏡下に採卵した。採取された卵は、TC 199に15% ヒト臍帯血清（56°C、30分間非効化）を加えた培養液中で、5% CO<sub>2</sub>、95% air, 37°Cにて成熟培養を行ない、0.1% ヒアルロニダーゼ溶液にて濾胞細胞を分散させ、0.5% プロテアーゼ溶液または0.5% トリプシン溶液にて透明帯を除去した後、実験に供した。チンパンジー精液は、成熟雄チンパンジー4頭より、用手法にて採取し、培養液を用いて300G、5分間遠沈を3回繰返して精子洗浄を行なった後、swim up法にて運動良好精子を選別した。organ culture dish 中にて、透明帯除去リスザル卵に対し、 $1 \times 10^6$  /mlの濃度にてチンパンジー精子を媒精し、一定時間インキュベーションを行なった後、10% ホルマリンにて固定、0.25% ラクモイドにて染色を行ない、ノマルスキーメッカ干渉顕微鏡下で精子貫通の有無を観察した。

一部の卵は、0.2% グルタルアルデヒドにて固定後、エタノールにて脱水し、炭酸ガスにて臨界点乾燥を行ない、走査顕微鏡にて、卵及び精子の微細構造の観察を行なった。

**結果：**得られた成熟卵53個のうち24個は、0.5% トリプシン溶液にて透明帯除去を行なったが、40分処理しても完全には透明帯除去できず、機械的除去を必要とし、その際10個の卵が損傷をうけた。残った14個の卵に媒精を行なったが、18時間後も侵入精子は一匹も認められなかった。一方、0.5% プロテアーゼ溶液にて処理した29個の卵は、約3分間処理により、卵損傷することなく透明帯を融解除去することができた。この卵に媒精を試みたところ、表1に示す如く、媒精後4時間すでに高率にチンパンジー精子侵入が認められ、8時間あたりから前核形成が観察された。18時間後には、21個中7個が細菌混入により損傷をうけたが、残り14個中8個にチンパンジー精子の膨化頭部または前核形成が観察された。走査電子顕微鏡による観察では、リスザル卵表面は長い微絨毛でおおわれており、チンパンジー精子は卵表面に垂直に接触し、頭部先端が卵微絨毛によりしっかりと捕えられているのが観察された。

**結論：**透明帯除去リスザル卵へのチンパンジー精子貫通が確認された。このことから、リスザル卵の異種精子識別機構は、ハムスターとヒトと同じように、主として透明帯上に存在していると推察された。またこの方法を用いることにより、ヒト精子に対するハムスター試験のように、チンパンジー精子の受精能を調べることが可能であると思われ、ワクチン検定などの面で医学にも貢献度の高いチンパンジーを繁殖させるための、生殖理解明にも役立つものと考えられる。サル卵を用いた実験系は、倫理的に制約の多いヒト体外受精法の改良のための基礎実験系としても有用であると考えられる。

表1. 透明帯除去リスザル卵へのチンパンジー精子貫通試験

透明帯処理方法	培養時間	透明帯除去卵総数	精子貫通卵数	多精子侵入卵数	前核形成卵数
0.5% プロテアーゼ	4時間	5	( 2 40 %)	( 2 100 %)	( 0 0 %)
	8時間	3	( 1 33.3 %)	( 0 0 %)	( 1 100 %)
	18時間	14	( 8 57.1 %)	( 7 87.5 %)	( 5 62.5 %)
0.5% トリプシン	18時間	14	( 0 0 %)	( 0 0 %)	( 0 0 %)

文献：

- (1) Yanagimachi R et al: The use of zona free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa Biol. Reprod. 15 pp 471~476 (1976)
- (2) 矢野樹理他：透明帯除去リスザル卵の精子貫通能検査、産婦人科治療 51 p 783 (1985)
- (3) Yano J et al: Induction of follicular growth in the squirrel monkey (Saimiri sciureus) with human urinary follicle stimulating hormone (Metrodin) Fertil. Steril 43 pp 799~803 (1985)

# カニクイザルの体外受精

In vitro fertilization in crab-eating monkeys

井田憲司・矢野樹理・津久井伸一・福田愛作  
辰巳賢一・松本 央・野田洋一・森 崇英

Kenji IDA, Juri YANO, Shinichi TSUKUI,  
Aisaku FUKUDA, Kenichi TATSUMI,  
Hisashi MATSUMOTO, Yoichi NODA, Takahide MORI

京都大学医学部婦人科学産科学教室

Dept. of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, Kyoto University

**目的：**ヒト体外受精の手法の改良、及びヒト初期胚の研究推進上、サル体外受精の技術を向上させる意義は大きい。しかし、サル体外受精はヒト体外受精に比し、いまだかなり手法の遅れがあり成功例も少ない。各種サルの体外受精の手技の確立が待たれるところである。我々は、月経周期が28～29日で年周期性が無い等、ヒト生殖パターンに近いカニクイザルの体外受精を試み、各種条件の摸索を行った。その過程で受精例をみたので併せ報告する。

**方法：**妊娠性の確認された雌18頭(3～4kg)、雄2頭(6kg)のカニクイザルを用いた。各サルは、恒温下、日照時間14時間、個別ケージにて飼育した。各ケージの床の出血斑を確認することにより、月経周期を定め、月経第2日目より7～11日間hMG 37.5 IU/dayを筋注、hMG最終投与より24～36時間後にhCG 1000～1500 IUを筋注した。その後24～49時間で塩酸ケタミン(20～25mg/kg)麻酔下に開腹、採卵を行った。卵は保温下にDulbecco's PBS(pH 7.4)中に運搬、微分干渉顕微鏡下に成熟度の判定、分類を行い、速やかに15%血清加Ham's F10(pH 7.4)に移し、5% CO<sub>2</sub> in air 37°Cにて培養した。血清は、FCS、サル血清、ヒト臍帯血を用いた。

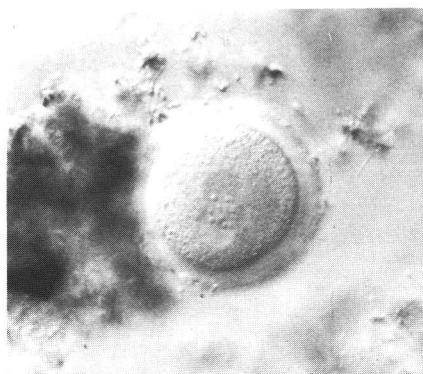
一方精液は、妊娠性の確認された雄2頭より、電気刺激器を用い、交流電流8～12V反復直腸刺激により、0.2～0.3mlを採取。精子は、7.5%血清加Ham's F10(pH 7.6)にて2回洗浄を行った。1時間swim-upの後、2.5mM theophyllineを加え15分間静置。遠心の後上清を捨て精子濃度1～5×10<sup>6</sup>/mlに調整、成熟卵に対して媒精を行った。未成熟卵は成熟培養後、媒精を行った。

**結果と考察：**延べ22頭にhMG-hCGによる排卵誘発を行い合計333個の卵を得た。そのうちMⅡまで成熟していたものは、63個(18.9%)であった。採取卵数は0個(6頭)から51個と個体差が大きく、1頭平均12.5個であった。月経の順、不順から、A、B、Cの3群に分類すると、平均採取卵数はA群36.3個(3頭)、B群

16.1個(7頭), C群4.5個(4頭)とhMGへの反応性の差が顕著に認められた。又, hMG排卵誘発を反復行ったものは、1回目平均採取卵数20.0であったものが、2回目平均4.6個と大きく減少した。これは、hMGのサルに対する異種蛋白としての抗原性を示唆するものと思われる。hMGの投与量についてみると、7, 8, 9, 10日間投与群の平均採取卵数は、各々8.0, 18.7, 18.7, 29.0と漸次増加している。又、8, 9日間投与群で卵巣の腫大は最高となり(無処理卵巣直徑の約4倍), 大きな卵胞を伴ったpolycysticな卵巣となる。10日間投与群では、卵巣の大きさ、卵胞の大きさとともに多少小さくなる傾向がみられるが、51個採卵した個体はこの群に属すことから、発育卵胞の数は増加するにもかかわらず、卵胞は増大できないものと思われる。性皮の発色度、子宮の腫大度も採取卵数を反映するように思われた。成熟卵を可及的多くとする目的でhCG投与後採卵までの時間を24時間より漸次49時間まで延長し排卵時期をみた。hCG投与49時間後開腹中に1例のみ排卵を見たがそれ以外はいずれも排卵の形跡をみないままであったことから、hMG過剰刺激による無排卵の可能性も否定できない。

なお、2個の卵が受精したが、これらは、hMG 10日間投与群であり、hCG 1500 IU投与後49時間で採卵したものである。いずれも、polyspermyであり、各々3個(写真)と5個の前核を認めた。精子は、洗浄、swim-up, theophylline処理後のものを用いた。精子濃度は $2 \times 10^6 / \text{ml}$ , 運動率は60~80%であった。

以上、hMG-hCG誘発法を用いて、カニクイザル体外受精の各種条件の検討を行ったが未だ成功率が低いため、排卵誘発法、卵培養法、精液調整法等、さらに改良を加え、受精率の向上を計らなければならない。



**hMG投与量と採取卵数、成熟卵、受精率**

hMG投与量 (total)*	個体数	平均採取卵数	成熟率	受精率
7日 (262.5 IU)	3	8.0	—	0
8日 (300.0 IU)	3	18.7	23.1	0
9日 (337.5 IU)	6	18.7	26.5	0.018(2)
10日 (375.0 IU)	2	29.0	42.6	0

\* hMGは37.5 IU/dayでimに投与

#### 文献:

- 1) Balmaceda, J.P. (1984) Successful in vitro fertilization and embryo transfer in cynomolgus monkeys. *Fertil. Steril.*, 42, 791~795.
- 2) Bavister, B.D. (1984) Birth of rhesus monkey infant after in vitro fertilization and nonsurgical embryo transfer. *Medical Sciences*, 81, 2218~2222.
- 3) Gould, K.G. (1978) Rectal probe electroejaculation of primates. *J. med. Primatol.*, 7, 213~222.
- 4) 本庄重夫, 長文 昭: カニクイザル—繁殖に関する基礎データー実験生殖生理学の展望 (1982)

ソフトサイエンス社

# 体外受精一胚移植における多精子受精卵の 電子顕微鏡による観察

Ultrastructure of polyspermic ova in human IVF-ET  
program

井上正人・小林善宗・本田育子・金子みつ恵・藤井明和

Masato INOUE, Yoshimune KOBAYASHI, Ikuko HONDA  
Mitsue KANEKO and Akitazu 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

目的：多精子受精は体外受精一胚移植IVF—ETにおける大きな問題の1つである。成熟卵子を数時間前培養してから媒精することにより、その頻度はかなり減少したといわれている。しかし多精子受精を完全に予防することはきわめてむずかしい。今回われわれはIVFで多精子受精となった卵子を走査型および透過型電子顕微鏡にて観察し、その卵子側要因について検討した。

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。Clomiphene—HCG又はClomiphene—HMG—HCGで排卵誘発を行い、卵胞の発育は超音波にて観察した。HCG注射後34～36時間で腹腔鏡（45回）あるいは超音波誘導（13回）により採卵した。成熟卵子は約5時間前培養後、洗浄精子（ $1 \times 10^5 / ml$ ）を加えて12～16時間培養した。受精の有無は2個の前核の存在により判定し、3個以上の場合は多精子受精とした。32例の受精率は $93.2\% \pm 2.6\%$ （Mean  $\pm$  S.E.）で、114個の成熟卵子中101個（88.6%）が受精した。このうち5個（5%）が多精子受精卵であった。多精子受精卵は定法通り固定し、3個は走査型電子顕微鏡（SEM）2個は透過型電子顕微鏡（TEM）にて観察した。

結果：SEM上、多精子受精卵の透明帯表面は多孔性のスponジ様構造を示し、前回報告した非受精卵のそれとほとんど同じであった。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、さまざまな侵入過程が観察されたが、精子数そのものは非受精卵に比べて必ずしも多くなかった。

TEMでは、3個の前核と2個の精子尾部が認められ、多精子受精卵であることが確認された。卵表下の表層粒は消失していた。透明帯の構造は非受精卵のそれとほとんど同じであり、透明帯反応を反映する所見は得られなかった。透明帯には先体反応を完了した侵入中の精子が観察されたが、表面にはintactな先体を有する精子も認められた。前核内には電子密度の高いcompactな核小体が存在し、その周辺には多数のmitochondria, annulate lamellaeが観察された。

考察：IVF-ETにおいて多精子受精は重大な問題であり、その予防はきわめて重要である。今回われわれは多精子受精卵をSEM、およびTEMで観察したが、多精子受精の要因となるような形態学的所見は認められなかった。多精子受精を誘起する卵子側要因としては、卵子の未熟性、または老化、採卵時の透明帯の破損などが重要視されている。

卵子の未熟性はin vitroでの培養により解決可能であり、最近では数時間の前培養が一般的に行われている。われわれも約5時間の前培養を一律に行ったが多精子受精率は5%と決して少なくなかった。5個の多精子受精卵はすべて2個以上の卵子を採取した症例に認められた。複数の卵子が発育する場合はその成熟度にかなりの差があるためではないかと思われる。多精子受精を予防するためには、個々の卵子の成熟度に見合った個別的な前培養が必要と思われる。

#### 主要文献

1. 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：体外受精における非受精卵の走査電子顕微鏡による観察  
哺乳卵研誌 2 : 157, 1985
2. Sathananthan, A.H. and Trounson, A.O. : The human pronuclear ovum : fine structure of monospermic and polyspermic fertilization in vitro.  
Gamete Research 12 : 385, 1985

# 豚受精卵移植技術に関する研究

## A Study on Embryo Transfer in Swine

### 1. Allyl Trenboloneによる性周期の同期化と受精卵回収

#### Synchronization of estrus in gilts with Allyl Trenbolone and embryo recovery

塩原広之、久保親二、添田益夫、武田光彦、深谷 守、  
杉本輝夫、\*菅野興文、\*\*菅原七郎、\*\*亀山賢次、\*\*正木淳二  
SHIOBARA,H.,KUBO,S.,SOETA,M.,TAKEDA,M.,FUKAYA,M.  
SUGIMOTO,T.,\*SUGANO,O.,\*\*SUGAWARA,S.,\*\*KAMEYAMA,K.,\*\*MASAKI,J.

昭和産業(株)飼料畜産部

\*昭和産業(株)総合研究所

\*\*東北大学農学部家畜繁殖学教室

Anim. Feed and Allied Pro. Dep., Showa Sangyo Co., Ltd.

\* Cent. Res. Lab., Showa Sangyo Co., Ltd.

\*\* Dept. of Anim. Sci., Fac. of Agri., Tohoku Univ.

目的：家畜の性周期のコントロールは、計画的及び効率的な生産にとって重要なものである。特に受精卵移植技術においては、供卵畜及び受卵畜の発情同期化が不可欠なものであり、各家畜において、より確実な発情同期化法の確立が望まれる。

本試験では、豚受精卵移植技術への応用を目的として、合成プロゲステロン剤の経口投与による若雌豚の発情同期化を検討し、さらに、受精卵回収までの日程のスケジュール化を企図した。

方法：発情同期化試験は2回行ない、供試豚はいずれも7か月令から8か月令までの未経産雌豚で、少なくとも1回以上発情が確認されたものを用いた。経口投与プロゲステロン剤は、Allyl Trenbolone (RU-2267, Rousell Uclaf, France) を用いた。給与は、豚の発情サイクルに関係なく、1日1頭当たり20mg、18日間あるいは14日間の連続給与とした。給与方法は、Allyl Trenbolone 20mg を添加した0.5 kgの種豚用飼料を朝の給餌時に与え、食べつくすのを確認してから残りの規定量を制限給餌で与えた。試験1では、給与終了日にPMSG (PMS「ゼンヤク」、日本全薬工業) 1,000IU、試験2では、給与終了翌日にPMSG 1,000IU、72時間後にhCG (ブベローゲン、三共) 1,500IU を投与した。発情は朝夕2回確認し、発情及び種付までの日数を0.5日間隔で数えた。種付は自然交配及び人工授精を行なった。

結果及び考察：発情同期化の結果はTable.1に示した。Allyl Trenbolone処理後6日以内に発情が誘起され、全体で97%の発情誘起率であった。また、Allyl Trenbolone給与期間中に発情がみられたものは1頭もなかった。試験1では、18日間給与の場合、PMSGの無投与区と投与区の間に、発情までの日数に有意な差があり、PMSGを投与した方が短かった。しかし、Allyl Trenbolone 18日間給与区と14日間給与区の間には差はなかった。試験2では、PMSGとhCGを併用して誘起排卵を行なったが、14日間給与区が18日間給与区に比べ、発情までの日数にやや短い傾向があるものの有意ではなく、また種付までの日数にも差はなかった。

1)~6)

Allyl Trenboloneの給与による発情誘起効果についてはいくつかの報告がある。その多くは、1日当たり10~20mgの18日間あるいは14日間の連続給与で、給与終了

後約5日で発情がみられている。また18日間給与と14日間給与では発情までの日数に差がない。本試験では、これらの報告とほぼ同じ成績が得られており、またPMSG、あるいはPMSGとhCGの併用で、発情までの日数が短縮化している。以上の事から、Allyl Trenboloneの投与及びその後のPMSG、hCG処理は豚の発情同期化に有効であり、受精卵移植における日程のスケジュール化が可能であると考えられる。

Table 1. Time of estrus following treatment with Allyl Trenbolone

Treatment	NO. of gilts	No. of gilts in estrus	Days to estrus	Days to mating (Mean ± SD)
<b>Trial 1:</b>				
Fed for 18 days	3	3	5.2 ± 0.3	7.0
Fed for 18 days + PMSG	7	7	3.3 ± 0.7	5.1 ± 0.8
Fed for 14 days + PMSG	4	4	3.8 ± 1.5	5.5 ± 0.7
<b>Trial 2:</b>				
Fed for 18 days + PMSG, hCG	4	4	3.3 ± 1.5	5.0
Fed for 14 days + PMSG, hCG	12	11	2.2 ± 0.9	5.3 ± 0.3

a, b : Means within a column with superscript letters in differ ( $P < 0.05$ )

Trial 1: The gilts were given I.M. injection of PMSG on the day after the treatment.

Trial 2: PMSG injection was performed on the second day after the treatment followed by hCG 72 hr. later.

#### 文献

- Davis,D.L. et al.(1979) Control of estrus in gilts with a progestogen. J.Anim.Sci.,49,1506.
- Redmer,D.A. et al.(1979) Estrus and ovulation in gilt fed a synthetic progestogen (R-2267). J.Anim.Sci.,49,suppl.1,116.
- Pursel,V.G. et al.(1981) Synchronization of estrus in gilts with Allyl Trenbolone : Fecundity after natural service and insemination with frozen semen. J.Anim.Sci.,52,130.
- Kraeling,R.R. et al.(1981) Synchronization of estrus in swine with Allyl Trenbolone (RU-2267). J.Anim.Sci.,52,831.
- Stevenson,J.S. and Davis,D.L.(1982) Estrus synchronization and fertility in gilts after 14- or 18-day feeding of Altrenogest beginning at estrus or diestrus. J.Anim.Sci.,55,119.
- 菅原七郎ら(1984)合成黄体ホルモン剤(RU-2267,allyl trenbolone)による豚の性周期の同期化試験 日畜学会東北支部会報,34,21.

# 家兎の卵管内人工授精に関する研究—VI

## Studies on the Tubal Insemination in Rabbits—VI

山海 直・金山喜一・遠藤 克・佐久間勇次

Tadashi SANKAI, Kiichi KANAYAMA, Tuyoshi ENDO and Yuzi SAKUMA

日本大学農獣医学部獣医生理学教室

Department of Veterinary Physiology, College of Agriculture  
and Veterinary Medicine, Nihon University

**目的：**受精は卵管膨大部において行われるが、受精に関与する精子は極めて少数である。また、一般に精子の受精能は子宮から卵管を通過する過程を経て獲得されるとされているが、卵管または子宮のみでも受精能が獲得されることが知られている。演者らは、これらの知見をもとに、卵管采から卵管内に少数の精子を注入する卵管内人工授精に関する一連の研究を続け、それらの成績を報告してきた。今回は、受精現象の機序に関する基礎的研究として、また、卵管閉塞症に起因する不妊症治療への応用を目的として、卵管子宮接合部を結紩あるいは切断した家兎を用い、2つの実験を試みた。実験1は、従来の卵管内人工授精後に回収した卵子を同一の供試家兎の子宮内に移植する、いわゆるバイパス方式の胚移植であり、実験2は、交配後、一定時間後に供試家兎の子宮より回収した精子を用いた卵管内人工授精およびバイパス方式による胚移植である。

**方法：**（実験1）体重2.7～3.4kgの日本在来白色種の成熟未経産雌の卵管子宮接合部を結紩あるいは切断し、その後1ヶ月以上、予備飼育したのち供試した。これらの家兎は開腹して、成熟卵胞を確認後、人工膜法で採取した精液をBrackett&Oliphant(1975年)のm-Tyrode液で100倍に段階稀釀し、その0.05mlを卵管采より卵管内に注入した。精液注入から1時間後に排卵誘起のためHCG 75iuを静注した。HCG投与後、31～81時間目に再び開腹してin situで卵管を上向性に灌流し卵子を回収した。回収卵子は直ちに同一供試家兎の子宮に移植した。HCG投与後11日目に開腹して着床胎児の有無を観察した。着床胎児が確認できた家兎は、その後の分娩の有無、産子数、妊娠期間を観察した。また、回収卵子の一部は、37°C、5%CO<sub>2</sub>下で培養し、胚の分割発生状態を観察した。さらに、着床胎児を確認した1例について、その後の排卵における卵子の卵管采からの取り込みについて検査した。

（実験2）実験1と同様に、供試1ヶ月以前に卵管子宮接合部を結紩あるいは切断した家兎を交配し、その直後にHCG 50iuを静注した。HCG投与後、13時間目に開腹し、子宮内精子を

回収して卵巣の排卵点を確認後、回収液 0.05 mlを同一供試家兎の卵管采から卵管内に注入した。HCG投与後、52~84時間目に in situで卵管を上向性に灌流し卵子を回収した。その他の操作は実験1に準じた。

**結果：**(実験1) 注入した生存精子の実数は  $2.96 \times 10^5 \sim 1.82 \times 10^6$  であった。in situで卵管を灌流した供試20例のうち、12例から51個の分割卵子を回収した。排卵点数に対する卵子の回収率は 62.4 %であり、受精率は 60.0 %であった。また、3例の家兎から回収した11個の分割卵子を培養し、いずれの卵子も blastocyst まで発育した。さらに8例について同一供試家兎の子宮に胚移植を試み、3例に着床胎児を確認し、2例が分娩した。また、その後、供試家兎で卵管采における排卵卵子の取り込みは正常であり、正常な産子を分娩した。

(実験2) 供試11例のうち9例、すなわち左右18本の子宮から精子を回収した。その一部は triple-stain して acrosome reaction を確認した。卵管采から注入した回収精液中の生存精子数は  $2.50 \times 10^2 \sim 0.88 \times 10^5$  であった。in situで卵管を灌流し、15本の卵管から分割卵子を回収した。回収率は、HCG投与後52時間目は 81.7 %、72~84時間目は 57.7 %であり、受精率は、HCG投与後52時間目は 55.2 %、72~84時間目は 73.3 %であった。32個の回収卵子を培養し、いずれの卵子も blastocyst まで発育した。4例について同一供試家兎の子宮に胚移植を試み、2例に着床胎児を確認し、1例が分娩した。また、その後、供試家兎で卵管采における排卵卵子の取り込みは正常であり、正常な産子を分娩した。

#### Summarized results on embryo transfer

Experiment	No. of Anim.	No. of embryo transferred	Developing stage of ova transferred	No. of Anim. implantation or delivery	No. of implanted fetuses or litter size
1	8	37	8 cell : 7 Morula : 26 Blastocyst : 4	3	3
2	4	11	Morula : 8 Blastocyst : 3	2	4

**結論：**卵管子宮接合部を結紮あるいは切断した家兎について、射精直後の精子と子宮から回収した精子とを用いて、それぞれ卵管内人工授精を試み、いずれも排卵を誘起する時期を考慮することによって、正常な受精が起こることが認められた。さらに、回収した卵子を同一供試家兎の子宮に移植して正常な産子を得た。分娩した家兎はその後、卵管采からの卵子の取り込みには異常がないことが認められた。

以上のことから、演者らが試みてきた卵管内人工授精は、ヒトおよび家畜における乏精子症、卵管性不妊症の治療手段として応用できる可能性を示唆したものといえよう。

#### 主要文献：

Kanayama,K.,T.Endo,G.Kobayashi and Y.Sakuma: Studies on artificial insemination into the oviduct through the tubal fimbria in rabbits. Jap.J.Fert.Ster.,30:65,1985

## 配偶子卵管内移植の成績

### Results of gamete intra-fallopian transfer

小林善宗, 本田育子, 井上正人, 金子みつ恵, 藤井明和

Yoshimune KOBAYASHI, Ikuko HONDA, Masato INOUE,  
Mitsue KANEKO, 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

目的:不妊症治療としての体外受精—胚移植(IVF-ET)は卵管性不妊のみならず、男性不妊や子宮内膜症、さらに原因不明不妊に対しても用いられているが、その成績は必ずしも満足のいくものではない。とくに男性不妊は精子受精能力異常が多く、IVF-ETを行っても妊娠率はきわめて低い。我々は、精子受精能力異常を伴う乏精子症患者に配偶子卵管内移植gamete intra-fallopian transfer(GIFT)を行い、はじめて妊娠に成功した(第3回日本受精着床学会<sup>1)</sup>)。その後適応を広げ、各種の不妊患者に83回のGIFTを行い(S60年度)、その有効性について検討した。

方法:対象は当科受診中の長期不妊患者66名で、原発性54名、続発性12名、平均年令34.1才(27~44才)、平均不妊期間8.7年(3~15年)であった。適応としては、子宮内膜症23名(4名は保存手術後、10名はレーザー又は電気メス焼灼後)、卵管形成術後21名(17名は腹腔鏡下手術、4名はマイクロサージェリー手術)、男性不妊12名(11名が精子受精能力異常)、AIH腹腔鏡検査による卵管内精子輸送障害7名、fimbria ovaricaの延長を伴う長期不妊3名であった。いずれも少くとも1側の卵管は開存していた。

採卵は、clomid100mg(月経5日目より5日間投与)、又はclomid100mg(月経2日目より5日間)—HMG 150IU(月経7日目より適時)による刺激周期で、超音波上主席卵胞が20mm程度に発育した時点で入院させ、HCG5000IU筋注した。HCG注射後36時間で針状腹腔鏡下に成熟卵子を採取し(平均2.5)、体外受精と同様に洗浄精子を加えて( $1 \times 10^5 / \text{ml}$ )30分間培養した。

18ゲージエラスター針の外套に $50 \mu\text{l}$ のinsemination mixtureを吸引し、卵管采より約2cmの所に注入した。

結果:83回のGIFTにより、15名が妊娠したが、これらはすべて子宮内妊娠であった。対患者妊娠率は22.7%(15/66)対施行妊娠率は18.1%(15/83)で、原発・続発性不妊間では差はなかった。施行回数別による妊娠成立は、1回目で25.5%(13/51)、2回目で7.7%(1/13)、3回目で50%(1/2)であった。妊娠15名のうち、11名に胎児

心拍動が確認され、現在1名分娩、10名が妊娠継続中である。15名中3名が双胎であったが、1名は流産、1名は単胎となった。GIFTの適応別による妊娠率は、子宮内膜症で対患者妊娠率8.7%(2/23)、対施行妊娠率6.9%(2/29)であった。卵管形成術後では、それぞれ28.6%(6/21)、22.2%(6/27)。男性不妊では16.7%(2/12)、11.8%(2/17)。卵管内精子輸送障害では、71.4%(5/7)、71.4%(5/7)。fimbria ovariaの延長では妊娠成立はなかった。適応数の多い子宮内膜症と卵管形成術後の分析を行ってみると、子宮内膜症では、AFS分類によるStage I(16名)、Stage III(5名)にそれぞれ1名の妊娠成立があった。一方卵管形成術後の場合、腹腔鏡下手術後では妊娠率は29.4%(5/17)、マイクロサージェリー手術後では25%(1/4)であった。

考察:1984年、Aschら<sup>2)</sup>が初めてGIFTの妊娠例を報告したが、その適応は原因不明不妊であった。我々は、精子受精能力異常の男性不妊をはじめとして、各種の難治性不妊に対してGIFTが有効な治療法である事を確認した。この新しい治療法の適応を決定するにあたり、我々は全例精子受精能力検査のみならず、AIH腹腔鏡を行い、卵管の通過性、骨盤内所見、卵管内精子輸送障害の有無を確認した。子宮内膜症stage I, IIについては、諸治療のうえ原則として1年間の待機療法を行い高率の妊娠成立を得ている。GIFTの適応としての子宮内膜症群は、非常に難治性の症例と考えられた。一方、卵管形成術後においても最低1年間の待機療法により高率の妊娠成立を得ており、GIFTの適応群は難治性の症例である。これらを背景として、GIFTの妊娠率をみると、卵管内精子輸送障害症例と卵管形成術後症例に高率に妊娠が成立したことから、難治性不妊の原因の一つとして、卵管内精子輸送障害又は卵子pick up障害が強く示唆された。またIVF-ETを行っても妊娠成立の期待できない精子受精能力異常による男性不妊に対して有効であった。

GIFTは体外受精に比べてより生理的かつ簡便であり、卵管の疎通性のある難治性不妊に対して有効な治療法と思われる。

#### 主要文献

1. 小林善宗、井上正人、本田育子、内林道隆、村上 優、淡路英雄、金子みつ恵、藤井明和:第3回日本受精着床学会講演集、演題17; 1985.
2. Asch, R.H., Balmaceda, J.P., Ellsworth, L.R., and Wong, P.C.: Pregnancy after translaparoscopic gamete intrafallopian transfer. Lancet 2: 1034,1984.

# 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、その徵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生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 $17\beta$ -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、御子紫 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

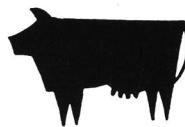
神奈川県藤沢市亀井野1866

日本大学農獸医学部獸医生理学教室内

TEL 0466-81-6241 内線332

哺乳動物卵子研究会編集委員会

# 繁殖障害に!!



(家畜共済診療点数採用)

要指示医薬品

動物用  
医薬品

# アントリン

前葉性卵胞刺激  
ホルモン剤

- 特長
- 米国アーマー社との技術提携によって製造された新しい前葉性の F S H 剤です。  
(アーマー社のFSHは世界で最初のFSH標準品に採用されています。)
  - F S H 成分を主に含有し、卵胞の発育、排卵、黄体化作用を有します。
  - H C G 又は、P M S G で無効或いは不的確な繁殖障害牛にも有効です。



適応症 牛・馬：卵胞のう腫、排卵障害、卵胞発育障害  
(卵巣発育不全、卵巣静止、卵巣萎縮)

包装 10アーマー単位(A.U.) 20アーマー単位(A.U.)  
40アーマー単位(A.U.) 溶解液付



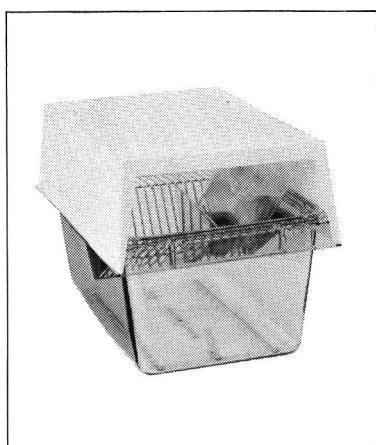
テンカ製薬株式会社

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

NEW!

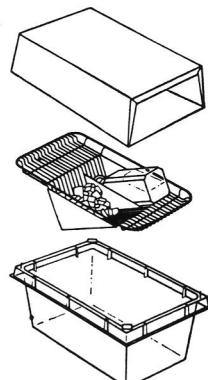
## M-7 (Isocage & Isocap)

マウス用アイソレーションケージ



### 特長

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



岡崎産業株式会社

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

健保適用

# 下垂体性性腺刺激ホルモン パーゴナル<sup>®</sup>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(FS/LH)はほぼ一定です。



## 【効能・効果】

間脳性（視床下部性）無月経、下垂体性無月経の排卵誘発

## 【用法・用量】

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

## 【包装】

パーゴナル注 75：10管  
パーゴナル注150：10管



帝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、間脳又は下垂体前葉の機能・器質的障害に由来する性腺刺激ホルモン低分泌無月経患者であるので次の点に注意すること。
    - ア. エストロゲン・プロゲステロンテストで初めて反応する第2度無月経又は抗エストロゲン療法（クエン酸クロミフェン、シクロフェニル等）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（毎日測定されること）
    - 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する卵巣の腫大を有する患者
  - 2) 妊婦
  - 3) 次の患者には投与しないことを原則とするが、やむを得ず投与する場合には、慎重に投与すること。
    - 1) 児を望まない第2度無月経患者
    - 2) 多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。

# 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<sub>2α</sub>製剤

(動物用医薬品)

# パナセラン・F液<sup>®</sup>

共済薬価基準表収載品

## [効能・効果]

牛：性周期の同調

黄体退行遅延に基づく卵巢疾患の治療

馬：性周期における黄体期の短縮

黄体退行遅延に基づく卵巢疾患の治療

豚：無発情の治療（黄体の退行遅延ないし遺残に基づくもの）

## [用法・用量]

牛：本品は子宮内注入または筋肉内注射します。

〈子宮内注入法〉……従来通り。

〈注射法〉

性周期の同調及び卵巢疾患の治療には

通常ジノプロストとして12～15mgを1回筋肉内に注射します。

馬：黄体期の短縮及び卵巢疾患の治療には

通常ジノプロストとして3～6mgを1回筋肉内に注射します。

豚：無発情の治療には

通常ジノプロストとして6mgを1回筋肉内に注射します。

〔貯法〕 室温・しゃ光保存

〔包装〕 12mg/6ml×5V・30mg/15ml×5V

○詳細は商品添付の説明書をご参考ください。

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

## 編 集 後 記

例年よりも春のおとずれが遅れた昭和61年であります、哺乳動物卵子研究会誌第3卷第1号をお届けいたします。

第1巻第1号を発刊以来、年2回の発刊を目標に頑張ってまいりました結果、発刊の遅れもなく順調に経過し、3巻の発刊となりました。3巻からは、先にご連絡いたしましたように編集方針を変更し、1号にも原著論文を掲載し、その他に研究会の講演要旨を掲載することいたしました。なお、3巻2号は10月発刊の予定ですので多数の投稿をお願いいたします。さらに哺乳動物研究会誌の発展のためにご鞭撻下さいますよう切望いたします。

(遠藤克)

## 編 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3巻 第1号

Vol. 3 No. 1

昭和61年3月25日印刷

（会員頒布）

昭和61年4月1日発行

発行者 哺乳動物卵子研究会  
代表 佐久間勇次

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

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)

# 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

日本薬局方 注射用胎盤性性腺刺激ホルモン

動物  
専用

プロベロゲン®

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

日本薬局方 注射用血清性性腺刺激ホルモン

動物  
専用

ピーメックス®

1,000単位

販売元



三共株式会社

東京都中央区銀座 2-7-12

製造元



三共ゾーキ株式会社

東京都中央区日本橋本町 4-15

