

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. 2

October 1986



牛の繁殖障害の
分野に新しい可能性
!



タケダのすぐれた合成技術が生んだ
LH放出ホルモン製剤

動物用医薬品

コンセラル®注射液

牛の卵胞のう腫、排卵障害、
卵巢静止の治療、排卵促進に

(要指示)

製造発売元
武田薬品工業株式会社

提携
帝国臓器製薬株式会社

女性と医師の立場から考えられた
画期的IUD

FD—1

エフディーワン

健全な家族計画のために

〔使用特性〕

●挿入・除去が容易

片方の腕で、子宮腔部にかけたミューザー鉗子を軽く牽引しながら、利腕に挿入器を把握し、子宮頸部の屈曲の方向に挿入器のカーブを合せながら静かに押すだけで挿入できます。

●自然脱出が少ない

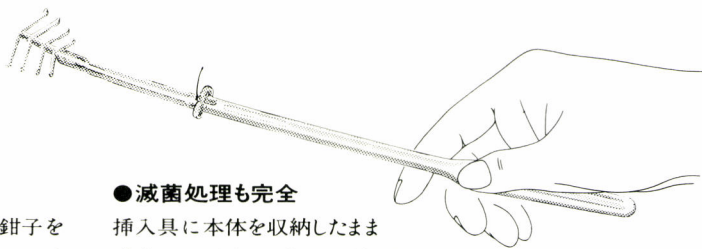
羽根状の部分が下降防止の役目をして、脱出率を2%程度にとどめています。

●滅菌処理も完全

挿入具に本体を収納したまま滅菌していますので、開封後、即時使用ができます。

●材質面の安全性

「FD-1」の原材料は、「エチレン酢酸ビニールポリマー」で使用中に変質・劣化などはありません。



●発売元：森永乳業株式会社 ●製造元：不二ラテックス株式会社

第28回 哺乳動物卵子研究会開催のお知らせ

哺乳動物卵子研究会

会長 佐久間 勇 次

下記により第28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62年4月25日(土) 9:00より

○場 所：日本大学会館大講堂

東京都千代田区九段南4-8-24

TEL 03-262-2271

○一般講演：前回の大会と同様に講演内容をオフセット印刷し，哺乳動物卵子研究会誌第4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62年1月31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62年2月28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3巻 第2号

昭和61年10月

目次

総説

哺乳類透明帯の生物・物理・化学

野田洋一 54

原著

ウサギの体外受精に関する走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察 (英文)

佐藤嘉兵, 若田修司, 鈴木淑恵 65

ラットとマウスにおける異属間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 73

EDTA 含有培地で発生した体外受精マウス胚の移植による正常産子について (英文)

鈴木宏志, 豊田 裕 78

ヒト精子透明帯除去ハムスター卵受精系の多様性について

永江 毅, 川村 良, 勝目 安, 館花明佳, 岩城 章, 木下 佐 86

長期間低温保存した培養液 (M16) によるマウス前核期受精卵の培養並びに移植試験

塩田ゆみ, 角田幸生 91

マウス2細胞期卵から分離した割球の体外発育

中村克彦, 石島芳郎 97

哺乳動物卵の成熟過程におけるエネルギー代謝動態卵の Phosphofructokinase 活性測定の意義

矢野 哲, 堤 治, 綾部琢哉, 佐藤和雄, 水野正彦 103

ハムスターテストとマウス受精卵初期発生成績からみた体外受精用培養液の検討

柳田 薫, 星 和彦, 村岡栄一, 菅野 薫 114

会田都美子, 吉松宣弘, 佐藤 章

マウス胚盤胞の着床遅延と透明帯消失との関係について

辻井弘忠, 伊藤 伸 122

ラット初期胚の体外培養における浸透圧および Na^+/K^+ 比の影響

伊藤雅夫, 橋詰良一, 種市衣里子, 丸 瑠璃子 128

短報

家兎のバルーンカテーテルによる経膈採卵法

山海 直, 須山隆行, 金山喜一, 遠藤 克, 佐久間勇次 134

Contents

Review

- Physicochemical and biological properties of mammalian zona pellucida.
NODA, Y. 54

Originals

- Scanning electron microscopic study of in vitro fertilization in the rabbit.
SATO, K., S. WAKATA and Y. SUZUKI 65
- The production of chimeric blastocysts (Rat ↔ Mouse) by aggregation method.
TAKAHASHI, F., K. FUJISHIRO, J. TAKAHASHI and Y. YASUDA 73
- Normal young from in vitro fertilized mouse embryos developed in a medium supplemented with EDTA and transferred to pseudopregnant recipients.
SUZUKI, H. and Y. TOYODA 78
- Variety of cross fertilization between human spermatozoa and zona-free hamster eggs.
NAGAE, T., M. KAWAMURA, H. KATSUME, A. TACHIBANA,
A. IWAKI and T. KINOSHITA 86
- Effect of storage period of the culture medium (M16) on the development of mouse zygotes in vitro and in vivo.
SHIODA, Y. and Y. TSUNODA 91
- In vitro development of blastomeres isolated from 2-cell eggs in mice.
NAKAMURA, K. and Y. ISHIJIMA 97
- Changes in energy metabolism during maturation of mammalian oocytes, with special reference to the measurement of phosphofructokinase activity in single oocytes.
YANO, T., O. TSUTSUMI, T. AYABE, K. SATOH and M. MIZUNO 103
- A study of culture mediums for in vitro fertilization from an overview of the results of a hamster test and of the initial development of mouse fertilized embryo.
YANAGIDA, K., K. HOSHI, E. MURAOKA, K. KANNO,
T. AITA, N. YOSHIMATSU and A. SATO 114
- Relationship between delayed implantation and loss of the zona pellucida in the mouse blastocyst.
TSUJII, H. and S. ITOH 122
- Effect of osmotic pressure and Na^+/K^+ ratio on the in vitro cultivation of the rat embryos.
ITO, M., R. HASHIZUME, E. TANEICHI and R. MARU 128
- Brief note
- Technique of collection of embryos from uterus through vagina by balloon catheter in rabbits
SANKAI, T., T. SUYAMA, K. KANAYAMA, T. ENDO
and Y. SAKUMA 134

哺乳類透明帯の生物・物理・化学

Physicochemical and Biological Properties of Mammalian Zona Pellucida

野 田 洋 一

Yoichi NODA

京都大学医学部産婦人科

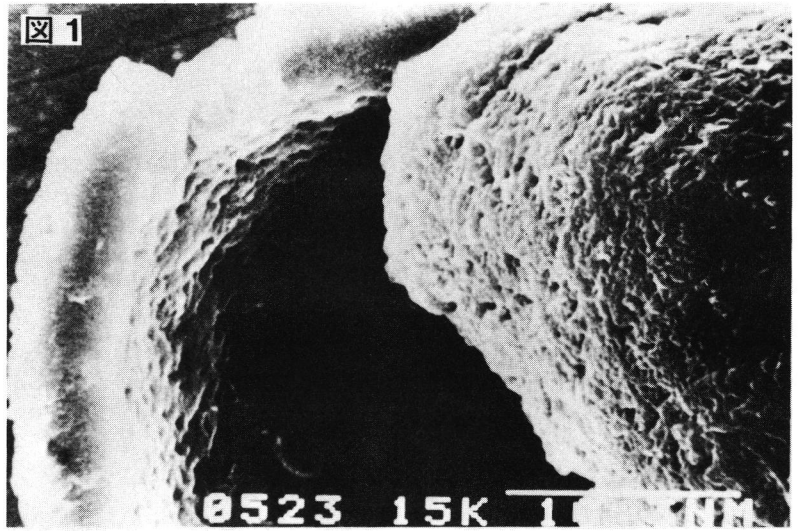
Department of Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine, Kyoto University

はじめに

哺乳類卵細胞をとりまく透明帯は、重要かつ多彩な生物作用を有しており、具体的には、①種間の認識の行なわれる場であること、②多精子受精の拒否のメカニズムの発揮される場であること、③受精後は胚の保護作用にあたるとされ、とりわけ受精の過程における役割は重要である。この哺乳類卵透明帯に対する研究の歴史をみると、単に形態の観察と記録という観点からすれば、すでに前世紀末には報告¹⁾がみられ、一世紀以上の経過があるといえる。しかしこのように長期間、興味と解析の対象となっている構造物であるにもかかわらず、透明帯の構造と機能に関するすべてが明らかになっている訳ではなく、むしろ今後さらに多くの研究がなされるべき段階にあると考えられる。その理由はすでに多数の研究者によって指摘されていることではあるが、1つには、哺乳類卵透明帯がconventional methodで物理、化学的に解析しうるほど大量に得ることがむづかしいことであり、そのため多くの研究報告は定性的で、定量的ではない。さらにこの透明帯成分は極めて凝集傾向がつよく各ステップの解析結果自体が再現性よく示されないことがしばしば経験され、研究者を悩ませてきたことである。ここで述べたいいくつかの理由によって、哺乳類透明帯は未だ十分に理解されているとはいいがたいが、単クローン抗体の利用や、精子-透明帯binding assay、電子顕微鏡による超微形態の観察や、各種クロマトグラフによる解析に加えて、最近ではマウス透明帯成分遺伝子のクローニングに成功したとの画期的報告があり、透明帯研究も新しい段階に入ったといえる。本稿ではこれまでに明らかにされている哺乳類卵透明帯の生物・物理・化学について、著者らの知見も交えてreviewを試みたい。

I 透明帯の細胞起源

透明帯あるいは透明帯構成成分がどの細胞によって産生され、分泌され、そして透明帯としての構造を構築するに至るのかについては、多方面からの解析がある。透明帯自体は厚さ約5~10 μm (マウス・ブタ)で光学顕微鏡下には無構造に見える糖蛋白質から成り立っている。粗な網目状構造が走査形電子顕微鏡下



に観察されるが(図1), *in vivo* では卵と周辺をとりまく顆粒膜細胞の間に位置しているので、透明帯成分は卵あるいは顆粒膜細胞のいずれかあるいは両者の共同作業下に構築されるであろうことが容易に推察される。形態学的手法での観察によれば, follicular cellによって形成されるとする報告²⁾や、卵との共同作用により透明帯のある成分は卵により、また他の成分はfollicular cellによりもたらされるとの報告³⁾⁴⁾がある。ウサギ卵胞を材料として用い、解析したWolgemuthら⁴⁾の報告によれば、透明帯蛋白は最初扁平な顆粒膜細胞層に囲まれている卵細胞の辺縁にあらわれ、その後顆粒膜細胞層がcuboidalに変化し、重層化するにしたがい、その内側(卵側)に位置する細胞の細胞質中出现するようになると述べている。透明帯がどの細胞由来であるかについて形態学的手法あるいは免疫化学的手法のみでアプローチするには限界があると思われる。その1つの理由は卵と、それをとりまく顆粒膜細胞は*in vivo* では密な相互関係を保っており、透明帯成分が分泌され透明帯構造が構築される以前から、これら二者の間にはGap Junction⁵⁾が形成されていることがすでに知られているからである。例えば、このGap Junctionを通して物質の移行が行なわれ、卵がとり込む栄養の85%以上がまず周辺の顆粒膜細胞によってとり込まれるとの報告があるくらいである⁶⁾⁷⁾。よって透明帯前駆体の細胞内局在を調べることももっと直接的な証明が必要であり、この観点から単離卵細胞の蛋白合成能を調べる実験が行われている⁸⁾⁹⁾。

Shimizuら⁸⁾は8週令のDBAマウス卵巣から卵胞を回収し⁹⁾、6日間の*in vitro* cultureのあと、L-¹⁴C-amino acid mixture, [³⁵S] sulfuric acid, [³²P]phosphoric acid, L-[5,6-³H]fucose, あるいはD-[1,6-³H]glucosamine等を用いてとり込み実験を行なった結果を報告している。それによると、すでに報告のあるZP-1, ZP-2およびZP-3はいずれも硫酸化糖蛋白であること、N-glycosilationの阻害剤であるtunicamycin存在下にcultureを行なうと全蛋白合成が30%阻害される条件下で新たに合成された標識蛋白が透明帯に全く沈着しないこと、等が明らかにされ、卵の合成する全蛋白の2~3%が透明帯

構成成分であることを明らかにしている。彼らの用いた実験条件下では、顆粒膜細胞由来の影響は無視し得るもので、マウス透明帯成分 ZP-1, ZP-2 および ZP-3 の三種とも卵由来と考えてよい。しかし、透明帯構成成分は、そもそもこれら三種の糖蛋白のみから成り立っているかどうかについてはまったく不明で、未知の成分がある可能性は否定できず、完全解は今後に残されている。

II. 透明帯の物理化学

哺乳類透明帯がどのような物性を示すかについてはすでにいくつかの報告がある。解析の対象となっている透明帯で量的に取り扱われているものは、殆んど唯一ブタ透明帯のみであり、他種の透明帯は大量に入手しがたいこともあって定性的である。

ブタに関しては、卵巢より大量に透明帯を得る方法が開発されたこともあって、量的に解析した報告がなされだしている。著者らの経験から申せば、ブタ透明帯は約10 μm の厚さの白色透明な構造物であるが、卵の浮遊している液の性状により、その厚さに変化が生ずる。0.05 M Na-phosphate pH 7.2 程度では10 μm 程度の厚さを示すが、100 %メタノール中では一見透明帯が消失したかのごとく菲薄化し、中性緩衝液中で再び元の厚みに戻る。このことから見かけよりも粗な構造であることが推定される。また蒸留水中では膨化し、60°C以上の加温により中性～アルカリのpH領域で時間経過に伴って可溶化される。図2に示したのはブタ透明帯粗標品の0.1 M Na-borate pH 10.0, 60°Cの条件下での可溶化の時間経過で上澄の蛋白濃度の推移を表わしている。

一方 low pH では常温で極めてすみやかに可溶化

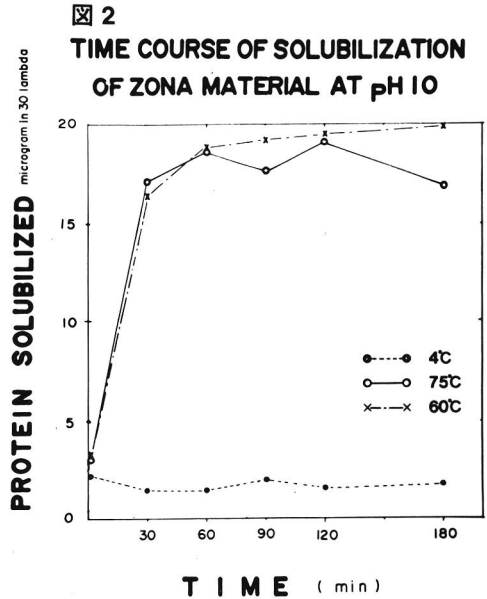
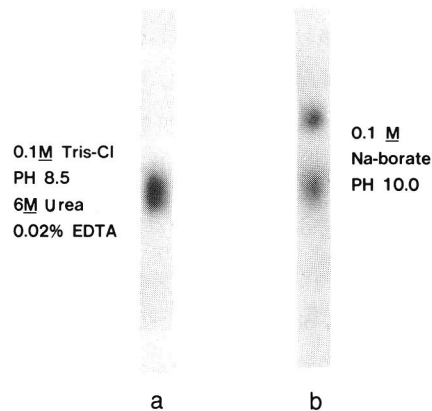


図3 SDS-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS



される。例えば 0.1 M Na-citrate, pH 2.5 では数秒以内に透明帯構造は消失する。この溶解性については基本的には他種の透明帯も同じ性質と思われるが、可溶化された透明帯成分を SDS-PAGE により解析すると種によって、あるいは可溶化の条件等により、ゲル上に示される蛋白のバンドの数や位置に大きな差異がもたらされる。図3に示したのは、ブタ透明帯の SDS-PAGE のパターンである。条件は、a) 0.1 M Tris-Cl pH 8.5, 6 M Urea, 0.02% EDTA, 60°C, b) 0.1 M Na-borate pH 10.0, 60°C でそれぞれ可溶化したものであるが、バンドの数に相異が認められる^{12) 13)}。興味あることに、同じ可溶化 b) の条件下で得た SDS-PAGE のパターンが a) と同じ結果を与えることもあることが知られている¹¹⁾。この事実の意味するところは、可溶化が十分行なわれていないか、あるいは不溶残渣が大量に存在するか、あるいは透明帯成分の

Table 1
Amino acid and carbohydrate composition of purified glycoproteins from porcine zona pellucida

Amino acid and Carbohydrate	No of Residues/10 ⁵ g	
	Crude Zona prep.	Solubilized Zona
Asp	54	65
Thr	44	51
Ser	56	59
Glu	59	76
Pro	45	61
Gly	33	44
Ala	36	47
Val	58	66
Met	10	10
Ile	24	25
Leu	54	70
Tyr	15	19
Phe	25	32
Lys	25	21
His	21	27
Arg	32	40
1/2 Cys	22	22
Trp	8	8
Fuc	4.1	4.1
Man	14.5	15
Gal	38.8	39
GlcNAc	51.9	52
NeuAc	14	14
Uronic acid	4	4.3
H ₂ SO ₄	6	6.3

agglutinating tendencyが強いとめと考えられる。このように SDS-PAGE のパターン自体が再現性という点ではやや不安定で、可溶化したあとの同じ標品を 4°C に保存しておくだけでも SDS-PAGE 上のパターンが変化する傾向にある。このようにブタ透明帯の電気泳動上のパターンはあてにならないものであるが、マウスの場合はブタと異なり、熱による可溶化によって ZP-1, ZP-2 および ZP-3 の三成分が比較的再現性よく電気泳動上確認しうるのである。このマウス透明帯の三成分は分子量 200K, 120K および 83K とされている¹⁴⁾。アミノ酸および糖の組成については、単離した透明帯標品について検討されており、^{13) 15) 16)} 比較的信頼度の高いのは、材料を入手しやすいブタ透明帯についての結果であろう^{13) 16)}。表1にアミノ酸および糖の組成を示した¹³⁾。マウス透明帯成分 ZP-1, ZP-2, ZP-3 については、いずれも糖蛋白であり、Shimizu ら¹⁷⁾により各成分の糖鎖の構造がレクチンとの結合性を調べることににより解析されている。Shimizu らは 5~8 週令の ICR マウスを用いて、過排卵処理により回収した卵より透明帯標品を得、SDS-PAGE のあと nitrocellulose に transfer し、そのあと peroxidase 標識あるいは biotin 標識レクチンを用いて反応せしめ、benzidine および H₂O₂ と反応させて発色せしめ、各成分の糖鎖部分とレクチンとの反応性を調べている。その結果、ZP-1~ZP-3 まですべての成分は GlcNAc GalNAc および糖鎖内に Gal の残基をそれぞれ保持し、ZP-1 と ZP-3 は末端に Gal 残基を、また ZP-2 は他の 2 者には含まれていない α -D-Man, α -D-Glu の残基を保持していることが明らかにされている。Shimizu ら⁸⁾の他の報告

にみられる〔³⁵S〕Sulfuric acid のとり込みの事実からマウス透明帯も硫酸化糖を含んでいることが推察されており、ブタにおけると同様の透明帯糖鎖成分から成り立っていると考えられる。

このようにマウスでは異なった透明帯成分 ZP-1 ~ ZP-3 の存在が想定されているが、ブタの場合はこの点議論が多い。先に述べた一次元電気泳動の蛋白のパターン自体が泳動や、可溶化条件の差によって変化するからである。Dunbar ら¹⁸⁾ は単離したブタおよびウサギ透明帯粗標品を可溶化したあと二次元電気泳動を行ない、3つの成分をゲル上に認めている。二次元電気泳動法による透明帯構成分子種の単離と同定は精力的に行われたが、この透明帯成分に関する限り泳動条件の設定がむつかしく、著者らが Dunbar 氏から個人的に得た情報¹⁹⁾ によっても二次元電気泳動法によって得られるパターンは一定傾向を示すものの、現われてくる蛋白のバンドは時には4本~5本が認められることがあるとのことで、実験条件の設定のむつかしさがわかる。crossed immunoelectrophoresis¹⁸⁾や monoclonal antibody²⁰⁾を用いた解析で、二次元電気泳動で認められるchargeとmolecular weight に関して極めてheterogeneityの強い3本のバンドは、それぞれが共通の抗原性を持つとの報告があるが、前者の結果に関しては、彼らが解析に用いたimmune serumが入手不可能なので追試はむつかしく、また単クローン抗体およびblotting法を用いての解析も、抗体がconformational antigenic determinantに反応する場合はfixation,あるいはaggregation等によって反応性が変化することが考えられ、透明帯抗原に関してはこのタイプの手法のみで構成成分に関する情報を得るのには限度がある。透明帯構成成分のcharacterization精力的に行われてきた理由は、1つには透明帯は受精現象における種特異性の発揮される場であり、恐らく種特異的な精子-透明帯相互作用の生ずる種特異性を示す構造あるいは抗原、別の言葉ではreceptorに相当するものが同定できるはずとの期待があるからで、もう1つの理由は抗透明帯抗体が透明帯上に沈着すると精子の透明帯への接着が妨げられ、結果として受精が阻止される現象が知られており、このことが受精現象の解析という立場や、あるいは臨床的には避妊法の開発といった観点から興味をもたれたからである。今後、透明帯成分のcharacterizationという観点からは糖鎖構造の解明が焦点になると思われる。ブタ透明帯の糖鎖構造は極めてユニークである可能性がある。表1に示したブタ透明帯の構成糖種をみると、硫酸化糖の存在が想定されるが、従来報告があって、すでに糖鎖構造が明らかになっているものと比較してみると、簡単に類似で既知の構造をみることができない。唯一の例はYamashitaら²¹⁾が報告したものにみられるのみである。この事実が透明帯の糖構造を中心とした生物現象の“特異性”にどのように関与しているのか、今後の課題であろう。

Ⅲ. 透明帯 - 精子相互作用

透明帯の示す種特異的な精子との結合は、自然界では異種間の受精が一般的には生じにくいしくみになっているので観察されにくい、in vitro では、精子-透明帯の相互作用の様子を観察することが出来る。

透明帯に種特異的な精子レセプターが存在していることはGwatkinら²²⁾によって明らかにされている。彼らはcapacitationさせたゴールデンハムスター精子と単離した同種透明帯とをin vitroにて反応せしめたところ、精子は透明帯の外側表面にも内側面にも結合することが観察されたことから、精子結合部位は透明

帯の内外側に存在していることを明らかにしている。また同時に熱処理によって可溶化せしめた透明帯成分を加えて、精子-卵相互作用を観察すると、精子は透明帯への付着が妨げられ受精が成立しなかったとし、また同時に受精卵から回収した透明帯を可溶化して同様の実験をしたところ、受精阻害はまったく認められず、受精前後で透明帯の性質の変化(構造変化)が生じていることを推定している。このとき異種透明帯(マウス)を可溶化して同様の操作を行なうと、受精阻止効果は認められるものの、同種透明帯の示す効果に比して低いことも明らかにしている。このように、透明帯に精子レセプターが存在することが示唆されてはいるが、このレセプターの完全解析には未だ到達していない。材料の制約から精子レセプターの単離の試みはブタ透明帯を用いて行われている。Dietle ら²³⁾²⁴⁾はブタ透明帯を単離したあと、Li-3,5-diiodosalicylate を用いて可溶化し、high performance liquid chromatography を行って11のフラクションを得ており、そのうち №6 のフラクションにcapacitation されたブタ精子に対して高い結合能を持った糖蛋白を回収している。著者らも high performance liquid chromatography を行いブタ透明帯構成成分の単離を試みたが、たとえ 6 M Urea 存在下の条件でも、可溶化透明帯成分の凝集傾向が強く、再現性ある溶出パターンを得ることが困難であった。よって Dietle らが試みたように、カラムによる分画と精子との反応性の検定という手順の組合せでは、実験が small scale でしか行えないことや、その為を得た分画の純度の検定がむづかしいこと、さらにブタ精子の capacitation の条件が決めにくいことなどから、精子レセプターに関して完全解をうることは困難であると思われる。

透明帯と精子との相互作用の、あるいは認識機構の基本は、糖鎖構造の認識を通じて行われることは多数の報告からみてうなずけるところである。Oikawa ら²⁵⁾²⁶⁾は、Wheatgerm agglutinin (WGA) でハムスター卵を処理すると暗視野で光散乱性が示されるようになり、媒精しても受精は成立しないが、WGA の阻害糖である GlcNAc で洗浄後に媒精すると再び受精可能になることを発見した。さらに RCA, WGA, DBA, および Con-A でハムスター卵を処理すると、いずれも異なった濃度で受精がほぼ完全に阻害されることを確認しており、このことから透明帯に存在する糖鎖構造をレクチンで修飾すると受精が阻害されること、すなわち透明帯上に存在する糖鎖構造が精子と卵の相互作用に直接影響を与えていることがわかるのである。

透明帯-精子相互作用に関して、Shur らは精子膜表面に存在する galactosyltransferase の活性との関連から解析を行っている。Shur は、マウスオ遺伝子座位における mutant の遺伝子解析を利用し、精子における capacitation と透明帯への binding という一連の現象において、糖鎖認識が galactosyltransferase 活性を通して行われる様子を定量的に解析した²⁷⁾²⁸⁾²⁹⁾³⁰⁾。それによると、精子表面に存在する galactosyltransferase は capacitation 前は精漿由来のポリ-N-アセチルラクトサミン (GlcNAc と Gal を有する) によって活性中心が覆われているが capacitation の過程でこのポリ-N-アセチルラクトサミンが遊離し、そのため透明帯の糖鎖末端の GlcNAc を認識、結合し、以後の精子の透明帯通過の最初のきっかけになるとしている。Shur らの提唱している galactosyltransferase 活性の透明帯認識の分子機構を図示すると図4のごとくになる。この精子膜上の酵素活性が糖鎖認識にある種の役割を果たすという考え方はユニークで、ホルモンとそのレセプターの組み合わせの場合のように分子-分子のレベルでの結合を考える場合と異なり、巨大な細

胞-精子-がキチンと呼ばれる細胞外構造の中を通過する過程を考える場合に考慮に値するものであると考えられ、さらに同様の機構で別種の酵素が関与する可能性について考慮を払うことも必要であろう。

透明帯-精子相互作用の中で、これまで述べてきた透明帯と精子の糖鎖構造を介しての相互認識の観点からの解析以外に、精子の acrosome reaction が開始するきっかけを与えるものとしての透明帯の性格を分析しているグループがある。Florman と Storey³¹⁾ は, cholinergic receptor に高い親和性を有する 3 - quinuclidinyl benzilate

(QNB)を解析の道具と

して用い、マウス受精系

における acrosome

reaction に与える影響

を調べた。Ionophore

A23187によって引き起

こされる acrosome

reaction は、QNB によ

って阻止することができ

なかったが、一方、卵透

明帯表面に付着している

か、単離透明帯に付着し

ているか、あるいは、可溶化透明帯存在下の精子には acrosome reaction が明らかに高率に引き起こされて

おり(彼らは acrosome reaction の有無の判定を Saling ら³²⁾の chlortetracyclin 法により行っている)こ

の場合は QNB により阻止することが可能であり、マウス IVF において QNB が受精阻止作用を示すことと

合わせて透明帯-精子の接着結合が成立したあと acrosome reaction が誘起されるとしている。この仮説を

支持する傍証としては、完全に acrosome reaction の生じた精子は透明帯に結合しないことや、QNB が

cumulus - intact の卵と精子の受精に関しても阻止効果を発揮することなどが、彼らによって主張されてい

る。一方、Bleil and Wasserman ら³³⁾は可溶化マウス透明帯標品 ZP - 1, ZP - 2, ZP - 3 をそれぞれ in

vitro で精子と反応せしめ、ZP - 3 には acrosome reaction を誘起する活性があるかどうかを調べている。

それによると、ZP - 1, ZP - 2 には受精卵、胚における透明帯と同様 acrosome reaction 誘起活性は低く、

ZP - 3 にはその活性が認められたとしている。受精の過程で精子の acrosome reaction がいつどこで生ず

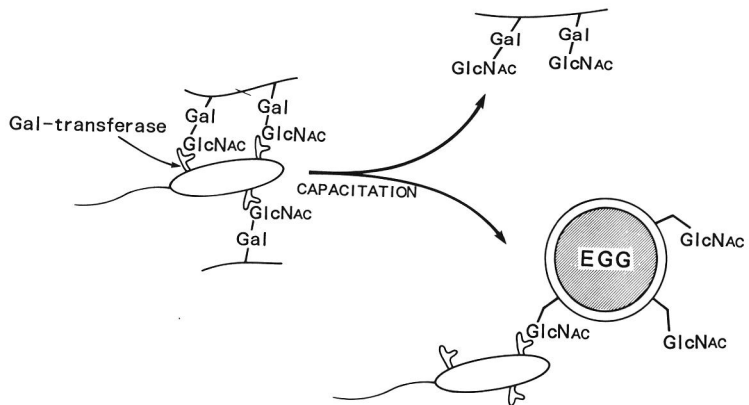
るかについては古くから議論のあるところである。Austin and Bishop³⁴⁾は cumulus - mass の中で精子

の acrosome 構造は部分的に、あるいは完全にこわれうるとしており、透明帯構造と精子との直接の関わり合

いがなく acrosome reaction が生ずるとの考えがあり³⁵⁾³⁶⁾、Florman らが主張するごとくであるのかどう

か、作用機作も含めて今後の検討がさらに必要であろう。

Figure 4



IV 受精以後の透明帯

受精成立の前後で透明帯の性質が変化することは多くの研究者によってすでに指摘されているところである。たとえば Inoue ら³⁷⁾³⁸⁾は受精成立前の透明帯と受精後では、solubilityに差が生じていることをすでに報告しているし、また Gwatkin ら²²⁾の報告にみられるように、精子のレセプター活性も未受精卵では検出されても受精成立以後は検出されないことが示されている。この変化は“zona reaction”として説明されているが、その実体に関しては未解決の部分が多い。1956年に Austin と Braden ら³⁹⁾によってはじめて zona reaction が報告されて以後、1971年になって Barros と Yanagimachi ら⁴⁰⁾によって cortical granule の内容物が zona reaction に関与していることが実験的に証明されるに至っている。その後 Gwatkin らはダイズ由来トリプシンインヒビターを用いてこの現象を解析し、cortical granuleの内容物がトリプシン様蛋白質分解酵素であるとする仮説を提出している。その後 Bleil ら³³⁾も受精成立後にマウス透明帯 ZP-2 が proteolytic に修飾されているとの根拠を得ており、このことから zona reaction 以後 ZP-2 が修飾され、その結果精子の透明帯侵入が阻止される機構について述べている。このように、zona reaction については受精成立後、卵より放出される cortical granule の内容 (proteolytic enzyme) によって透明帯が修飾されるという仮説が一見合理的に展開されてきているが、別の仮説を提唱する者もいる。Oikawa ら³⁹⁾⁴⁰⁾は、Gwatkin らが行った実験に用いられたトリプシンインヒビターそのものが、ダイズレクチンとして作用する可能性のあること、ジャガイモレクチン (STA) を用いると未受精卵と受精卵の表層糖鎖を区別することができること、トリプシン処理をして STA 結合部位は未受精卵、受精卵を問わず等量存在する等の証拠を提出し、cortical granule の内容は proteolytic enzyme ではなく、むしろ glycosidase 活性を想定した方がよいのではないか、との示唆を与えている。

おわりに

本稿は透明帯の生物・物理・化学という大きな標題をかかげているが、もとより透明帯研究そのものは膨大な数と幅と歴史のあるもので、すべての研究領域を網羅することは不可能である。受精現象に興味を持ち、透明帯研究の進歩に目を見はっている臨床家の1人として、透明帯を中心命題にすえて review を試みたが、客観的な記載というよりも私的な興味からの記述になったのではないかと恐れている。最近号の Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 83, P 4341-4345 (1986) において、Ringuette らによって発表された “Oocyte-specific gene expression: Molecular characterization of a cDNA coding for ZP-3, the sperm receptor of the mouse zona pellucida” は透明帯研究に新しいページを開くもので、この領域の今後の進歩に期待したい。

本稿を終るにあたり、執筆の機会を与えて頂きました哺乳類卵子研究会編集委員会の皆様に深く感謝致します。

REFERENCES

1. Van Beneden, E. (1880): Contribution a la Connaissance de L'ovaire des Mammifres. Arch.Biol. 1: 475-544
2. Duncan Chiquoine (1960): The development of zona pellucida of the mammalian ovum. Am.J.Anat. 106: 149-155
3. Wartenberg, H. and Stegner, H.E. (1960): Uber die Elektronenmikroskopische Feinstruktur des Menschlichen Ovarialeises. Z.Zellforsch. 52: 450-474
4. Debra, J., Wolgemuth, D.J. et al. (1984): Formation of the rabbit zona pellucida and its relationship to ovarian follicular development. Dev.Biol. 106: 1-14
5. Anderson, E., and Albertini, D.F. (1976): Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. J.Cell.Biol. 71: 680-686
6. Heller, D.T. et al. (1981): Biochemical studies of mammalian oogenesis: Metabolic cooperativity between granulosa cells and growing mouse oocytes. Dev.Biol. 84: 455-464
7. Brower, P.T. and Schultz, R.M. (1982): Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: Existence and possible nutritional role during oocyte growth. Dev.Biol. 90: 144-153
8. Shimizu, S., Tsuji, M. and J. Dean (1983): In vitro biosynthesis of three sulfated glycoproteins of murine zonae pellucidae by oocytes grown in follicle culture. J.Biol.Chem. 258: 5858-5863
9. Bleil, J.D. and Wasserman, P.M. (1980): Synthesis of zona pellucida proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture in vitro. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 77: 1029-1033
10. Eppig, J.J. (1977): Mouse oocyte development in vitro with various culture system. Dev.Biol. 60: 371-388
11. Personal communications with Dr. Hasebe department of obstetrics and gynecology Tokushima University.
12. Noda, Y. et al. (1981): A new method for preparation of pure zonae pellucidae in large quantities from porcine ovaries. J.Reprod.Immunol. 3: 147-156
13. Noda, Y. et al. (1983): Characterization of glycoproteins isolated from porcine zonae pellucidae. J.Reprod.Immunol. 5: 161-172
14. Bleil, J.D. and Wasserman, P.M. (1980): Structure and function of the zona pellucida: Identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. Dev.Biol. 76: 185-202
15. Loewenstein, J.E. and Cohen, A.I. (1964): Dry mass, lipid content and protein content of the intact and zona-free mouse ovum. J.Embryol.Exp.Morph. 12: 113-121
16. Dunbar, B.S. et al. (1980): Isolation, physicochemical properties, and macromolecular composition of zona pellucida from porcine oocytes. Biochemistry 19: 356-365
17. Shimizu, S. et al. (1982): Glycoproteins of mouse zona pellucida: Analysis of their reactivity to lectins. B.B.R.C. 109: 449-454
18. Dunbar, B.S., Lin, C and Sammons, D.W. (1981): Identification of the three major proteins of porcine and rabbit zonae pellucidae by high resolution two-dimensional gel electrophoresis:

- comparison with serum, follicular fluid, and ovarian cell protein. Biol.Reprod.24: 1111-1124
19. Personal communications with Dr.Dunbar
20. Wardrip,N.J. et al.(1986): The 55k glycoprotein family of the porcine zona pellucida contains two chemically and immunologically distinct components: Develop.Growth.Diff. 28: 102
21. Yamashita,K. et al.(1983) : Sulfated Asparagine-linked sugar chains of hen egg albumin. J.Biol.Chem. 258: 14144-14147
22. Gwatkin, R.B.L. and Williams,D.T.(1977): Receptor activity of the hamster and mouse solubilized zona pellucida before and after the zona reaction. J.Reprod.Fertil.49: 55-59
23. Dietle, J. et al.(1982) : Solubilization of four porcine zona pellucida antigens by Lithium - 3,5 - diiodosalicylate. Hoppe-Seyler's. Z.Physiol.Chem. 363: 381-386
24. Dietle,J. et al.(1983): Identification of a sperm receptor-glycoprotein from the porcine zona pellucida. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 364: 261-267
25. Oikawa,T. et al.(1974): Inhibition of hamster fertilization by phytoagglutinin. Exp.Cell.Res. 83: 239-246
26. Oikawa,T. et al.(1973): Wheatgerm agglutinin blocks mammalian fertilization. Nature, 241: 256-259
27. Shur,B.D. and Bennett,D. (1979): A specific defect in galactosyltransferase regulation on sperm bearing mutant alleles of the T/t-locus. Dev.Biol. 71: 243-259
28. Shur,B.D.(1981): Galactosyltransferase activities on mouse sperm bearing multiple t^{lethal} and t^{viable} haplotypes of the T/t-complex. Genet.Res. 38: 225-236
29. Shur,B.D. and Hall,N.G.(1982): A role of mouse sperm surface galactosyltransferases in sperm binding to the egg zona pellucida. J.Cell.Biol. 95: 574-579
30. Shur,B.D. and Hall,N.G.(1982): Sperm surface galactosyltransferase activities during in vitro capacitation. J.Cell.Biol. 95 :567-573
31. Florman,H.M. and Storey,B.T.(1982): Mouse gamete interactions - the zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. Dev.Biol. 91: 121-130
32. Saling,P.M. and Storey,B.T. (1979): Mouse gamete interactions during fertilization in vitro. - Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse acrosome reaction. J.Cell.Biol. 83: 544-555
33. Bleil,J.D. and Wasserman,P.M. (1983): Sperm-Egg interactions in the mouse - Sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. Dev.Biol. 95: 317-324
34. Austin,C.R. and Bishop,M.W.H. (1957): Fertilization in mammals. Biol.Rev. 32: 296-349
35. Overstreet,J.W. and Cooper,G.W.(1979): The time and location of the acrosome reaction during sperm transport in the female rabbit. J.Exp.Zool. 209: 97-104
36. Huang,T.T.F. et al. (1981): Only acrosome-reacted spermatozoa combind to and penetrate zona pellucida. J.Exp.Zool 217: 287-290
37. Inoue,M. and Wolf,D.P. (1974): Comparative solubility properties of the zona pellucidae of unfertilized and

- fertilized mouse ova. Biol.Reprod. 11: 558-565
38. Inoue, M. and Wolf, D.P. (1975): Comparative solubility properties of rat and hamster zona pellucida. Biol.Reprod. 12: 535-540
 39. Oikawa, T. (1979): Is cortical granule material a trypsin-like protease? Zoological Magazine 88: 84-85
 40. Oikawa, T. and Maruyama, Y. (1983): Detection of differences in surface carbohydrates of unfertilized and fertilized golden hamster eggs using potato agglutinin. J.Exp.Zool. 227: 139-143

Scanning electron microscopic study
of in vitro fertilization in the rabbit

Kahei SATO, Shuji WAKATA and Yoshie SUZUKI
Laboratory of Animal Reproduction, College
of Agriculture and Veterinary Medicine,
Nihon University, Fujisawa 252, Japan

Abstract

Under invitro conditions, the interaction of rabbit gametes were observed by using scanning electron microscope. The majority of rabbit spermatozoa preincubated in mTALP medium for 5 hours attached to the cumulus cells had intact acrosomes. After 15-20 minutes of insemination, the spermatozoa passed out the cumulus cell mass and reached on the surface of the zona pellucida. In the cumulus cells the majority of the spermatozoa observed were in acrosome reacting states, but the completion of the acrosome reaction was not observed. Many spermatozoa completed the acrosome reaction on the zona surface.

Introduction

In vitro fertilization is a good tool for the analysis of mechanisms of fertilization in mammals. In mammals, spermatozoa must undergo the acrosome reaction before they penetrate the zona pellucida. Under in vitro conditions, mammalian spermatozoa with intact acrosomes may reach on the zona surface immediately after insemination (Yanagimachi, 1981). Saling and his associates (1979a, b) have reported that acrosome intact sperm of the mouse can bind to the zona surface and begin their acrosome reactions on the zona surface thereafter. Similar observations in the hamster has reported by Gwatkin et al. (1977). A report by Bedford (1970) has indicated that uncapacitated rabbit spermatozoa can attach to the zona pellucida shortly after insemination. Further, he has observed that capacitation promotes the ability of spermatozoa to attach to

the zona surface. Thus, under in vitro conditions spermatozoa can undergo capacitation and/or the acrosome reaction on the zona surface. However, Cummins and Yanagimachi (1981), Yanagimachi and Philips (1984) have pointed out that under ordinary in vivo conditions, fertilizing spermatozoa probably complete their capacitation before contact with the cumulus and the acrosome reaction occurs near on the surface of the zona pellucida in the hamster. In the rabbit, however, relationships of the acrosome reaction of the spermatozoa and attachment to the zona surface are not clear. In the present study, the interaction of sperm and the zona pellucida of eggs of rabbits were examined by using scanning electron microscope (SEM).

Materials and Methods

Japanese white rabbits, 2.8-3.0 kg body wt., were used. All animals were housed in individual cages under light and temperature controlled conditions. Spermatozoa were collected from adult males proven their fertility by an artificial vagina. Semen samples were centrifuged (800 rpm, 10 min) in order to separate sperm cells from the seminal plasma. The spermatozoa were suspended in a chemically defined medium, a modified Tyrode's solution (mTALP; Yanagimachi, 1982) and then the sperm suspension was centrifuged. This washing procedure was repeated 2 times. To induce capacitation, washed spermatozoa were incubated in mTALP covered with mineral oil for 5 hours at 37 C under 5% CO₂ in air.

Adult does were superovulated by pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) human chorionic gonadotropin (hCG) injections. Briefly, 100 IU PMSG was given intravenously followed by an intravenous injection of 75 IU hCG 72 hours later. Ovulated eggs were recovered from oviducts 15 hours after hCG injection. The eggs were rinsed with fresh medium and then kept in the medium at 37 C under 5% CO₂ in air for in vitro fertilization.

For in vitro fertilization, also, mTALP was used. The medium was prepared immediately before use.

Insemination was performed as follows: an aliquots of sperm suspension dropped into droplet of the medium containing 5-7 eggs.

After insemination eggs were examined by a phase-contrast microscope and some eggs were fixed with 2.5%-glutaraldehyde for scanning electron microscopic observations.

Fixation of eggs was performed at a temperature of 4 C in fresh phosphate buffered 2.5%-glutaraldehyde for over night. After fixation the eggs were dehydrated rapidly with a graded acetone series and placed on coverslips coated with poly-L-lysine (Sigma) and they were dried. After drying them, samples were placed on the supporter and coated with gold by an ion-coater (Eiko). Observation and photography were executed using Akashi (Alpha-25) scanning electron microscope.

Results

The SEM showed that rabbit spermatozoa preincubated for 5 hours in mTALP attached to the cumulus cells immediately after insemination (Fig. 1). The majority of the spermatozoa attached to the cumulus cells were intact acrosomes (AI). At 15-20 minutes after insemination, spermatozoa passed out the cumulus cell layers and reached on the surface of the zona pellucida (Fig. 2). The spermatozoa attached firmly on the zona surface. During passing the cumulus layers, the sperm cells showed the enlargement of their heads (Fig. 3). After the enlargement of the acrosome, the spermatozoa on the zona surface showed vesiculation of the acrosome membranes (Fig. 4 and 5) and then the completion of the acrosome reaction (AR) was observed (Fig. 6). The spermatozoa attached firmly on the surface of the zona pellucida appeared to digest the zona substances (Fig. 7). The sperm tract also was seen on the zona surface (Fig. 8). When the spermatozoa in the cumulus cells, the majority of spermatozoa observed were in modification of the acrosome morphology (Fig. 9), but the completion of the acrosome reaction was not yet.

Discussion

The present study has demonstrated that at least in the rabbit,

capacitated spermatozoa with AI can attach to and penetrate the cumulus cells. Further, the majority of spermatozoa, during passing the cumulus layers, was found as acrosome reacting. We also observed that the majority of spermatozoa observed near or on the zona surface were beginning or/and completion of AR. Bedford (1968) has reported that rabbit spermatozoa among cumulus cells near the eggs begin or complete the AR in the majority, whereas the majority of AI spermatozoa located at the periphery of the cell mass. And often rabbit sperm cells adhering to the zona surface are known to have vesiculated acrosome sheath (Bedford, 1970). Our observations are agreement with results reported by Bedford (1968, 1970).

In vivo data to be reported elsewhere have shown that only acrosome reacting spermatozoa are found during penetrating through the cumulus cell layers and all the spermatozoa attached to the zona pellucida in the hamster (Cummins and Yanagimachi, 1982; Yanagimachi and Philips, 1985). Also, Huang et al. (1981) have reported evidence that in the guinea pig only AR spermatozoa can attached to and penetrate the zona pellucida. These disagreements under in vitro or in vivo conditions can not be explained clearly. Perhaps, it may be depend upon defferences of experiment conditions. However, specific specificity is not neglected.

References

- Bedford, J.M.(1968): Ultrastructural changes in the sperm head during fertilization in the rabbit. *Am.J.Anat.*, 123,325-357.
- Bedford, J.M.(1970): Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol.Reprod. suppl.*, 2,128-158.
- Cummins, J.M. and Yanagimachi, R.(1982): Sperm-egg ratios and the site of the acrosome reaction during in vivo fertilization in the hamster. *Gamete Research*, 5,239-256.
- Gwatkin, R.B.L.(1977): Fertilization mechanisms in man and mammals. New York, Plenum Press.
- Saling, P.M. and Storey, B.T.(1979): Mouse gamete interactions during fertilization in vitro: Chlortetracycline as a fluorescent probe for mouse sperm acrosome reaction. *J.Cell Biol.*, 83,544-556.
- Saling, P.M., Sowinski, J. and Storey, B.T.(1979): An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zonae pellucidae in vitro: Sequential relationship to the acrosome reaction. *J.Exp.Zool.*, 209,229-238.

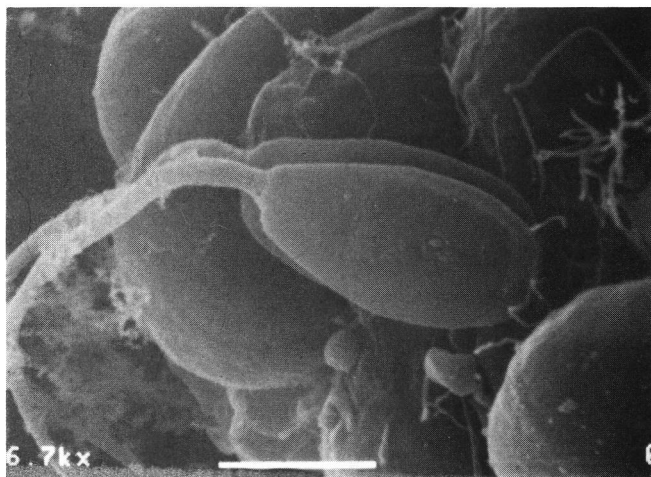


Fig. 1. Attachment of rabbit spermatozoa with intact acrosomes to the surface of cumulus cells

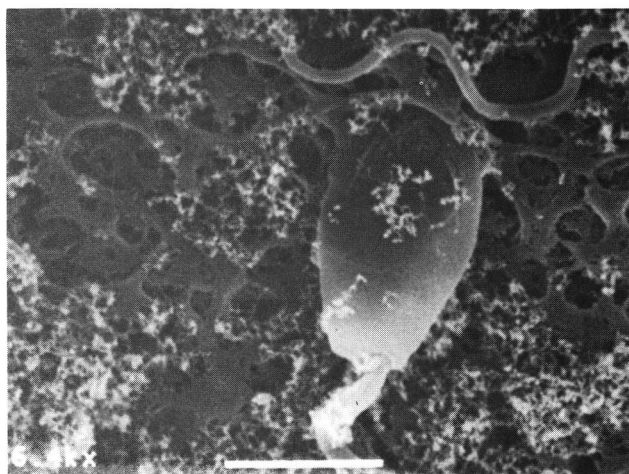


Fig. 2. A spermatozoon on the zona surface 20 min after insemination

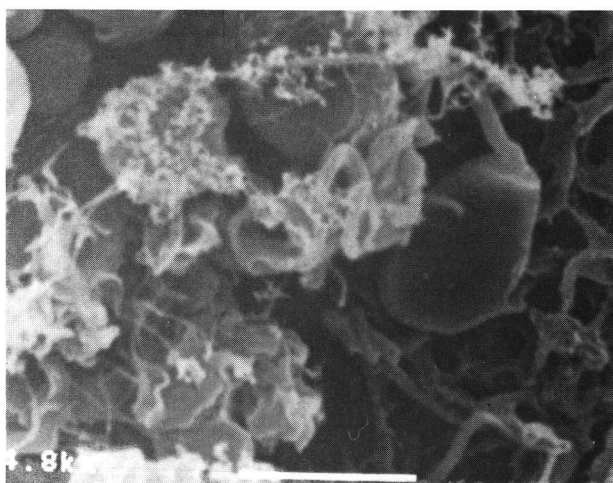


Fig. 3. A spermatozoon with swelled head during passing the cumulus layer

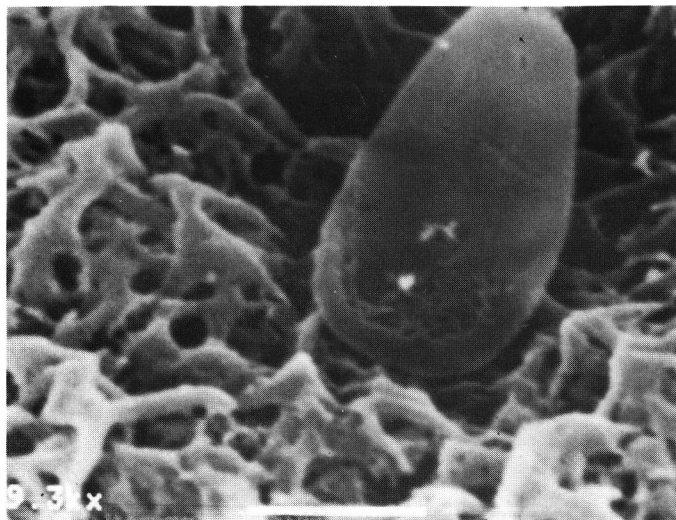


Fig. 4. On the zona
a spermatozoon shown
vesiculation of the
acrosome cap

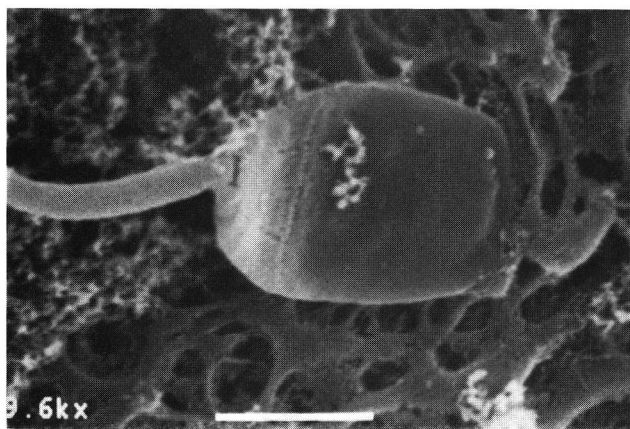


Fig. 5. Acrosomal ghost
remains on the top of
the head

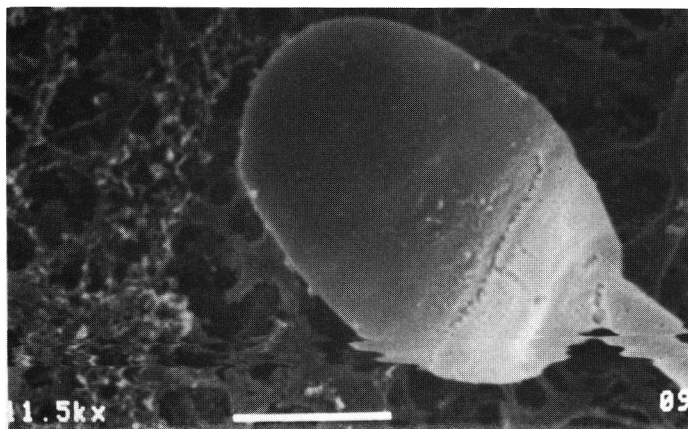


Fig. 6. Acrosome cap al-
ready can not be seen on
the acrosome

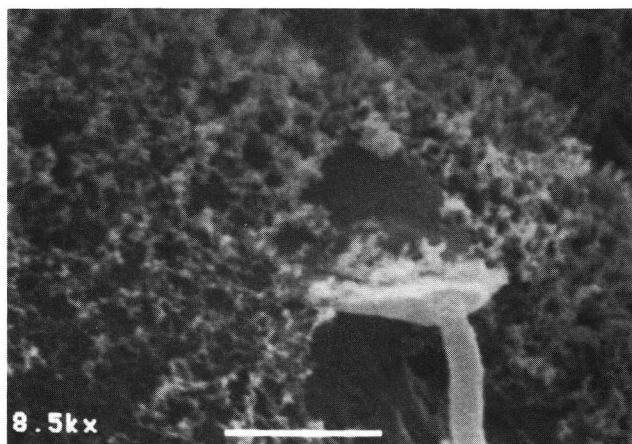


Fig. 7. A spermatozoon that digest the zona pellucida

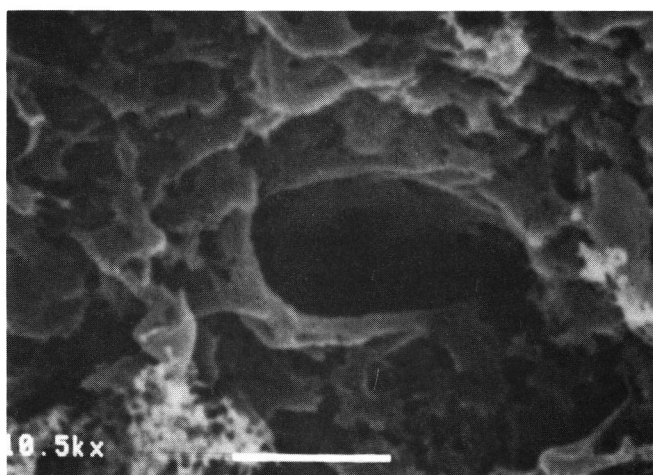


Fig. 8. The sperm tract seen on the zona pellucida

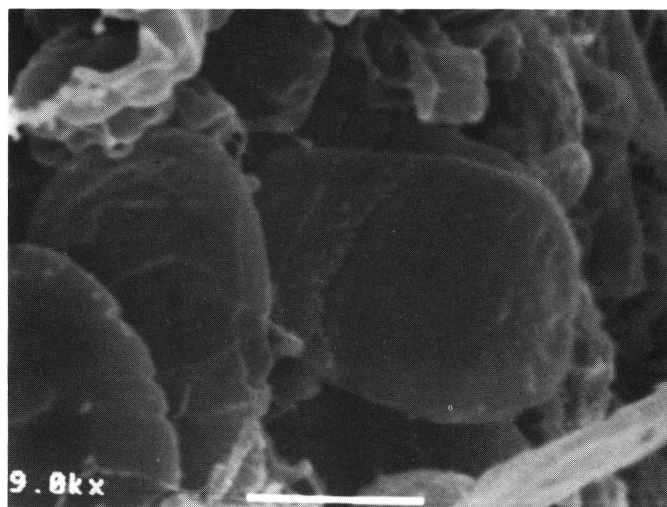


Fig. 9. IN the cumulus cells a modification of the acrosome are seen

- Yanagimachi, R.(1981): Mechanisms of fertilization in mammals. In "Fertilization and embryonic development in vitro". Mastroianni, L. and Biggers, J.D.(eds). Plenum Press, New York, pp81-182.
- Yanagimachi, R. and Philips, D.M.(1984): The status of acrosomal caps of hamster spermatozoa immediately before fertilization in vivo. Gamete Reseach, 9,1-19.

ウサギの体外受精に関する走査型電子顕微鏡 (SEM)による観察

佐藤嘉兵、若田修司、鈴木淑恵

日本大学農獣医学部家畜繁殖学教室

mTALP培養液中でcapacitationを誘起したウサギ射出精子を用いて体外受精を行ない、初期受精過程における精子先体の形態変化について SEMを用いて観察を行なった。5 時間の前培養を行なった精子は媒精後 15-20分でcumulus cellに接着した。その大部分のものは acrosome intact(AI)であった。Cumulus cell群を通過している精子はほとんどがAIであり、一部形態変化が見られたが先体反応は観察できなかった。完全な先体反応が見られたのは透明帯上の精子のみであった。透明帯上に接着し先体反応を起こした精子は、透明帯を消化して卵卵腔内に侵入した。

ラットとマウスにおける異属間集合キメラ胚の作成

The production of chimeric blastocysts (Rat ↔ Mouse) by aggregation method.

高橋文明・藤代克彦・高橋寿太郎・安田泰久

Fumiaki TAKAHASHI, Katsuhiko FUJISHIRO,

Jutaro TAKAHASHI and Yasuhisa YASUDA

岩手大学農学部動物育種学教室

Laboratory of Animal Breeding, Faculty of Agriculture,
Iwate University, Morioka-shi 020, JAPAN

An attempt for obtaining xenogeneic blastocysts (Rat ↔ Mouse) was undertaken by aggregation method. As a culture medium, Dulbecco's modified eagle medium with 0.3% bovine serum albumin (pH 7.4) was used for the production of xenogeneic chimeric embryos in this experiment.

When the late eight-cell stage rat and mouse embryos were cultured immediately after flushing from the uterus, 88.2% (30/34) of rat embryos and 95.0% (19/20) of mouse embryos developed into expanded blastocyst after 48 hours in culture. When rat and mouse embryos were removed their zona pellucidae with 0.3% pronase before culture, 87.0% (20/23) of rat embryos and 95.7% (22/23) of mouse embryos developed into expanded blastocyst after 48 hours in culture. On the other hand, 87.0% (40/44) of allogenic chimeric rat embryos (Rat ↔ Rat) and 90.5% (38/42) of allogenic chimeric mouse embryos (Mouse ↔ Mouse) developed into single, integrated expanded blastocyst after 48 hours in culture respectively. Furthermore, xenogeneic chimeras between rat and mouse were produced by aggregating embryos at the late eight-cell stage in this experiment. Out of 41 aggregated embryos from rat and mouse, 34 (82.9%) formed single, integrated expanded blastocyst after 48 hours in culture.

These results showed that Dulbecco's modified eagle medium was available for the production of xenogeneic chimeras between rat and mouse.

緒 言

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なわれている。実験発生学における集合キメラ作成の利点は、遺伝的に由来の異なる2種類以上の胚細胞を集合させ、その発生過程における細胞間の相互作用を解析し得ることである。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(ニッスイ)を用いて、同一実験系によるラットおよびマウスの同種内集合キメラ胚の作成、さら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。ラットとマウス間の異属間集合キメラは、初期胚に見られる種特有の細胞内微細構造や種特異抗原を標識として利用でき、細胞系譜の解析に有用な手がかりを与えてくれるものと考えられる。また、ラットとマウス間キメラ胚の移植により、着床、妊娠における、胎子-母胎間の免疫機構の解析など、今後ラットとマウス間キメラ胚の応用価値が増すものと考えられる。そこで本実験は、ラットとマウス間集合キメラ胚作成の実験系の確立を目的としている。

材料および方法

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/Jc1系マウスを使用した。これらの動物は、 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ の温度条件下で飼育され、照明は午前7時点灯、午後7時消灯とし、餌と水は自由摂取とした。

胚の採取は、交配確認日を0日目として、ラットで妊娠3日目、マウスで妊娠2日目の午後4時から6時の間に子宮かん流により行ない、得られた後期8細胞期胚を実験に供した。交配の確認は、ラットでは膣スメア中の精子、マウスでは膣栓により行った。

後期8細胞期胚はダルベッコ修正培養液で3回洗った後、0.3% pronase(科研製薬株式会社)含有ダルベッコ修正培養液に約10分間浸し、透明帯が消失する直前に、ダルベッコ修正培養液に移し、透明帯の消失を確認した。

その後直ちに、0.3% phytohemagglutinin P(Difco Laboratory)含有ダルベッコ修正培養液に移し、ラット間、マウス間、さらにラットとマウス間で接着を行ない10分間放置した。接着は時計皿中で微細なガラス棒を用いて行った。その際、それぞれの胚の間で、できる限り接着面を広くするようにするとともに、必要以上に胚に触れないように留意した。

接着を行なった胚は、0.3% bovine serum albumin(Sigma Chemical Company)含有ダルベッコ修正培養液で1回洗い、流動パラフィン(和光純薬工業株式会社)で覆った0.3% bovine serum albumin含有ダルベッコ修正培養液の小滴に移した。

それぞれの操作は、各種ダルベッコ修正培養液をホットプレートや培養器を用いて、 37°C に保

ちつつ行った。

培養は37℃, 5% CO₂と95%空気混合気相中で48時間行い, 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。

0.3% pronase含有ダルベッコ修正培養液は, あらかじめ37℃で2時間加温し, 混在する核酸分解酵素を自己消化させたものを用いた。

培養液の調整には滅菌2次水を用い, また培養液は適宜ろ過滅菌し操作中の汚染を防止した。培養液のpHは, 使用前日に重曹で7.4に調整し, 一晚37℃, 5% CO₂と95%空気混合気相中に置き, この気相に飽和させ, 使用前に再びpHを7.4に調整した。

結 果

対照とした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(87.0%)であり, マウスでそれぞれ, 19/20(95.0%), 22/23(95.7%)であった (table 1)。

ラットおよびマウスの同種内, さらにラット・マウス異属間の胚の接着による Chimeric Expanded Blastocyst への発生率は, それぞれ40/46(87.0%), 38/42(90.5%), 34/41(82.9%)であり (table 2), その間に有意な差 ($P<0.05$) は認められなかった。

Fig. 1 はラット・マウス間接着胚のChimeric Expanded Blastocystへの発生を継時的に観察したものである。接着時, 円盤状の胚がラット胚で, 球状の胚がマウス胚である。24時間後に腔の出現が見られ, 48時間後にはChimeric Expanded Blastocystに発生していることが観察され, 78時間後にはさらに大きく成長したBlastocystが観察された (Fig. 1)。

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				
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	41	1(2.4)	34(82.9)	6(14.6)

考 察

マウスキメラ動物作出の方法については、現在までにほぼ確立されたといってよく、すでに数千匹のキメラマウスが作出されている。ラットキメラ動物作出に関してはMayer and Fritz(1), Mullen and Lavail(2), Yamamura and Markert(3) および亀山ら(4) が報告しており、修正標準マウス培養液を用いた集合法によるChimeric Blastocyst への発生率はMayer and Fritz(1)および Yamamura and Markert(3)の報告では、おおよそ50%であった。また、亀山ら(4) は修正ダルベッコ P B S (-)培養液を用いた実験で、Chimeric Blastocyst への発生率が83.7%であったと報告している。

集合法によるラット・マウス異属間キメラ胚の作出の実験は、Mulnard(5), Stern(6), Zeilma ker(7), およびTachi and Tachi(8)により行なわれており、Tachi and Tachi(8)は修正標準マウス培養液を用いた実験で、Chimeric Blastocyst への発生率が37.7%であったと報告している。今回の同一実験系を用いた実験で、我々はラット、マウス同種内、およびラット・マウス異属間でそれぞれ、87.0%, 90.5%, 82.9%という高い Chimeric Expanded Blastocyst への発生率を得た。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内集合キメラ胚の作出ならびに、ラット・マウス異属間集合キメラ胚の作出に有効であると考えられる。また、これらの同種内および異属間の間の発生率に有意な差はなく、初期胚の発生段階において、ラット胚とマウス胚の間は、相互に免疫学的に寛容な状態にあると考えられる。この点に関しては、今後さらに詳細な検討が必要と思われる。

本研究は昭和60年度文部省科学研究費補助金、一般研究(C)「異種動物間のキメラ胚作成による類縁性の解析」(課題番号 60560271)の一部であることを付記する。

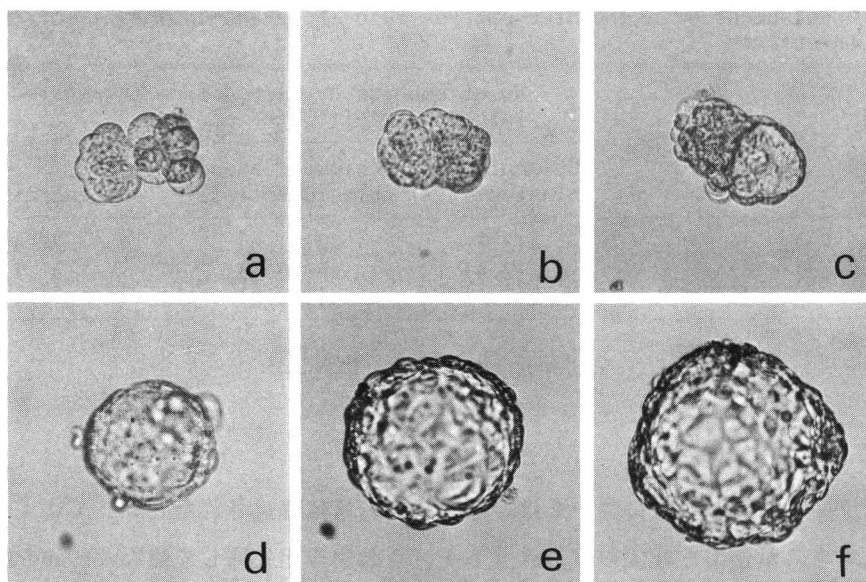


Fig. 1 (a) A xenogeneic chimera between rat(left) and mouse (right) was demonstrated shortly after culture. The xenogeneic chimera of various developmental stages after 12(b), 24(c), 36(d), 48(e) and 76 hours(f) in culture. ($\times 50$)

文 献

- (1) Mayer, J.F. and Fritz, H.I. (1974) The culture of preimplantation rat embryos and the production of rats. *J. Reprod. Fert.*, 39, 1-9.
- (2) Mullen, R.J. and Lavail, M.M. (1976) Inherited retinal dystrophy: Primary defect in pigment epithelium determined with experimental rat chimeras. *Science*, 192, 799-801.
- (3) Yamamura, K. and Markert, C.L. (1981) The production of chimeric rats and their use in analysis of hooded pigmentation pattern. *Develp. Genet.*, 2, 113-146.
- (4) 亀山賢次, 菅原七郎, 小島 勝, 正木淳二 (1985) キメララットの作出. *哺乳卵研誌*, 2, 123-146.
- (5) Mulnard, J.G. (1973) Formation de blastocystes chimeriques par fusion d'embryons de rat et de souris au stage VIII. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 276, 379-381.
- (6) Stern, M.S. (1973) Chimeras obtained by agregation of mouse eggs with rat eggs. *Nature*, 243, 472-473.
- (7) Zeilmaker, G. (1973) Fusion of rat and mouse morulae and formation of chimeric blastocysts. *Nature*, 242, 115-116.
- (8) Tachi, S. and Tachi, C. (1980) Electron microscopic studies of chimeric blastocysts experimentally produced by aggregating blastomeres of rat and mouse embryos. *Develop. Biol.*, 80, 18-27.

健保適用

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・プレグナニジオール分泌，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ため，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卵性卵巣症候群を原因としない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) 多くの卵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 ときに悪心，頻尿，しびれ感，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。

Normal young from in vitro fertilized mouse embryos developed in a medium supplemented with EDTA and transferred to pseudopregnant recipients.

Suzuki, H. and Toyoda, Y.

School of Veterinary Medicine and Animal Sciences,
Kitasato University

Present address: Drug Development Laboratories,
Chugai Pharmaceutical Co.Ltd.

Abstract

In vitro fertilized ICR mouse embryos were cultured during preimplantation period from the one-cell to the blastocyst stage in a chemically defined medium supplemented with EDTA. Development of normal progeny was confirmed by subsequent transfer into the uteri of pseudopregnant recipients. Developmental rate of newborn was not significantly different from that of the embryos derived from fertilization in vivo.

Introduction

The mouse embryos derived from certain strains or F1 hybrids can be cultured through the preimplantation period in vitro. Yet mostly one-cell embryos of randomly bred strains arrest development at the two-cell stage^{1,2)} This so-called 'in vitro two-cell block' can be overcome by the addition of

EDTA-2Na into the culture medium.^{3,4)} However, only a preliminary report has so far been published concerning the developmental normality of the embryos cultured in the presence of this chelating agent.⁵⁾

In the present study, the in vitro fertilized embryos of randomly bred strain were developed into the blastocyst stage in a chemically defined medium supplemented with 100 μ M EDTA and were transferred into the uterus of pseudopregnant recipients to assess the developmental ability after implantation.

Materials and Methods

Jcl:ICR mice (ICR), 2-4 months of age, were induced to superovulate by intraperitoneal injections of 5 i.u. PMSG and 5 i.u. hCG given 48hr apart. These females were killed by cervical dislocation 15-16hr after hCG injection and the oviducts were removed and placed in a culture dish containing 0.4ml TYH medium⁶⁾ covered with paraffin oil. The ampullar region of the oviduct was dissected with a needle and the eggs surrounded with cumulus cells were introduced into the medium.

Sperms were obtained from cauda epididymis of 3-5 months old ICR male mice and suspended into 0.4ml of the medium under paraffin oil. After preincubation for 2 hr at 37°C under 5% CO₂ in air, a small volume of sperm suspension was added to the medium containing eggs. The final concentration of sperm was adjusted to 150 cells/ μ l.

At six hours after insemination, the eggs extruded second

polar body were picked up from the medium, washed 4 times and then cultured in 0.4ml droplets of Whitten's medium⁷⁾ supplemented with 100 μ M EDTA under paraffin oil at 37°C under 5% CO₂ in air, according to Hoshi & Toyoda.⁴⁾ Embryos were cultured for 72 hours or 96 hours after insemination and were transferred as morulae (72hr) or blastocysts (96hr) into the uterine horns of Day 3 (morula and blastocyst) or Day 4 (blastocyst) pseudopregnant ICR foster mothers.

Pseudopregnancy was induced by mating with sterility-proven vasectomized C3H/He or ICR males. When the vaginal plug did not appear, pseudopregnancy was induced by using artificial penis⁸⁾ in the morning of Day 1. Day 1 was the day on which the vaginal plug was noticed.

After anesthetizing the recipient with 50mg sodium pentobarbital per kg body weight and exposing the oviducal end of the uterine horn through dorsal incision, the uterine wall in the vicinity of utero-tubal junction was punctured with a 25- or 27- gauge needle. Three to 6 embryos suspended in a small amount (below 0.3 μ l) of Hepes-buffered Whitten's medium were then introduced into each horn of recipient using a fine glass pipette, which was made of hematocrit tube (75mm) and attached to a mouth piece. Embryo transfer was done as quickly and gently as possible.

The recipients were housed individually after transfer and examined daily for their vaginal smears. After a placental sign was detected, the recipients were allowed to deliver at full term, and the young were sexed and weighed.

In the control groups, morulae and blastocysts were obtained from the uterus of superovulated ICR mice on Day 3 and Day 4 of pregnancy, respectively. All embryos fertilized in vivo were flushed from the uterus of the donors with 0.1-0.2ml of Hepes-buffered Whitten's medium. These freshly collected morulae and blastocysts were immediately transferred into the uterus of pseudopregnant recipients with the same procedures as for the embryos fertilized in vitro.

Results

The results of transfer of in vitro and in vivo fertilized embryos are shown in Table 1. All of 27 recipients, except one received in vitro fertilized morulae, became pregnant as assessed by the appearance of a placental sign. Out of 4 pseudopregnant females that had received 46 in vitro fertilized morulae, only one recipient delivered 3 young. After autopsy of these recipients, 7 implantation sites were found in 2 recipients. The rate of development (3/46) in this group was significantly lower than other groups.

Of the 21 and 60 blastocysts derived from in vitro fertilization and transferred into the uteri of pseudopregnant recipients on Day 3 and Day 4, 76% (16/21) and 50% (30/60) were developed into the newborn young, respectively. Slightly lower rate of development in the Day-4 transfer group was due to 2 cases of stillbirth in this group.

In the control groups, 62% (37/60), 55% (61/56) and 29% (12/41) of the embryos were development to the newborns after transfer of morulae to Day-3 recipients, transfer of blastocysts to Day-3 recipients and transfer of blastocysts to

Table 1 Development of in vitro fertilized and in vivo fertilized mouse embryos after transfer into uterus of pseudopregnant recipients.

Fertilization	Stage of embryos	Stage of recipient (day) ³⁾	No. pregnant / No. of recipient	No. of embryos transferred	Appearance of P.S. (day) ³⁾	Parturition (day) ³⁾	Newborn		No. of implantation(%)	Remarks
							No. (%)	mean weight		
in vitro	M ¹⁾	3	3/4	46	10.7±2.1 ^a	21 ^a	3 (7) ^a	2.59	7(5)	
	B ¹⁾	3	2/2	21	11 ^a	20 ^a	16(76) ^b	2.02±0.02	21(100)	
	B ¹⁾	4	6/6	60	11.3±1.8 ^a	20.7±1.0 ^a	30(50) ^{bc}	2.12±0.37	47(78)	5 stillborn
in vivo	M ²⁾	3	6/6	60	11.0±1.1 ^a	20 ^a	37(62) ^b	2.03±0.10	40(67)	
	B ²⁾	3	5/5	56	10.6±0.5 ^a	19.8±0.8 ^a	31(55) ^b	2.07±0.19	37(66)	1 stillborn
	B ²⁾	4	4/4	41	10.8±0.5 ^a	20.5±0.6 ^a	12(29) ^c	2.34±0.31	22(54)	3 stillborn

1) Morula(M.) and blastocyst(B.) developed in culture for 72hr(morula) or 96hr(blastocyst) after fertilization in vitro.

2) Morula(M.) and blastocyst(B.) obtained by flushing uterine horns of naturally mated females on Day 3(M.) or Day 4(B.) of pregnancy.

3) Day 1 is the day on which the vaginal plug was noticed.

P.S.: Placental sign.

Values with the same superscripts are not significantly different in the same column at P>0.05.

Day-4 recipients, respectively. The developmental rate in the last group (29%) was significantly lower than those of other two groups.

The developmental rates to young following transfer were not significantly different between the in vitro and the in vivo fertilized blastocysts whether they were transferred on Day 3 (76% vs 55%) or Day 4 (50% vs 29%). In all six experimental groups, there was no difference in the day of the appearance of placental sign and the day of parturition ($P>0.05$). No gross abnormalities were found among the young.

Discussion

Although the development into fetuses has been shown by transfer of mouse embryos fertilized in vitro, only limited experimental data have so far been available with regard to the transfer of embryos after cultivation throughout the preimplantation period in vitro.⁹⁻¹⁵⁾ Furthermore, developmental normality of the embryos which were stimulated to develop with the addition of EDTA into the medium has not been fully examined yet. Kimura et al⁵⁾ have recently made a brief comment on the successful birth of newborn mice after transfer of in vivo fertilized embryos cultured in the medium containing EDTA.

In this paper, in vitro fertilized ICR mouse embryos were cultured up to the blastocyst stage in the Whitten's medium supplemented by 100uM EDTA. Development of normal progeny was observed by subsequent transfer into the uteri of pseudopregnant foster mothers. Developmental rate to young

were not significantly different as compared with those in the control groups. except for the low rate of development of in vitro fertilized morulae transferred to Day-3 recipients. These results suggest that the in vitro fertilization and culture system used in the present experimental condition represents fundamentally the same conditions as in vivo.

The authors wish to express their gratitude to Mr. Arthur B. Karnuah for his kindness in reading and revising the manuscript and to Miss Ruriko Sakurada for her help in preparing the manuscript.

References

- 1) Biggers, J.D. (1971). New observations on the nutrition of the mammalian oocyst and the preimplantation embryo. In; The Biology of the Blastocyst ed, Blandau, R.J. The University of Chicago Press, Chicago, 319-327.
- 2) Whitten, W.K., and Biggers, J.D. (1968). Complete development in vitro of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. J.Reprod.Fert. 17, 399-401.
- 3) Abramczuk, J., Solter, D., and Koprowski, H. (1977). The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. Dev.Biol. 61, 378-383
- 4) Hoshi, M. and Toyoda, Y. (1985). Effect of EDTA on the preimplantation development of mouse embryos fertilized in vitro. Jpn.J.Zootech. Sci. 56, 931-937.
- 5) Kimura, S.N., Kojima, H., Yokoyama, M. and Kathuki, M. (1985). The culture of mouse zygotes in vitro. J.Mamm.Ova Res. 2, 43-44.
- 6) Toyoda, Y., Yokoyama, M. and Hoshi, T. (1971). Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. I. In vitro fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. Japan J.Anim.Reprod. 16, 147-151.
- 7) Whitten, W.K. (1971). Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro. Adv.Biosci. 6, 129-141.
- 8) Takeshima, T. and Toyoda, Y. (1977). Artificial insemination in the mouse with special reference to the effect of sperm numbers on the conception rate and litter size. Exp.Anim. 26, 317-322.

- 9) Mukherjee, A.B., and Cohen, M.M. (1970). Development of normal mice by in vitro fertilization. *Nature* 228, 472-473.
- 10) Mukherjee, A.B. (1972). Normal progeny from fertilization in vitro of mouse oocytes matured in culture and spermatozoa capacitated in vitro. *Nature* 237, 397-398.
- 11) Hoppe, P.C., and Pitts, S. (1973). Fertilization in vitro and development of mouse ova. *Biol. Reprod.* 8, 420-426.
- 12) Kasai, K., Sugimoto, M., and Toyoda, Y. (1979). Normal progeny produced by the parent derived from mouse egg fertilized in vitro. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 51, 740-744.
- 13) Nakagata, N. and Toyoda, Y. (1980). Normal young after transfer of frozen-thawed 2-cell mouse embryos obtained by fertilization in vitro. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 51, 740-744.
- 14) Massip, A., van der Zwalm, P., Puissant, F., Camus, M., and Leroy, F. (1984). Effects of in-vitro fertilization, culture, freezing and transfer on the ability of mouse embryos to implant and survive. *J. Reprod. Fert.* 71, 199-204.
- 15) Hoppe, P.C., and Comar, D.R. (1983). Reduced survival in utero from transferred mouse blastocyst compared with morulae. *Gamete Res.* 7, 161-167.

EDTA含有培地で発生した体外受精マウス胚の移植による正常産子について

鈴木 宏志*、豊田 裕

北里大学獣医畜産学部

現所属: 中外製薬(株) 開発研究所*

ICRマウスの過排卵卵子と精巢上体精子を用いて体外受精を行い、精子添加後6時間に前核期の卵子を100 μ Mの濃度のEDTA・2Naを含むWhitten培地へ移し、72時間または96時間培養した。得られた桑実胚(72時間)および胚盤胞(96時間)を偽妊娠第3日または第4日の受容雌の子宮へ移植した。対照区として、交配後第3日および第4日の妊娠マウスの子宮を灌流して採取した桑実胚および胚盤胞を採取後直ちに偽妊娠マウスに移植した。体外受精由来胚の新生子への発生率は、桑実胚では対照区に比し有意に低かったが、胚盤胞では、偽妊娠第3日および第4日のいずれの移植においても対照区との間に有意差を認めなかった。これらの結果から、'2-cell block'を克服するためにEDTAを添加した培地内で発生した体外受精由来胚は、正常な発生能を有していると考えられる。

ヒト精子と透明帯除去ハムスター卵受精系の多様性 について

Variety of cross fertilization between human spermatozoa and zona-free hamster eggs

永江 毅, 川村 良, 勝目 宏, 館花明佳, 岩城 章, 木下 佐

Takeshi Nagae, Makoto Kawamura, Hiroshi Katsume, Akiyoshi
Tachibana, Akira Iwaki, and Tasuku Kinoshita

東邦大学医学部第2産婦人科

2nd Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine,
Toho University, Tokyo.

Abstract

When zona-free hamster egg test is used for assessment of fertilizing ability in human spermatozoa and elucidating the mechanism of fertilization, it needs to know the effect of zonaless, polyspermic, and cross fertilization. In this study, it is shown to observe unusual fertilization and sperm head chromatin decondensation. Multiple flagella sperm was also shown to be capable of penetrating egg. These observations seems to be very useful for electron microscopic observations.

緒 言

柳町¹⁾により報告された透明帯除去ハムスター卵とヒト精子の異種間受精系は、10年の年月が過ぎた今日、IVF-ETとの成績比較にも相関の有る事が多く報告されるに至り²⁾³⁾⁴⁾、臨床面での有用性が確立されたかのようと思われる。しかしながら、不動性精子との受精⁵⁾や非定型的精子頭部膨化過程⁶⁾などの報告もあり、透明帯除去卵の使用・多精子受精系そして異種間受精などの点を慎重に考慮しなくてはならないものと考えられる。近年、この系を用いた精子一卵初期融合過程がそれぞれ透過電顕および走査電顕を用いて観察されている⁷⁾⁸⁾。ここで問題となるのは、標本固定による一断面を観察することしか可能でない電顕観察にある。すなわち、前述した現象を考慮に入れた観察が必要と考えられる。言い換えれば、何が生理的变化であるか？何が非生理的变化であるかを同定しなくてはならない。

既でに私共は、この系に於ける最も生理的と考えられるヒト精子頭部膨化過程を報告し、同時に他の膨化過程を行う精子の存在を報告している⁶⁾。そこで今回は、非定型的ヒト精子頭部膨化過程及び興味ある受精を行った精子について、位相差顕微鏡を用いて観察したので報告する。

実験材料・方法

基本培養液は、Krebs-Ringer solution (mBWW)⁹⁾ に3%ヒト血清アルブミン (Sigma) を添加して使用した。培養条件は、37℃, 5%CO₂ in air とした。

透明帯除去ハムスター卵の作製は、柳町ら¹⁾の方法に準じた。ヒト精液および精子の処理は、永江¹⁰⁾の方法に準じて行った。尚、今回観察した卵は、媒精後60~120分である。

結 果

観察されたヒト精子頭部膨化過程の大半は、既でに報告された変化のものであった (Fig. 1)。また、この様な変化は媒精後60~90分頃をピークにしばしば観察されていたが、4時間後の卵に於いてはあまり観察されなかった。さらに、媒精4時間後の卵内には時として核小体を有する雄性前核を観察している。

精子奇形の中で比較的良好に観察されるものに、複尾精子がある。このような精子は、運動性も良く保たれているので、卵への受精の関与が考えられる。私共の観察でも、明らかな2尾部精子が卵内にて正常な膨化頭部となっていることが認められている (Fig. 2)。一方、形態学的に正常と思われた精子に於いても時として不完全な膨化過程を生じるものや、全く異なる過程にて膨化頭部を形成してゆくものがある。後帽部領域からの halo 構造の出現、早期消失等ほぼ生理的と考えられる膨化過程を経たにもかかわらず、その後私共の分類 Ie の段階にて停止した精子を Fig. 3 に示す。chromatin の両側方には、黒い斑状構造物が特徴的に観察されている。

Fig. 4 に示す精子は、膨化精子頭部内に

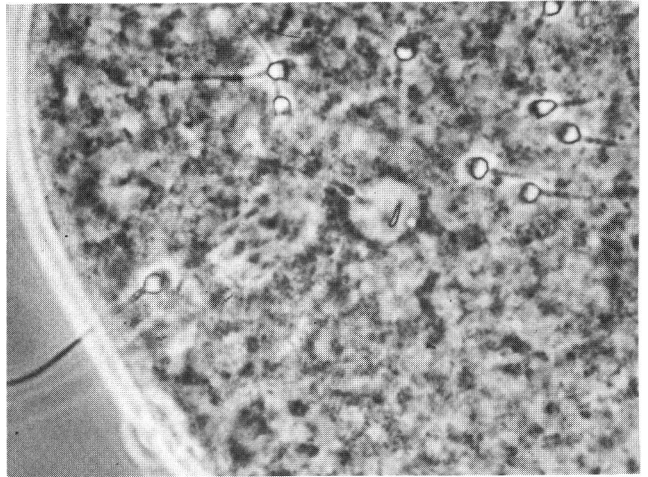


Fig. 1

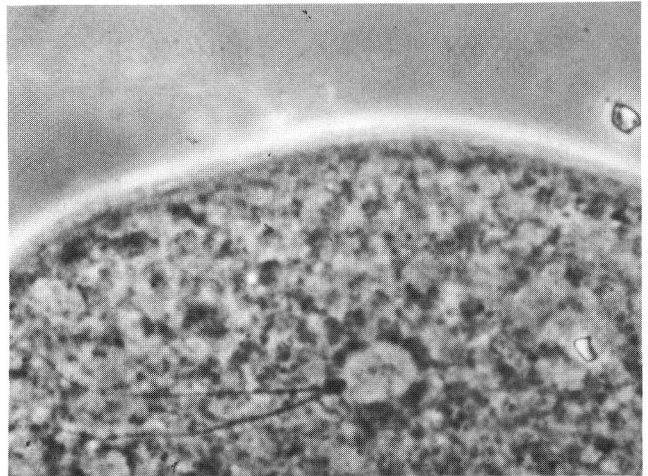


Fig. 2

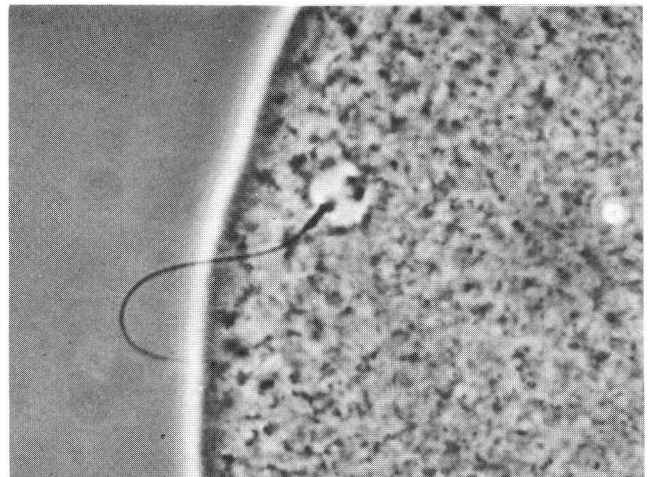


Fig. 3

Chromatin の遺残が明らかに観察されるものである。この精子の初期膨化過程では、後帽部よりの膨化が観察されず、頭部全体に一樣な膨化が認められたものである。Fig.5 では、先体部より膨化の開始した精子を示す。膨化開始と共に先体部領域は不鮮明となり、次第に halo 構造が認められるようになる。この halo 構造内部には、mid-piece と連結した後帽部領域が観察され、この部位にて膨化が開始していない事がわかる。又、この卵表層には皮質顆粒も観察されている。

Fig.6 では極体内に観察された膨化精子頭部を示した。卵表層の皮質顆粒の消失および雌性前核の出現から、この極体は第2極体であると考えられる。

尚、精子 mid-piece についても改めて観察すると、興味あることに、全ての精子において膨化頭部内での一部膨化が認められている。

考 察

ハムスター卵と同精子との受精系においては、媒精後約1時間にて膨化精子頭部が、約3時間後には雄性前核の出現が報告されている¹¹⁾。今回の観察からも、ヒト精子頭部の膨化は約1時間後には充分完了しており、初期膜融合から膨化精子頭部完了までの種の時間的差は無いと考えられる。しかしながら雄性前核の出現時間については大きな差が認められている。私共の観察した雄性前核出現は、媒精後約4時間であるが、このものは今まだ充分な前核形成はしておらず、この点に関しては多精子受精による影響と考えられる。

奇形精子の受精について考える時、この系には大きな問題点がある。透明帯除去による不動

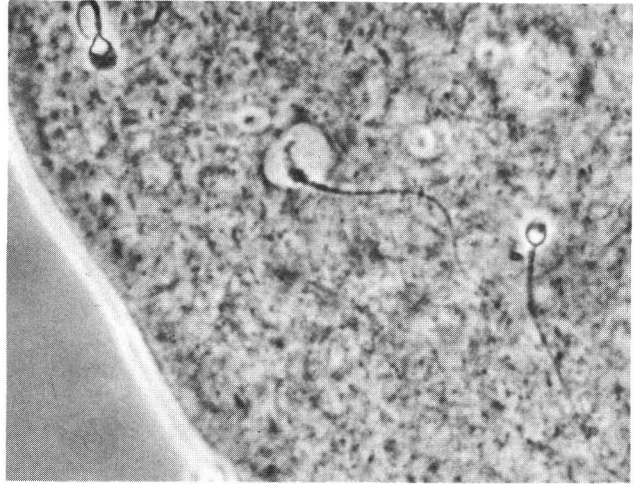


Fig. 4

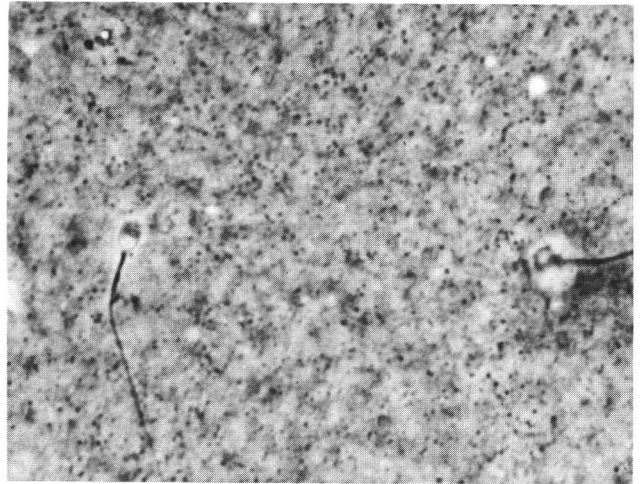


Fig. 5

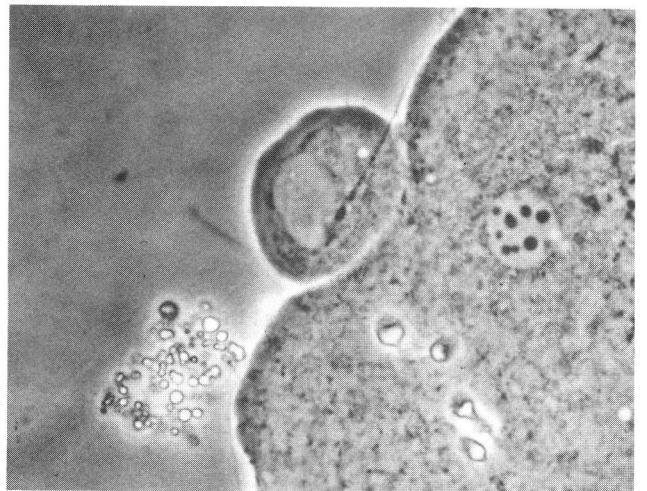


Fig. 6

性精子との受精⁵⁾などは、その最も典型的なものと考えられる。又、円頭精子の無受精能¹²⁾も報告されている。これらの事は、この系に於ける精子受精能の評価に、先体反応の有無が最も大切なものであることを示している。精子奇形の中でも、比較的程度の軽いと思われる複尾精子に於いては、運動性や先体反応等に問題なく、in vivoにおいても受精の生じる可能性が示唆される。

今回観察した異常膨化過程を示した精子については、同様な変化と思われる精子を Barros et al¹³⁾も報告している。一般的に初期卵-精子融合過程に必要な事として、精子側での先体反応完了¹⁴⁾これに従う後帽部及び赤道節 Plasma membraneの生理学的変化¹⁵⁾が挙げられる。これに対し、今回観察された精子では、後帽部よりの生理的膨化が認められなかったもので、何かしらの理由による極めて稀な変化なのかもしれない。

ハムスター卵の極体については、興味ある知見が得られている。すなわち、第1極体には微絨毛の存在が確認されるものの、第2極体にはこの微絨毛が存在しない¹⁶⁾この事は、第2極体自体には、精子との融合機構が欠如しているように考えられる。従って今回観察された極体内膨化精子頭部も、卵 meta phase II の時期に侵入・膨化した精子が、その後第2極体側に引かれていったものと考えられる。

精子 mid-piece の卵内での変化についてはあまり知られていない。Szollosi and Hunter¹⁷⁾ Barros et al¹²⁾そして井上¹⁸⁾は、卵 Cytoplasm 中の mid-piece—すなわち mitochondria の存在を報告している。今回の観察では、光顕を用いたものの為、今後電顕を用いて、mid-piece の過程をも追ってゆくつもりである。

文 献

- 1) Yanagimachi, R., et al., 1976, The use of zona-free animal ova as a Test System for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa, Biol. Reprod. 15: 471.
- 2) Inoue, M., et al., 1986, Analysis of zona-free hamster-egg sperm penetration tests from 1083, infertile couples, Dev. Growth, Diff. 28, supplement, 44.
- 3) Rogers, B.J., et al., 1979, Analysis of human spermatozoal fertilizing ability using zona-free ova, Fert. Steril. 32:664.
- 4) Overstreet, J.W., et al. 1980, Penetration of human spermatozoa into human zona-pellucida and zona-free hamster egg: A study of fertile donors and infertile patients. Fertil. Steril, 33:534.
- 5) Aitken, R. J., et al., 1983, Analysis of Sperm function in Kartagener's Syndrome. Fertil, Steril, 40:696.
- 6) 永江 毅・他: 1984. ヒト精子頭部膨化現象(光学顕微鏡を用いた連続観察), 哺乳卵研誌, 1:143.
- 7) 対木 章, 星 和彦, 斉藤 晃, 京野広一, 星合 昊, 鈴木雅洲, 堀内俊孝: 透明帯除去ハムスター卵子へのヒト精子の侵入機序-走査型電子顕微鏡による経時的観察-, 日産婦誌, 35:1705, 1983.
- 8) Talbot, p. Chacon, R. S. : Ultrastuctual observations on binding and membrane fusion

between human sperm and zona pellucida-free hamster oocytes. *Fertil., Steril.*, 37 : 240, 1982.

- 9) Biggers, J.D., et al.: The culture of mouse embryos in vitro. In "Methods in Mammalian Embryology" (ed. J.C. Daniel), 86, San Francisco, Freeman, 1971.
- 10) 永江 毅: カルモデュリンおよびカルモデュリン阻害剤・W-7 のヒト精子先体反応・受精に及ぼす影響, 日産婦誌 36 : 1123.
- 11) Yanagimachi, R.: Mechanisms of Fertilization in Mammals, In "Fertilization and Embryonic Development in vitro" (ed. Mastroianni, L. Jr., and Biggers, J.D.), Plenum press, pp82, 1981.
- 12) Weissenberg, R., et al. 1983 : Inability of round acrosomeless human spermatozoa to penetrate zona free hamster ova. *Arch Andro* 11 : 167.
- 13) C. Barros, et al. : Human sperm penetration into zona-Free Hamster Oocytes as a test to evaluate the sperm Fertilizing Ability. *Andrologia*. 11 : 197, 1979.
- 14) Huang, T. T. F., et al. 1981, Only acrosome reacted spermatozoa can bind to and penetrate zona pellucida : A study using the guinea pig, *J. Exp.* 2001.
- 15) Koehler, J.K., et al. 1982 : Interaction of human sperm with zona-free hamster eggs : A freeze-fracture study. *Gamete. Res* 6 : 371.
- 16) 平尾幸久 : 1986, 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。哺乳卵研誌 3 : 14.
- 17) Szollosi, D., and Hunter, R.H.F. : Ultrastructural aspects of fertilization in the domestic pig : sperm penetration and pronucleus formation. *J. Anat.* 116 : 181. 1973.
- 18) 井上正人・他 : 1986, 体外受精-胚移植における多精子受精卵の電子顕微鏡による観察。哺乳卵研誌 3 : 46.

新発売

動物用医薬品

繁殖障害の治療と 卵子移植のときに！

注射用・高濃度品

パナセラン®・Hi 劇 要指示

プロスタグランジンF_{2α}製剤



1ml 中 ジノプロスト (PGF_{2α}) 5mg 含有

パナセラン®・F 液 劇

1ml 中 ジノプロスト (PGF_{2α}) 2mg 含有

牛の子宮内注入、馬および豚にご利用下さい。

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

長期間低温保存した培養液 (M16) による

マウス前核期受精卵の培養並びに移植試験

Effect of storage period of the culture medium(M16)

on the development of mouse zygotes in vitro and in vivo

塩田ゆみ・角田幸生

Yumi SHIODA and Yukio TSUNODA

農林水産省畜産試験場繁殖部

Department of Reproduction, National Institute of Animal Industry

The present study was undertaken to examine the effect of storage period of the culture medium, M16 (Table 1)³⁾, on the development of mouse zygotes to blastocyst stage in vitro, and to live fetuses after transfer to recipients.

Mouse zygotes obtained from the superovulated F1 (C57BL/6 X CBA) females 18 hrs after hCG injection were used. The zygotes with two pronuclei were cultured for 4 days in one of the medium either fresh, stored for 30 days, 60 days, or 90 days in the refrigerator. Blastocysts developed from zygotes cultured in each medium were separately transferred into the uteri of recipients on the third or the 4th day of pseudopregnancy. They were killed on day 18 to examine the number of implantation sites and live fetuses.

In fresh medium, 185 of 228 zygotes (81%) were developed to blastocyst stage. The proportion of blastocysts developed from zygotes cultured in preserved media was not significantly different from that obtained in fresh medium (76~85%, in table 2).

The proportions of implantation sites (58 to 65%) and live fetuses (38 to 51%) after transfer of blastocysts developed in preserved media were not also significantly different from those (67% and 46%) obtained in fresh medium (Table 3).

The present study clearly demonstrated that the chemically defined culture medium, M16, could be preserved at least for 90 days in refrigerator without any detrimental effect on

mouse zygotes.

緒 言

胚の体外培養は、哺乳動物の初期発生過程を研究する上で欠かすことのできない技術である。これまで主としてマウスおよびウサギ胚を用いて、胚の体外培養に及ぼすエネルギー源、アミノ酸、浸透圧、pH、培養の気相あるいは培養液の作製に用いる水質等多くの要因が検討されている¹⁻³⁾。マウスでは、Whitten⁴⁾が化学合成培地を用いて8細胞期胚を胚盤胞期まで体外で発育させることに成功して以来、主としてクレブスーリンゲル重炭酸塩溶液(KRB)が用いられ多くの改良が加えられてきている。その結果現在では、受精直後の前核期卵を胚盤胞期まで高率に発育させ、またこれらの培養卵を受卵雌に移植することによって産児が得られる培養液が開発されている^{3,5,6)}。

これらの化学合成培地は、研究者によって異なったいくつかの方法によって作製されている。すなわち、(1) 必要な試薬をすべて秤量して混合する方法、(2) 無機塩類、グルコースやビルビン酸等を含む試薬および炭酸水素ナトリウムの保存液をそれぞれあらかじめ作り混合する方法、(3) すべての試薬の等張液を保存液として作っておき混合する方法、のいずれかの手法によって調整されている。いずれの場合も、保存液は低温下で1ヶ月間、最終の混合液は1~2週間以内に使用することが望ましいとされている^{3,7-9)}。しかしながら、化学合成培地の保存性についてはほとんど検討されておらず、わずかにWales and Whittingham¹⁰⁾の報告があるのみである。同氏らは、培養液を長期間低温下に保存すると、培養液中に含まれるビルビン酸が脱カルボキシ化するため、マウス胚の体外での発生率が低下すると報告している。

本実験は、マウス胚の体外培養に最も広く用いられている培養液の1つであるM16³⁾を用いて、保存日数別に胚の培養および移植試験を行ない、培養液の保存性について検討した。本実験の目的は、マウス胚の生存性を低下させることなく、培養液を長期間保存する技術を確立し、培養液作製の労力を軽減することである。

材料および方法

1) 供試動物： 実験には自家繁殖したF1 マウス (C57BL/6 X CBA) の成熟雌を用いた。

2) 採卵： PMSG(5IU) と hCG(5IU) を48時間間隔で投与して過剰排卵誘起後、CBA系成熟雄マウスと交配した。hCG 投与後17~18時間目に卵管膨大部を裂き、卵丘細胞に包まれた1細胞期卵を採取した。採取後5~6時間前培養をし、ついでヒアルロニターゼ (300IU/ml, BSA欠 M2)¹¹⁾で卵丘細胞を除去したのち前核が2個みられる卵子のみを選び出した。

3) 培養液の調整: Whittingham の M16液を用いた (表 I)。
各試薬は、原法に従って保存液を作製し、冷蔵庫内に保存して
1 ヶ月間使用した。なお炭酸水素ナトリウム、ビルビン酸ナト
リウムおよびフェノールレッドは 1 週間ごとに作製したものを
用いた。各保存液はプラスチック製ディスポーザブルビペット
(¹²⁾ファルコン社製) を用いて規定量を秤量して混合後、5%CO₂、95%空
気の混合ガスを 10 分間通気した。ついで、ウシ血清アルブミン
(No. A-4378, シグマ社製) を添加後ミリポアフィルター (0.45 μ ,
ミリポア社製) で濾過滅菌し、プラスチック製小試験管 (No. 2003,
ファルコン社製) に分注して冷蔵庫内 (3.6°C) で 30~90 日間保存し
た。なお、試薬の調整には脱イオン後蒸留した水を、調整直前
にさらに 2 回蒸留した 3 回蒸留水を用いた。

4) 体外培養: 採取した前核期受精卵は 4 群に分け、調整直後
の新鮮培地 (対照区) および 30、60 ならびに 90 日間保存した培
養液でそれぞれ 4 日間体外培養し、胚盤胞への発生率を調べた。
培養は 5% CO₂、95 % 空気の気相下で、流動パラフィン (軽
質、BDH 社製) を満たしたプラスチックシャーレ (No. 3001、ファルコン社製) に入れた培養液の小
滴 (0.1 ml) 内で行った。なお、各培養液は前日に小滴をつくり、炭酸ガス培養器内に静置したもの
を用いた。

5) 移植: 培養後胚盤胞期へ発育した胚は、受卵雌に移植して産児への発生能を調べた。受卵雌に
は、精管結紮雄マウスと交配した偽妊娠 3 日目あるいは 4 日目 (膣栓確認日を第 1 日目とする) の雌
マウス (CD-1 系) を用い、子宮角当り 3~5 個の胚を移植した。¹³⁾ いずれの受卵雌も妊娠 18 日目にと殺
して、着床数ならびに生存胎児数を調べた。なお、結果の統計処理は χ^2 検定により実施した。

結 果

第 2 表に、培養液の保存日数別の培養成績を示した。新鮮培養液を用いた場合、培養した前核期受
精卵のうち 81% が胚盤胞へ発育した。表から明らかなように、30~90 日間冷蔵庫内に保存した培養液
を用いても体外における胚の発生率は低下しなかった。すなわち、30 日間保存した培養液を用いた場
合の胚盤胞への発生率は 85% であり、対照区と差のない高い発生率であった。また、60 日および 90 日
間保存した培養液を用いた場合でも胚盤胞への発生率は 76% および 83% と高く、いずれも対照区にお

Table 1. Composition of M16³⁾

Compound	g/l
NaCl	5.534
KCl	0.356
CaCl ₂	0.189
KH ₂ PO ₄	0.162
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.294
NaHCO ₃	2.106
Na lactate	2.608
Na pyruvate	0.036
Glucose	1.00
Bovine serum albumin	4.00
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	50 μ g/ml
Distilled H ₂ O	Up to 1L

ける発生率と比べて有意な差は認められなかった。

Table 2. The effect of storage period of medium on the development of mouse zygotes in vitro.

Storage period of the medium	No. of zygotes cultured	No. of zygotes developed to blastocysts(%)
Fresh	228	185 (81)
30 days	139	118 (85)
60 days	63	48 (76)
90 days	81	67 (83)

Table 3. The viability of blastocysts developed from zygotes cultured in mediam preserved for different period, and transfered to recipients.

Storage period of the medium	No. of blastocysts transferred	No. pregnant/ No. of recipients(%)	No. of implants(%)	No. of live fetuses(%)
Fresh	52	9/10 (90)	35(67)	24(46)
30 days	35	7/7 (100)	22(63)	18(51)
60 days	37	5/7 (71)	24(65)	14(38)
90 days	26	5/6 (83)	15(58)	11(42)

胚盤胞へ発生した胚の移植成績を、第3表に示した。対照区においては、52個の胚盤胞を10匹の受卵雌に移植した結果、9 匹が妊娠し35個 (67%)の着床が確認され、24匹 (46%)の生存胎児が得られた。表から明らかなように、30～90日間低温保存した培養液を用いて得られた胚盤胞を移植した場合の妊娠率 (71～100%)、着床率 (58～65%)および生存胎児率 (38～51%)は、いずれも対照区と比べて大差なく有意な差はみられなかった。

考 察

4) Whittenが、化学合成培地を用いてマウス8細胞期胚の体外培養に成功して以来、培養液の組成や培養条件等に多くの改良が加えられ、現在では1細胞期卵を胚盤胞期まで体外で高率に発育させることのできる化学合成培地がいくつか開発されている。これらの化学合成培地の多くは、KRBを基本と^{3,5,6)}して修正されたものであり、いずれも最終の調整後1～2週間以内に使用する必要があるとされてい^{3,7～9)}る。しかしながら、胚の発生率を低下させることなく、培養液を低温下に保存できる保存期間につい

ではほとんど検討されていず、わずかに Wales and Whittingham¹⁰⁾の報告があるにすぎない。同氏らは¹⁰⁾ 5℃に1ヶ月間保存した化学合成培地を用いてマウス2細胞期胚を培養した結果、胚盤胞への発生率は新鮮培地を用いた場合に比べて低いことを明らかにした。その原因として、培養液中のビルビン酸が保存期間中に脱カルボキシ化するためと考えられている。

しかしながら、本実験で得られた結果は Wales and Whittingham¹⁰⁾の報告とは異なり、マウス初期胚の体外培養に広く用いられている化学合成培地M16液は、³⁾少なくとも90日間冷蔵庫内に保存できることが明らかになった。すなわち、受精直後の前核期マウス卵を、90日間保存した培養液で4日間体外培養した場合の胚盤胞への発生率は83%であり、新鮮培地を用いて得られた対照区の発生率81%に比べて差がみられなかった。また、これらの胚盤胞を受卵雌に移植後得られた受胎率(83%)、着床率(58%)および生存胎児率(42%)は、新鮮培地を用いて得られた成績(90%, 67% および46%)に比べていずれも有意な差は認められなかった。

Wales and Whittingham¹⁰⁾が用いた動物の系統、培養条件あるいは培養液の保存条件等は明らかにされていないことから、本実験で得られた結果との相違を比較することはできない。保存後の培養液中のビルビン酸濃度は測定していないが、ビルビン酸は希釈された条件下ではきわめて不安定であること¹⁴⁾を考えると新鮮培地に含まれる0.33 Mより低い濃度でマウスの1細胞期卵を胚盤胞へ発生させることが可能と推察される。

本実験では培養液を、完全には密封されていないプラスチック製試験管に分注して保存したため、保存期間が長くなるに従ってpHが9.1まで上昇した。しかしながら、培養前日に流動パラフィンを入れた培養皿に培養液の小滴を作り、5%CO₂、95%空気の炭酸ガス培養器内に静置したため、培養開始時のpHは保存前の7.4に下がっており特に問題はみられなかった。90日間保存後も培養液中に沈殿はみられず、また培養期間中雑菌等は全く観察されなかった。

従来、化学合成培地は1～2週間ごとに調整する必要があるとされていたが、本実験の結果からマウス胚の生存性を低下させることなく、少なくとも90日間冷蔵庫内に保存できることが明らかとなった。現在、さらに長期間保存したM16液を用いてマウス胚の培養ならびに移植試験を継続中である。

文 献

- 1) Brinster, R.L., (1969). Mammalian embryo culture. In The Mammalian Oviduct, Edited by E.S.E. Hafez and R.J. Blandau. Chicago and London. The University of Chicago Press. p.419.

- 2) Biggers, J.D., Whitten, W.K. and Wittingham, D.G. (1971). The culture of mouse embryos in vitro. In *Methods in Mammalian Embryology*, Edited by Daniel, J.C.Jr., San Francisco, W.H. Freeman and Company. p.86.
- 3) Wittingham, D.G. (1971). Culture of mouse ova. *J.Reprod.Fert.*, Suppl. 14, 7 ~21.
- 4) Whitten, W.K. (1956). Culture of tubal mouse ova. *Nature*, 177, 96.
- 5) Whitten, W.K. and Biggers, J.D. (1968). Complete development in vitro of the preimplantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. *J.Reprod.Fert.*, 17, 339 ~401.
- 6) Kasai, K., Minato, Y. and Toyoda, Y. (1978). Fertilization and development in vitro of mouse eggs from inbred and F1 hybrids. *Japan.J.Anim.Reprod.*, 24, 19-22.
- 7) Kaufman, M.H. (1983). Methodology: in vitro and in vivo activation techniques. In *Early Mammalian Development: Parthenogenetic studies*, Edited by Kaufman, M.H., Cambridge, Cambridge University Press, P.20.
- 8) 鈴木秋悦 (1981). 初期胚の培養、“哺乳動物の初期発生” 妹尾左知丸、加藤淑裕、入谷明 鈴木秋悦、館野編、理工学社、p.215.
- 9) 館野 (1984). マウスキメラ、“哺乳類の発生工学” 大沢仲昭、江藤一洋、館野、御子柴 克彦編、ソフトサイエンス社、p.140.
- 10) Wales, R.G. and Wittingham, D.G. (1970). Decomposition of sodium pyruvate in culture media stored at 5°C and its effects on the development of the preimplantation mouse embryo. *J.Reprod.Fert.*, 24, 126.(abstr.)
- 11) Falton, B.P. and Wittingham, D.G. (1978). Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. *Nature*, 273, 149-151.
- 12) 角田幸生 (1985). 胚の培養法、“リプロダクション実験マニュアル” 飯塚理八、入谷明、鈴木秋悦、館野編、講談社サイエンティフィック、p.130.
- 13) Tsunoda, Y., Wakasu, M. and Sugie, T. (1985). Viability of blastocysts and morulae cultured from 1-cell stage and transferred to recipients in the mouse. *Jap.J.Zootech.Sci.*, 56, 417-419.
- 14) Silverstein, E. and Boyer, P.D. (1964). Instability of pyruvate-¹⁴C in aqueous solution as detected by enzyme assay. *Analyt.Biochem.*, 8, 470-476.

マウス 2 細胞期卵から分離した割球

の体外発育

In vitro development of blastomeres isolated from 2-cell eggs in mice

中村克彦・石島芳郎

Katsuhiko NAKAMURA and Yoshiro ISHIJIMA

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.

The present paper describes the in vitro development of single blastomeres isolated from 2-cell eggs in mice.

Two-cell eggs were recovered from CF#1 females which were injected with 5 IU of PMS followed 48 hours later by 5 IU of HCG and were mated with fertile CF#1 males. Zona pellucidae were removed by incubation in Hanks medium containing 0.2 % pronase for 5 to 8 minutes, and the zona free eggs were washed two times with Hanks medium. Blastomeres were separated mechanically with a glass pipet in Ca^{++} and Mg^{++} free Hanks medium containing 0.02 % EDTA. Separated blastomeres were incubated in drops of culture medium (Whitingham 1971) covered with paraffin oil at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 , 95% air for 72 hours.

Of the 576 single blastomeres isolated from 288 2-cell eggs, 416 (72.2 %) developed to blastocyst in culture for 72 hours. This rate was similar to the rate of development into blastocyst in zona free 2-cell eggs, although lower than that of normal 2-cell eggs. The proportion of monozygotic pair embryos developed to blastocyst was 61.5 % in this culture.

緒言

近年、マウス、ヒツジ、ヤギ、ウシおよびウマなどで、1個のembryoをマイクロマニプレーターを用いて2分離あるいは切断し、その1組の分離embryoをrecipientに移植して一卵性双子が作出されていることはよく知られている(1)。一方、このembryoの分離法として、2~8細胞のような初期embryoでは、EDTAを添加した Ca^{++} 、 Mg^{++} freeの培養液中で軽くピペッティングして割球を分離する方法がマウスで試みられている(2,3,4,5)。

このEDTA添加による割球分離は、マイクロマニプレーションを用いる必要がなく、割球の損傷も少ないので、一卵性双子作出ばかりでなく、一卵性多子用の割球や実験用の割球を得るのに便利な方法である。しかしながら、この分離法で得られた割球の体外発育についてはまだ検討が少なく(2,3,4)、移植結果も芳しくない(2,5)。

本実験では、一卵性多子作出にこのEDTAを用いた割球分離法を応用していく前段として、まずマウス2細胞期卵から得られた分離割球が著者らの培養系でどの程度発育させられるか検討した。

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CF β 1系マウスの成熟雌(2~5カ月齢)を用いた。

2) 採卵

IV期の午後3時に5 IUのPMSGを皮下注射し、ついで48時間後に5 IUのhCGを皮下注射して交配する過排卵誘起法を用い、hCG注射後48時間にマウスをと殺し、卵管灌流法によって2細胞期卵を採取した。この採卵にはHanks液を用いた。

3) 透明帯の除去

採取した2細胞期卵を直ちにプロナーゼ(アクチナーゼE, 科研製薬)を0.2%含むHanks液中に移して5~8分培養し、透明帯の一部が消失しかけたらプロナーゼを含まないHanks液に移し、軽いピペッティングにより行った。

4) 割球の分離

透明帯を除去した2細胞期卵をHanks液で洗浄後、EDTA(第一化学)を0.02%含む Ca^{++} 、 Mg^{++} freeのHanks液中に移し、数回ピペッティングすることにより行った。

5) 培養法

培養は、プラスチックシャーレ (35×10mm) に0.1mlの小滴を4個つくり、各小滴に1割球 (1/2embryo) ずつ入れ、1シャーレに2対入るようにして行った。培養液にはM16液を用いた。培養条件は、炭酸ガス5%, 空気95%, 湿度100%, 温度37℃とした。

なお、対照区として、正常な2細胞期卵ならびに透明帯除去2細胞期卵を、各小滴に1個ずつ入れ、同じ条件で培養した。

6) 観察

培養割球ならびに培養卵は、24時間ごとに実体顕微鏡下で観察を続け、終局的に72時間後の発育程度をもとに発生率の比較を行った。

結果

EDTAを添加したCa⁺⁺, Mg⁺⁺ free培養液中で透明帯除去したマウス2細胞期卵を2分離し、その割球の体外発育能を調べた。

本実験では、透明帯の除去にプロナーゼを用いたが、その結果、損傷なく透明帯が除去できた卵の割合は88.4% (578/654 個) であった。また、透明帯除去卵のうち358個を割球分離に供した結果、288個 (80.4%) が全く割球を損傷することなく2分離できた。

この288個から得た分離割球576個を72時間培養し、同様に培養した正常な2細胞期卵ならびに透明帯除去2細胞期卵の発生率と比較した。その結果はTable 1に示す通りである。Table 1から明らかなように、分離した割球のblastocystへの発生率は72.2%で、透明帯除去2細胞期卵の73.6%と大差なかったが、正常2細胞期卵の87.5%にはおよばなかった。

Table 1 In vitro development of blastmeres isolated from 2-cell stage eggs in mice

Type of embryos	No. of embryos	Stage of development reached *			
		Blastocyst	Morula	Abnormal blastocyst	Degenerated embryo
Intact 2-cell egg	641	561(87.5)	21(3.3)		59(9.2)
Zona free 2-cell egg	220	162(73.6)	22(10.0)	24(10.9)	12(5.5)
Zona free 1/2-embryo	576	416(72.2)	43(7.5)	66(11.5)	51(8.9)

Values in parentheses are percentage of the number of embryos used.

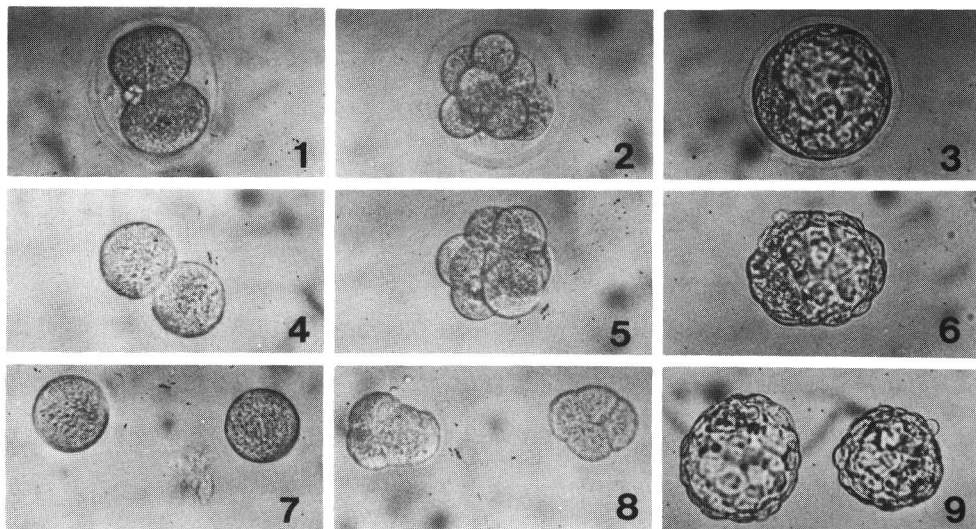
*Stage reached after 72 hrs in culture.

また, blastocystへに発育した分離割球のうち, 対で発育した率は61.5%(177/288組), 一方のみ発育した率は21.5%であった (Table 2)。この結果, 供試卵がともかくblastocysto に発育した率は83%となり, この率でみるかぎりには正常2細胞期卵の発生率に匹敵するものであった。

Table 2 Development of the monozygotic pairs of blastomeres isolated from 2-cell eggs

No. of pair embryos cultured	No. of pair embryos developed to blastocyst (%)	No. of one half embryos developed to blastocyst (%)
288	177 (61.5)	62 (21.5)

培養開始ならびに培養後のembryoの形態は図 1～9 に示した。



Explanation of Figures

- Fig.1. Intact 2-cell egg.
 Fig.2. 8-cell developed from intact 2-cell egg after 24 hrs in culture.
 Fig.3. Blastocyst developed from intact 2-cell egg after 72 hrs in culture.
 Fig.4. Zona free 2-cell egg.
 Fig.5. 8-cell developed from zona free 2-cell egg after 24 hrs in culture.
 Fig.6. Blastocyst developed from zona free 2-cell egg after 72 hrs in culture.
 Fig.7. Pair of half embryo isolated from 2-cell egg.
 Fig.8. Pair of 4-cell developed from half embryo after 24 hrs in culture.
 Fig.9. Pair of blastocyst developed from half embryo after 72 hrs in culture.

なお、対で发育した14組のblastocystを、偽妊娠4日のrecipient 14匹に、それぞれ1組ずつ移植してみたが、いずれからも産子は得られなかった。

考察

一卵性多子作出のためのembryoの分離法のひとつとして、EDTAを添加した $\text{Ca}^{++}, \text{Mg}^{++}$ freeの培養液中で軽くピペッティングする方法がマウスで試みられている(2,3,4,5)。この方法は、高価なマイクロマニプレーターを必要とせず、割球に対する損傷も少ないことから、分離割球を簡便に得る方法としてこれから広く利用されることが考えられる。しかし、この方法を再現性のある方法として受け入れるにはまだ検討が不十分のように思われる。本実験では、この方法が誰にでも簡単に利用できるかどうかを知るために、マウス2細胞期卵を用いて初歩的な検討を行ってみた。

まず、分離に先立ってプロナーゼによる透明帯除去について出来るだけ多くの卵を対象に実施した結果、割球に損傷なく透明帯が除去できた割合は88.4%(578/654個)で、lossした卵が11.6%もみられた。このlossはおそらく取り扱う卵を少なく、慎重に扱えばもつと軽減できると思われる。

本実験では、透明帯除去卵のうち358個の卵をEDTA添加培養液で割球分離に供したが、全く割球を傷めずに2分離できたのは80.4%に当たる288個であった。この率は、鈴木ら(4)が本実験と同様な方法で94~100%分離に成功しているのに比べると劣るものであったが、マイクロマニプレーターでマウス2細胞期卵を分離した長嶋ら(6)の率よりは若干上回っていた。

2分離した割球の培養によるblastocystへの発生率は72.2%(416/576割球)で、同時に培養した正常2細胞期卵の87.5%にはおよばなかったが、透明帯除去2細胞期卵の73.6%とは大差なかった。このことは、分離割球の発生率が劣った原因が、分離による影響ではなく、むしろ透明帯のないことに起因していることを示唆している。これまでに、EDTA添加培養液中でマウス2細胞期卵を2分離した場合の発生率は、Fiser and Macpherson(2)がSwiss Albinoマウスで44.6%、Tojo et al.(3)がC57Bl/crSlc系雌にDBA/2Slc雄を交配したF1卵で87.7%、また鈴木ら(4)がIVCSならびにF1マウスで91~100%の値を報告している。今回の発生率は、Fiser and Macpherson(2)よりはかなり高い率であったが、その他にはおよばなかった。こうした発生率の差は、用いるマウスの系統差が考えられる。

今回, blastocystに发育した分離割球のうち, 対で发育したものは288組中177組(61.5%)であり, 62組(21.5%)は一方のみが发育, また49組(17.0%)は双方とも发育しなかった。この結果, 供試卵が何らかの形でblastocystに发育した率は83%となり, この率でみるかぎりには正常2細胞期卵の発生率にさして劣るものでなかった。今回の対の発生率は, 鈴木ら(4)が同様な方法で86~100%を得ているのには遠くおよばなかった。いずれにせよ, 今回ある程度の発生率が得られたことは, EDTAを用いた分離法が十分活用できることをうらずけているように思われた。今回, 対で发育したblastocystを1組ずつ recipientに移植しても産子は得られなかった。これは当然予測された結果であり(2,5), 今後適切な移植法の開発がこの実験では必要と考えられた。

要約

本実験の結果を要約すると次の通りである。

- 1) プロナーゼ添加により割球を傷めることなく透明帯が除去できた割合は88.4% (578/654), また, EDTA添加培養液中で全く割球を損傷することなく2分離できた卵の率は80.4% (288/358) であった。
- 2) 分離割球のblastocystへの発生率は72.2% (416/576) で, 透明帯除去2細胞期卵の73.6% (162/220) とは大差なかったが, 正常2細胞期卵の87.5% (561/641) にはおよばなかった。また, 分離割球が対でblastocystに发育した率は61.5% (177/288組) で, 62組(21.5%)は一方のみが发育し, 49組(17.0%)は双方とも发育しなかった。
- 3) 偽妊娠4日のrecipient 14匹に, 対で发育したblastocystをそれぞれ1組ずつ移植してみたが, 産子は得られなかった。

文献

- 1) 角田幸生(1986)哺乳動物卵子のマイクロマニプレーション, 特に一卵性双子の作出について. 畜試年報, 24, 109-120.
- 2) Fiser, P.S. and Macpherson, J.W. (1976) Development of embryonic structures from isolated mouse blastomeres. Can. J. Anim. Sci., 56, 33-36.
- 3) Tojo, H., Ogita, Z. and Momose, Y. (1985) Comparison of the in vitro development of mouse single blastomeres with and without the zona pellucida. Experientia, 41, 108-109.
- 4) 鈴木宏志, 富樫 守, 宮井達也, 岡本道生(1986)マウス2および4細胞期胚から得た分離胚の発生能について. 哺乳卵研誌, 3, 26-27.
- 5) 富樫 守, 鈴木宏志, 宮井達也, 岡本道生(1986)マウス2および4細胞期胚から得た分離胚の移植成績について. 第33回日本実験動物学会講演要旨, 80.
- 6) 長嶋比呂志, 藤倉 朗, 尾川昭三(1982)マウスと家兎の2細胞期胚より分離した単一割球の発達能および凍結生存性に関する研究. 家畜繁殖誌, 28, 20-23.

哺乳動物卵の成熟過程におけるエネルギー代謝動態
卵の phosphofructokinase 活性測定の意義

Changes in energy metabolism during maturation of
mammalian oocytes, with special reference to the
measurement of phosphofructokinase activity in single
oocytes

矢野 哲^{*1}, 堤 治^{*1}, 綾部 琢哉^{*1}, 佐藤 和雄^{*2}, 水野 正彦^{*1}

Tetsu YANO^{*1} Osamu TSUTSUMI^{*1} Takuya AYABE^{*1} Kazuo
SATO^{*2} and Masahiko MIZUNO^{*1}

^{*1} 東京大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 水野正彦教授)

^{*2} 埼玉医科大学総合医療センター産婦人科

^{*1} Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine,
University of Tokyo (Director: Prof. Masahiko Mizuno)

^{*2} Department of Obstetrics and Gynecology, Saitama Medical
Center

Abstract

It is well known that in mammalian oocytes meiotic division is resumed by LH surge. Oocytes and preovulatory follicles from immature rats injected with PMS or PMS-hCG were used for studies of the changes in energy metabolism during oocyte maturation. The activity of phosphofructokinase, a rate-limiting enzyme in glycolysis, and ATP content in one oocyte were measured using an ultramicroassay called the enzymatic cycling method. They increased markedly in parallel with meiotic maturation after hCG injection. The activity of phosphofructokinase increased after PMS injection dissociated from meiosis, which may be mediated by production of estrogen within the follicles.

Oocyte maturation should be considered meiotic and cytoplasmic separately. It is

proposed that activated energy metabolism, that is, glucose metabolism, is so good an indicator for cytoplasmic maturation as germinal vesicle breakdown and polar body emission for meiotic maturation.

緒 論

哺乳動物では、卵は一般に LH surge により減数分裂を再開して germinal vesicle breakdown (GVB)をおこし、第2減数分裂中期にいたって受精能を獲得する。1935年、PincusとEnzmann¹¹⁾は家兎の卵胞より取出した卵はホルモンの影響を受けずに in vitroでGVBをおこし第2減数分裂中期まで進む現象、すなわち spontaneous maturation について発表した。その後この現象は他の哺乳動物においてもおきることが確認された。しかし、このような卵を用いて体外受精・胚移植を行った場合、正常な胎仔へ発育するものは1%足らずで、ほとんどの場合、卵子内へ進入した精子頭部の膨化や雄性前核形成が阻害されている⁹⁾。これは、spontaneous maturation の場合卵の細胞質中に合成される雄性前核成長因子の量が不十分なためではないかと考えられている¹³⁾。

そこで、卵の成熟を検討する際にはGVBや第1極体形成を指標とする核の成熟「nuclear maturation」だけではなく、細胞質の成熟「cytoplasmic maturation」もまた考慮する必要があるという概念が生まれた¹³⁾。卵のタンパク質合成能¹²⁾や呼吸能⁸⁾などを成熟の指標とする必要があるとの考えである。しかし、哺乳動物卵は直径約100 μ mと非常に微小なため、従来は複数個を集めなければ分析することができなかったが、われわれは酵素的サイクリング法⁵⁾⁷⁾による超微量定量法を確立し、卵細胞1個の物質代謝の分析を可能にした¹⁵⁾。本研究ではこの方法を用いて、卵のエネルギー代謝とその細胞質の成熟の指標とみなし、解糖系の律速酵素である phosphofructokinase (PFK)活性の卵成熟過程における変化を検討した。またそれに加えて、卵のATP含量の測定及び plasma estradiolの測定を行った。

実験材料および方法

1. 試 薬

1) PFK活性測定, ATP定量に用いた酵素

酵素はすべてBoehringer Mannheim社の硫酸浮遊液を購入し、使用直前に遠沈により硫酸を除去し20mM Tris-HCl (pH 8.0)溶解した。

2) その他

NAD, NADH, NADP, NADPH, ATP, AMP, glucose-6-phosphate, oxalacetate, α -ketoglutarate, hyaluronidaseはBoehringer Mannheim社、PMSは帝国臓器、hCGは持田製薬、3-isobutyl-1-methyl xanthine (IBMX)はResearch Biochemicals Inc.より購入し、その他の試薬もすべて特級を用いた。

2. 実験動物

Wistar 系幼若雌ラット25日齢(体重約50g)を用いた。第1群は25日齢に断頭屠殺後、採血し、卵胞内卵細胞を採取した。第2群は25日齢にPMS(10iu/0.2ml生食)を皮下注射し48時間後に断頭屠殺し、採血と卵胞内卵細胞採取を行った。第2群の一部を用いて、cumulus-oocyte complex(COC)の培養を行った。第3群は、PMS投与48時間後に卵巣より成熟卵胞(径0.7~1.0mm)を取り出し器官培養を行った。第4群は、PMS投与48時間後にhCG(30iu/0.2ml生食)を皮下注射し、過排卵をおこした。hCG投与16時間後の排卵率は100%であり、この時点で屠殺し卵管内卵細胞を採取した。第5群は、PMS投与時と、その24時間後の2回にわたり、強力なestrogen antagonistであるLY156758⁶⁾(0.2, 1.0, 5.0mg/0.2ml溶解液:DMSO/生食=1/4)を皮下注射して48時間後に断頭屠殺し、卵胞内卵細胞を採取した。各群で、ラット10匹以上を用いた。

3. 卵胞内卵細胞の採取

卵巣あるいは器官培養終了後の卵胞をculture dish(Falcon 3001)にとったPBS(phosphate buffered saline pH 7.4 2ml)中に置き、実体顕微鏡下に23ゲージ針で穿刺し、cumulus-oocyte complexを遊出させた。これをhyaluronidase 300iu/mlを含むPBSに移し、ビベッティングにより卵丘細胞を除去し卵細胞単独にした。卵細胞は、新しいPBSで3回洗浄し、GVBや第1極体放出の率を倒立位相差顕微鏡で観察した後、ガラス試料板に載せ凍結乾燥した。これをPFK活性測定試料とした。

4. 卵管内卵細胞の採取

実体顕微鏡下に卵管をhyaluronidase 300iu/mlを含むPBS中で切開し、COCを遊出させ、以下3.と同様の操作により試料を得た。

Table 1. Composition of m BWW

5. cumulus-oocyte complex(COC)の培養
COCは0.2mM IBMXを含むmodified BWB
<Table 1>2ml中に3.と同様な操作で遊出させ、別のmBWW中で16時間までhCG 10iu/mlを添加した群と、非添加の群の

Component	Concentration (mM)
NaCl	84.19
KCl	4.77
KH ₂ PO ₄	1.19
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.19
Ca lactate·5H ₂ O	1.71
Na pyruvate	0.25
Na lactate	21.55
Na HCO ₃	22.52
Glucose	5.55
BSA	3 g/l
K-Penicillin-G ₁	62.8 mg/l
Streptomycin SO ₄	50 mg/l
Phenol red	0.001 g/l

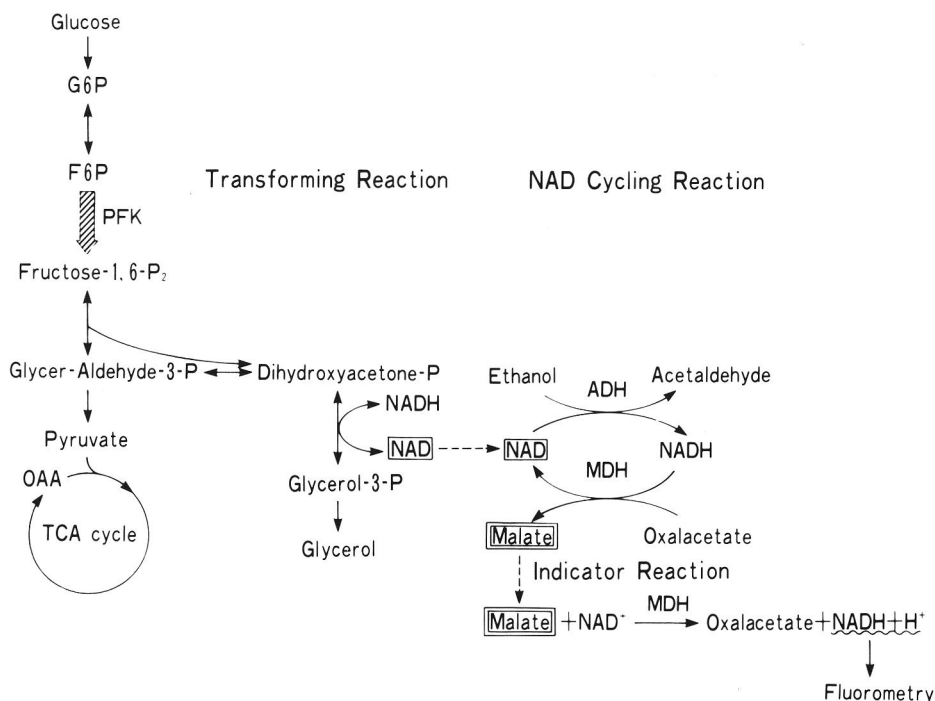
2群に分けて培養した(20個/dish)。培養は37℃, 5% CO₂, 95% airの条件下に行った。

6. 卵泡器官培養

成熟卵胞をステンレス製グリッドに載せ(20個/グリッド), 15% fetal bovine serum (GIBC O) を含む mBWW 2ml 中で, hCG 10 iu/ml 添加, 非添加の2群に分けて12時間培養した。培養条件は5と同様とした。

7. PFK 活性測定法

Fig. 1. Measurement of PFK Activity



P F K 活性は、解糖に続く glycerol 生成経路で生成される N A D をサイクリング基質とし、N A D 酵素的サイクリング法により 400 倍に増幅定量した<Fig. 1>。N A D が生成されるまでの転換反応条件は<Table 2>に示した。反応液は 5 μ l と微量であるため、oil-well法を用いた<Fig. 2>。oil-wellとは、テフロン板に直径 2 mm、深さ 2 mm の小さな well を掘ったもので、その中にパラフィンを満たし、反応液の蒸発を防ぐ一種の試験管である。oil-well 中に投下した卵細胞が反応液に到達することをもって反応開始とし、H C l を加え余剰の N A D H を壊して反応を停止させた。生成された N A D は過剰量の ethanol と oxalacetate の存在下で、alcohol dehydrogenase (A D H) により N A D H に還

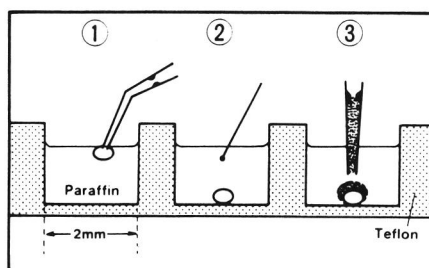
元され、続いて malate dehydrogenase (MDH) により NAD に戻る。この1回のサイクリックな反応で NAD と等量の malate が生成される。この反応を 400 回くり返すことにより元の NAD の化学量論的に 400 倍の malate が蓄積される。100℃, 3 分加熱による反応停止の後, malate を指示反応により NADH に変えて蛍光光度計 (Farrand Ratio II) にて測定し, NAD の正確な増幅値を定量した。

Table 2. Enzyme Reaction Condition

Enzyme	Reagent	Reaction volume	Volume of HCl(0.3M)	Incubation period
Phosphofructokinase	2 mM MgCl ₂ 3 mM NH ₄ Cl 0.2mM AMP 5 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM Glucose-6-P 1 mM ATP 0.15mM NADH ₂ 3μg/ml Glucose-P-isomerase 12μg/ml Aldolase 3μg/ml Triose-P-isomerase 12μg/ml Glycerol-3-P-dehydrogenase	5.24 μℓ	5.24 μℓ	30min.

This reagent was prepared in 100mM Tris-HCl buffer containing 0.05%(w/v) bovine serum albumin. The pH was 8.0.

Fig. 2. Oil-Well Technique



- ① The reagent(1~5μℓ) is added.
- ② The reaction is started by introducing an oocyte into the reagent droplet through the oil.
- ③ The reaction is stopped by adding HCl(or NaOH).

8. ATP 定量法<Fig. 3>

ATP は転換反応によって生成される NADPH をサイクリング基質とし, NADP 酵素的サイクリング法により 5000 倍に増幅定量した。転換反応は oil -well 中で行い, NaOH を加えて反応を停止させた。サイクリング反応により元の NADPH の化学量論的に 5000 倍の 6-phospho-gluconate が蓄積される。100℃, 3 分加熱による反応停止の後, 6-phospho-gluconate を指示反応により NADPH に変えて蛍光測定した。

Fig. 3. Measurement of ATP

1. An Oocyte is introduced into 0.2 μ l of 0.1N NaOH.
0.2 μ l of 2~20 μ M NADPH in 0.1N NaOH for standards
:40min at 60 C.

2. Add 1 μ l of ATP reagent. 30min at 20 C.

3. Add 5 μ l of 150mM NaOH. 30min at 60 C.

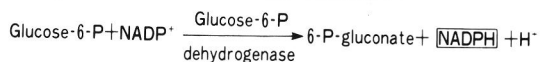
4. Transfer 3 μ l aliquots to 50 μ l of NADP
cycling reagent in fluorometer tubes.
Incubate 40min at 38 C; 3min at 100 C.

5. Indicator reaction

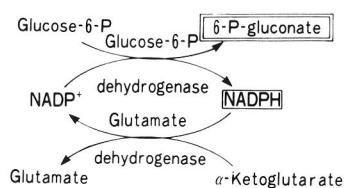
※ATP reagent

50mM Tris-HCl pH8.0; MgCl₂ 1mM;
dithiothreitol. 0.5mM; Glucose. 100 μ M; NADP.
20 μ M; BSA. 0.02%; Hexokinase. 2 μ g/ml;
Glucose-6-P-dehydrogenase. 0.15U/ml.

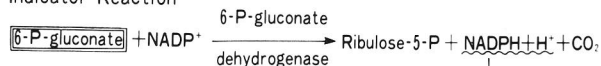
Transforming Reaction



NADP Cycling Reaction



Indicator Reaction



Fluorometry

9. plasma estradiol の測定

第1群と第2群のラットの plasma estradiol 値を E₂RIA キット (第一ラジオアイソトープ) に
よって測定した。

10. 統計学的検討

平均値間の有意差検定は Student の t 検定により, 比率の有意差検定は X² 検定により行った。

結 果

1. COC培養系におけるエネルギー代謝動態: <Fig. 4>

PMS投与48時間後の卵ではすべて germinal vesicle が保たれており, PFK活性は 3.45 ± 0.18 (pmol/oocyte/min, mean \pm S.E.M., $n=10$, 以下同様)であった。培養開始と共にGVBの率は急速に増加し1時間後に75.5% ($n=53$), 3時間後には96.1% ($n=51$), 8時間後には100% ($n=30$)となった。PFK活性も培養開始後3時間で 6.09 ± 0.43 と急激に増加し, 以後漸増し, 16時間後には 7.45 ± 0.24 となった。hCG 10iu/ml を添加した場合もPFK活性はほぼ同様の増加を示した。

2. 卵胞器官培養系におけるエネルギー代謝動態: <Fig. 5>

培養開始12時間後には, hCG 10iu/ml 添加群ではGVBの率は86.9%, 第1極体放出率は41.0% ($n=61$), PFK活性は 6.23 ± 0.39 と培養開始前に較べて有意 ($p < 0.01$) に上昇した。しかしhCG非添加群ではGVBの率は4.5% ($n=66$), PFK活性は 2.96 ± 0.35 と培養開始前と有意差がなかった。

Fig. 4.

Spontaneous Maturation of COC

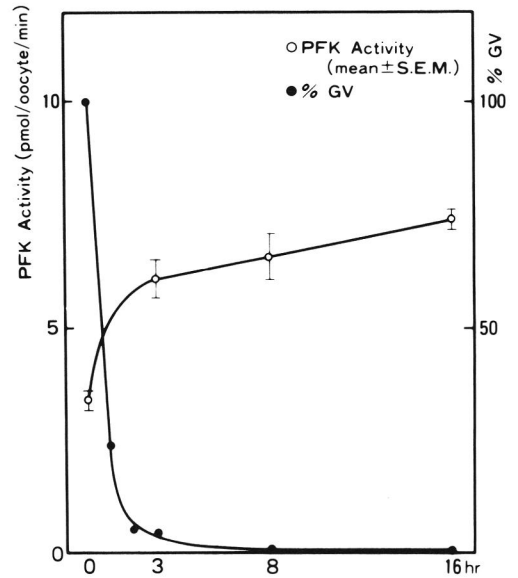
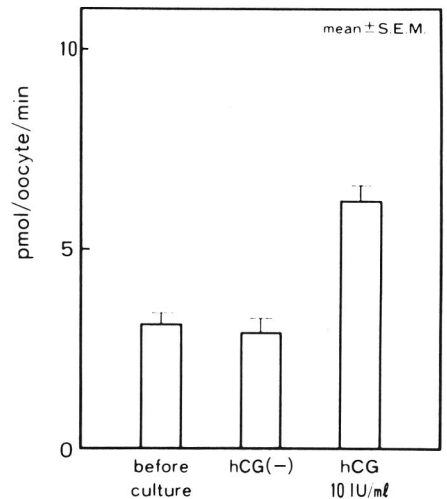


Fig. 5.

Effect of hCG on the PFK Activity (follicle enclosed oocyte)



3. 過排卵処置系におけるエネルギー代謝動態 : <Fig. 6, 7>

無処置の未熟卵胞内卵細胞は, 100%

germinal vesicleが保たれており ($n=100$), これはPMS投与48時間後 ($n=100$)にも変化がなかった。しかし, PFK活性は 2.29 ± 0.31 から 3.45 ± 0.18 へと有意 ($p < 0.01$) に上昇した。hCG投与16時間後の過排卵卵のGVB率は100%, 第1極体放出率は87.7% ($n=211$), PFK活性は 6.15 ± 0.41 とPMS投与48時間後の卵に較べて有意 ($p < 0.01$) に上昇していた。

ATP含量は未熟卵胞内卵細胞で 0.23 ± 0.05 (pmol/oocyte, mean \pm S.E.M. $n=10$, 以下同様), PMS投与48時間後の卵で 0.29 ± 0.04 と上昇傾向を示し, hCG投与16時間後の過排卵卵で 0.62 ± 0.01 と有意 ($p < 0.01$) に増加した。

Fig. 6.
PFK Activity of the Oocyte
(PMS-hCG treated immature rat)

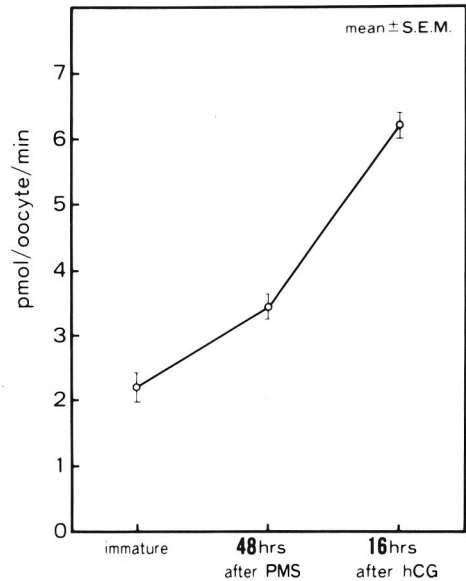
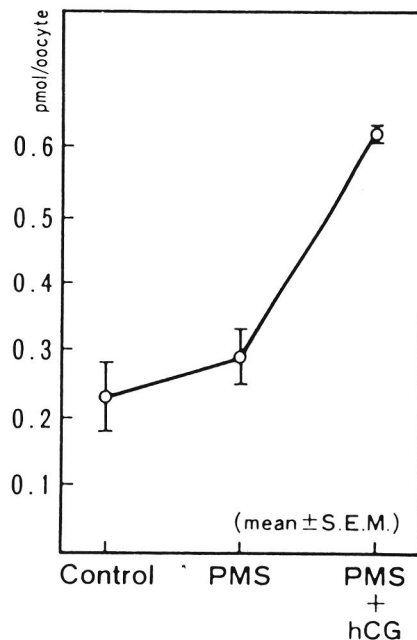


Fig. 7.
Contents of ATP in the Oocyte



4. 卵成熟過程における estradiol の効果:

<Fig. 8, 9>

PMS 投与前後でラットの plasma estradiol 値は 20.2 ± 2.9 (pg/ml, mean \pm S.E.M. n=3) から 335 ± 65 (n=5) へと, PFK 活性の上昇と平行して有意 ($p < 0.01$) に上昇した。

LY 156758 を追加投与した場合の PFK 活性は 0.2 mg 2回投与群で 1.65 ± 0.27 (n=4), 1.0 mg 2回投与群で 2.28 ± 0.12 (n=4), 5 mg 2回投与群で 1.64 ± 0.24 (n=4) と, PMS 投与前と同レベルに抑制された。

Fig. 8.

Effect of PMS on Plasma Estradiol Concentration and PFK Activity of Oocytes

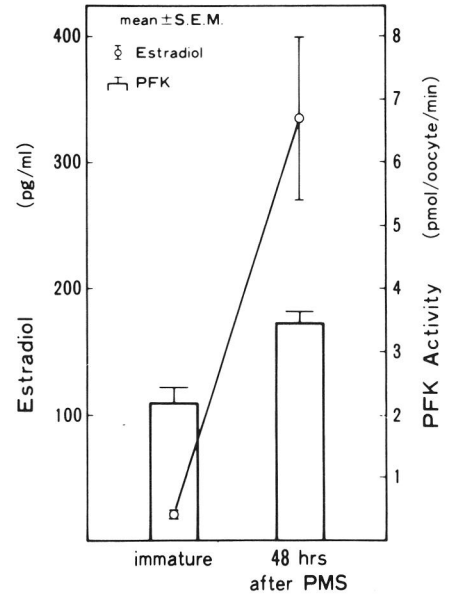
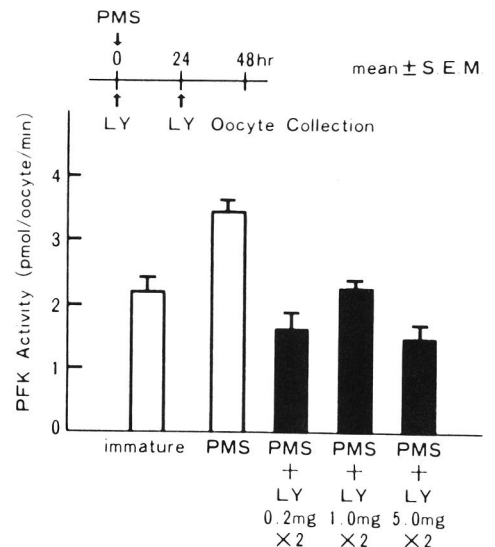


Fig. 9.

Effect of LY156758 on PFK Activity (PMS treated immature rat)



考 察

酵素的サイクリング法は、2つの酵素反応を組み合わせ、 10^{-15} mol 以下の物質を単一細胞レベルで測定する方法で、Lowry, O. H., 加藤らによって完成された。われわれはこの手法を用い、単一卵細胞の P F K 活性の測定法を確立した。卵は実際には受精後 8-cell までは glucose をエネルギー基質として利用できない³⁾⁴⁾ が、F S H 作用下の成熟初期の段階から糖代謝能の完成に向けて P F K 活性が上昇していくことが本研究で明らかになった。P F K 活性の上昇の結果、A T P の産生も進み、受精前には卵の A T P 含量は、未熟卵の約3倍になる。

P M S 投与前後において卵は G V B をおこさないが、P F K 活性は有意に上昇した。また P M S による F S H 作用で plasma estradiol 値は上昇するが、強力な estrogen antagonist である L Y 156758 の作用で P F K 活性は抑制された。すなわち、LH surge 前の卵胞内卵細胞に核の成熟は見られないが、estrogen により細胞質の成熟は進むことが明らかになった。Bar-Ami と Tsafiriri¹⁾²⁾ は卵胞内卵細胞が卵胞から解放された場合、spontaneous maturation をおこす能力、meiotic competence を有するためには、卵胞に十分 F S H が作用し estradiol が産生されることが必要であると報告している。この meiotic competence は細胞質が十分に成熟した卵のみに獲得されると考えられる。

C O C の培養でも卵の P F K 活性は上昇していくが、spontaneous maturation による卵では受精能が低いという事実から、受精能という機能的な面から捉えた卵の細胞質の成熟の指標として、P F K 活性は適当でないかもしれない。Moor¹⁰⁾ は aminoglutethimide を用いた卵胞培養実験によりステロイドが雄性前核形成に必須であることを報告している。堤¹⁴⁾ は、卵のステロイド合成酵素のひとつである 3β hydroxysteroid dehydrogenase (3β H S D) 活性の測定を N A D サイクリング法により可能にした。過排卵処理をした幼若ラットにおいて、卵の 3β H S D 活性は h C G 投与 8 時間後まで変化がなく、16~24 時間後に peak を示し 48 時間後には低下したとしている。卵の内因性のステロイド合成能を示す 3β H S D 活性は、meiosis とは関連しないが受精能の指標になる可能性があり、今後検討を要する。

P F K 活性は、少なくとも核の成熟に連動する細胞質の成熟の指標とみなせる。現在 G V B の観察だけに終始している卵成熟機構の解明に、鋭敏な感度をもつ P F K 活性の測定は有用であると考えられる。

文 献

- 1) Bar-Ami, S., and Tsafiriri, A. : Gamate Res., 4:463, 1981.
- 2) Bar-Ami, S., Nimrod, A., Brodie, A. M. H., and Tsafiriri, A. : J. Steroid. Biochem., 19:965, 1983.
- 3) Biggers, J. D., Whittingham, D. G., and Donahue, R. P. : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 58:560, 1967.
- 4) Brinster, R. L. : J. Exp. Zool., 158:59, 1965.
- 5) Kato, T., and Lowry, O. H. : Anal Biochem., 53:86, 1973.
- 6) Kleinberg, D. L., Todd, J., and Babitsky, G. : Proc. Natl. Sci. U. S. A., 80:4144, 1983.
- 7) Lowry, O. H., and Passonneau, J. V. : A Flexible System of Enzymatic Analysis, Academic press, New York, 1972.
- 8) Magnusson, C., and Hillensjö, T. : J. Exp. Zool., 201:139, 1977.
- 9) Moor, R. M., and Warnes, G. M. : Control of Ovulation. Butterworths, London, 1978.
- 10) Moor, R. M., Polge, C., and Willadsen, S. M. : J. Embryol. Exp. Morphol., 56:319, 1980.
- 11) Pincus, G., and Enzmann, E. V. : J. Exp. Med., 62:655, 1935.
- 12) Stern, S., and Wassarman, P. M. : J. Exp. Zool., 189:275, 1974.
- 13) Thibault, C., and Gerand, M. : Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., 13:145, 1973.
- 14) 堤 治, 佐藤 和雄, 坂元 正一 : 日内分泌誌, 58:1321, 1982.
- 15) 堤 治, 佐藤 和雄, 坂元 正一 : 日産婦誌, 34:1755, 1982.

繁殖障害に!!

(家畜共済診療点数採用)

要指示医薬品



動物用
医薬品

アントリン

前葉性卵胞刺激
ホルモン剤



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

- 適応症** 牛・馬：卵胞のう腫、排卵障害、卵胞発育障害
(卵巣発育不全、卵巣静止、卵巣萎縮)
- 包装** 10アーマー単位(A.U.) 20アーマー単位(A.U.)
40アーマー単位(A.U.) 溶解液付



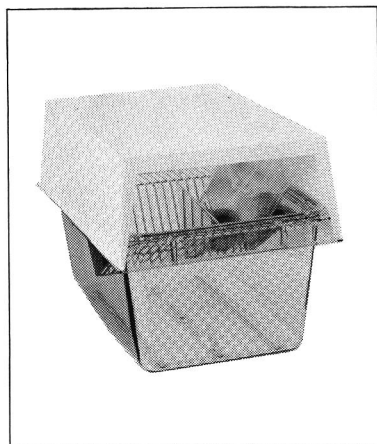
デンカ製薬株式会社

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

NEW!

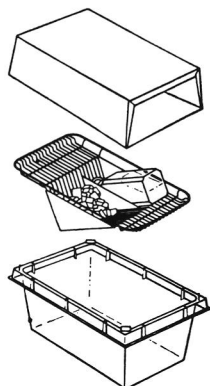
M-7 (Isocage & Isocap)

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

ハムスターテストとマウス受精卵初期発生成績からみた 体外受精用培養液の検討

A study of culture mediums for in vitro fertilization from an
overview of the results of a hamster test and of the initial
development of mouse fertilized embryo

柳田 薫 星 和彦 村岡 栄一 菅野 薫 会田都美子
吉松 宣弘 佐藤 章

K. Yanagida, K. Hoshi, E. Muraoka, K. Kanno, T. Aita,
N. Yoshimatsu, A. Sato

福島県立医科大学産科婦人科

Department of Obstetrics and Gynecology, Fukushima Medical
College

Many kinds of culture medium are used for human IVF-ET at various institutions around the world, but the reason for their use is not always clear.

We examined such culture mediums for human IVF as Hoppe & Pitts, mEarles, Ham's F-10, T₆ and for animal IVF as mBWW, mKRB, TALP-2 for their applicability to fertilization and to embryo culture by the hamster test and cultural experiment of mouse 2-cell stage embryo, respectively. The mBWW showed the most favorable results in both experiments. It seems important for the mBWW to be reconsidered as a culture medium for human IVF.

緒 言

Whittingham T₆, Ham's F-10をはじめとして世界の各施設でヒトの体外受精, 胚移植(以下 IVF-ET と略す)に用いられている培養液の種類は数多い。しかし, なぜその培養液を用いているかの根拠は必ずしも明確でなく, IVF-ET を臨床応用する際の培養液の選択はむずかしいのが現状である。

今回われわれは、現在使用されているヒト IVF 用各種培養液と、実験動物の IVF 用培養液として従来から使われている数種類の培養液をとりあげ、受精に関する適性はハムスターテスト¹⁾²⁾で、又胚培養に関する適性についてはマウス 2 細胞期胚の培養実験³⁾を行い、それぞれの成績を比較し、ヒト IVF 用培養液について検討したので若干の考察を加えて報告する。

材料および方法

1. 実験方法の概略

検討の対象とした培養液は、ヒト IVF 用培養液である Hoppe & Pitts 液、m Earles 液、Ham's F-10 液、T₆ 液、HTF 液と実験動物の IVF 用培養液である mBWW 液、mKRB 液、TALP-2 液の 8 種類である。

その各々の培養液を用いてハムスターテスト (透明帯除去ハムスター卵とヒト精子との in vitro 侵入実験) とマウス 2 細胞期胚培養実験を施行した。

2. 培 養 液

実験に供した培養液の組成を表 1 に示した。それぞれの pH は実験毎に検査し 7.4~7.6 に調整した。ハムスターテストの場合は、Human Serum Albumine (HSA) を加えてその 3.5% 溶液とし、マウス 2 細胞期胚培養実験では、Bovine Serum Albumine (BSA) を加えて 0.5% 溶液とした。浸透圧は mBWW 液が 308 mOsm で他

表 1 検討した培養液とその組成

組 成 (mM)	Hoppe&Pitts	mEarles	Ham's F-10 ^{*1}	T6	HTF	mBWW	mKRB	TALP-2 ^{*2}
NaCl	88.0	116.4	126.7	99.4	101.6	84.0	99.6	124.8
KCl	4.78	5.36	3.82	1.42	4.69	4.78	4.78	2.68
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.19	0.81	0.62	0.71	0.20	1.19	1.19	0.49
KH ₂ PO ₄	1.19		0.61		0.37	1.19	1.19	
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O		1.01						0.36
Na ₂ HPO ₄			1.10	0.36				
CaCl ₂ ·2H ₂ O (or Ca lactate)	1.71	1.80	3.00	1.78	2.04	1.71	1.71	1.80
NaHCO ₃	22.60	25.00	25.00	25.00	25.00	35.71	25.07	11.90
Na-lactate	21.6			24.9	21.4	21.58	21.58	9.00
Na-pyruvate	0.25	0.10	1.00	0.47	0.33	0.25	0.5	0.09
Glucose	5.56	5.56	6.11	5.56	2.78	5.56	5.56	4.50
Penicillin (200,000iu/ml)	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml

pH

7.4~7.6

* 1 Amino acids, Vitamins等を含む

* 2 Taurine, Epinephrineを含む

注 ハムスターテストでは 3.5% HSA 溶液、マウス 2 細胞期胚培養実験では 0.5% BSA 溶液とする

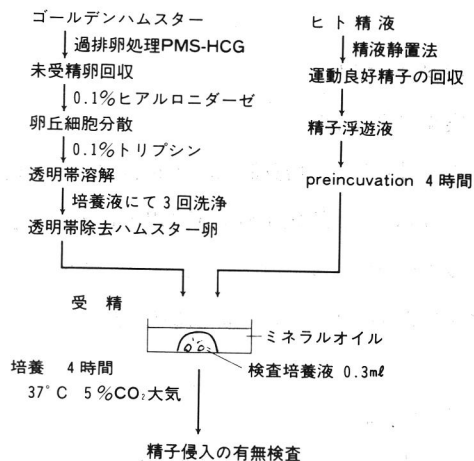
の培養液では275~290 mOsm であった。

3. ハムスターテスト

i) 透明帯除去ハムスター卵の作製

概略は図1に示した。体重90~150gの成熟メスゴールデンハムスターを用いた。発情周期の第1日目 (postestrous discharge の認められた日) の午前中に PMS 30 iu を腹腔内に投与, 第3日目に hCG 30 iu を投与することで過排卵をおこさせ, hCG 注射後17時間目に開腹して卵管中より未受精卵を採取した。その卵を0.1% hyaluronidase で15分間処理して卵丘細胞を分散させて卵子を分離, 実験に供する培養液の0.3% HSA 液にて3度洗浄後0.1% trypsin で3分間処理して透明帯を溶解除去した。その後さらに3回洗浄してできた透明帯除去ハムスター卵子を検査に供した。

図1 実験方法-1 ハムスターテスト



ii) 精液からの精子の分離

精液は健康成人男子より用手法にて得られた。室温に約20分静置して十分に液化させた後, mBWW 液(HSA 0.3%) 2 mlを入れた試験管の底に静かに0.5mlずつに等分する。試験管口をパラフィルムにて覆い, 精液・培養液境界が広がるよう30°に傾け37°Cに1時間静置する。この間に, 運動良好精子は精液中から培養液中に swim up して来る。管底に残った精液を捨て, 残った mBWW 液を遠心 (230×g 5分間) により2度洗浄後, 一定の濃度 (10×10⁶/ml) になるように, 検査培養液 (HSA 3.5%) 0.3ml中に移した。なお検査培養液はプラスチック製ペトリ皿に入れ, その上をミネラルオイルで覆った。その後4時間の前培養を行い実験に供した。

iii) 培養・判定

前培養の終了した一定濃度の精子を含むペトリ皿中の検査培養液 (HSA 3.5%含, 0.3ml) の中に透明帯除去ハムスター卵子を入れ, 37°C 5% CO₂大気中で4時間培養した。

侵入の判定は位相差顕微鏡下に卵を観察して行った。卵内に1個以上の膨化精子頭部もしくは雄性前核が尾部を伴っている場合, 侵入していると判定した。

4. マウス2細胞期胚培養実験

実験方法の概略を図2に示した。使用マウスは7~9週令の C57BL/6N で, PMS 8 iu の腹腔内投与後48時

間目に hCG 8 iu を投与し過排卵操作を行いその後交配させた。翌朝、腔栓を認めた雌マウスについて、hCG 投与48時間後に腹部を切開し、実体顕微鏡下に卵管より wash out 法および乱切によって受精卵を採取した。この時卵は2細胞期胚となっておりこれらを実験に供した。検査培養液0.5mlをプラスチック製ペトリ皿に取りミネラルオイルで覆い、この中にマウス2細胞期胚を入れ、37°C 5% CO₂大気下で培養した。24時間後実体顕微鏡下で桑実胚、胞胚に発育したものを正常発育卵と判定した。

成 績

1. ハムスターテスト

8種類の検査培養液に対するハムスターテストの成績を表2に示した。何個の卵子に侵入が見られたかを数え(精子侵入卵数)、実験に用いた卵総数に対する割合を%表示(侵入率)したものである。又、1個の卵当たりの侵入精子数を平均侵入精子数 ($\frac{\text{侵入精子数}}{\text{卵}}$) として示した。

精子の侵入率を見ると最も良好な成績であったのが mBWW 液の55%で、次いで T₆液の48%、Ham's F-10液の44%、HTF 液の43%で、他は40%以下であった。

平均精子侵入数でも mBWW 液が2.0、mEarles 液が1.1、Ham's F-10液が0.9、T₆液が0.9であった。

侵入率、平均精子侵入数からでは、ヒト体外受精用培養液と実験動物用培養液の間には明らかな差は認められなかった。

次にハムスターテストの成績の良好な順に培養液を並べ、それらの培養液に含まれる Na⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺のそれぞれのイオン濃度と Na⁺/K⁺、Ca²⁺/Mg²⁺(それぞれのイオン濃度の比)を表3に示してみた。実験培養液中の Na⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺の濃度とハムスターテストの成績との間には特に関連性を認め得なかった。Na⁺/K⁺、Ca²⁺/Mg²⁺の比についても同様で関連性はなかった。

図2 実験方法-2 マウス2細胞期胚の培養実験

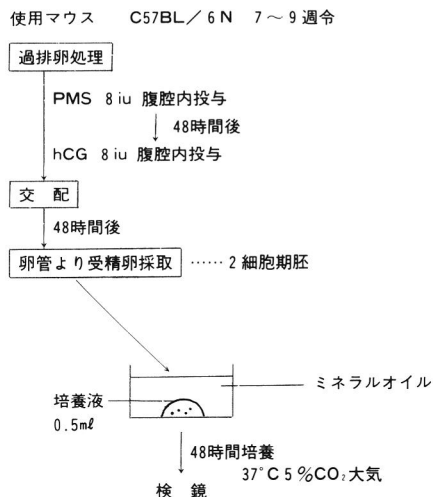
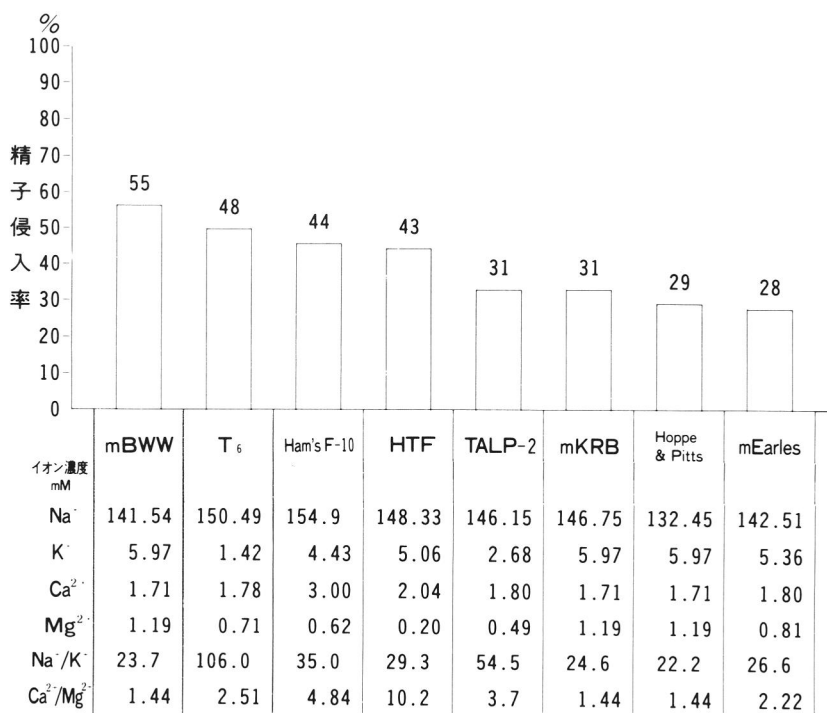


表2 ハムスターテストの成績

培 養 液	実 験 回 数	実験に用いた 卵 総 数	精子侵入卵数 (%)	侵入精子数 卵
Hoppe & Pitts	6	45	13 29%	0.6
m Earles	6	50	14 28%	1.1
Ham's F-10	9	46	20 44%	0.9
T ₆	5	48	23 48%	0.9
HTF	6	53	23 43%	0.6
m BWW	15	137	75 55%	2.0
m KRB	5	49	15 31%	0.4
TALP-2	6	49	15 31%	0.4

表3 ハムスターテスト成績と培養液内イオン濃度



2. マウス2細胞期胚培養実験

8種類の検査培養液に対する実験成績を表4に示した。正常発育卵数と変性した卵数を示すとともに、それらの実験に用いた卵総数に対する割合(%)も示した。実験結果は、最も良好な成績であったのがmBWW液で正常発育卵は97%であった。次にmKRB液の85%、Hoppe & Pitts液の82%、Ham's F-10液の79%であり、TALP-2液の35%が

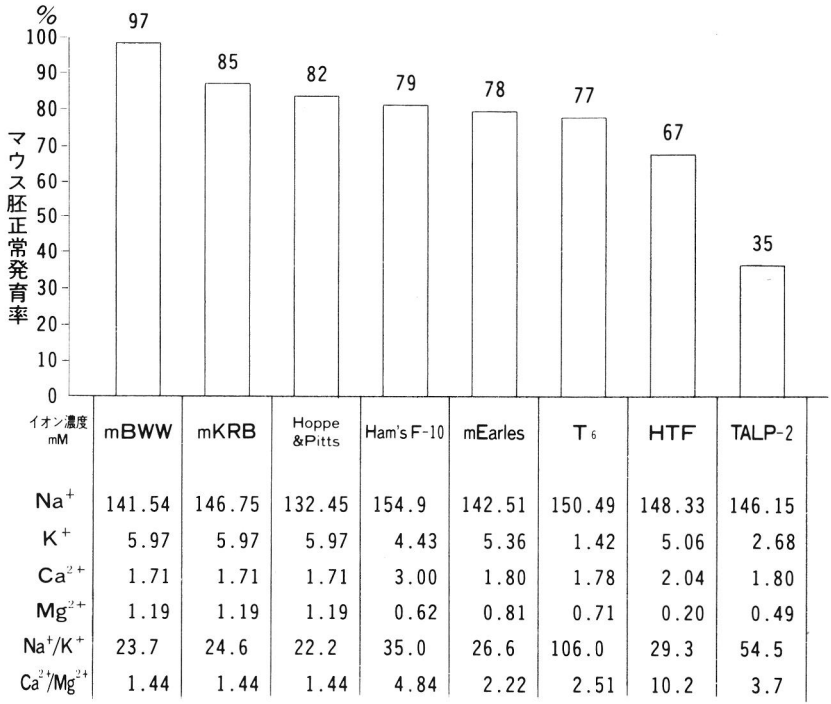
最も悪い結果であった。ヒト体外受精用培養液は実験動物用培養液に比較して安定した培養成績であった。

次にマウス2細胞期胚培養成績の良い順に培養液を並べ、それぞれの培養液中のNa⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺の濃度とNa⁺/K⁺、Ca²⁺/Mg²⁺を表5に示した。実験成績とイオン濃度の関係は、Na⁺、Ca²⁺については一定の傾向が認められなかったが、K⁺、Mg²⁺については、それぞれのイオン濃度が高い程良好な成績が得られた。Na⁺/K⁺、Ca²⁺/Mg²⁺については特に関連性はなかった。

表4 マウス2細胞期胚の培養実験成績

培 養 液	実験に用いた 卵 総 数	正常発育卵数 (%)	変 性 卵 数 (%)
Hoppe & Pitts	22	18 82%	4 18%
m Earles	32	25 78%	7 22%
Ham's F-10	29	23 79%	6 21%
T ₆	31	24 77%	7 23%
HTF	24	16 67%	8 33%
m BWW	30	29 97%	1 3%
m KRB	34	29 85%	5 15%
TALP-2	43	15 35%	28 65%

表5 マウス2細胞期胚培養成績と培養液内イオン濃度



考 察

表6 医療施設別使用培養液

現在、ヒト体外受精に用いられている培養液の種類は多い。表6には各医療施設で使用されている培養液を示してある。ほとんどの施設では受精用培養液と受精卵培養用培養液とは同一の培養液を使用している。今回われわれは、数ある培養液の中で、どの培養液がIVF-ETに適当であるかを検討して以下のような結果を得ることができた。

医 療 機 関		培 養 液	
		受 精 用	受精卵培養用
Bourn Hall	(イギリス)	Earle's	Earle's
Gothenberg	(スウェーデン)	Tyrode's	F10
Kiel	(西ドイツ)	F10	F10
Melbourne-Monash	(オーストラリア)	F10, Earle's, T 6, Hoppe & Pitts	F10, Earle's, T 6, Hoppe & Pitts
Melbourne-Royal Women's Hospital	(オーストラリア)	F10+Ca-lactate	F10+Ca-lactate
Norfolk	(アメリカ)	F10	F10
Paris-Clamart	(フランス)	B 2	B 2
Paris-Sèvres	(フランス)	B 2	B 2
Vienna	(オーストリア)	F10+lactate+K	F10+lactate+K

(星による¹¹⁾)

1. 受精用培養液

その適性をハムスターテストの侵入率で検討したが、8種類の培養液では明確な違いは得られなかった。また、Na⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺の濃度についても関連性は認められなかった。

Ca²⁺、Mg²⁺は精子の運動性維持、⁵⁾⁶⁾⁷⁾先体反応、精子-卵子の細胞膜融合に関与し、⁷⁾⁸⁾⁹⁾K⁺は精子が卵子の表面に付

着するのに関与しているといわれている。先体反応について Ca^{2+} は不可欠で、星らの検討によれば最少必要濃度は 0.4 mM であったという⁹⁾。今回実験に用いた8種類の全ての培養液は、受精に必要な各イオン濃度について必要条件を満たしているものと考えられる。

pH に関しても8種類の培養液はすべて $7.4 \sim 7.6$ であり、受精に関して問題はない。しかし、それらの培養液の中で mBWW 液は最も安定した成績を示した。この理由は種々考えられるが、精子の運動性と代謝には高浸透圧の方が適しているとされており¹⁰⁾、他の培養液の浸透圧が $275 \sim 290 \text{ mOsm}$ に対して、mBWW 液では 308 mOsm であり、このことも一因であろう。

以上の結果、受精用の培養液としては、8種類の培養液はいずれも適当であるが、中でも mBWW 液が安定しているようである。

2. 受精卵培養液用培養液

受精卵培養の適性を、IVF-ET の際の quality control としてよく用いられるマウス胚培養実験で検討した。

8種類の培養液は TALP-2 液を除いて良好な成績で、その中でも特に mBWW 液が最良の成績であった。

初期胚の発生に影響を及ぼす因子としては酸素分圧、pH、浸透圧、エネルギー源等があげられる¹⁰⁾。初期胚は高濃度酸素で傷害を受けやすく、20%以上では胚盤胞への発生率が低下し、その至適濃度は5%前後と考えられている。浸透圧に関しては卵管液の浸透圧が最適と考えられており、これは血清の浸透圧 $275 \sim 290 \text{ mOsm}$ に近いものである。pH も卵管液、血清に近い値が適しており 7.4 前後である。エネルギー源については、一般の細胞ではグルコースが最も重要なもので、8細胞期以後の胚においてもグルコースが利用されているが、それ以前の時期ではグルコースは利用されず、ピルビン酸、乳酸が重要である。本実験で使われた培養液は以上の4つの因子に関しては、必要条件を全て満たしている (表1)。

各培養液中のイオン濃度と実験

表7 ヒト卵管液における主要電解質イオン濃度 (mM)

ion	Borland et al.	Lippes et al.		David et al.	
		Pre-ovulatory	Post-ovulatory	Pre-ovulatory	Post-ovulatory
Na^+	130 ± 5	140 ± 3	139 ± 2	142.07 ± 4.40	148.63 ± 4.65
K^+	21.2 ± 0.24	9.9 ± 1.8	7.7 ± 0.9	6.72 ± 1.26	6.95 ± 0.48
Ca^{2+}	1.13 ± 0.24	1.89 ± 0.52	2.37 ± 0.27	—	—
Mg^{2+}	1.42 ± 0.26	$0.53 - 0.69$		—	—
Cl^-	132 ± 6	119 ± 4	117 ± 3	127.76 ± 19.30	112.09 ± 10.94

(R. M. Borland et al. による)

成績の関係をみると、 K^+ 、 Mg^{2+} についてイオン濃度が高い程良好な成績が得られた。ヒト卵管液の組成については、いくつかの報告があり表7にその主要電解質の組成を示したが、 Na^+ は^{11) 12) 13)} おおよそ $130 \sim 140 \text{ mM}$ 、 K^+ は $6 \sim 10 \text{ mM}$ 、 Ca^{2+} は $1 \sim 3 \text{ mM}$ 、 Mg^{2+} は $1 \sim 2 \text{ mM}$

である。今回検査した培養液を卵管液の組成と比較すると、 Na^+ 、 Ca^{2+} はほぼ同様の濃度であるが、 K^+ 、 Mg^{2+} は全体として低濃度の傾向があり、実験成績は卵管液のレベルにより近い組成を持つ培養液が良好な成績をおさめている。 K^+ 、 Mg^{2+} の初期発生にかかわる役割については、現在のところ明らかにされてはいないが、やは

りある濃度以上の存在が必要であろうと思われた。

結 語

ヒト IVF-ET に適した培養液を検討するために、ハムスターテストとマウス2細胞期胚培養実験を8種類の培養液について行った。その結果、現在実験動物用として多用されている mBWW 液が最も良い成績であり、今後ヒト IVF 用の培養液として再考する価値があると思われた。

文 献

- 1) Yanagimachi, R., et al. (1976) The use of zona-free animal ova as a test system for the assesment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Biol. Reprod. 15, 471
- 2) 星和彦, 他 (1984) ハムスター卵子を用いた精子の受精能検査, 細胞工学, 13, 595~604
- 3) 勝木元也 (1984) マウス初期胚の培養と顕微操作, 生体の科学, 35, 90~95
- 4) 星和彦 (1985) 体外受精の実際, 産婦人科治療, 50, 211~215
- 5) Heffner, L.J., et al. (1981) The role of calcium in maintaining motility in mouse spermatozoa, J.Exp. Zool, 218, 427
- 6) Mitchell, J.A., et al. (1976) Motility of spermatozoa, In Human Semen and Fertility Regulation in Men, The C.V. Mosby Co., Saint Louis p 83
- 7) 星和彦, 他 (1983) ヒト精子の先体反応と $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{Mg}^{2+}$, 臨床婦人科産科, 37, 235~240
- 8) Yanagimachi, R. (1978) Calcium requirement for sperm-egg fusion in mammals, Biol. Reprod, 19, 949
- 9) 星和彦, 他 (1982) in vitro 受精実験システムを用いて検討したヒトの受精に与える Ca^{2+} と Mg^{2+} の影響, 日本産科婦人科学会誌, 34, 1899-1906
- 10) 星和彦 (1985) 受精と環境, 産婦人科治療, 50, 38~42
- 11) R. M. Borland, et al. (1980) Elemental composition of fluid in the human Fallopian tube, J. Reprod. Fert, 58, 479~482
- 12) J. Lippes, et al. (1972) The collection and analysis of human fallopian tubal fluid, contraception, 5, 85~103
- 13) A. David, et al. (1973) Chemical composition of human oviduct fluid, Fertility and Sterility, 24, 435~439

マウス胚盤胞の着床遅延と透明帯消失との
関係について

Relationship between delayed implantation and loss
of the zona pellucida in the mouse blastocyst

辻井弘忠・伊藤伸

Hirotsada TSUJII and Shin ITOH
信州大学農学部家畜育種繁殖学教室

Department of Animal Breeding and Reproduction, Faculty of
Agriculture, University of Shinshu, Kamiina, Nagano, 399-45

Summary

Loss of the zona pellucida in the blastocyst is an essential process at the initiation of implantation, but its mechanism has not been completely clarified. It is generally known that loss of the zona pellucida is retarded during delayed implantation. In this experiment, we compared and investigated how the varied methods of delayed implantation effected the time when loss of the zona pellucida occurred.

Mature virgin female mice of ICR strain, 6-9 weeks old and 25-35 g in body weight, were kept in a light controlled room, supplied with water and a standard laboratory diet ad libitum. The mice at proestrus were caged overnight with males, and were checked for copulation plug the morning of the following day, which was set as the first day of pregnancy.

The results obtained were: (1) Loss of the zona pellucida began as early as the afternoon of the 4th day and was over by 2 o'clock of the 5th day; (2) the loss got significantly delayed in the groups of tubal ligation, recerpin, atropine sulfate, indomethacine, ovariectomy (OVX), and OVX + progesterone, the most retarded among those groups being the one that got OVX; (3) Uterine environment and ovarian hormones did not seem directly participate in loss of the zona pellucida, judged from the fact that such loss occurred even in the groups of tubal ligation and OVX; (4) loss of the zona pellucida was prompted by the application of a higher concentration of progesterone and / or of estrone treatment. It may be said that the gestagens and estrogens are indirectly responsible for the ratio of zona-free mouse blastocysts.

緒 論

卵子を囲む透明帯は、卵下降および卵子の保護に重要な働きをしており、多くの哺乳動物において、着床前に透明帯が消失することが知られている。^{1,2)} この透明帯消失は、着床の開始のために欠くことのできない過程であるが、その機構については不明な点が多い。Rumery and Blandau²⁾ は、泌乳による着床遅延マウスにおいて、透明帯消失が24~48時間遅れることを報告している。泌乳による着床遅延以外に、下垂体摘出、レセルピン、硫酸アトロピン、インドメサチン、クロムヘン等の薬物投与、³⁻⁵⁾ ⁶⁻⁹⁾ ¹⁰⁾ ¹⁰⁾ 卵巣摘出、卵巣摘出後黄体ホルモン投与、抗血清等による人為的着床遅延も知られている。下垂体除去による着床遅延によっても透明帯消失が遅れることが知られているが、他の人為的着床遅延による透明帯消失については不明である。そこで本実験では、透明帯の消失機構を解析する手始めとして、各種の人為的着床遅延誘起方法が、マウス胚盤胞の透明帯消失時間に及ぼす影響を調べた。さらに、卵巣摘出後黄体ホルモンの投与量による透明帯消失時間の違いと発情ホルモンの投与が透明帯消失時間に及ぼす影響についても検討した。

材料および方法

実験材料は当研究室で系統維持しているICR系処女マウス(生後6~9週齢、体重25-30g)である。午前点燈の12LDの人工照明下で、餌は市販の実験動物用固型飼料(クレア, CE-2)と水を自由に与えた。産褥が発情前期を示した日に雄と一晚同居させ、翌朝産褥の形成で交尾を確認し、産褥を有した日を妊娠第1日目とした。実験群は以下の11である。

- (1) 正常妊娠群
- (2) 卵管結紮群: 妊娠第1日目に卵管と子宮の間を手術用絹糸で結紮
- (3) レセルピン投与群: 妊娠第3日目の18時に1 mg/kgを投与
- (4) 硫酸アトロピン投与群: 妊娠第3日目の12時に700 mg/kgを投与
- (5) インドメサチン投与群: 妊娠第3日目の18時に0.5 mg/kgを投与
- (6) 卵巣摘出群: 妊娠第1日目に卵巣を摘出
- (7) 卵巣摘出+プロジェステロン1mg投与群: 妊娠第1日目に卵巣を摘出後、プロジェステロン1mgを連日投与
- (8) 卵巣摘出+プロジェステロン2mg投与群: 妊娠第1日目に卵巣を摘出後、プロジェステロン2mgを連日投与
- (9) 正常妊娠+エストロン投与群: 妊娠第4日目の1時にエストロン0.125 µgを投与
- (10) レセルピン+エストロン投与群: 妊娠第3日目の18時にレセルピン1 mg/kgを投与、さらに、妊娠第4日目の12時にエストロン0.125 µgを投与
- (11) 卵巣摘出+プロジェステロン+エストロン投与群: 妊娠第1日目に卵巣を摘出後、プロジェステロンを連日投与、さらに妊娠第4日目の15時にエストロン0.125 µgを投与

透明帯消失開始時から完全に消失するまで1時間毎に3～5匹(胚の数30-50)経時的に観察を行い、透明帯の有無および胚の発生状態を実体顕微鏡下で観察し、不明のものはさらに高倍率の顕微鏡を用いて確認した。採卵に用いた液はKRB (pH 7.2)で、卵管結紮群では卵管から、その他の群では子宮から胚を得た。透明帯消失胚数/採卵数の比率で表示した。

結 果

各群において、発生の遅れている胚および退行胚の透明帯消失はみられなかった。

正常妊娠群(図1)。正常妊娠群の胚盤胞の透明帯消失は、妊娠第4日目の13時(受精後約81時間)から一部の胚盤胞で始まり、妊娠5日目の2時(受精後約94時間)に全ての胚で終った。

卵管結紮群は、透明帯消失が正常妊娠群より12～39時間有意に遅れた。なお卵管結紮群において妊娠5日目15時以降は、死滅退行した胚が多く、データをとることが出来なかった。

レセルピン投与群、硫酸アトロピン投与群およびインドメサチン投与群(図2)においては、いずれの群も透明帯消失は、正常妊娠群より7～21時間有意に遅延したが、卵管結紮群および卵巣摘出群の胚盤胞の透明帯消失より早かった。

卵巣摘出群、卵巣摘出+プロジェステロン投与群(図3)。卵巣摘出群よりプロジェステロン1mg投与群が、また、1mg投与群よりも2mg投与群が、約9時間透明帯消失速度が促進されるのが観察された。

エストロゲン投与群(図4)。正常妊娠群のマウスにエストロゲン投与によって、透明帯消失が約5時間早まることが観察された。レセルピン+エストロゲン投与群は、レセルピン投与群より透明帯の消失が約

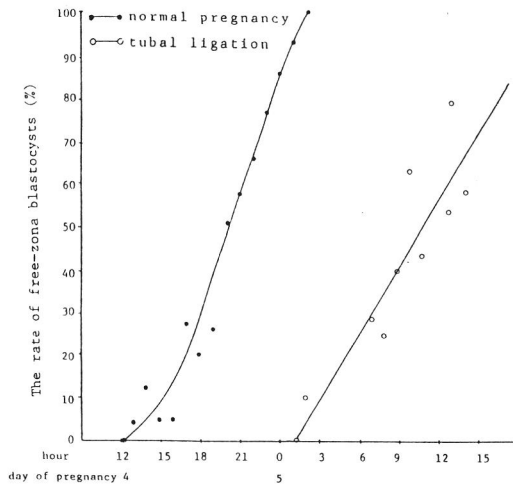


Fig. 1.

Loss of the zona pellucida in mouse blastocysts in normal pregnancy and tubal ligation groups.

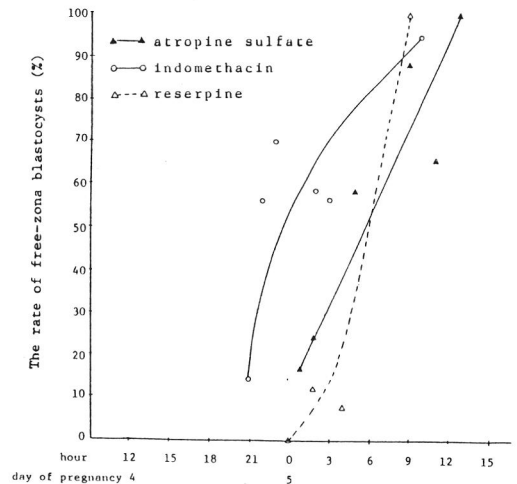


Fig. 2. Loss of the zona pellucida in mouse blastocysts reserpine, atropine sulfate and indomethacin groups.

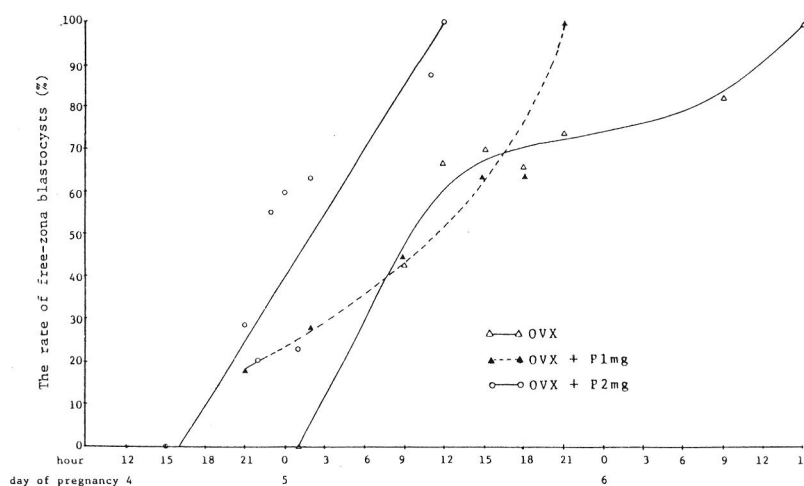


Fig. 3. Effect of progesterone on the loss of the zona pellucida in mouse blastocysts in ovariectomy groups.

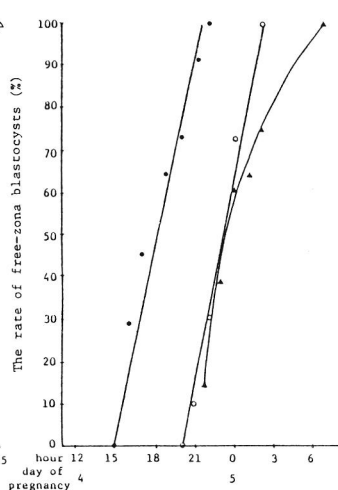


Fig. 4. Effect of estrone treatment on the loss of the zona pellucida in mouse blastocysts in normal pregnancy group (●), reserpine group (○), and OVX + F1mg group (▲).

8時間早まった。卵巣摘出+プロジェステロン+エストロン投与群も卵巣摘出+プロジェステロン投与群より約15時間透明帯消失が早まることが観察された。

プロジェステロンとエストロンの双方が透明帯消失の速度に及ぼす影響については、卵巣摘出+プロジェステロン+エストロン投与群が、卵巣摘出群より透明帯消失が約31時間早まった。また、卵巣摘出+プロジェステロン投与群のものより約14時間早まり、正常妊娠群に近づいた値を示した。

考 察

Orsini and McLaren¹⁰⁾は、マウスでは妊娠4日目の22時から透明帯の消失が一部の胚盤胞で始まり、同日の23時には半分以上の胚で消失することを報告している。また、Rumery and Blandau²⁾, McLaren¹¹⁾も類似の報告をしており、本実験の結果はこれらの報告とほぼ一致した。

Orsini and McLaren¹⁰⁾は、卵管結紮時における胚盤胞の透明帯消失は、正常妊娠のものより12時間遅れたと報告している。本実験においては、12~39時間遅れ、Orsini and McLaren¹⁰⁾の結果とほぼ同じであった。また、卵管結紮群において、回収卵に死滅胚が多数見られたことから、卵管は桑実胚期以降の発育には決して良い環境とは考え難いが、卵管内でも80%近くの胚で透明帯が消失することから子宮環境は透明帯消失には、心ずしも必須でないものと思われた。Orsini and McLaren¹⁰⁾も、卵巣摘出によって透明帯の消失が正常妊娠より遅れることを報告している。このことから透明帯消失には卵巣ホルモンが必須でないと推察された。

卵巣摘出群、卵巣摘出+プロジェステロン1mg投与群、卵巣摘出+プロジェステロン2mg投与群の順に透明帯消失が早まったことから、プロジェステロンは、透明帯消失速度に影響を及ぼすことが推察された。

正常妊娠, レセルピン投与, 卵巣摘出+プロジェステロン 1 mg 投与の3群のマウスにエストロンを1回投与すると, 3群のマウス胚とも透明帯の消失が早まること, また, 透明帯の消失時間が正常妊娠の約半分の6時間で総て消失することが観察された。このことから, 発情ホルモンは透明帯消失速度に強く影響を及ぼすことが判明した。また, 卵巣摘出+プロジェステロン 1 mg 投与より卵巣摘出+プロジェステロン 1 mg +エストロン投与の方が透明帯消失が早まり, 正常妊娠の透明帯消失に近づくことが観察された。これらのことから卵巣ホルモンの存在が, 透明帯消失速度に強く影響することがうかがえた。

着床前のエストロゲンサージは, マウスおよびラットの着床には欠かせないので, この発情ホルモンが^{12,13)} 胚盤胞の蛋白質や核酸の合成を高め, 胚盤胞腔の拡張, 子宮液中の蛋白分解酵素の活性を高め, さらに, 透明帯消失に作用し, 胚盤胞の表面構造の変化や着床に備えて子宮内膜への変化をきたしていると推察された。^{14,15) 16) 17,18) 19,20) 21) 22)}

要 約

卵管結紮, 薬物投与, 卵巣摘出および卵巣摘出後卵巣ホルモン投与による着床遅延誘起が, マウス胚盤胞の透明帯の消失時間に及ぼす影響を調べ, さらに, 発情ホルモン投与の影響についても調べた。

(1) 正常妊娠における胚盤胞の透明帯消失は, 妊娠4日目の13時から一部の胚盤胞で始まり, 妊娠5日目の2時に総ての胚盤胞で終わった。

(2) 卵管結紮群, レセルピン投与群, 硫酸アトロピン投与群, インドメサチン投与群, 卵巣摘出群, 卵巣摘出+プロジェステロン 1 mg 投与群, 卵巣摘出+プロジェステロン 2 mg 投与群においては, 透明帯消失が有意に遅れ, 特に卵巣摘出群が著しく, 正常妊娠群より12~36時間遅れた。

(3) 卵巣摘出+プロジェステロン投与群において, 透明帯の消失は 1 mg 投与より 2 mg 投与の方が早かった。

(4) 正常妊娠, レセルピン投与および卵巣摘出+プロジェステロン 1 mg 投与の各群のマウスにエストロンを投与したところ, 透明帯消失が早まった。

主要文献

- 1) DICKMAIN, Z.: Adv. Reprod. Physiol., 4, 173, 1969.
- 2) RUMERY, R.E. & R.J. BLANDAU: Loss of zona pellucida and prolonged gestation in delayed implantation in mice. In The Biology of the Blastocyst. 115, The University of Chicago Press. 1971.
- 3) COCHRANE, R.L. & R.K.MEYER: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 96, 155, 1957.
- 4) COCHRANE, R.L., M.R.N. PRASAD, & R.K.MEYER: Endocrinology, 70, 228, 1962.
- 5) SCHLOUGH, J.S., A.W. SCHUETZ, & R.K. MEYER: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 120, 458, 1965.
- 6) PRASAD, M.R.N. & S.P.KALRA: Fertil. Steril., 16, 101, 1965.
- 7) MAYER, G., J.M.MEUNIER, & J.E.ROUAULT: C.R. Acad. Sci. Paris, 247, 524. 1958.

- 8) SCHLOUGH, J.S. : Biol. Reprod., 1, 315, 1969.
- 9) KENNEDY, T.G. : Biol. Reprod., 16, 286, 1977.
- 10) ORSINI, M.W. & A. MCLAREN : J. Reprod. Fertil., 13, 485, 1967.
- 11) MCLAREN, A. : J. Reprod. Fertil., 14, 159, 1967.
- 12) PSYCHOYOS, A. : Nature, 211, 864. 1966.
- 13) HUMPHREY, K.W. : Steroids, 10, 591. 1967.
- 14) WEITLAUF, H.M. & G.S. GREENWALD : J. Reprod. Fertil., 10, 203, 1965.
- 15) TSUJII, H., S. SUGAWARA & S. TAKEUCHI : Jap. J. Zootech. Sci., 43, 659, 1972.
- 16) DASS, C.M.S., S. MOHLA & M.R.N. PRASAD : Endocrinology, 85, 528, 1969.
- 17) YASUKAWA, J.J. & R.K. MEYER : J. Reprod. Fertil., 11, 245, 1966.
- 18) TSUJII, H., Y. MURAKAMI, & M. YOSHIDA, : J. Fac. Agr. Shinshu Univ., 18, 133, 1981.
- 19) HOVERSLAND, R.C. & H.M. WEITLAUF : Biol. Reprod., 19, 908, 1978.
- 20) HOVERSLAND, R.C. & H.M. WEITLAUF : J. Reprod. Fertil., 62. 105. 1981.
- 21) HOVERSLAND, R.C. & H.M. WEITLAUF : J. Reprod. Fertil., 62. 111. 1981.
- 22) BERGSTROM, S., & O. NILSSON : J. Reprod. Fertil., 23, 339, 1970.

ラット初期胚の体外培養における浸透圧
および Na^+/K^+ 比の影響

Effect of osmotic pressure and Na^+/K^+ ratio on the
in vitro cultivation of the rat embryos.

伊藤雅夫, 橋詰良一, 種市衣里子, 丸瑠璃子

Masao ITO, Ryouichi HASIZUME, Eriko TANEICHI
and Ruriko MARU.

日本大学医学部衛生学教室

Department of Hygiene, Nihon University School of Medicine

The results of cultivation of rat embryos under various osmotic pressure are summarized as follows.

1) 2-cell embryos did not develop into blastocysts under various osmotic pressure, but only developed into 4-cell embryos.

4-cell embryos grew into morula, blastocysts under an osmotic pressure more than 190m-osmol. The maximum growth rate into blastocyst was obtained under an osmotic pressure of 190m-osmol, 47.8%.

Early 8-cell and after embryos developed very well under an osmotic pressure of less than 230m-osmol. Especially, an osmotic pressure of 190m-osmol yielded the highest growth rate, and more than 80% of embryos grew into blastocyst.

Thus the optimum osmotic pressure amounted to about 190m-osmol for in vitro cultivation of rat ova.

2) 41.9—45.6% of 4-cell embryos was grown into blastocyst at more than 6 of Na^+/K^+ ratio under an osmotic pressure of 190m-osmol. However, all ova cultured did not develop under 270m-osmol. This result may be suggested that the optimum osmotic pressure for early rat embryos is 190m-osmol, do not relate to Na^+/K^+ ratio in the medium.

3) In order to test the ability of cultured embryos to continue normal development, blastocysts grown from the 4-cell stage in vitro were transferred to recipient females. Cultured embryos under low osmotic pressure were found to have the ability of normal development.

結 言

近年の卵子研究の急速な進展は、発生工学的手法を導入した新しい研究の進展を広い分野に亘って期待させる。しかし、各種の実験に汎用されているラット^{1)~5)}ハムスター^{5)~11)}の初期胚の培養は困難であり、胚盤胞に发育させ得るのはいずれの場合も8細胞期以降とされている。これは発生工学的手法による研究の遂行に大きな制限を加えることとなり、早期の解決が望まれる。著者等は、ハムスターおよびラットの早期8細胞卵子の体外培養において、培養液の浸透圧を下げることによって、より高頻度に胚盤胞まで发育させ得ることを報告した⁵⁾⁶⁾。本実験は、KRB液を用いてラットの初期胚を培養し、低浸透圧の影響とNa、Kイオン比の関連性について検討したものであり、ラット4細胞卵子を胚盤胞に发育させるのに成功したので報告する。

材料および方法

1) 供試動物

4週令で入手した、市販のSD系ラットを3ヵ月令まで飼育して供試した。供試にさいしては膣スミアの検査により正しい性周期を示す動物を抽出した。飼育環境は、室温23~26℃、湿度50~60%、照明は6~20時までの14時間とした。

2) 受精卵の採取

培養に供した受精卵子は全て自然排卵由来のものである。発情前期のスミア像を示した動物を交配し、翌朝膣栓の有無により交尾を確認した。交尾を確認した日をday1として、day2の18時に2細胞卵子、day3の20時に4細胞卵子をそれぞれ卵管から採取した。また、day4の4時に早期8細胞卵子、day4の10時に8細胞卵子を子宮より採取した。

3) 培養液および培養条件

培養液はBiggers(1971)¹²⁾の液を基本とし、NaCl、KClの量を加減して浸透圧を150~270m-osmolに、Na⁺/K⁺比を3~24に調整した。実験に用いた培養液それぞれのNaCl、KClの量をTable 1に示す。pHは培養気相で7.2~7.6を示すように重炭酸ソーダを調整した。調整した後濾過滅菌し、あらかじめ培養気相内で平衡にさせた後、ペトリ皿(35X10mm)に分取し、その上を流動パラフィンでおおって使用した。培養条件は気相CO₂ 5%、空気95%、湿度100%、温度37℃とした。

4) 培養卵子の観察と偽妊娠雌への移植

2, 4細胞卵子は48時間培養し、卵子の状態を観察した。胚盤胞に達したものの一部を偽妊娠(day4)子宮に移植し、day20に開腹して着床の状態を観察した(一部は分娩に至らせて産子を得た)。8細胞卵子は24時間培養の後卵子の状態を観察した。

Table 1 Concentration of NaCl & KCl in various media

Osmotic pressure	Na ⁺ /K ⁺ ratio	NaCl (mmol)	KCl (mmol)
190mOsm	3	19.1	20.8
	6	28.5	11.4
	12	34.3	5.6
	24	37.6	2.3
270mOsm	3	49.1	30.8
	6	62.8	17.1
	12	71.3	8.7
	24	76.0	3.9
150mOsm	10.0	14.9	4.8
190 *	13.3	34.9	4.8
230	16.5	54.9	4.8
270 **	19.8	74.9	4.8

a real quantity *177.7±0.58mOsm
**248.3±0.58

結 果

発生段階の異なる卵子を種々の浸透圧条件で培養した結果を Table 2 および Fig. 1 に示した。2細胞卵子の培養においては、胚盤胞への発育は全く見られず、4細胞へ達した卵子が若干認められるにすぎなかった。4細胞卵子の場合、190m-osmol以上の浸透圧下で Morula 以上への発育が見られたが胚盤胞まで発育する割合は190m-osmolでの47.8%が最高であり、浸透圧がこれより高くても低くても発育率は低下している。早期8細胞卵子の培養では230m-osmol以下の浸透圧下で良好な発育を示しており、190m-osmolでは80%の卵子が胚盤胞まで発育した。しかし、その発育率のターンは4細胞卵子の場合とよく類似しており、190m-osmolが最適の浸透圧条件と言える。8細胞卵子においては、いずれの浸透圧条件においても高い割合で胚盤胞までの発育を示しており、発生ステージの進行によって浸透圧条件に対する許容域が広がることがかかる。

Table 3 に発情前期に採取した子宮液中のNa、K イオン濃度を血清と比較して示した。NaイオンとKイオンの比率は、子宮液で 2.2、血清で38.0であり、子宮液のKイオン濃度の高い事が知れる。Table 1 に示したように、NaClの量を減じて培養液の浸透圧を下げた場合のNa⁺K⁺比は低下し、190m-osmolでは13.3とな

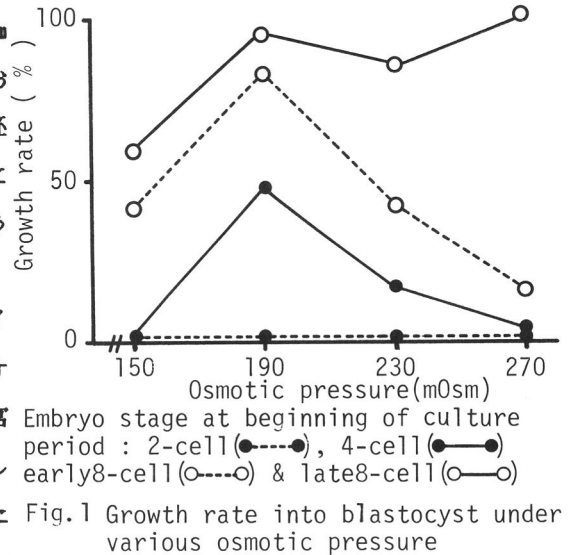


Table 2 Effects of osmotic pressure culture medium

Embryo stage at beginning	Osmotic pressure (mOsm)	No. of embryos cultured	Stage of development reached (% development)			NO. Of degenerated embryos(%)
			2—8cell	morula	blastocyst	
2 cell	150	61	41(67.2)			20(32.8)
	190	55	53(96.4)			2(3.6)
	230	55	43(78.2)			12(21.8)
	270	59	57(96.6)			2(3.4)
4 cell	150	67	50(74.6)			17(25.4)
	190	130	16(12.2)	25(18.9)	62(47.8)	27(21.1)
	230	52	16(30.8)	7(13.5)	9(17.3)	20(38.5)
	270	90	81(90.0)	1(1.1)	1(1.1)	7(7.8)
early 8 cell	150	71	7(9.9)	27(38.0)	29(40.8)	8(11.3)
	190	122		9(7.4)	101(82.8)	12(9.8)
	230	58	5(8.6)	12(20.7)	25(43.1)	16(27.6)
	270	52	27(51.9)	7(13.5)	8(15.4)	10(19.2)
late 8 cell	150	50		13(26.0)	29(58.0)	8(16.0)
	190	50		3(6.0)	47(94.0)	
	230	53		4(7.5)	45(84.9)	4(7.5)
	270	60			60(100)	

Table 3 Ionic composition of rat uterus fluid and blood serum (mEq/l)

Component	Uterus fluid	Blood serum
Na ⁺	97.5±1.84	145.4±1.08
K ⁺	44.3±1.63	4.0±0.94
Na ⁺ /K ⁺	2.2±0.12*	38.0±7.00*

*ratio

Table 4 Effects of osmotic pressure and Na⁺/K⁺ ratio culture medium

Osmotic pressure (mOsm)	Na ⁺ /K ⁺ ratio	No. of 4-cell ova cultured	NO. of blastocysts (% development)
190	3	35	0 (0)
	6	60	27 (45.0)
	12	57	26 (45.6)
	24	62	26 (41.9)
270	3	33	0 (0)
	6	53	1 (1.8)
	12	55	0 (0)
	24	52	2 (3.8)

Table 5 Development of cultured blastocysts after to pseudopregnant recipients

	Experiment group	Control group
No. of recipient females	5	5
% of pregnant females	100 %	100 %
No. of blastocyst transferred (Mean±SD)	35 (7.0±2.5)	38 (7.6±1.8)
NO. of implants (Mean±SD)	24 (4.8±2.6)	27 (5.4±2.3)
% of implants	68.6 %	71.1 %
NO. of live fetuses (Mean±SD)	15 (3.0±2.2)	18 (3.6±1.3)
Vaability	62.5 %	66.7 %

り、血清に比べてかなりの低値を示す。したがって先の結果 (Table 2、Fig.1)に見られた至適浸透圧が、Na⁺/K⁺比の適正化によって生じたものとも考えられる。そこで、浸透圧条件とNa、Kイオン比との関連性について検討し、その結果を Table 4に示した。190、270m-osmolの両浸透圧条件下においてNa⁺/K⁺比をそれぞれ、3、6、12、24とし、4細胞卵子を48時間培養した時のそれぞれの胚盤胞への発育率を示してある。胚盤胞への発育が認められたのは浸透圧190m-osmol、Na⁺/K⁺比6以上の場合であり、41.9~45.6%の卵子が胚盤胞まで発育した。しかし、270m-osmolの浸透圧ではNa⁺/K⁺比を変化させても胚盤胞への発育はほとんど見られなかった。すなわち、浸透圧の調整に伴って生じるイオン組成の変化の影響はみられず、ラット初期胚の培養における至適浸透圧がおおよそ190m-osmolであることを裏付けた。

至適浸透圧である190m-osmolの条件で4細胞期から発育した胚盤胞を偽妊娠雌に移植し、正常な発生能を有するか否かを検索した。その成績は Table 5に示す通りであり、妊娠率、着床率 (着床数/移植胚数)、生存胎児率 (生存胎児数/着床数)のいずれもが対照区との間に有意差が認められず、低浸透圧下で発育した胚盤胞が正常な発育能を持つことが確認された。また分娩させた2頭の移植母獣から移植胚の41.7%に当る5頭の正常産子を得ることが出来た。

考 察

これまでのラット卵子の培養成績をみると、8細胞期から胚盤胞への発育率は高く、いずれも80%以上の成績を示している^{1)~5)}しかし、8細胞期以前の卵子を高率に胚盤胞まで発育させた報告はなく、ラット卵子を体外で発育させ得るのは早期8細胞期が限度といえる²⁾⁴⁾⁵⁾従って、本実験の190m-osmolの浸透圧下での培養において47.8%の4細胞期を胚盤胞へ発育させ得たのは、極めて良好な成績と言える。さらに、培養によって得られた胚盤胞は偽妊娠雌への移植により、正常な胎児に発育し産子を得ている。

初期発生過程における浸透圧条件に関しては、Brinster¹³⁾¹⁴⁾によるマウス2-cell卵で276m-osmol、Whitten¹⁵⁾らによるマウス1-cell卵で242m-osmol、Nagleeら¹⁶⁾およびMaurerら¹⁷⁾によるウサギ2~4-cell卵で270m-osmol、Brackett¹⁸⁾によるウサギ体外受精卵で221m-osmolなどの報告がみられ、いずれも血清に比べて低値を示す。また、浸透圧の条件には広い範囲にわたった許容域が有るようであるが、本実験で得られたラット卵子における至適浸透圧190m-osmol (実測値は 177.7 ± 0.6) はこれらの報告に比べて際立って低く、特異的といえる。Table 4に示すように、NaClの減量に伴うNa⁺/K⁺イオン比の変化による影響は認められず、低浸透圧が、卵子の発育に好影響を与えているものと推察される。

Stambaugh¹⁹⁾らはウサギの卵管分泌液の浸透圧が302~310m-osmolであると報告しており、in vivoにおける初期発生卵が血清とほぼ同じ浸透圧条件下に存在することが考えられる。すなわち、本実験にみられる至適浸透圧は生体内の条件と著しく異っており、卵子の発育の場としてはむしろ異常な条件といえ、2細胞期卵子や体外受精卵子を胚盤胞まで発育させ得るためにはさらに多くの検討が必要であろう。また、浸透圧の影響と他の培養条件との関連性についても多くの議論があり、培養気相における酸素濃度¹⁵⁾培養液のpH⁷⁾やアルブミンなどの蛋白濃度^{14) 20)}との関連性等が指摘されている。本実験においては、浸透圧と相互作用する因子についての検討はしておらず、至適浸透圧についての結論を得るためになお慎重な実験が必要となろう。

要 約

ラットの初期胚の体外初発育に及ぼす浸透圧とNa⁺/K⁺比の影響について検討した。

1) 190m-osmolの浸透圧下での培養により、4細胞期卵子の47.8%が胚盤胞まで発育したが、2細胞期卵子の発育はみられなかった。早期8細胞期以降の卵子では80%以上が胚盤胞に発育した。胚盤胞への発育率は190m-osmolno浸透圧下で最も高く、至適浸透圧がかなり低いことが推察された。

2) 190、270m-osmolの両浸透圧条件下においてNa⁺/K⁺比をそれぞれ3~24とし、4細胞期卵子を48時間培養した時の胚盤胞への発育率を比較した。190m-osmolではイオン比6以上で41.9~45.6%の発育率を示したのに対し、270m-osmolではいずれのイオン比においてもほとんど発育を示さなかった。すなわち、浸透圧を下げるに伴って生じるイオン組成の変化が卵子の発育におよぼす影響は認められなかった。

3) 190m-osmolの条件で4細胞期から発育した胚盤胞を偽妊娠雌に移植した結果、移植胚の85.2~75.0%が着床し、その55.6~68.7%が生存胎児であった。これらの値は対照区との間に有差が認められず、培養卵子の正常性が確認された。また、分娩に至らしめた2頭から5頭の正常産子を得た。

文 献

- 1) Folstad, L., Bennett, J.P. and Dorfman, R.I. (1969) The in vitro culture of rat ova. *J.Reprod. Fert.*, 18, 145-146.
- 2) 辻井弘忠 (1986) 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. 哺乳卵研誌, 3, 1-5.
- 3) Eliot, D.S., Maurer, R.R. and Staples, R.E. (1974) Development of mammalian embryos, in vitro with increased atmospheric pressure. *Biol. Reprod.*, 11, 162-167.
- 4) Horiuchi, T., Ohta, M., Kozima, 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.Fertil.Steril.*, 28, 319-322.
- 5) 榎本晃 (1983) 哺乳動物卵子の体外培養における種特異性に関する研究. 日大医誌, 42, 173-182.
- 6) Hashizume, R., Ito, M., Douwaki, 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Carney, E.W. and Bavister, B.D. (1985) Development of hamster preimplantation embryos in vitro. *Biol. Reprod.*, 32(suppl.1), 98.
- 10) Carney, E.W. and Bavister, B.D. (1986) Increased atmospheric carbon dioxide stimulates hamster embryo development. *Biol. Reprod.*, 34(suppl.1), 199.
- 11) 石島芳郎, 小野寺政一, 加賀谷朋子 (1985) 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. 哺乳卵研誌, 2, 129-132.
- 12) Biggers, J.D., Whitten, W.K., and Whittingham, D.G. (1971) *Methods in Mammalian Embryology* (ed. by Daniel, J.C.Jr.) W.H.Freeman and Company, San Francisco, pp.87.
- 13) Brinster, R.L. (1973) Nutrition and metabolism of the ovum, zygote, and blastocyst. In *Handbook of Physiology, Section 7, Endocrinology* (ed.R.O.Greep) American Physiological Society, Baltimore, pp.165-185.
- 14) Brinster, R.L. (1965) Studies on the development of mouse embryos in vitro. I. The effect of osmolarity and hydrogen ion concentration. *J.Exp.Zool.*, 158, 49-58.
- 15) Whitten, W.K. (1970) Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro. *Advances in the Biosciences*, 6, 129-141.
- 16) Naglee, D.L., Maurer, R.R. and Foote, R.H. (1969) Effect of osmolarity on in vitro development of rabbit embryos in a chemically defined medium. *Exp.Cell Res.*, 58, 331-333.
- 17) Maurer, R.R., Onuma, H. and Foote, R.H. (1970) Viability of cultured and transferred rabbit embryos. *J.Reprod.Fert.*, 21, 417-422.
- 18) Brackett, B.G. (1969) Effects of washing the gametes on fertilization in vitro, *Fertil. Steril.*, 20, 127-142.
- 19) Stambaugh, R., Noriega, C. and Mastroianni, D.Jr. (1969) Bicarbonate ion; the corona cell dispersing factor of rabbit tubal fluid. *J.Reprod.Fert.*, 18, 51~58.
- 20) Austin, C.R. (1961) *The Mammalian Egg*. Blackwell Scientific Pub., Oxford

家兎のバルーンカテーテルによる経膣採卵法

Technique of Collection of Embryos from Uterus
through Vagina by Balloon Catheter in Rabbits

山海 直, 須山隆行, 金山喜一, 遠藤 克, 佐久間勇次

Tadashi SANKAI, Takayuki SUYAMA, Kiichi KANAYAMA, Tsyoshi ENDO
and Yuzi SAKUMA

日本大学農獣医学部獣医学科生理学教室

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

A large number of normal ova or embryos are needed in basic researches on the ovum including ET, IVF and embryo engineering. For those purposes, ova are obtained by perfusing the extirpated oviduct or uterus. The authors succeeded in collecting embryos through the vagina from the uterus in situ of a rabbit with superovulation treatment, using their original 2-way balloon catheter for the boy's bladder.

A total of 555 ova were obtained from 17 subject rabbits; cleaved ova included 391 morula and 46 early blastocyst. The best yield from a single rabbit was 65 ova including 63 cleaved ova.

This is a very efficient method for embryo collection from the rabbit as it enables us to obtain many ova from the uterus in situ and even in repetition from the same animal.

発生工学の一分野として、体外受精、胚移植、胚培養および遺伝子操作など卵子に関する研究が急速に進歩発展している。これらの研究は、家兎、マウス、ラットなどの実験動物で試みられ、初期発生の全過程を in vitro で行うことが可能となったが、まだ、多くの開発すべき研究課題が残されている。一方、家畜において、優秀なメスの子孫を増殖する方法として、胚移植は重要な改良増殖技術であり、実験動物による技術開発と共に、応用、実用化されている。しかし、これらの技術もまだ完成されたものではなく、実験動物による基礎的研究が待たれている。このような発生工学に関する研究を行うためには、家兎、マウス、ラットなど実験動物の多数の卵子あるいは胚が必要とされる。その採取方法として、一般に動物を安楽死させて摘出した卵管、子宮を灌流する方法が行われている。しかし、この方法では、胚の回収率は高いが同一個体から何回も反復して採卵することはできない。そのため、反復して卵子を回収する方法として、家兎、山羊、綿羊などで、in situ で卵管を灌流して、卵管内の卵子を回収する方法が試みられているが、満足できる成果は得られていない。

著者らは、家畜の胚移植に関する基礎研究に最も多く用いられている家兎について、in situ で子宮内の胚を回収する方法として、著者らが考案したバルーンカテーテルを用いた経膣採卵の手法によって良好な成績が得られたのでその手法を報告する。



Fig.1 バルーンと膨満した子宮角



Fig.2 カテーテルによる灌流液の回収

供試家兎は、体重 3.0kg 以上の日本在来白色種の未経産雌17例で、個別にケージに収容して、青草、固形飼料および水を不断に給与し、購入後1ヶ月以上、予備飼育したものをを用いた。

採卵に供した家兎はいずれも過排卵誘起処理したもので、FSH(デンカ製薬 k.k.) 1 AUを午前と午後の1日2回、3日間に6回、計6 AUを皮下注射し、4日目に複数の雄と交配し、その直後にhCG(帝国臓器 k.k.) 75 iu を静脈内注射した。

hCG投与後76時間目に全身麻酔後、仰臥位に保定し正中線を約4~5 cm切開して、左右の卵巢を観察し、排卵点を算定した。さらに正中線切開部から子宮角と子宮頸管を引き出して手指で保定し、外陰部から 3cc 10Fr. の男児用膀胱 2-wayバルーンカテーテルを挿入し、子宮角内へ2~3 cm挿入したのを確認し、air を送りバルーンを膨らませ、灌流液を注入した。バルーンに air を注入する時、子宮破裂あるいは灌流時に灌流液が漏出しないように子宮角の膨張の度合に注意した。灌流は、バルーンカテーテルに連結した 10cc の注射器から灌流液を注入し、子宮角が膨満したところで子宮角を指でもみながら灌流液を注射器に回収し、再び同一の灌流液でこの操作を繰り返した。この操作を左右の子宮角でそれぞれ5回ずつ、すなわち、片側の子宮に計50ccの灌流液で10回の子宮灌流を行った。灌流液は、TC-199(日水製薬k.k.)に10%NRSを添加したものをを用いた。回収した灌流液は、直ちにペトレイに移して実体顕微鏡下で鏡検し、卵子数および卵子の形態を観察した。

以上の結果、供試17例のすべての個体に過排卵が認められ、排卵数は、 51.4 ± 11.57 で合計874個で、回収卵子数は、 32.6 ± 16.77 で合計555個、分割卵子数は、 25.1 ± 17.41 で合計437個であった。その分割卵子像は、morula 391個、early blastocyst 46個であった。すなわち、卵子の回収率は、2例の100%を含み63.5%であり、受精率は78.7%であった。最も良好な個体の回収卵子数は65個で、そのうち分割卵子は63個であった。

以上のように、男児用膀胱 2-wayバルーンカテーテルを用いた経膈採卵法で、in situ で採卵したところ、供試17例の家兎から555個の卵子、437個の正常な分割卵子を回収することができた。また、著者らは本法を用いた別の実験(未発表)で同一個体から最高7回まで反復採卵を試みたところ、最も多くの卵子を回収した個体の卵子数は262個、最も多くの正常な分割卵子を回収した個体の分割卵子数は228個であった。合計17例の家兎においては、回収した卵子数2095個、分割卵子数1677個であった。このように、本法は、子宮から多数の正常な卵子を得るのに非常に優れた有効な方法であった。

文 献

- 1) 丹羽皓二(1985)。実験動物の卵子の採取法,リプロダクション実験マニュアル,飯塚理八、入谷 明、鈴木秋悦、館 郷、講談社サイエンティフィク、P.1。

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 鄰、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3巻第2号をお届けいたします。

第1巻第1号を発行して以来、年2回の発刊を目標に頑張ってきましたが、会員からの投稿原稿もふえ、一応軌道にのりつつあるものと考えております。

今号は、総説、原著10編、短報1編を掲載することができ、内容も一層の充実をはかることができたものと思います。なお、第4巻第1号には第28回研究会の講演要旨を掲載いたしますが、原著論文を数編掲載することができますので投稿をお願いいたします。

今後とも、哺乳動物卵子研究会誌の発展にご指導ご鞭撻下さいますようお願いいたします。

(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 3 巻 第 2 号

Vol. 3 No. 2

昭和61年9月25日印刷

昭和61年10月1日発行

(会 員 頒 布)

発行者 哺乳動物卵子研究会
代表 佐久間 勇 次

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

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

牛受精卵恒温灌流液回収用 自動灌流装置



子宮灌流法によって受精卵を採取するときの
灌流液の温度維持と空気圧送による注入の
自動化によって 補助者の必要なく
ひとりで操作できるとともに
灌流液が外気にさらされることなく
受精卵が寒冷感作を受けないので
省力的で 安全な回収ができます

100 VAC 50/60Hz 4A

本 体 440 × 170 × 215 mm

カ ー ト 675 × 275 × 700 mm

富士平工業株式会社

東京都文京区本郷6丁目11番6号 〒113

電話 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

ブペローゲン®

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

ピーメックス®

1,000単位

販 売 元



三 共 株 式 有 限 公 司

東京都中央区銀座2-7-12

製 造 元



三 共 ゾ ー キ 株 式 有 限 公 司

東京都中央区日本橋本町4-15

