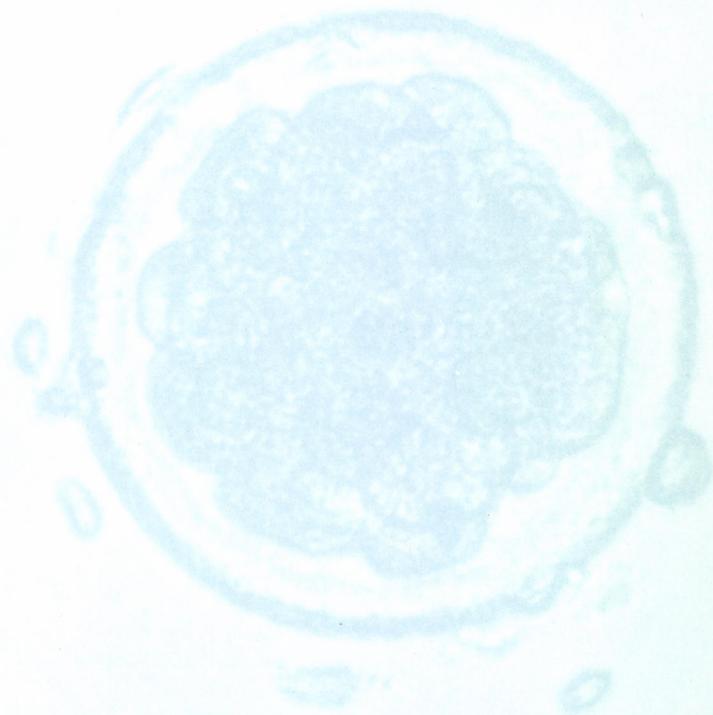


哺乳卵研誌
J. Mamm. Ova Res.

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. 4 No. 1

April 1987



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

(要指示)

牛の卵胞のう腫、排卵障害、
卵巣静止の治療、排卵促進に

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

牛の繁殖障害の
分野に新しい可能性！



母乳に多い

感染防御因子

ラクトフェリン新配合



また一歩、母乳に近づきました

ラクトフェリンは、赤ちゃんを
病気から守る感染防御物質
です。

森永BFLドライミルクは
赤ちゃんのおなかに大切な
ビフィズス菌を増やすラクチ
ロース、赤ちゃんの脳や神経
の発育に大切なタウリンも配
合しました。

新製法で、さらに
溶けやすくなりました



母乳に多いラクトフェリン新配合で赤ちゃんすこやか

森永 BFL ドライミルク



森永乳業

哺乳動物卵子研究会誌

第4巻 第1号

昭和62年4月

目次

原著

- 家兎およびマウス胚の非凍結低温保存についての検討
山海 直、佐原弘益、金山喜一、遠藤 克、佐久間勇次 1
- 仔雌牛の卵胞卵を用いた体外受精(英文)
辻井弘忠、山本静二、小嶋健司 9

短報

- マウス胚の初期発生に対する Actinomycin D(Act-D) 及びタンパク合成
阻害剤の影響
松井素子、佐藤嘉兵 16

第28回哺乳動物卵子研究会講演要旨集

特別講演

- I V F - E R の展望
鈴木雅洲 18

一般講演

- ハムスターにおける体外培養卵巣の排卵機序について
渡辺靖浩、金山喜一、遠藤 克、佐久間勇次 19
- 受精卵分割における細胞質の意義の検討
—二次元電気泳動法を用いて—
小松節子、鈴木秋悦、北井啓勝、遠藤芳広、大庭三紀子、
伊藤武夫、依田和彦、深沢俊夫、飯塚理八 21
- マウス2細胞期における細胞質変化の必要性
鈴木 治、森 誠、河本 馨、正田陽一 23
- 牛受精卵の電顕的観察—I
続木靖浩、藤原 昇、毛利孝之、古賀 脩 25

マウス受精卵子の発生に対する Insulin および Hydrocortisone の効果 高木優二、亀山賢次、菅原七郎、正木淳二	27
マウス初期胚のミコフェノール酸感受性とキサンチンによる回復 星 雅樹、水野敦子、結城 惇	29
ラット初期胚の低浸透圧下での発育におよぼす諸要因の影響 伊藤雅夫、橋詰良一、種市衣里子、丸 瑠璃子	31
マウス 2 細胞期卵から分離した割球の培養後の移植成績 中村克彦、亀山祐一、石島芳郎	33
キメララットに関する研究 : 6-PGD-i による 2 系統間のキメラとその繁殖性 橋本伸二、菅原七郎、正木淳二	35
簡単な組成の生理的塩類溶液での前培養によるヤギ精子の先体反応誘起 楠 比呂志、加藤征史郎、刈田 淳	37
卵の姉妹染色分体交換に対する EDTA の影響 齊藤英和、佐藤文彦、平山寿雄、斉藤隆和、荒木慶彦、 楊 美貴、広井正彦	39
マウスおよびチャイニーズ・ハムスター胚盤胞の染色体分析による性判別法の検討 堀内俊孝、大久範幸、石川勇志、高田直和、沼辺 孝、 島田昌幸、美甘和哉	41
核型分析によるヤギ X, Y 精子の判別 阪上守人、楠 比呂志、加藤征史郎、刈田 淳	43
蛋白質無添加培地におけるマウス卵子の体外受精 後藤和文、上野康公、中西喜彦、小川清彦	45
カフェイン添加培地におけるマウス体外受精卵の補足・過剰精子の出現率 吉沢 緑、野沢えみ子、仲本智之、村松 隆	47
凍結融解マウス卵子の体外受精およびその後の発生 平泉真吾、東 貞宏、内藤邦彦、福田芳詔、豊田 裕	49
マウスプロラクチンのマウス体外受精および胚発生に及ぼす影響 福田愛作、野田洋一、森 崇英、森 千里、橋本尚詞、星野一正	51

細胞培養用汎用培地GITによるマウスおよびウサギ胚の培養・凍結 および移植試験	小野寺政一、塩田ゆみ、河野友宏、角田幸生	53
体外受精に由来する透明帯除去マウス胚の培養および移植成績について	鈴木宏志、富樫 守、宮井達也、岡本道生	55
豚卵胞卵子の体外受精	菅原七郎、亀山賢次、橋本伸二、高木優二、半沢康弘 佐々田比呂志、正木淳二	57
豚体外成熟卵の雄性前核形成能に及ぼす豚卵胞液の効果	内藤邦彦、浜野晴三、金田光稔、石坂 篤、鈴木 真、 福田芳詔、豊田 裕	59
豚凍結精子による卵胞卵の体外受精	永井 卓、榊田博司、岩崎説雄、福島護之、花田 章	61
卵丘細胞層によって区分した牛未成熟卵胞卵子の体外受精後の発生能	塩谷康生、桑山正成、福島護之、岩崎説雄、花田 章	63
体外受精由来ウシ2細胞期胚の染色体分析	岩崎説雄、塩谷康生、桑山正成、福島護之、花田 章、 中原達夫	65
体外受精卵卵管内移植の試み	小林善宗、本田育子、淡路英雄、松山毅彦、宮川和子 井上正人、藤井明和	67
ブタ・ヒト透明帯共通抗原である低分子蛋白質のモノクローナル 抗体3A4による分析	長谷川昭子、繁田 実、香山浩二、磯島晋三	69
ヒト精子の運動形態に関する研究 — hyperactivation との関連性から —	柳田 薫、会田都美子、吉松宣弘、渡辺清彦、菅野 薫、 星 和彦、佐藤 章	71

Journal of Mammalian Ova Research

Vol. 4 No. 1

April 1987

Contents

Originals

- Unfrozen low-temperature preservation of rabbit and mouse embryos.
SANKAI, T., H. SAHARA, K. KANAYAMA, T. ENDO & Y. SAKUMA 1
- Gonadotropin induced superovulation in the calf and in vitro fertilization.
TSUJII, H., S. YAMAMOTO & K. KOJIMA 9

Brief note

- Effects of Actinomycin D and protein synthesis inhibitors on early development of mouse embryos
MATSUI, M. & K. SATO 16

Proceeding of the 28th Annual Meeting of Japan Society for Mammalian ova Research

Special report

- The future of IVF-ER SUZUKI, M. 18

General reports

- Studies on ovulation in the explanted hamster ovary
WATANABE, Y., K. KANAYAMA, T. ENDO & Y. SAKUMA 19
- Roles of cytoplasm for fertilized ova cleavage, — by the use of two-dimensional electrophoresis.
KOMATSU, S., S. SUZUKI, H. KITAI, Y. ENDO, M. OBA, T. ITO, K. YODA, T. FUKASAWA & R. IIZUKA 21
- Necessity of cytoplasmic change in mouse 2-cell embryos.
SUZUKI, O., M. MORI, K. KOHMOTO & Y. SHODA 23
- Electron microscopic observation of bovine embryos - I.
TSUZUKI, Y., N. FUJIIHARA, T. MOHRI & O. KOGA 25
- Effect of insulin and hydrocortisone on the development of mouse embryos in vitro.
TAKAGI, Y., K. KAMEYAMA, S. SUGAWARA & J. MASAKI 27

Effects of mycophenolic acid and xanthine on development of preimplantation mouse embryos.	
HOSHI, M., A. MIZUNO & A. YUKI	29
Effects of some factors on early development under low osmotic pressure in the rat embryo.	
ITO, M., R. HASHIZUME, E. TANEICHI & R. MARU	31
Transfer of embryos following culture in the blastomere isolated from 2-cell eggs of mice.	
NAKAMURA, K., Y. KAMEYAMA & Y. ISHIJIMA	33
Studies on chimeric rats : chimeras between 2 strain marked with 6-PGD-i and their reproductive ability.	
HASHIMOTO, S., S. SUGAWARA & J. MASAKI	35
Induction of the acrosome reaction in goat spermatozoa by preincubation in a simple physiological salt solution.	
KUSUNOKI, H., S. KATO & S. KANDA	37
Effects of EDTA on sister chromatid exchange in ova.	
SAITO, H., F. SATO, T. HIRAYAMA, T. SAITO, Y. ARAKI, M. YOH & M. HIROI	39
Sexing of mouse and chinese hamster embryos by chromosomal analysis.	
HORIUCHI, T., N. OHISA, Y. ISHIKAWA, N. TAKADA, T. NUMABE, M. SHIMADA & K. MIKAMO	41
Identification of goat X- and Y-bearing spermatozoa by karyotype analysis.	
SAKAUE, M., H. KUSUNOKI, S. KATO & S. KANDA	43
In vitro fertilization of mouse ova in protein-free medium.	
GOTO, K., Y. UENO, Y. NAKANISHI & K. OGAWA	45
The incidence of supplementary and supernumerary spermatozoa in the mouse eggs fertilized in caffeine-containing medium.	
YOSHIZAWA, M., E. NOZAWA, S. NAKAMOTO & T. MURAMATU	47
In vitro fertilization and development of frozen-thawed mouse oocytes.	
HIRAIZUMI, S., S. AZUMA, K. NAITO, Y. FUKUDA & Y. TOYODA	49
The analysis of the effects of prolactin on in vitro fertilization and embryo development for the mouse.	
FUKUDA, A., Y. NODA, T. MORI, C. MORI, H. HASHIMOTO & K. HOSHINO	51

Culture and freezing of the mouse and rabbit embryos using GIT. ONODERA, M., Y. SHIODA, T. KONO & Y. TSUNODA	53
Viability of zona-free mouse embryos derived from eggs fertilized in vitro. SUZUKI, H., M. TOGASHI, T. MIYAI & M. T. OKAMOTO	55
In vitro fertilization of porcine follicular oocytes. SUGAWARA, S., K. KAMEYAMA, S. HASHIMOTO, Y. TAKAGI, Y. HANZAWA, H. SASADA & J. MASAKI	57
The effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in pig oocytes matured in vitro. NAITO, K., S. HAMANO, M. KANEDA, A. ISHIZAKA, M. SUZUKI, Y. FUKUDA & Y. TOYODA	59
In vitro fertilization of pig follicular oocytes by frozen boar spermatozoa. NAGAI, T., H. MASUDA, S. IWASAKI, M. FUKUSHIMA & A. HANADA	61
In vitro fertilization and cleavage abilities of bovine oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. SHIODA, Y., M. KUWAYAMA, M. FUKUSHIMA, S. IWASAKI & A. HANADA	63
Chromosomal analysis of bovine 2-cell embryos fertilized in vitro. IWASAKI, S., Y. SHIOYA, M. KUWAYAMA, M. FUKUSHIMA, A. HANADA & T. NAKAHARA	65
Experience with in vitro fertilization-embryo tubal replacement (IVF-ETR). KOBAYASHI, Y., I. HONDA, H. AWAJI, T. MATSUYAMA, K. MIYAGAWA, M. INOUE & A. FUJII	67
Characterization of the low molecular protein obtained from porcine zona pellucida by using monoclonal antibody (3A4) which reacts exclusively to pig and human zona pellucidae. HASEGAWA, A., M. SHIGETA, K. KOYAMA & S. ISOJIMA	69
Movement characteristics of human spermatozoa. - relation to hyperactivation - YANAGIDA, K., T. AITA, N. YOSHIMATU, K. WATANABE, K. KONNO, K. HOSHI & A. SATO	71

家兎およびマウス胚の非凍結低温保存
についての検討

Unfrozen Low-Temperature preservation of
Rabbit and Mouse Embryos

山海 直、佐原弘益、金山喜一、遠藤 克、佐久間勇次

Tadashi SANKAI, Hiroeki SAHARA, Kiichi KANAYAMA, Tuyoshi 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

Abstract

At present embryos are frozen for long-term preservation. But this method is not easy to carry out because of the complexity of the equipment and procedure required and the many problems yet to be solved.

The authors studied the possibility of unfrozen low-temperature preservation of embryos for a short period by keeping them at 5-8°C.

As a result, it was found that embryos at the 8-16 cell stage were well preserved in serum-added geratine solution. The optimal serum concentration was 33.3%, and the addition of gelatine had a favorable effect. When rabbit embryos at the morula stage were preserved in rabbit oviducts, they survived up to 7 days in nearly all the cases, while mouse embryos preserved in rabbit oviducts were not viable. When rabbit embryos were preserved in blood vessels, viable embryos were obtained up to 5 days from more than half the cases. These embryos were transferred, and they were proved normal embryos because they yield young.

The above-mentioned findings indicated that this method could be put to practical use with detailed studies of the oval stage, medium, and environment optimal for embryo preservation.

緒 言

家畜の改良増殖を目的とした胚移植技術が広く応用されるようになり、獣医畜産領域に大きく貢献するようになってきた。胚移植は、移植に用いる胚の発育程度とrecipientの同期化が必須の条件である。また、過排卵処置によって一度に多数の胚を採取することができるようになったことから、多数のrecipientに同時に移植することができる反面、同期化した多数のrecipientを準備することが必要であり、時間的および操作面でかなりの制約が生じる。そのため、採取した胚を採取時

の發育段階のまま保存し、必要に応じて移植に供することを目的とした胚の短期および長期の保存に関して種々の検討がなされている。Chang¹⁾は、血清を保存液とした家兎胚の低温保存で6日間の保存に成功し、また、Hafez²⁾は血清にゼラチンを添加することにより6日間の保存で31%の生存を報告している。その後、菅原、竹内³⁾、Whittingham、Wales⁴⁾、Anderson、Foote⁵⁻⁷⁾、Trounsonら⁸⁾によって低温における短期間の保存成果が報告されている。Hughes、Anderson⁹⁾は、PBSを用いて、胚を7日間保存し、その生存率は76%、10日間では15%であり、これまでの報告の中で最も良い保存成績を報告している。また、小林ら¹⁰⁾は、牛胚をPBSで輸送用簡易保温器に保存し、採取後2~9時間、長距離を自動車輸送したのち移植しているが、146個の胚を117例の recipient に移植し、73例の妊娠を確認している。保存時間は短かったものの、この簡易保存法は実用面への応用方法として十分に満足できるものであったと報告している。

現在、胚の保存に関する研究は、その殆どが長期間の保存を目的とした凍結保存を中心に進められており、多くの研究者により、耐凍剤および冷却、解凍速度などについて詳細な検討がなされている。ウサギ、マウスなどの実験動物では凍結保存胚を移植してもその成功率は高いが、ウシでは産子が得られるようになったものの、その成功率はまだ低い。胚を凍結保存するためには、高額な凍結設備と複雑な操作が必要であり、しかもウシでは胚の生存性および移植成績などから実用技術としてまだ安定した保存方法とは言えない状況にある。recipientの発情同期化方法はすでに確立されており、また、ウシの性周期は21日と短いことなどを考慮すると、ウシの胚移植の実用化には必ずしも、胚の長期間の凍結保存の必要性は少なく、簡便な非凍結の低温保存方法による2~3週間の保存方法を確立することも必要である。

そこで著者らは、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギなど産業家畜における胚移植への応用を目的として、家兎およびマウスの胚を用いて非凍結低温保存方法について検討を試みた。

材料および方法

1) 供試動物

供試家兎は、日本在来白色種の未經産雌で、個別にケージに収容し、青草、固形飼料および水を不断に給与した。購入後1ヶ月以上の予備飼育を行い、体重が2.1~3.0 kgのものを供試した。供試マウスは、8~10週齢のddY系の未經産雌で、ケージに収容し、固形飼料および水を不断に給与した。照明は、人工照明で午前5時から午後7時までの14時間とした。

2) 供試卵子の採取

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、過排卵誘起方法は、FSH(デンカ製薬K.K.)は1 AUを午前と午後の1日2回、3日間に計6 AUを皮下投与し、または、PMSG(帝国臓器K.K.)50iuを静脈内単一投与した。FSHを投与した場合は最終投与から24時間後に、また、PMSGを投与した場合は投与72時間後に複数の雄と交配し、その直後にhCG(帝国臓器K.K.)75iuを静脈内注射して排卵を誘起した。

供試した2~4、8~16cell stageの卵子は、それぞれ交配後30、45時間目に卵管を灌流し、また、morula stageの卵子は交配後75時間目に子宮を灌流して採取した。灌流液は、TCM199(日水製薬K.K.)に10%非働化家兎血清を添加したものをを用いた。また、マウスは、性周期を考慮せずにPMSG5iuを皮下投与し、48時間後にhCG5iuを皮下投与したのち雄マウスと同居させ、翌朝、膣栓を認めたものを供試した。morula stageの卵子は、hCG投与後80時間目に卵管および子宮を

M₂ mediumで灌流して採取した。

3) 培地の調整

生理的食塩水を溶媒とした7%ゼラチン溶液を高圧蒸気滅菌し、ゼラチン溶液として室温で保存した。実験に際し、この溶液に生理的食塩水、非働化家兎血清を添加したものを低温保存液とした。なお、保存液は、ろ過滅菌後、それぞれ3 mlをプラスチックシャーレに入れ供試胚を保存した。

4) 培地下での非凍結低温保存

7%ゼラチン溶液、生理的食塩水および家兎非働化血清をそれぞれ等量添加したものを保存液として、2~4、8~16cell、morula stageのものについて、1~10日間の低温保存を試みた。また、保存液の血清濃度を100.0、66.6、50.0、33.3、25.0および20%に調整し、morula stageの卵子についてそれぞれ4日間の低温保存を試み、それらの生存性を比較検討した。さらに、自家家兎非働化血清のみを保存液とし、2~4、8~16cellおよびmorula stageの卵子を1~7日間低温保存しゼラチン溶液と比較検討した。保存は、5~8℃に調整した冷蔵庫内に卵子を入れたシャーレを静置して行った。その後、保存卵子は30%非働化家兎血清および抗生物質を添加したTCM199で2回洗浄し、37℃、5%CO₂下で培養し、blastocyst stageへの発生をもって低温保存後の生存胚と判定した。

5) 卵管、子宮および血管における非凍結低温保存

家兎胚、マウス胚の摘出した家兎卵管内での低温保存およびマウス胚の摘出したマウス卵管、子宮内低温保存、また、家兎胚の血管内低温保存を試みた。家兎胚の家兎卵管内保存は、2~4、8~16cell stageの卵子はそれぞれ交配後30、45時間目に卵管を結紮して摘出したものを用い、自家非働化血清中で保存した。morula stageの場合は、摘出子宮を灌流して採取し自家非働化血清とともに自家卵管内に注入して同様に保存した。マウス胚の家兎卵管内保存は、採取したmorula stageの卵子を過排卵誘起処置の後75時間目に摘出した家兎卵管内に、卵管供試家兎の非働化血清とともに注入し同様に保存した。マウス胚のマウス卵管、子宮内での低温保存は、妊娠3日目あるいは4日目の午前中に卵管、子宮を摘出し、それぞれ8~16cell、morula stageの卵子を含んだまま非働化血清中で保存した。家兎胚の血管内低温保存では、morula stageを摘出した後大静脈内に自家非働化血清とともに注入し結紮して保存した。その後、家兎胚は30%非働化家兎血清を添加したTCM199で、マウス胚はM₂ mediumで培養し、その生存性について4)と同様に培養して判定した。なお、家兎のmorula stageを卵管内に7日間保存した10個の胚を、同期化した家兎の子宮へ移植してその生存性を検討した。

結 果

7%ゼラチン溶液、生理的食塩水および家兎非働化血清をそれぞれ等量添加した保存液は、2~4 cell stage群で4日間まで生存胚を認めることができたが全般的に低率であった。8~16cell stage群では3日間まで全例に生存胚が認められ、4日目以降生存率は急激に低下したが、10日間まで生存胚を確認することができた。morula stage群では、8~16cell stage群に比べて低率であったが、1、2日間の保存では95.0、89.5%と高い生存率を示した(Table 1)。ゼラチン保存液における血清濃度を検討した結果では、血清比33.3%において4日間保存した胚の生存率は60.0%で最も優れていた(Table 2)。自家非働化家兎血清のみを保存液とした場合、8~16cell、morula stageで1日間保存で100%の生存率を示したが、その後の生存率においていずれもゼラチン溶液群

に比べて低い成績であった (Table 3)。

家兎胚を自家卵管内で保存した成績は、2~4、8~16cell stageでは良好な成績は得られなかったが、morula stageで7日間保存まで、ほぼ全例に生存を確認することができ、その後、保存期間の延長とともに胚の生存率は低下していったが、最長12日間の保存まで生存胚を認めた (Table 4)。また、マウス胚を家兎卵管内で保存した成績は、1日保存で33.3%の生存胚を得たにすぎず、2日以上で生存胚は認められなかった (Table 5)。マウス胚のマウス卵管および子宮内での低温保存では、1日保存で、8~16cell、morula stageがそれぞれ21.4、100%の生存率であったが、2日間以降では生存胚は得られなかった (Table 6)。家兎胚の血管内低温保存では、1日保存では100%の生存率であり、5日間まで半数以上の生存が認められ、7日間保存でも31.2%と良好な成績であった (Table 7)。また、家兎卵管内に7日間保存したmorula stage10個を同期化した家兎の子宮に移植して、6例の正常な産仔を得ることができた (Table 8)。

Table 1 Survival of rabbit embryos in gelatine storage medium

Cell stage at storage		Storage time (days)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2-4	No. of embryos examined	10	10	10	11	12		12	12		10
	developed to blastocyst	2	1	3	2	0		0	0		0
	%	20.0	10.0	30.0	18.2	0		0	0		0
8-16	No. of embryos examined		20	36	33	17	25	20	20	20	20
	developed to blastocyst		20	36	16	10	12	7	8	1	4
	%		100	100	48.5	58.5	48.0	35.0	40.0	5.0	20.0
Morula	No. of embryos examined	20	19	20	25	21	20	20	17	13	14
	developed to blastocyst	19	17	12	16	7	0	1	0	0	0
	%	95.0	89.5	60.0	64.0	33.3	0	8.3	0	0	0

Table 2 Survival of rabbit embryos on gelatine storage medium in various serum concentration

Cell stage at storage		gelatine medium : rabbit serum					
		0:1	1:1	1:2	2:1	3:1	4:1
Morula	No. of embryos examined	24	15	13	25	11	10
	developed to blastocyst	8	4	1	16	2	2
	%	33.3	27.0	7.7	60.0	18.1	20.0

Table 3 Survival of rabbit embryos on serum storage medium

Cell stage at storage		Storage time (days)						
		1	2	3	4	5	6	7
2-4	No. of embryos examined	9	10	12		12		
	developed to blastocyst	6	0	0		0		
	%	66.7	0	0		0		
8-16	No. of embryos examined	10	10	10	9	8		
	developed to blastocyst	10	3	3	0	0		
	%	100	30.0	30.0	0	0		
Morula	No. of embryos examined	20	20	30	24	20	10	10
	developed to blastocyst	20	16	15	8	1	0	0
	%	100	80.0	50.0	33.3	5.0	0	0

Table 4 Survival of rabbit embryos in rabbit oviduct

Cell stage at storage		Storage time (days)													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2-4	No. of embryos examined	28		17											
	developed to blastocyst	0		0											
	%	0		0											
8-16	No. of embryos examined	13	12	19	5	5									
	developed to blastocyst	11	0	0	0	0									
	%	84.1	0	0	0	0									
Morula	No. of embryos examined	8	10	27	13	12	22	10	18	12	16	10	14		17
	developed to blastocyst	8	10	26	13	12	22	10	13	6	8	3	1		0
	%	100	100	96.3	100	100	100	100	72.4	50.0	50.0	30.0	7.1		0

Table 5 Survival of mouse embryos in rabbit oviduct

Cell stage at storage		Storage time (days)				
		1	2	3	4	5
Morula	No. of embryos examined	9	10	10	11	9
	developed to blastocyst	3	0	0	0	0
	%	33.3	0	0	0	0

Table 6 Survival of mouse embryos in mouse oviduct and uterus

Cell stage at storage		Storage time (days)				
		1	2	3	4	5
8-16	No. of embryos examined	14		5		
	developed to blastocyst	3		0		
	%	21.4		0		
Morula	No. of embryos examined	11	10	11		13
	developed to blastocyst	11	0	0		0
	%	100	0	0		0

Table 7 Survival of rabbit embryos in rabbit vena cava caudalis

Cell stage at storage		Storage time (days)						
		1	2	3	4	5	6	7
Morula	No. of embryos examined	9	14	8	14	15		16
	developed to blastocyst	9	7	6	8	9		5
	%	100	50.0	75.0	57.1	60.0		31.2

Table 8 Result of embryos transfer

No. of Anim.	No. of embryos transferred	Cell stage of embryos transferred	Litter size
1	10	Morula	6

考 察

ゼラチン溶液による胚の低温保存は、1961年にHafez²⁾が行った実験を参考に試みたが、Hafezは、保存後の生存性を胚移植によって確認しており、recipientの状態、移植技術などの要因が関与するため、胚の生存性を正確に評価することは困難である。著者らは、体外培養によって胚の生存性を判定し、一部の胚を移植することによってその正常性を確認した。このように、生存胚の判定方法は異なるが、本実験は、Hafezの報告と同様に胚のstageによってその生存率に大きな差が認められた。Anderson、Foote⁵⁻⁷⁾は一連の低温保存で、24時間程度の低温曝露において保存後の胚に発育の停止がおこる可能性が示唆されたと報告している。本実験では、保存後の2~4 cell stageの卵子を体外培養する過程において、morula stageまで発生するがその後blastocystに発生しない胚が多く認められ、低温曝露していない胚との間に発生の差が認められたこと、また、Anderson、Footeの実験と保存液が異なることから、保存中の胚の代謝に差が生じ、低温曝露が胚の発生に悪影響を及ぼしたものと考えられる。ゼラチンおよび血清の添加に関しては、ゼラチン溶液中の血清濃度は33.3%が最適環境であることが明らかであり、ゼラチン無添加培地での保存と比較することにより、ゼラチン添加の必要性が示唆された。Hughes、Anderson⁹⁾は、PBSにlactate、ピルビン酸、血清などを添加した保存液で高率な生存性が認められたと報告し、Anderson、FooteはPromine Dの添加が胚の生存性の向上に有効だと報告している。このように、10℃前後の低温下の保存にはこれらの物質が胚の基礎代謝に何らかの影響を及ぼしているものと考えられる。

家兎胚の卵管内低温保存では、morula stageで7日間までほぼ全例に生存胚が認められ、また、12日間まで生存を確認することができた。さらに、7日間の保存胚を移植することにより正常な産仔を得ており、この成績は低温保存で良好な生存性を示したHughes、Andersonの成績を上回る結果であった。この要因として、家兎では交配後約3日まで卵管分泌液が盛んに分泌されており、今回はこの時期の卵管を供試したことによるものと考えられる。卵管分泌液の成分としては数多くの物質が知られているが、胚の生存に重要なものとしては、ピルビン酸、グルコース、遊離アミノ酸などが考えられる¹¹⁻¹³⁾。今回のmorula stageの卵管内保存の良好な成績は、多くの研究者によって試みられた物質を添加した培地での成績より保存性に優れており、卵管分泌液中に保存に最も適した物質が含まれているものと考えられる。しかし、同一条件下における、2~4および8~16 cell stageの胚の卵管内保存では良好な成績は得られなかった。このように、卵管内保存は、morula stage胚の低温保存に適した方法といえるが、供試胚の発生stageと排卵後の卵管の経過時間と密接な関連性をもっていることを示したものと考えられる。

家兎卵管内におけるマウスmorula stageの保存では、2日間以降で生存胚を得ることができなかった。近年、受精、卵子培養などを目的として家兎卵管内に異種動物の卵子を移植し回収する手法が試みられるようになり^{14,15)}、部分的な成功を収めていることを考えると、本研究においても、胚と卵管との実験条件等を十分に検討することによって、より有効な卵管内保存が明らかにされるものと思われる。

以上のように、低温環境下で胚を保存することによって、胚の生存性を保つことが可能であったが、保存胚のstage、保存環境および保存液が大きく関与しており、最も良好な保存成績は家兎卵管を用いて家兎のmorula stage胚が最長12日間の低温保存が可能であることが示された。このこと

は、産業家畜、特にウシの胚移植における胚の短期間保存に、と場で採取できる同種卵管を利用して低温保存を有効に応用できる可能性が示唆された。

文 献

- 1) Chang, M. C.(1947). Normal development of fertilized rabbit ova stored at low temperature for several days. *Nature*, 159, 602-603.
- 2) Hafez, E. S. E.(1961). Storage of rabbit ova in gelled media at 10°C. *J. Reprod. Fertil.*, 2, 163-178.
- 3) 菅原七郎、竹内三郎(1962).低温保存したラット卵子の呼吸能について、*家畜繁殖誌*、8, 65-68.
- 4) Whittingham, D. G. and Wales, R. G.(1969). Storage of two-cell mouse embryos in vitro. *Aust. J. biol. Sci.*, 22, 1065-1068.
- 5) Anderson, G. B. and Foote, R. H.(1974). Effects of low temperature storage upon subsequent energy metabolism of rabbit embryos. *Exptl. Cell Res.*, 87, 302-306.
- 6) Anderson, G. B. and Foote, R. H.(1975). Effects of low temperature upon subsequent nucleic acid and protein synthesis of rabbit embryos. *Exptl. Cell Res.*, 90, 73-78.
- 7) Anderson, G. B. and Foote, R. H.(1975). Development of rabbit embryos after storage at 10°C. *J. Anim. Sci.*, 40, 900-904.
- 8) Trounson, A. O., Willadsen, S. M., Rowson, L. E. A. and Newcomb, R.(1976). The storage of cow eggs at room temperature and at low temperatures. *J. Reprod. Fert.*, 46, 173-178.
- 9) Hughes, M. A and Anderson, G. B. (1982). Short-term storage of rabbit embryos at 4°C. *Theriogenology*, 18, 275-282.
- 10) 小林軍次郎、石島芳郎、金山喜一、山田均、高橋敬一、佐久間勇次(1980).保存・輸送をともなった牛胚の移植に関する二、三の知見、*東獣畜誌*、28, 19-22.
- 11) Iritani, A., Gomes, W. R. and VanDemark, N. L.(1969). Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in ewes. *Biol. Reprod.*, 1, 72-76.
- 12) Iritani, A., Nishikawa, Y., Gomes, W. R. and VanDemark, N. L.(1971). Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in rabbits. *J. Anim. Sci.*, 33, 829-835.
- 13) 竹内三郎(1976). 哺乳動物の卵子(15)、*畜産の研究*、30, 574-580.
- 14) DeMayo, F. J., Mizoguchi, H. and Dukelow, W. R.(1980). Fertilization of squirrel monkey and hamster ova in the rabbit oviduct (xenogenous fertilization). *Science*, 208, 1468-1469.
- 15) Lawson, R. A. S., Adams, C. E. and Rowson, L. E. A.(1972). The development of sheep eggs in the rabbit oviduct and their viability after re-transfer to ewes. *J. Reprod. Fert.*, 29, 105-116.

Gonadotropin Induced Superovulation in the Calf
and In Vitro Fertilization

Hirotsada TSUJII, Seiji YAMAMOTO* and Kenji KOJIMA**

Faculty of Agriculture University of Shinshu, Veterinary
Practitioner*, Fujita Pharmaceutical Co.**

Abstract In an attempt at collection of an increased amount of follicular ova, superovulation was induced in prepuberal, sexually immature calves (8-12 weeks old) by intramuscular injection of 15 00 iu of PMSG followed 5 days later by intravenous injection of 1500 iu of hCG. The ovaries were removed by laparotomy at 24 hours after hCG treatment. The ovaries from one animal contained 70 follicles above 10 mm in diameter, 13 follicles 9-5 mm and 145 follicles above 2mm. The ovaries from the other animal contained 86 follicles measuring more than 2 mm in diameter. The in vitro fertilization experiment using the collected follicular oocytes resulted in 58.2% sperm penetration and 44.9% fertilization with female and male pronuclear formation. The results suggested that ovaries from prepuberal cattle have a higher potentiality for ova.

Introduction

Pre- and post-fertilization ova are important in gene manipulation. Especially in biotechnology using bovine ova, collection of as many early-stage ova of high viability as possible is an important process. From one sexually mature cattle, only 6 to 8 ova are ovulated even by induction of superovulation. Ovaries collected from cattle at a slaughter house are utilized for researches of in vitro fertilization, but ovaries from diestrous cattle usually contain an

average of 17 follicles per cow. An average of only 8 ova are usually recovered.¹⁾

The purpose of this study is to increase the rate of follicular oocyte collection by induction of superovulation in prepuberal, sexually immature cattle. In vitro fertilization was also carried out using follicles collected from superovulated calves.

Materials and Methods

Holstein calves were reared since birth under standard environmental conditions. Two female calves at 8-12 weeks of age were used in the experiment. Follicular development was stimulated by intramuscular injection of 1500 i.u. of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) followed 5 days later by intravenous injection of 1500 i.u. of human chorionic gonadotropin (hCG).²⁾ At 24 hours after the injection of hCG, the animals were fixed in a supine position on an operating table and laparatomized by a midline incision under general anesthesia to remove the both ovaries. The ovaries were immediately transported to the Laboratory using a container controlled at 30-35 °C. Oocytes were aspirated from follicles in accordance with the diameters of follicles. After washing twice in the culture medium, only oocytes with microscopically normal morphology were chosen and used for the experiment.

Ham's F12 containing 10% fetal calf serum (FCS) and 20% bovine follicular fluid (BFF) was used for maturation and fertilization of the follicular oocytes. Ham's F12 was supplemented with 100 i.u./ml of crystalline penicillin G and 50 µg/ml of streptomycin sulfate. FCS and BFF had been heat-inactivated at 56°C for 30 minutes prior to use. Frozen semen from Japanese black cattle was used for fer-

tilization. It was rapidly thawed in lukewarm water at 35°C at the time of use. It was diluted two-fold with a BO medium (Brackett and Oliphant, 1975)³⁾ and washed twice by centrifugation at 300 rpm for 5 minutes. The sperm suspension was then cultured for capacitation. Using a BO medium containing BFF, spermatozoa diluted to the final concentration of approximately 3.0×10^6 /ml were enwrapped in droplet with paraffin oil and precultured for 5-6 hours at 37°C in a CO₂ incubator with 5% CO₂ and 95% air.^{1,4,5)}

Oocytes from follicles above 10 mm in diameter were immediately inseminated. Oocytes from follicles measuring 5-9 mm in diameter were cultured in vitro for 12 hours and those from follicles measuring 2-4 mm in diameter for 28 hours. Oocytes normally matured into metaphase II (M II) were inseminated. In vitro fertilization was carried out using the above-described culture medium. Ten M II matured oocytes were added into the 300 µl droplet and inseminated with 0.2 ml (1.2×10^6 sperms/ml) of capacitated sperms which had been placed in the droplet. The oocytes and spermatozoa contained in the paraffin-covered droplet were co-cultured for 15-18 hours at 37 °C in a CO₂ incubator with 5% CO₂ and 95% air.^{1,4,5)} After the co-culture, some of the ova were stained by the Tarkowski's method⁶⁾ and microscopically (x 400-1000) examined to divide into fertilized ova with female and male pronuclear formation, non-fertilized ova with sperm penetration into the zona pellucida and degenerated ova.

Results

The ovaries extracted from calf 1 showed remarkable development and measured 6.5 x 6.4 and 7.0 x 4.5 cm. Table 1 shows the number of follicles and oocytes collected. The left and right ovari-

Table 1. The number of follicles and oocytes collected from calf 1.

Diameter (mm)	Left ovary		Right ovary	
	No. of follicles	Recovery of oocytes	No. of follicles	Recovery of oocytes
10 ≤	30	14	40	21
5-9	5	2	8	5
2-4	31	12	31	18
	66	28	79	44

Recovery of oocytes / No. of follicles = 72/145 (49.7%)

Table 2. The number of follicles and oocytes collected from calf 2.

Diameter (mm)	Left ovary		Right ovary	
	No. of follicles	Recovery of oocytes	No. of follicles	Recovery of oocytes
10 ≤	2	1	1	0
5-9	3	2	5	1
2-4	45	15	30	16
	50	18	36	17

Recovery of oocytes / No. of follicles = 35/86 (40.7%)

es contained 30 and 40 follicles respectively that measured larger than 10 mm in diameter. Thirteen follicles 5-9 mm in diameter existed in the left and right ovaries. The total of 145 follicles above 2 mm that can be used for in vitro fertilization existed in the left and right ovaries. The collection rate of oocytes amounted to 49.7%.

The ovaries extracted from calf 2 were somewhat smaller in size compared to those extracted from calf 1 and measured 3.2 x 0.9

Table 3. The rates of MII maturation, sperm penetration and fertilization.

Diameter (mm)	Recovery of oocytes	MI I maturation	Sperm penetration	Fertilization
10 ≤	36	36	31	24
5-9	10	8	4	2
2-4	61	54	22	18
Total (%)	107	98 (91.6)	57 (58.2)	44 (44.9)

and 2.5 x 1.7 cm. A relatively large blood point (approximately 10 mm) immediately after ovulation was detected in one of the ovaries. Table 2 shows the number of follicles and oocytes collected. The totals of 3 follicles ≥ 10 mm in diameter and 8 follicles 5-9 mm existed in the left and right ovaries, in addition to 86 follicles ≥ 2 mm in diameter that can be utilized for in vitro fertilization. The collection rate of oocytes amounted to 40.7%.

Table 3 shows the rates of M II maturation, sperm penetration and fertilization. M II maturation occurred in 8 of 10 oocytes from follicles 5-9 mm in diameter and in 54 of 61 oocytes from follicles 2-4 mm in diameter. Insemination of 98 oocytes matured into M II resulted in 57 sperm penetrated ova (58.2%) including polyspermy. These included 44 ova (44.9%) which showed female and male pronuclear formation. Fertilization was achieved in 77% of the sperm penetrated ova.

Discussion

Onuma et al. (1970)²⁾ found different patterns of follicular development in Holstein calves in which superovulation was induced

by gonadotropin. They reported that an average of 43 follicles \geq 10 mm in diameter were produced by either 1500 or 2000 i.u. of PMSG and that the ovulation rate amounted to 79% by administration of 50 mg of LH and to only 16% by 1500 i.u. of hCG. In a similar experiment using calves, Seidel et al.⁷⁾ obtained, on the average, 46.5 follicles \geq 10 mm in diameter and more than 30 follicles 5-10 mm in diameter. Almost the same follicular development was found in the present experiment. Though the number of animals used in this study was limited, the follicular responses appeared different. This may be due to the differences in the lot number of hormones and importantly, as suggested by Onuma,²⁾ to the nutritional and breeding conditions of animals.

In this experiment, ova were collected at 23-24 hours after hCG administration. Ovulation of one ovum occurred in calf 2. This indicated that laparotomy within 24 hours seemed desirable. Since it is our intention to collect follicular ova by surgical extraction of ovaries without sacrificing animals, we prefer as much as possible to avoid collection of ova discharged into the oviduct. By induction of superovulation with PMSG, Onuma et al.²⁾ obtained 79% ovulation by treatment with 50 mg of LH and 16% ovulation by treatment with 1500 i.u. of hCG. A higher response to LH than to hCG suggests that a combination of PMSG and LH may contribute to more equal maturation of follicular oocytes.

Higher rates of M II maturation, sperm penetration and fertilization were obtained in the present experiment, compared to the corresponding rates obtained in a previous in vitro fertilization experiment using follicular oocytes collected from slaughtered cattle ovaries.¹⁾ This seemed to suggest that the potential activity

is higher in follicular oocytes from prepuberal, sexually immature cattle.

Simplification of follicular oocyte collection under fiberoptic control is expected. Experiments on cleavage of fertilized ova and transplantation in a recipient are also expected to further progress.

References

- 1) TSUJII, H.: Jap. J. Fer. & Ster. (in the press)
- 2) ONUMA, H., J. HAHN & R.H. FOOTE : J. Reprod. Fert., 21, 119, 1970.
- 3) BRACKETT, B.G., & G. OLIPHANT : Biol. Reprod. 12, 260, 1975.
- 4) IRITANI, A. & K. NIWA : J. Reprod. Fert., 50, 119, 1977.
- 5) SUGAWARA, S. et al.: 10th Int. Cong. Animal Reprod. & A.I.,
Champaign, Ill. U.S.A. 1984.
- 6) TARKOWSKI, A.K.: Cytogenetics, 5, 394, 1966.
- 7) SEIDEL, G.E., L.L. LARSON & R.H. FOOTE : J. Animal Science 33,
617, 1971.

仔雌牛の卵胞卵を用いた体外受精

辻井 弘 忠 · 山本 静 二^{*} · 小嶋 健 司^{**}

(信州大学農学部 · 開業獣医^{*} · フジタ製薬^{**})

牛卵胞内卵子をより多く集める手段として、春期発動前の幼若雌牛に過排卵誘起することが考えられたので実験を行った。生後2～3カ月齢の幼若の雌牛にPMSG 1500 iu筋注、5日後にhCG 1500 iu静注。24時間に、開腹手術を行って卵巣を摘出した。1頭より10mm以上の卵胞が70、9～5mmの卵胞が13と、2mm以上の卵胞が145個存在した。他の1頭も2mm以上の卵胞が86個存在した。採取した卵胞卵を用いて体外受精を行ったところ精子侵入卵58.2%、雌雄両核を形成した受精卵が44.9%得られた。幼若牛から採取した卵胞卵はかなり活性が高く、利用価値があると思われた。

本研究は、稲盛財団の助成金によった。

マウス胚の初期発生に対する Actinomycin D(Act-D)
及びタンパク合成阻害剤の影響

Effects of Actinomycin D and Protein Synthesis
Inhibitors on Early Development of Mouse Embryos

松井 素子 ・ 佐藤 嘉兵

Motoko MATSUI and Kahei SATO

日本大学農獣医学部家畜繁殖学教室
Laboratory of Animal Reproduction, college of Agriculture
and Veterinary Medicine, Nihon University
Fujisawa 252, JAPAN

Mouse embryos were cultured in vitro in media containing Act-D, PM or CHX during the interval from the 2-cell stage to the early blastocyst stage. Two- or 4- cell stage embryos cultured in the presence Act-D developed to the 4- or 8-cell stage, respectively, but further development did not occur. Act-D at 10^{-1} ug/ml inhibited development of morula. PM and CHX inhibited completely the development in vitro of the embryos.

近年マウス胚に発生工学的に外部から操作を加え、哺乳動物胚の発生機序を探る方法が広く用いられている。このためマウス胚の発生に関する情報の必要性に迫られてきた。ツメガエルにおいては初期発生胚では 8細胞期までは新しい mRNA を必要とせず、いわゆる maternal mRNA によるタンパク合成が行われていることが知られている(塩川、1978)。一方、マウス胚においては 2~4 細胞期以降、新しい mRNA のコピーが開始されるとされている。しかしその細部についての検討は十分なされていない。我々はこうした背景からマウス初期胚に対する mRNA あるいはタンパク合成阻害物質の影響について調べ、初期発生胚における mRNA とタンパク合成と発生との関係について情報を得ようとした。

供試動物は ICR 系マウスの生後 10 週齢以上の成熟した雌雄マウスで体重 30~40g のものを 5~8 匹ずつケージに収容し、固形飼料を水と共に自由摂取させた。マウスは性周期に関係なく雌マウスを PMSG(帝国臓器 K.K) 10IU、48 時間後に hCG(帝国臓器 K.K) 10IU をそれぞれ腹内に投与し過排卵誘起を行った。hCG 投与後直ちに雄と同居させ hCG 投与後 48~72 時間で 2cell~morula の胚を採取した。その胚をそれぞれ mRNA 阻害剤である Act-D(SIGMA)は 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} ug/ml、タンパク合成阻害剤である Puromycin(PM)(SIGMA)あるいは Cycloheximide(CHX)(和光純薬)の 0.1, 0.5, 1, 5ug/ml を添加した Brinster 培養液に入れ培養し、その後の発生について観察した。

以上の結果を Fig.1~3 に示した。2 細胞期からの培養では Act-D(10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} ug/ml)を添加した場合、2cell stage からの培養では 4cell stage 達したが、それ以上は発生しなかった。4cell stage からの培養でも類似した結果であったが、morula からの培養では 10^{-1} ug/ml の濃度で完全に胚発生を抑制した。一方、PM 及び CHX の添加では各濃度が 0.5~5ug/ml の範囲で完全に 2, 4cell stage 及び morula からの胚発生

を抑制した。

以上の結果からマウスの初期胚では少なくとも4細胞期までmaternal mRNA が作動しているものと思われた。しかし、morulaでは新しくコピーされたmRNAによりタンパク合成が行われているものと推察された。この結果は、培養マウス胚に対するAct-Dを用いたMonesi et al(1970)の結果と類似していた。今後、マウス胚におけるmaternal mRNA 及び新しいmRNAとタンパク合成に関して詳細な検討が望まれる。

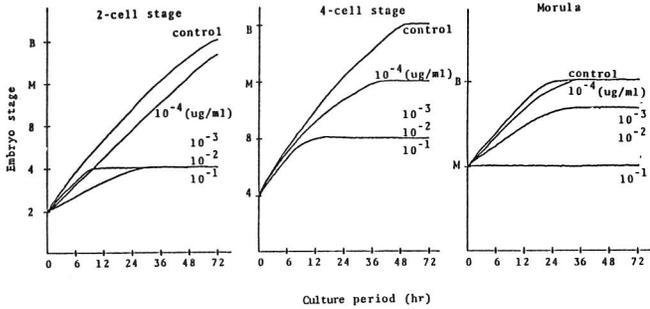


Fig. 1 Development of 2-,4-cell and morula mouse embryos in the absence or in the continuous presence of Actinomycin-D

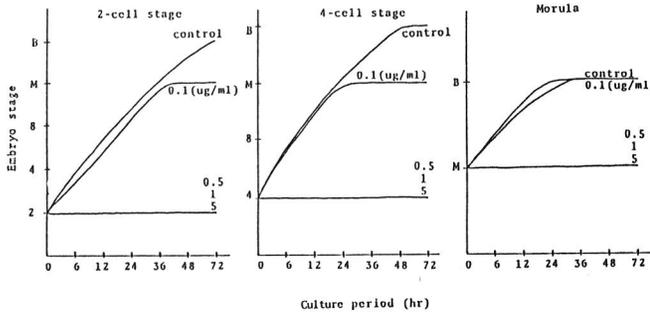


Fig. 2 Development of 2-,4-cell and morula mouse embryos in the absence or in the continuous presence of Puromycin

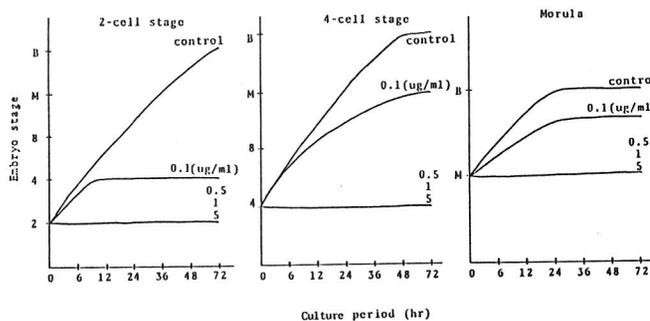


Fig. 3 Development of 2-,4-cell and morula mouse embryos in the absence or in the continuous presence of Cycloheximide

文献

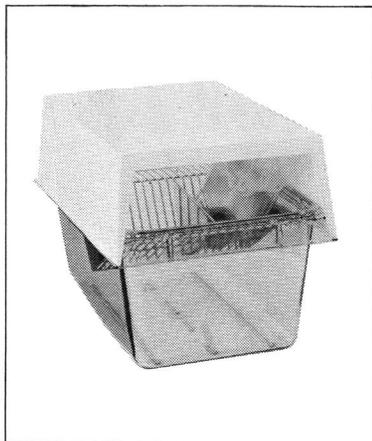
塩川光一郎(1984) ツメガエル卵の分子生物学, 東京大学出版会

Monesi, M. Morinaro, E. Spalletta and C. Davoli (1970). Effect of metabolic inhibitors on macromolecular synthesis and early development in the mouse embryo. *Exp. Cell. Res.* 59, 197-206

NEW!

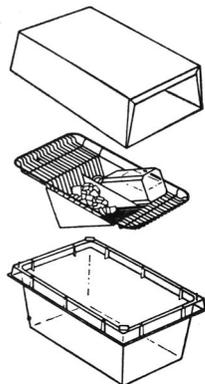
M-7 (Isocage & Isocap)

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

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
(卵巢発育不全、卵巢静止、卵巢萎縮)

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

第 28 回

哺乳動物卵子研究会

講演要旨集

会 期 昭和62年 4月 25日(土)
会 場 日本大学会館

特別講演

IVF-ERの展望

鈴木雅洲<スズキ病院>

ハムスターにおける体外培養卵巣の
排卵機序について

Studies on ovulation in the explanted
hamster ovary

渡辺靖浩・金山喜一・遠藤 克・佐久間勇次

Yasuhiro WATANABE, Kiichi KANAYAMA, Tuyoshi ENDO and Yuzi SAKUMA

日本大学農獣医学部生理学教室

Department of Veterinary Physiology, college of Agriculture

and Veterinary Medicine, Nihon University

目的：哺乳動物における排卵現象は、成熟卵巣の卵巣壁組織の開裂が必須条件とされている。しかし、この卵巣壁開裂の機構についてはいまだ明確でない部分が多く、その機序解明のため組織化学的、生理学的、生化学的な方面から種々の検討が試みられている。これまで、卵巣壁組織開裂の機構に関しては、平滑筋収縮説や卵巣内圧説が支持されてきたが、現在は、排卵現象の最終段階でプラスミノゲン・アクチベータが作用して卵巣壁組織が開裂し排卵が起こるといふ仮説が最も有力視されている。しかし、これまで *in vivo* の実験では良好な成績は得られず、本研究では、プラスミノゲンアクチベータ合成阻害剤である Tranexamic-acid を、卵巣により直接的に作用させる目的で、卵巣の液面培養法(Surface Culture)を用いてTranexamic-acidによる排卵抑制効果の実証およびプラスミノゲンアクチベータ阻害による濾胞内過熟卵作出の可能性について検討を試みた。

方法：(実験 1) 膣垢検査により規則正しく発情周期を、連続して3回以上繰り返した70日齢以上(体重 100~160 g)の成熟未産ゴールデンハムスターの摘出卵巣を用いた。卵巣は、ハムスターをと殺したのち無菌的に採取し、PBS液を満たした時計皿中で付着脂肪、卵巣嚢を除去し培養液中で軽く洗浄した。その後、組織培養用シャーレ (Organ Tissue Culture Dish 60×15mm、内径30mm : Falcon社) にステンレス製の金網台 (100 mesh) を置き、この上に卵巣を載せ、その上部約80%を液面上に露出した状態で液面培養 (Surface Culture) を行った。培養は、95% air、5% CO₂、37℃の条件下で翌日の検索時 (発情期の10:00) まで行った。また、培養液は森岡らの報告を参考にし、TCM199(日本水社) の 1ml中に3.0mgのグルコース、0.1mgのL-グルタミン、0.05mgのアスコルビン酸、0.035mgのインスリン、1.9mgの重炭酸ソーダ、0.12mgのストレプトマイシンを添加した修飾 TCM 199を用いた。*in vivo* におけるハムスターの自然排卵は、発情期の0:00より始まることから、卵巣の摘出時刻を発情前期の19:00、21:00、22:00、23:00の4試験区を設定し

た。(実験 2) 卵巣摘出時刻を実験 1の成績から21:00と23:00の2試験区を設定した。培養液は、同一個体から摘出した2個の卵巣のうち1個は修飾 TCM 199で培養して対照区とし、残りの1個は0.1% w/w Tranexamic-acidを添加した修飾 TCM 199で培養した。

結果:(実験 1) 排卵率は、19:00に摘出した卵巣で0%、21:00で75.0%、22:00で90.4%、23:00で95.8%であり、排卵数は、21:00で1.90個、22:00で1.76個、23:00で3.96個であった。in vivoにおける排卵開始時刻の0:00に近づくにつれて排卵率および排卵数は増加した。しかし、in vivoにおける片側卵巣からの平均排卵数の約6個に比べると、排卵数は少なかった。(実験 2) 培養液にTranexamic-acidを0.1%添加した結果、21:00に摘出した卵巣の排卵率は25.0%、排卵数は0.25個であり、23:00に摘出した卵巣の排卵率は91.6%、排卵数は1.58個であって対照区に対して有意な低下を示し、排卵抑制作用が認められた。

Table Effect of tranexamic-acid on hamster ovaries explanted at 21:00 and 23:00

Time of explantation	% of tranexamic-acid in medium	No. of ovaries	No. of ovaries ovulated	No. of ova ovulated	Ave. No. of ova/ovary
21:00	0.0 (control)	12	10	24	2.00±0.78
	0.1	12	3	3	0.25±0.12
23:00	0.0 (control)	12	12	46	3.83±0.61
	0.1	12	11	19	1.58±0.26

Values are mean±S.E.

結論: 19:00に摘出した体外培養中の摘出卵巣には全く排卵が認められなかったが、21:00以降の摘出卵巣には排卵が認められた。しかし、卵胞壁の開裂が起こる21:00、23:00の卵巣の培養液にTranexamic-acidを添加することによって排卵が抑制された。その抑制作用は23:00より21:00に強く認められた。これらのことから、排卵における卵胞壁の開裂にはプラスミノゲンアクチベータが作用していることが裏付けられ、また、実験的に過熟卵を作出できる可能性が明らかとなった。

主要文献

1. 森岡宏至、市川茂孝(1982)。ハムスターの体外培養卵巣からの排卵、家畜繁殖誌、28、200-204。
2. Espey, L., Shimada, H., Okamura, H. and Mori, T. (1985) Effect of various agents on ovarian plasminogen activator activity during ovulation in pregnant mare's serum gonadotropin-primed immature rats. Biol. Reprod., 32,1087-1094.

受精卵分割における細胞質の意義の検討

— 二次元電気泳動法を用いて

Roles of cytoplasm for fertilized ova cleavage

— by the use of two-dimensional electrophoresis

小松節子・鈴木秋悦・北井啓勝・遠藤芳広・大庭三紀子
伊藤武夫・依田和彦・深沢俊夫*・飯塚理八

Setsuko KOMATSU・Shuetsu SUZUKI・Hirokatsu KITAI・
Yoshihiro ENDO・Mikiko OBA・Takeo ITO・Kazuhiko YODA
Toshio FUKASAWA*・Rihachi IIZUKA

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室, 分子遺伝学研究室*

Dept. of Ob. & Gyn., Lab. of Mol. Gen. *, Keio Univ., Sch. of Med.

目的：最近，卵培養の技術に関する種々の検討がなされ，ヒトを含む多くの種属の受精卵の培養が可能となっている¹⁾。しかし，ある種のマウスの系統では，培養しても2細胞期で分割停止する，いわゆる“2-cell block”という現象が報告されている²⁾。この“2-cell block”は，EDTAの添加によって解除される³⁾が，その作用機序は不明であり，“2-cell block”の原因は体外培養によって，卵の細胞質に何らかの異常をきたすためであると推論されている²⁾。そこで本研究は，“2-cell block”に関係する細胞質要因を，二次元電気泳動法を用いて，タンパク合成パターン，および，リン酸化パターンより解析した。

方法：ICR-slc マウスを用い，未分割受精卵は雌雄同居24時間後に，後期2細胞期卵は48時間後に，卵管内より採取し，未分割受精卵は0.1% hyaluronidase (シグマ)含有BWW培養液で卵丘細胞を除去し，半数は，108 μ M ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA, 半井)含有培養液にて培養した。各群50-65個の卵は経時的に分割状態を観察した。二次元電気泳動には，後期2細胞期卵群，未分割受精卵から培養して2細胞期となった卵群(培養2細胞期卵群)，未分割受精卵からEDTAにて培養して2細胞期となった卵群(EDTA培養2細胞期卵群)の3群を設けた。各群200個の卵は，50 μ Ci L-[³⁵S]methionine (1000-1400 Ci/m mol, アマーシャム), [³²P] orthophosphate (アマーシャム)にて，夫々，3時間培養した。3回凍結融解後，凍結乾燥し，20 μ lのlysis bufferを加えた。二次元電気泳動法はO' Farrellの方法⁴⁾を参考に，一次元目にpolyacrylamide gelによるディスク等電点泳動，二次元目にSDS slab gelを用いた。ゲルは，泳動後，染色固定し，乾燥し，1週間の露光後，現像定着した。 [³⁵S] methionine でラベルしたゲルに関しては，染色固定後，ENLITNING (New England Nuclear)にて30分間振とうした。

結果：in vivo系(後期2細胞期卵)とin vitro系(培養2細胞期卵とEDTA培養2細胞期卵)の間には，タンパク合成パターンに種々の相異なるタンパクが認められた。さらに，培養2細胞期卵においては，EDTA培養

2細胞期卵と比較して、タンパクの欠如および増加が認められた。リン酸化タンパクにおいては、*in vivo*系と*in vitro*系との間には、塩基性側から酸性側へ移行するタンパクを認められたが、培養2細胞期卵に特殊なタンパクは認められなかった。

考察：Luthardt and Donahueは⁵⁾、胚盤胞への発生が困難な系統のマウス前核期卵を培養し、発生した2細胞期卵を $[H^3]$ チミジンで処理した結果、ほとんどの卵がラベルされたことから、2細胞期で発生を停止する卵においては少なくともDNA合成が開始可能であり、“2-cell block”がDNA合成の欠如のためでないことを示した。そして、EDTAの体外受精由来卵に対する作用時期は、1細胞期の後半から2細胞期の前半に顕著に作用することが知られており⁶⁾、これは、卵細胞質における母親由来のメッセンジャーRNAの一部が活性化される時期⁷⁾と一致しており、“2-cell block”における細胞質因子の関連も推測されている。すでに、われわれは、EDTAをマイクロインジェクション法を用いて、直接未分割受精卵の細胞質へ注入することにより、“2-cell block”を解除することにより細胞内成分の重要性を示唆した。

この細胞質因子に関しては、Muggleton-Harrisら⁸⁾、 F_1 マウスの受精卵あるいは2細胞期で体外に取り出した MF_1 マウスの細胞質の一部を、それぞれ MF_1 マウスの受精卵の細胞質へ注入し、またGulyasら⁹⁾、 F_1 と MF_1 マウスの受精卵を細胞融合させ、“2-cell block”を解除し、桑実胚へ分割することにより、 F_1 と MF_1 の間での細胞質要因の違いを示唆している。さらに、われわれは、未分割受精卵の細胞質へ後期2細胞期卵の細胞質を、マイクロインジェクションしたとき、また、培養2細胞期卵の割球へ後期2細胞期卵の割球を細胞融合したとき、“2-cell block”を解除することより、体内受精由来の後期2細胞期卵と blocked 2-cell 卵の間でも細胞質要因の相違を示した¹⁰⁾。

そして、今回のタンパク合成パターンの解析より、hCG投与48時間後の培養2細胞期卵は、後期2細胞期卵(*in vivo*系)と比較して、タンパクの欠如および増加が認められた。さらに、blocked 2-cellにおいては、後期2細胞期卵に欠如している、分子量30000近辺に一連のタンパクを認めたが、これはFlach et al.¹¹⁾が報告している1細胞期から初期2細胞期卵に出現するタンパクと一致していることより、*in vitro*系における細胞質の成熟遅延によるものと判断した。また、タンパクのリン酸化は、“2-cell block”に特有でないと推察した。

主要文献：1. 鈴木秋悦・他(1985)：組織培養. 11:164-168.

2. Goddard, M. J., et al. (1983)：J. Embryol. Exp. Morph. 73:111-133.

3. Abramczuk, J., et al. (1977)：Dev. Biol. 61:378-383.

4. O'Farrell, P. H. (1975)：J. Biol. Chem. 250:4007-4020.

5. Luthardt, F. W., et al. (1975)：Dev. Biol., 44:210-216.

6. Suzuki, H., et al. (1986)：J. Mamm. Ova Res. 3:78-85.

7. Luthardt, F. W. (1979)：Nature 282:102-105.

8. Muggleton-Harris, A., et al. (1982)：Nature 299:460-462.

9. Gulyas, B. J., et al. (1984)：Dev. Biol. 101:1083-1084.

10. 鈴木秋悦・他(1985)：医学のあゆみ. 134:1083-1084.

11. Flach, G., et al. (1982)：The EMBO Journal 1:681-686.

マウス2細胞期における細胞質変化の必要性

Necessity of cytoplasmic change in mouse 2-cell embryos.

鈴木 治・森 誠*・河本 馨・正田陽一

Osamu SUZUKI, Makoto MORI, Kaoru KOHMOTO & Yoichi SHODA

東京大学農学部家畜育種学講座

Department of Animal Breeding, Faculty of Agriculture,
University of Tokyo

*静岡大学農学部家畜飼育学講座

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture,
Shizuoka University

〔目的〕マウスの胚を前核期から培養すると一部の系統を除いては、ほとんどが2細胞期で発生を停止する。この現象は、俗に“in vitro 2-cell block”と呼ばれている。この発生停止は卵の由来する系統に依存していることから、卵細胞質の役割が注目されている。本研究では、核移植法による胚の再構成、および細胞質移植法を用いてこの発生停止に対する卵子核、及び細胞質の関与を調べた。

〔方法〕文献データから、発生停止を起こす系統としてICRを、起こさない系統としてB6C3F₁を用いた。両系統の4週令雌へ、PMSG 5 IU、hCG 5 IUを48時間間隔で投与することにより過排卵を誘起し、hCG投与後16時間で採卵した。3ヶ月令のICR雄より採取した精巣上体精子によりWhitten培地¹⁾にて体外受精を行った。授精後6時間で第2極体の存在を指標として受精を判定し、受精卵を実験に供した。核移植法は、McGrathとSolterの方法によった²⁾。サイトカラシンBとコルセミドを含むHEPES-buffered Whitten培地の小滴に操作しようとする胚を15分間前培養した後、保定用ピペット（直径約80 μ m）と除核・注入用ピペット（直径約15 μ m）により操作した。微分干涉顕微鏡下で核供与胚より前核をカリオプラストとして抜去し、HVJ（阪大細胞工学センターより分与）により、あらかじめ除核した胚の圍卵腔内にてカリオプラストを細胞融合させることにより核を導入した。前培養を含め、一連の操作は1時間以内に行った。操作後直ちに新しい培地に移し換えることにより洗浄し、Whitten培地により5日間培養した。カリオプラストの代わりにサイトプラストを用いると核移植と同じ様な方法で、細胞質の移植も可能で、この方法により、細胞質の移植実験も行った。観察は、24時間毎に実体顕微鏡下で行った。

〔結果と考察〕各実験群の培養結果を表1にまとめた。核移植による細胞質核再構成胚の発生をみると、移植された核の系統によらず、細胞質の由来する系統がICRであれば発生率が悪く、F₁であれば発生率が良いことがわかる。つまり胚の発生性は細胞質に支配されており、またICRの核が発生能を欠く

ということではないことがわかる。さらに、F₁核とICR細胞質からなる胚は、ICR核とICR細胞質からなる胚よりも2細胞期を越えて発生する率が高い。これはカリオプラストに随伴した細胞質の影響で発生向上がなされたことを示唆する。つまりF₁には存在する発生に必須な物質が、ICR細胞質にはないことを示唆している。一方、ICR胚でも2細胞期から培養すると高率に胚盤胞に達することから、前核期から2細胞期にかけて胚になんらかの変化が生じることを示唆する。そこでステージの違う細胞質をICR胚に移植してその細胞質の発生向上効果を指標に胚の経時的細胞質変化を調べた。表からわかるとおり、2細胞期胚の細胞質の方が発生向上効果が高い。このことは、前核期から2細胞期になるにつれ、細胞質に変化が生じることを示している。マウス初期胚の細胞質による支配は、Muggleton-Harrisら³⁾によっても指摘されているが、この細胞質支配は、今回の細胞質移植の結果から考えて、単に卵子形成時の蓄積物の影響でというよりも、前核期から2細胞期にかけて胚、特に細胞質になんらかの変化が体外で生じうるかという点で発生停止の鍵を握っているといえるだろう。

Table 1 *In vitro* development of embryos in the Whitten's medium for 5 days of culture

	Cultured embryos ^{a)}	Cleaved embryos ^{b)}	Beyond 2-cell stage ^{c)}	Reached the Blastocyst stage ^{d)}
Control				
ICR	54	51(94)	3(6)	1(2)
F ₁	85	85(100)	84(99)	77(92)
Reconstituted cytoplasm				
nuclei				
ICR	28	16(57)	3(19)	0(0)
F ₁	53	8(71)	17(45)	4(11)
F ₁	47	33(70)	29(87)	20(61)
F ₁	37	24(65)	21(88)	18(75)
Cytoplasm-transplanted cytoplasm				
pronuclear F ₁	27	22(81)	6(27)	1(5)
2-cell F ₁	27	27(100)	20(74)	9(33)

4~6回の反復実験をまとめたもの。胚操作により、操作胚に若干の発生遅延がみられたため、観察ステージを培養3日目、4日目、6日目に判定した。

- a) 対照群では、培養胚数を、操作胚では、カリオプラストまたはサイトプラストを卵細胞腔に注入できて培養にうつした胚数を示す。
- b) 2日間の培養で、卵割をした胚の数。カッコ内は、培養胚数に対するパーセント。
- c) 3日間の培養で、2細胞期を越えて発生した胚の数。カッコ内は、卵割した胚に対するパーセント。
- d) 5日間の培養で、胚盤胞になった胚の数。カッコ内は、卵割した胚に対するパーセント。

REFERENCES

1. Whitten, W.K. Adv. Biosci., 6:129-139 (1970).
2. McGrath, J and Solter, D. Science, 220:1300-1302 (1983).
3. Muggleton-Harris, A., Whittingham, D.G. & Wilson, L. Nature (Lond.) 299:460-462 (1982).

牛受精卵の電顕的観察 - I

Electron microscopic observation of bovine embryos - I

続木靖浩・藤原 昇・毛利孝之・古賀 脩

Yasuhiro TSUZUKI, Noboru FUJIHARA, Takayuki MOHRI and Osamu KOGA

九州大学農学部畜産学科

Dept. of Animal Science, Fac. of Agriculture, Kyushu University

目的：牛受精卵の形態については、新鮮卵および凍結融解卵を対象として、光顕ならびに電顕的に観察した報告がいくつかみられる（1-3）。しかし、卵の凍結融解に伴う微細構造の変化については、まだ十分には検討されていない。本研究はこの点を明らかにしようとして計画されたものであるが、今回はまず新鮮卵の微細構造および凍結融解後にみられる形態的变化について、現在までに得られた観察結果を報告する。

方法：新鮮卵の場合には、人工授精後7日目に採取した受精卵（10個以上）をただちに3%グルタルアルデヒドで2時間（5℃）前固定した後、30分間 Millonig のリン酸緩衝液（pH7.4）で洗浄し、さらに1%四酸化オスミウムで1時間（5℃）後固定した。その後アセトンシリーズで脱水を行い、エボン樹脂に包埋し、ウルトラミクロトーム（SORVALL MT-1）を用いて超薄切片を作成し透過型電子顕微鏡（TEM, HITACHI HS-9型）で観察した。一方、凍結融解卵の場合には、採取後10%のグリセロールを含む PBS で処理し、0.25mlの精液用ストローにつめて、プログラムフリーザー（ダイサン）で凍結した後、液体窒素中に約6ヶ月間保存した。融解は二段階法により37℃の温湯中にストローを1分間静置して行い、その後新鮮卵の場合と同様に処理して、TEMで観察した。

結果および考察：新鮮卵の場合、光学顕微鏡による観察で正常と思われた胚盤胞をTEMで観察すると、栄養芽細胞に多数の microvilli が存在し、細胞間の接合部は tight junction と desmosome からなる junctional complex を形成していた（図-1）。ミトコンドリアは球状あるいは卵型で、細胞内に散在しており内部にはクリステ構造が観察された。内細胞塊の細胞では、ミトコンドリアは栄養芽細胞の場合と同様に散在しており、細胞中には大きなライソゾームも含まれていた。また内細胞塊および栄養芽細胞には多数の細胞質突起がみられ、それらが隣接した細胞に接していた。次に早期胚盤胞についてみると、透明帯に面した細胞には microvilli がよく発達しており、この細胞は将来栄養芽細胞になるものと思われた。細胞内にはミトコンドリアも多

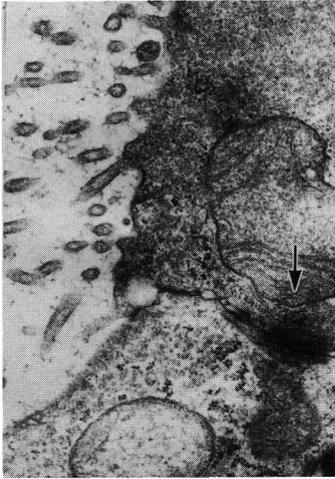


図-1 栄養芽細胞の junctional complex(矢印) x 40,000

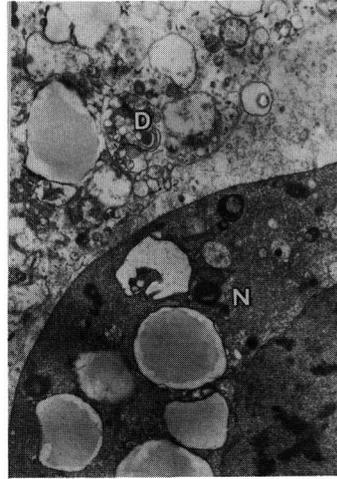


図-2 凍結融解卵. 障害を受けている割球(D)および正常な割球(N) x 7,000

くみられ、それが核周辺にとくに集中している細胞も観察された。多数の細胞質突起が観察されたが、胚盤胞と比較すると若干少ないように思われた。

次に、凍結融解の場合、光学顕微鏡で観察して正常な形態を保持していると思われた割球細胞では、原形質膜および細胞内小器官には大きな変化は見られなかった。これに対し、変性した割球細胞では、原形質膜が脱落し、細胞内小器官が露出しているものが観察された(図-2)。また部分的に原形質膜が脱落し、細胞内容物が流出しているものも認められた。このような割球では、細胞内小器官は多くの場合で変形しており、とくにミトコンドリアにはクリステ構造の見られないものが多かった。したがって、牛受精卵を凍結融解した場合の形態的变化としては、まず原形質膜が損傷を受け、部分的に脱落が起り、その結果細胞内小器官に影響が及ぶものと考えられた。

謝辞：本実験に用いた受精卵の採取および凍結保存に御協力いただいた大分県畜産試験場ならびに福岡県畜産研究所に深く感謝いたします。

主要文献

- (1) Flechon, J.E. and Renard, J.P. (1978): A scanning electron microscope study of the hatching of bovine blastocysts in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 53:9-12.
- (2) Linda, R.M. and Trounson A.O. (1981): Structural changes associated with freezing of bovine embryos. *Biol. Reprod.*, 25:1009-1025.
- (3) Lehn-Jensen, H. and Ra11, W.F. (1983): Cryomicroscopic observations of cattle embryos during freezing and thawing. *Theriogenology*, 19:263-277.

マウス受精卵子の発生に対する InsulinおよびHydrocortisone の効果

Effect of Insulin and Hydrocortisone
on the development of mouse embryos in vitro

高木優二・亀山賢次・菅原七郎・正木淳二

Yuji TAKAGI, Kennji KAMEYAMA, Shichiro SUGAWARA, Junji MASAKI

東北大学農学部家畜繁殖学教室

Lab. of Anim. Reprod. Fac. of Agric., Tohoku Univ.

目的：着床前の受精卵子の発生におけるホルモン類の役割については明確にされていない。実際、マウス受精卵子をin vitroで培養した場合、培養液に新たにホルモンを添加しなくても胚盤胞まで発生することから特に必要であるとは考えられていない。しかし、最近、着床前の初期胚の発生に対するステロイドホルモン作用の解析¹⁾やInsulinのレセプターに関する研究²⁾が行われるようになり、初期発生とホルモンとの関係が解明されるようになってきた。本研究では、マウスの初期発生におけるInsulinとHydrocortisoneの効果について検討を行った。

方法：ICR系4週齢雌マウスにPMSGおよびhCG各10i.u.を48時間間隔で腹腔内注射しhCG投与後直ちに同系成熟雄マウスと同居させた。腫栓の認められたものをhCG投与49-51時間後に2細胞期胚を卵管灌流法で回収した。BMOC-3液を基礎培地として、それに牛Insulinを $0.6 \times 10^{-7}M$, $1.5 \times 10^{-7}M$, $3.0 \times 10^{-7}M$ になるように添加した。HydrocortisoneはInsulin $1.5 \times 10^{-7}M$ 添加したBMOC-3液に $1.5 \times 10^{-8}M$, $3.0 \times 10^{-8}M$, $6.0 \times 10^{-8}M$ になるように添加した。それぞれの培養液滴1つ当たりには10-16個の2細胞期胚を入れ38°C, 5% CO₂, 95% 空気混合気相下で培養し24時間おきに発生を観察した。なお、培養は採卵後120時間まで行った。

結果および考察：Table 1.に示すようにInsulin添加区の胚盤胞までの発生率は、対照区、 $0.6 \times 10^{-7}M$, $1.5 \times 10^{-7}M$ で90.9%, 84.8%, 92.6%を示したが、 $3.0 \times 10^{-7}M$ 添加区では72.2%と他の区よりも低い発生率であった。これより $3.0 \times 10^{-7}M$ 以上添加することにより

発生が抑制されるものと考えられる。透明帯からハッチングした胚は、それぞれ 18.2%, 6.5%, 18.2%, 15.2%であった。Hydrocortisone添加区 (Insulin $1.5 \times 10^{-7}M$) では、例数は少ないものの $1.5 \times 10^{-8}M$, $3.0 \times 10^{-8}M$, $6.0 \times 10^{-8}M$ で胚盤胞まで、それぞれ 88.9%, 96.4%, 100% 発生し、またハッチング率では $1.5 \times 10^{-8}M$, $6.0 \times 10^{-8}M$ 添加区で 33.1%, 35.7% と対照区および Insulinのみの添加区よりも高い値を示した。ハッチング後の発生において Insulinまたは Hydrocortisone 添加区では、対照区よりも良い傾向が見られた。以上のことから、本実験において Insulinおよび Hydrocortisone 添加による著しい効果は認められなかった。なお、移植後の着床・分娩への影響については現在検討中である。

Table 1. The effect of Insulin and Hydrocortisone concentration on the development of mouse embryos

Insulin ($\times 10^{-7}M$)	Hydrocortisone ($\times 10^{-8}M$)	No. of embryos cultured	No. and (%) of embryos developed to			
			4-cell	8-cell	Blastocyst	Hatched
control		99	93(93.9)	90(90.9)	90(90.9)	18(18.2)
0.6	-	92	83(90.2)	78(84.8)	78(84.8)	6(6.5)
1.5	-	121	118(97.5)	112(92.6)	112(92.6)	22(18.2)
3.0	-	79	68(85.3)	58(73.4)	57(72.2)	12(15.2)
1.5	1.5	27	27(100)	25(92.6)	24(88.9)	9(33.1)
1.5	3.0	28	28(100)	27(96.4)	27(96.4)	3(10.7)
1.5	6.0	14	14(100)	14(100)	14(100)	5(35.7)

主要文献

- 1) Niehann, H. & Elsaesser, F. : Evidence for estrogen-dependent blastocyst formation in the pig. Biol. Reprod. 35, 10, 1986
- 2) Rosenblum, I. Y., Mattson, B. A. & Heyner, S. : Stage-specific insulin binding in mouse preimplantation embryos. Devel. Biol. 116, 261, 1986

(科研費 一般研究A 60440019)

マウス初期胚のミコフェノール酸感受性と キサンチンによる回復

Effects of mycophenolic acid and xanthine on develop- ment of preimplantation mouse embryos

星 雅 樹・水 野 敦 子・結 城 惇

Masaki HOSHI, Atsuko MI ZUNO, and
Atsushi YUKI

雪印乳業株式会社生物科学研究所

Research Institute of Life Science, Snow Brand Milk Products,
Co., Ltd.

目的: IMP dehydrogenaseの Specific inhibitor であるミコフェノール酸は、グアニンの欠如下において哺乳類細胞のDNA合成を阻害する¹⁾。最近、演者らはマウス初期胚の発生におよぼすミコフェノール酸の影響を体外培養法を用いて検査し、1ないし2細胞期胚は他の細胞と著しくことなりミコフェノール酸の影響をうけないこと、および $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ではミコフェノール酸の効果が8細胞期の後半から顕著になり胚盤胞への発生を阻害することを報告した²⁾。本実験では、マウス初期胚のプリン合成系の特異性を調べる目的で、初期胚に影響をおよぼすミコフェノール酸の必要最低濃度を検査し、さらにキサンチンによる回復効果について検討を加えた。

方法: 過排卵処理したB6C3F₁ 雌をCD-1雄と交配させ、hCG注射後20時間に1細胞期胚を採取した。体外培養は、whitten 培地を用いて37°C、空气中5%CO₂ の条件下で行った²⁾。ミコフェノール酸 (Sigma) およびキサンチン (Sigma) は、0.1N水酸化ナトリウムに溶解後ただちに培地へ添加し、0.1N塩酸で中和した。培養胚の観察は、24時間間隔で倒立顕微鏡下(×200-400)で行った。培養時に発生した胚盤胞の一部は偽妊娠雌に移植し、仔への発生能力を検定した。

結果および考察: 1細胞期胚の発生におよぼすミコフェノール酸(0-10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)の影響は、Table 1に示した。すべての濃度区においてミコフェノール酸は、第1および第2卵割を抑制しなかったが、培養72時間における桑実期から初期胚盤胞期にかけて発生阻害効果がみられた。1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度区でその部分的阻害がみられ、濃度の増加にともなって発生率は減少した。培養96時間における後期胚盤胞形成への効果はさらに著しく、対照の94%に対して1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度区で14%が後期胚盤胞を形成したが、2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ではすべての胚が崩壊した。0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のミコフェノール酸は、後期胚盤胞までの発生には影響しなかった。移植実験の結果から、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 区で発生した胚盤胞の少なくとも一部は仔へ発生することが示さ

Table 1. Inhibitory effect of mycophenolic acid on development of 1-cell mouse embryos in vitro.

Conc. of mycophenolic acid(μg/ml)	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to:			
		2-cell (24 h) ¹⁾	4-8-cell (48 h) ¹⁾	Morula or early blastocyst (72 h) ¹⁾	Late blastocyst (96 h) ¹⁾
0	36	36(100)	36(100)	36(100)	34(94.4)
0.5	36	36(100)	36(100)	36(100)	33(91.7)
1.0	36	36(100)	36(100)	31(86.1)	5(13.9)
2.5	36	35(97.2)	35(97.2)	14(38.9)	0
5.0	36	35(97.2)	35(97.2)	6(16.7)	0
10.0	36	35(97.2)	35(97.2)	0	0

1) Culture periods.

Table 2. Reversal effect of xanthine on development of 1-cell mouse embryos cultured in the presence of mycophenolic acid.

Conc. of mycophenolic acid(μg/ml)	Conc. of xanthine (μg/ml)	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to:			
			2-cell (24 h) ¹⁾	4-8-cell (48 h) ¹⁾	Morula or early blastocyst (72 h) ¹⁾	Late blastocyst (96 h) ¹⁾
0	0	36	36(100)	36(100)	36(100)	34(94.4)
2.5	0	36	34(94.4)	34(94.4)	13(36.1)	0
2.5	6.3	36	35(97.2)	35(97.2)	28(77.8)	0
2.5	12.5	36	33(91.7)	33(91.7)	29(80.6)	5(13.9)
2.5	25.0	36	36(100)	35(97.2)	34(94.4)	28(77.8)
2.5	50.0	36	33(91.7)	33(91.7)	33(91.7)	32(88.9)
2.5	100.0	36	36(100)	36(100)	36(100)	33(91.7)

1) Culture periods.

れた。

2.5 μg/ml ミコフェノール酸存在下におけるキサンチンの1細胞期胚の発生におよぼす影響は、Table 2に示した。6.3 μg/ml のキサンチンは桑実胚あるいは初期胚盤胞への発生を有意に高めたが、後期胚盤胞形成への影響はこの濃度ではみられなかった。25.0 μg/ml のキサンチンは後期胚盤胞への発生に顕著な効果を示し、さらに濃度の増加にともなって発生率は上昇した。

キサンチンを単独で培地へ増加した場合、100 μg/ml の濃度までは胚盤胞までの胚発生に対して影響はみられなかった。

以上の結果から、ミコフェノール酸はマウス初期胚の8細胞期以降に発生阻害効果を示すこと、およびその阻害効果はグアニンの欠如下でキサンチンによって回復することが示された。このキサンチン添加による回復は、マウス初期胚におけるバクテリア型の xanthine - guanine phosphoribosyltransferase の役割をはたす酵素の存在を示唆している。

文 献 1) Franklin T J, Cook J M (1969) : Biochem. J. 113 : 515 - 524.

2) Hoshi M, Yuki A (1986) : Japan. J. Anim. Reprod. 32 : 147 - 152.

ラット初期胚の低浸透圧下での 発育におよぼす諸要因の影響

Effects of some factors on early development
under low osmotic pressure in the rat embryo

伊藤雅夫、橋詰良一、種市衣里子、丸瑠璃子

Masao ITO, Ryouiti HASHIZUME, Eriko TANEICHI and Ruriko MARU

日本大学医学部衛生学教室

Dept. of Hyg. Nihon Univ. School of Med.

目的： 演者等は、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発育させ得ることを報告した。また、190m-osmolの浸透圧下で4細胞卵子を培養し、40%前後の卵子を胚盤胞へ発育させるのに成功し、培養によって得られた胚盤胞から正常な産子を得ている。しかし、このような生体内の条件と著しく異なる低浸透圧が卵子の初期発生に及ぼす作用の生理的機序は不明であり、ラットの2細胞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となる。今回は、培養気相における酸素濃度、培養液のpH、アミノ酸およびEDTA添加の影響など、浸透圧と他の培養条件との関連性について検討したので報告する。

材料および方法： 1) 供試動物；SD系ラットであり、4週令で入手した後、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°C、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。3) 培養液および

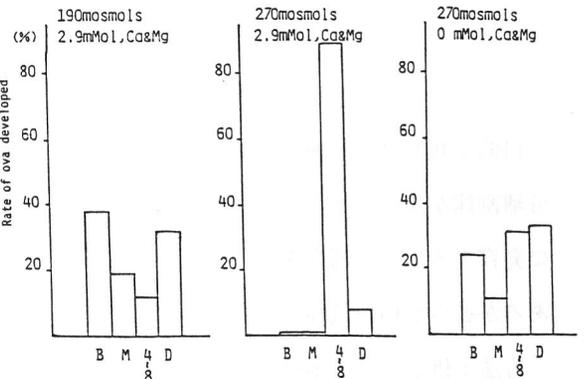
培養条件；培養液は Biggers(1971)の液を基本とし、それぞれの実験に則して浸透圧、pH、NaHCO ₃ 濃度、Ca, Mg濃度、アミノ酸およびEDTA添加などの調整を行なった。調整した後濾過滅菌し、あらかじめ培養気相内で平衡にさせた後、ペトリ皿(35X10mm)に分取し、その上を流	mOsm	Cell stage	No. of ova cultured	After culture					
				2-cell	4-cell	8-cell	Mol.	Bl.	De.
	190	2-cell	197	50 (25.4)	130 (66.0)				17 (8.6)
		4-cell	102			4 (3.9)	26 (25.5)	68 (66.7)	4 (3.9)
	270	2-cell	69	16 (23.2)	40 (58.0)	10 (14.5)	1 (1.4)		2 (2.9)
		4-cell	46		27 (58.7)	13 (28.3)	2 (4.3)		4 (8.7)

Amino acid: glutamine, phenylalanine, methionine, isoleucine

動パラフィンでおおって使用した。培養気相はO₂濃度の検討以外は全てCO₂ 5%、空気95%とし、湿度100%、温度37°Cで培養した。結果：従来から卵子の体外発育に影響を与えるとされている要因について、浸透圧を変えて検討した結果を表および図に示した。[培養気相中のO₂濃度の影響] O₂濃度を5~10%に下げることにより通常の気相の場合に比べて良好な発育を示し、通常の気相では胚盤胞への発育を示さない270mOsmの浸透圧下においても18%の卵子が胚盤胞に発育した。[重炭酸ソーダ濃度の影響] 190mOsmでは通常濃度±10%ではその影響は見られず、±20%において発育率は低下したが、270mOsmでは±10%、-20%で20数%の発育を示した。[Ca, Mg濃度の影響] 通常では胚盤胞への発育が見られない270mOsmの浸透圧下においても、Ca, Mgを添加しない場合には24.4%の卵子が胚盤胞へ発育した。[アミノ酸添加の影響] 190mOsmにおいて、BSAの一部をアミノ酸(グルタミン、フェニルアラニン、メチオニン、イソロイシン)に置変えた場合の4-cell卵子の胚盤胞への発育率は66.7%と極めて良好な成績であった。[EDTA添加の影響] 190, 270mOsmのいずれにおいてもEDTAの添加により発育率は改善されるが、270mOsmの浸透圧においてもEDTA 50 μm/mlの添加により39%の4-cell卵子が胚盤胞へ発育したことは特筆すべき結果である。

Effect of NaHCO₃ concentration on the in vitro cultivation of rat ova

mOsm	NaHCO ₃ (mM)	No. of ova cultured	After culture				
			4-cell	8-cell	Mol.	B1.	De.
190	5.1	54	26 (48.1)	8 (14.8)	10 (18.5)	2 (3.7)	8 (14.8)
	15.1	53	17 (32.1)		11 (20.8)	18 (34.0)	7 (13.2)
	25.1	142	17 (12.0)	1 (0.7)	34 (23.9)	56 (39.4)	34 (23.9)
	35.1	39	1 (2.6)	6 (15.4)	8 (20.5)	18 (46.2)	6 (15.4)
270	45.1	52	32 (51.5)	8 (15.4)	2 (3.8)	10 (19.2)	
	5.1	40	2 (5.0)	16 (40.0)	8 (20.0)	8 (20.0)	6 (15.0)
	15.1	49	18 (36.7)	4 (8.2)	4 (8.2)	12 (24.5)	11 (22.4)
	25.1	41	10 (24.4)	21 (51.2)	4 (9.8)		6 (14.6)
270	35.1	53	17 (32.1)	11 (20.8)	11 (20.8)	7 (13.2)	7 (13.2)
	45.1	60	36 (60.0)	20 (33.3)		2 (3.3)	2 (3.3)



Effect of Ca, Mg concentration on the in vitro cultivation of rat ova

Effect of EDTA on the in vitro cultivation of rat ova

mOsm	EDTA	No. of ova cultured	After culture				
			4-cell	8-cell	Mol.	B1.	De.
190	0	142	17 (12.0)	1 (0.7)	34 (23.9)	56 (39.4)	34 (23.9)
	10	54			14 (25.9)	24 (44.4)	16 (29.6)
	50	72			15 (20.8)	24 (33.3)	33 (45.8)
	100	52			9 (17.3)	23 (44.2)	20 (38.5)
270	0	41	10 (24.4)	21 (51.2)	4 (9.8)		6 (14.6)
	50	41	1 (2.4)	7 (17.1)		16 (39.0)	17 (41.5)
	100	38	2 (5.3)		8 (21.1)	6 (15.8)	22 (57.9)

EDTA: μm/ml

Effect of O₂ content in atmosphere on the in vitro cultivation of rat ova

mOsm	O ₂ (%)	No. of ova cultured	After culture				
			4-cell	8-cell	Mol.	B1.	De.
190	5	101	4 (4.0)	1 (1.0)	46 (45.5)	41 (40.6)	9 (8.9)
	10	121	2 (1.6)	5 (4.1)	37 (30.6)	52 (43.6)	32 (26.4)
270	21	193	11 (5.7)	19 (9.8)	38 (19.7)	62 (32.5)	62 (32.5)
	5	56	9 (16.1)	19 (33.9)	5 (8.9)	9 (16.1)	13 (23.2)
270	21	41	10 (24.4)	21 (51.2)	4 (9.8)		6 (14.6)

マウス 2 細胞期卵から分離した割球の 培養後の移植成績

Transfer of embryos following culture in the blastomere isolated
from 2-cell eggs of mice

中村克彦・亀山祐一・石島芳郎

Katsuhiko NAKAMURA, Yuichi KAMEYAMA and Yoshiro ISHIJIMA

東京農業大学家畜繁殖学研究室

Laboratory of Animal Reproduction, Tokyo University of Agriculture

目的：我々は、簡便な割球分離法として知られる EDTA 添加培地を用い、マウス 2 細胞期卵の分離割球からの一卵性双子作出の検討を進めており、すでに、分離割球が培養により大部分胚盤胞に発育することを報告した（中村、石島 1986）。本実験では、それら培養胚に胎子への発生能があるかどうか移植試験を試みたので報告する。

方法：供試した 2 細胞期卵は、当研究室で閉鎖集団として維持している CF Ⅱ 系マウスの成熟雌（3 カ月齢前後）に PMS と hCG の過排卵処理を施して採取した。透明帯の除去は、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 0.2~0.3 % 含む Hanks 液中で行った。割球の分離は、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 液に移し、数回ピペッティングすることにより行った。分離した割球は、空の透明帯に入れることなく、そのまま培養を行った。培養には M16 液を使用し、通常の炭酸ガス培養法を用いた。培養胚の移植は、桑実胚の場合は偽妊娠 3 日、また胚盤胞の場合は偽妊娠 4 日の recipient を用い、それぞれ、左子宮角に分離培養胚 8 個（4 対）、右子宮角に無処理の培養胚 7 個を注入した。移植技術の対照として、in vivo 胚盤胞を偽妊娠 4 日の左子宮角のみに移植する区を設けた。recipient は偽妊娠 18 日に当たる日に開腹し、着床状況を観察した。

結果：本実験での 2 分離割球の培養による胚盤胞への発生率は 73.4% (392/534 割球) で、同時に

培養した無処理2細胞期卵の90.1%(282/313個)にはおよばなかった。また、分離割球双方が胚盤

No. of half (or pair) embryos	No. of half embryos developed to blastocyst (%)	No. of monozygotic pairs developed to blastocyst (%)
534(267)	392 (73.4)	162 (60.7)

胞を形成した割合は60.7%(162/267対)であった(表1)。こうした分離割球の培養成績は先の我々の報告と同様であった(中村, 石島 1986)。培養後の分離胚の移植成績は表2に示すとおり, 2個(1対)を1子宮角に移植したも

のでは1例も妊娠がみられなかったが, 他方の子宮角に無処理培養胚を移植したrecipientに8個(4対)移植したものでは, 明らかに妊娠率が改善された。しかし移植胚数に対する生存胎子の割合は, 桑実胚では3.1%, 胚盤胞でも10.4%にすぎなかった。それに対し, 他側子宮角に入れた無処理の培養胚の生存胎子率は, in vivo 胚盤胞を移植した場合と遜色ない結果であった。このことから, 2細胞期卵由来の分離胚は, 胎子への発生が極めて困難なことが伺えた。しかし, 富樫ら(1986)は, 2細胞期卵由来の分離胚から本実験より高い生存胎子率を得, 双子も生ませているので, さらに改善の余地はあると思われる。

Table 2 Results of transfer of embryos following culture in blastomeres isolated from 2-cell eggs of mice

Stage of embryos transferred	Type of embryo	Side of uterine horn	No. of embryos transferred/recipient	No. of recipients	No. pregnant (%)	Pregnant recipients	
						No. of embryos transferred	% live fetuses
blastocyst	half	left	2	14	0(0.0)	28	0 **
morula	half	left	8	8	4(50.0)	32	3.1
	normal	right	7		7(87.5)	49	42.9
blastocyst	half	left	8	8	6(85.7)	48	10.4
	normal	right	7		6(85.7)	42	52.4
blastocyst	normal*	left	10	37	23(62.2)	230	56.1
blastocyst	normal*	left	20	22	17(77.3)	340	47.1

* in vivo **previous data

文献: 1) 中村克彦, 石島芳郎 (1986) マウス2細胞期卵から分離した割球の体外発育. 哺乳卵研誌, 3, 97~102.
 2) 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.

キメララットに関する研究：6-PGD-iによる

2系統間のキメラとその繁殖性

Studies on chimeric rats : chimeras between 2 strain
marked with 6-PGD-i and their reproductive ability

橋本伸二・菅原七郎・正木淳二

Shinji HASHIMOTO, Shichiro SUGAWARA, Junji MASAKI

東北大学農学部家畜繁殖学教室

Lab. of Anim. Reprod., Fac. of Agric. Tohoku Univ., Sendai, JAPAN

〔目的〕 演者らは、6-PGD(6-リン酸グルコネート脱水素酵素)のアイソザイムがラットにおけるキメラのマーカースになりうることを見だし、それによりWistar系ラットを2群に分け、系統を確立した。その結果、2系統間で産子数に差があること、その差は、胚盤胞形成時に生ずるものであり、その要因が卵子側、特に卵細胞質にある可能性が示唆されたことを第79回日本畜産学会で報告した。本研究では、6-PGD アイソザイムをマーカースとしてキメラの作出を試みるとともに、その繁殖性を調べ、6-PGD アイソザイムと繁殖能力との関係についてさらに検討を加えることとした。

〔方法〕 実験には本研究室で累代繁殖している3～8か月齢のWistar系ラットを用いた。ラットの赤血球をデンブengel電気泳動にかけ、その6-PGD アイソザイムによりAとCの2群に分け、それぞれを兄妹交配で維持し、系統を確立した。キメラの作出は胚集合法によった。すなわち、これら2系統をdonorとし、妊娠4日目の13:00～14:00時に放血屠殺した。卵管灌流により8～12細胞期胚を回収し、0.5%アクチナーゼE含有ダルベッコPBS中でその透明帯を除去した。次に0.5 μ g/ml phytohaemagglutinin P含有修正培養液中でAとCの2系統の胚を集合せた。集合胚は、5%牛胎児血清含有修正培養液を用いて、38 $^{\circ}$ C・5%CO₂ in Airのインキュベーター内で培養し、約20時間後、正常に発生したもののみをrecipientへ外科的に移植した。以上の操作により作出したラットの雌を、AまたはC系統の雄と交配させた。その産子数を記録する一方で、産子から採血し、アイソザイムの分離を調べ、排卵卵子の遺伝子型を判定した。雌一頭について1～2産させた後、放血屠殺し、赤血球・大脳・心臓・肝臓・子宮・卵巣を採取した。それらの試料についてデンブengel電気泳動を行い、泳動帯により、各組織が実際に2系統の細胞から構成されているかどうかを確かめた。

また、2系統間でハイブリッドを作出し、その雌とハイブリッド、AまたはC系統の雄を交配させた。そ

これらの産子数を記録する一方、産子におけるアイソザイムの分離を調べ、キメラの場合と比較した。

〔結果〕 作出した 206個の集合胚のうち、127個が胚盤胞・拡張胚盤胞へと発生し、移植の結果、20匹の産子 (雄10, 雌10) を得た。離乳以降まで成長したのは17匹 (雄7, 雌10) であり、このうち実験期間中に成熟した雌8匹について繁殖試験を行った。最終的に8匹の各組織を分析した結果、6匹が2系統の細胞から構成されているキメラであった。これら6匹のキメラは2系統の細胞が比較的均等に分布しており、このうち3匹は生殖細胞もキメラ状になっていた。6匹のキメラの繁殖成績を表1に示した。キメラ×Aはキメラ×Cよりも低い産子数を示す傾向があった。一方、ハイブリッド雌はいずれの交配でも良好な産子数を示した。産子におけるアイソザイムの分離から、キメラ由来のA胚 (遺伝子型 A/A) は発生能が低いが、ハイブリッド由来のA胚は正常な発生能を有することが示唆された。キメラの卵巢は2系統の細胞から構成されていたので、キメラ由来のA卵子はC系統卵胞細胞由来の卵細胞質を含有していたはずである。それにもかかわらず発生能の上昇が見られなかったことは、卵子の成長・成熟期間中に合成された卵細胞質に低発生能の原因があることを示唆している。

表1 キメラ, ハイブリッド (AC) の繁殖成績

♀ × ♂	平均産子数 ($m \pm S D$)	アイソザイムの分離		
		A (A/A)	AC (A/C)	C (C/C)
キメラ × A (5)*	9.4±2.9	3	7	10
× C (6)	11.5±1.6		4	7
AC × AC (8)	10.6±1.8	1	6	2
× A (5)	12.0±1.8	1	5	3
× C (4)	11.8±1.3		1	8

*分娩例数

主要文献

- (1) 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. は乳卵研誌, 2, 123-146.
 (2) Schultz, R.N., Letourneau, G.E. & Wassarman, P.M. (1979) Program of early development in the mammal. Develop. Biol., 73, 120-133.

(科研費 一般研究A 60440019)

簡単な組成の生理的塩類溶液での前培養による
ヤギ精子の先体反応誘起

Induction of the acrosome reaction in goat spermatozoa
by preincubation in a simple physiological salt solution

楠 比呂志、加藤 征史郎*、苅田 淳*

Hiroshi Kusunoki, Seishiro Kato* and Sunao Kanda*

神戸大学自然科学研究科、*農学部

The Graduate School of Science and Technology,

*Faculty of Agriculture,

Kobe University

目的：先体反応は精子が受精を完遂するための必須条件である。In vitroでほ乳動物精子の先体反応を誘起する場合に通常用いられる媒液には、陽イオンとして Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} および Mg^{2+} 、陰イオンとして Cl^- 、 SO_4^{2-} および PO_4^{3-} 、代謝基質としてグルコース、ピルビン酸および乳酸、緩衝剤として重炭酸塩やHEPESが含まれている。また、そのほかに不活化血清や血清アルブミンなどが含まれる場合もある。 Ca^{2+} が先体反応誘起に必要不可欠であることはよく知られているが¹⁾、その他の成分と先体反応との関係についてはあまり調べられていない。最近、我々²⁾は、ヤギ射出精子のin vitroでの有効な先体反応誘起方法として39.5°Cでの密封ガラス管内前培養法を報告した。そして、この方法を用いて、ヤギ射出精子の先体反応誘起における媒液中の種々の成分の必要性について調べ、ウシ血清アルブミンは無効であること³⁾、代謝基質を含まないほうが先体反応がむしろ促進されること²⁾などを明らかにした。今回は、媒液中の陽イオンである K^+ と Mg^{2+} および陰イオンの PO_4^{3-} の必要性について調べた。

方法：雑種雄ヤギ1頭から人工ちつ法により採取した精液を、Table 1に示す生理的塩類溶液を用いて高精子濃度(30~50億精子/ml)の3回洗浄精子浮遊液とし、密封ガラス管内に入れ、39.5°Cで1~3時間前培養した。精子の先体反応誘起の程度はトリバンブルー・ギムザ(TG)染色⁴⁾およびハムスターテスト⁵⁾により調べた。

Table 1. Composition of physiological salt solutions used

Component	K-1	K-2	K-3
NaCl (mM)	120.20	125.00	125.83
KCl (mM)	4.02	-	-
CaCl_2 (mM)	2.25	2.25	2.25
MgCl_2 (mM)	0.52	-	-
NaH_2PO_4 (mM)	0.83	0.83	-
NaHCO_3 (mM)	37.00	37.00	37.00
Phenol red (mg/l)	1.00	1.00	1.00

Table 2. Percentage of acrosome-reacted goat spermatozoa^{a)} and ability of cells to penetrate zona-free hamster eggs^{b)} after preincubation in various physiological salt solutions

Physiological salt solution	Duration of preincubation (hr)	No. of tests	% of acrosome-reacted sperm ^{a)}	No. of eggs penetrated/ no. examined ^{b)} [%]	Average no. of sperm in penetrated eggs ^{b)}
K-1	1	3	2.5	3/33 [9.1]	1.0
	2	5	32.3	36/39 [92.3]	4.1
	3	4	21.2	37/45 [82.2]	3.7
K-2	1	5	0.8	1/52 [1.9]	1.0
	2	5	49.5	80/92 [87.0]	2.1
	3	5	55.2	73/78 [93.6]	4.4
K-3	1	3	1.7	1/28 [3.6]	1.0
	2	5	58.5	32/42 [76.2]	1.7
	3	6	63.0	49/51 [96.1]	2.9

a) Assessed by a trypan blue-Giemsa stain.

b) Assessed by a hamster test.

結果：TG染色により判別された先体反応精子の割合およびハムスターテストの成績はTable 2に示す通りである。K-1、K-2およびK-3のいずれの生理的塩類溶液を用いた場合でも、1時間の前培養では精子の先体反応誘起の程度は低かったが、2および3時間の前培養ではかなり高い先体反応精子率、精子侵入卵子率および平均侵入精子数が得られた。以上の結果から、媒液中における K^+ と Mg^{2+} および PO_4^{3-} の存在は、ヤギ精子の先体反応誘起に対して特に効果がないことが推定され、NaCl、CaCl₂および重炭酸塩だけからなる簡単な組成の生理的塩類溶液中でも先体反応の誘起されることが知られた。

文献

- 1) Yanagimachi, R. & N. Usui, *Exp. Cell Res.*, 89: 161. 1974.
- 2) 楠(比)、阪上(守)、加藤(征)、苅田(淳)、日本畜産学会関西支部報、104: p.23. 1986.
- 3) 楠(比)、阪上(守)、加藤(征)、苅田(淳)、日本アンドロロジー学会第5回学術大会プログラム講演抄録集: p.124. 1986.
- 4) 楠(比)、阪上(守)、加藤(征)、苅田(淳)、第79回日本畜産学会大会要旨集: 印刷中、1987.
- 5) Kato, S., H. Kusunoki, N. Miyake, T. Yasui & S. Kanda, *Jpn. J. Zotech. Sci.*, 56: 62. 1985.

卵の姉妹染色分体交換に対する

EDTAの影響

Effects of EDTA on sister chromatid exchange in ova

齊藤英和, 佐藤文彦, 平山寿雄, 齊藤隆和, 荒木慶彦, 楊 美貴 広井 正彦

Hidekazu SAITO, Fumihiko Sato, Toshio HIRAYAMA, Takakazu SAITO,

Yoshihiko ARAKI, Miki YOH, Masahiko HIROI

山形大学医学部・産科婦人科学教室

Dept. of Ob/Gyn Yamagata University School of Medicine

目的：体外受精-胚移植がヒトに応用されるに至り、体外で卵や胚を培養するより安全な条件が求められるようになった。我々は、以前より発癌性物質や催奇形成物質に敏感に反応する姉妹染色分体交換 (sister chromatid exchange-SCE) を用いて、培養条件の安全性について検討してきた。(1-3) 今回我々は、エチレンジアミンテトラアセチック・アシッド (ethylenediaminetetraacetic acid-EDTA) が重金属やアルカリ土金属とキレート化合物を形成することに着目し、EDTAのマウス初期胚培養にいかなる影響を及ぼすかについて、卵割球数・SCEより検討した。

方法：B6C3F1マウスより2細胞期胚を卵管より採取した。これをウシアルブミン (5mg/ml) プロモデオキシウリジン (300ng/ml) とEDTAを各種濃度 (1mMから1μM) で含むヒト卵管液培養液 (human tubal fluid-HTE) にて、2回のDNA合成期を経るまで培養し、コルセミド (0.04μg/ml) を加えた。2時間後、胚をタルコフスキの方法にてスライドグラフ上に固定した。約24時間、ス

Table 1. Effect of EDTA on blasomere number

concentration	mean	n	SEM
1mM	12.3	80	0.7
100μM	13.1	78	0.5
10μM	12.8	85	0.6
1μM	12.7	84	0.7
control(0M)	12.7	80	0.8

ライドグラスを37℃にて乾燥させた後、フルオ
レスセンス・プラス・ギムザ法にて染色した。
ヘキスト 33258色素 (5μg/ml) にて15分間染
色後、シエレセン緩衝液 (pH 6.8) にて封入し、
40分間ブラックライトを照射し、カバーグラス
を除去後ギムザにて15分染色した。顕微鏡下に
胚あたりの卵割球数、染色体中期像あたりのS

Table 2. Effect of EDTA on SCE number

concentration	mean	n	SEM
1mM	27.4	30	2.3
100 μ M	14.0	34	1.7
10 μ M	13.0	32	2.0
1 μ M	22.0	43	1.3
control(0M)	21.8	41	2.1

C Eの数を観察した。

結果：胚あたりの卵割球数の値は表1に示すように、EDTAの濃度変化で卵割球数の変動は認めなかった。またSECの変化は、表2に示すように、1 μ Mでは対照との間に差を認めないが、10 μ M、100 μ Mでは対照に比較して有意に減少した。また1mMでは、逆にSCEは対照より高値を示した。

考案：我々は以前培養液中の亜鉛濃度が生体内の5%以下であることに着目し、培養液に亜鉛の補充を試みた。しかし体外の培養系においては生体の10%になるように補充しても胚の発育を抑制し、SCEも上昇した。さらに高濃度の亜鉛の補充はSCEをより上昇させ、胚の発育も抑制された。最もよく発育したのは対照、すなわち亜鉛の補充をしない群であり、SCEも最小であった。しかし、培養液を作製すると、いかに製精した水を用いてもある程度の重金属を含有してしまう。亜鉛だけを考えても培養液中には0.01ppm含まれている。今回の研究においては、単にEDTAの卵に対する直接の作用を考えるのではなく、むしろEDTAのキレート作用を含めた胚への影響を観察していることになる。EDTAは、重金属やアルカリ土金属と安定したキレート複合体を形成するために、重金属の卵に対する毒性を除去することができると考えられている。その変化は胚培養時間が短いためか、胚の卵割球数では1mMから1 μ Mの間で変化を認めないものの、敏感なモニタであるSCEで検討すると、その最適濃度は10 μ Mから100 μ Mであり、1mMになるとEDTA自体の毒性か、または微量重金属やアルカリ土金属がキレート複合体を形成し、極度に重金属、アルカリ土金属が減少するためかSCEは上昇した。

よってEDTAは、10 μ Mから100 μ Mの濃度において、姉妹染色分体交換数が減少することにより、染色体の安定化を促し、卵・胚培養により安全な培養条件と成り得るものと考えられた。

主要文献

- 1.Saito H,BergerT,Mishell DR,Jr,MarrsRP(1984):Fertil.Steril 41:460-464
- 2.Saito H,BergerT,Mishell DR,Jr,MarrsRP(1984):Fertil.Steril 41:761-765
- 3.齊藤英和、佐藤文彦、小川哲司、揚 美貴、広井正彦(1986)：受精・着床 '85：88-91

マウスおよびチャイニーズ・ハムスタ-胚盤胞の
染色体分析による性判別法の検討

Sexing of Mouse and Chinese Hamster Embryos by
Chromosomal Analysis

堀内俊孝・大久範幸・石川勇志・高田直和・沼辺孝・

1) 島田昌幸・ 1) 美甘和哉

Toshitaka HORIUCHI, Noriyuki OHISA, Yushi ISHIKAWA,

Naokazu TAKADA, Takashi NUMABE, 1) Masayuki SHIMADA,

1) Kazuya MIKAMO

宮城県畜産試験場・酪農肉牛部

Miyagi-ken Exp. Station of Anim. Sci.

1) 旭川医科大学・生物学教室

Department of Biological Sciences,

Asahikawa Medical College

目的：畜産分野において 特に乳牛では 雌の価値が高いため、人為的に雌雄を生み分ける技術の確立によって得られる利益は非常に大きい。雌雄の生み分け技術のひとつとして 初期胚の染色体分析による方法が検討されているが、技術的な問題などが多く、いまだ その判別率は低い。今回、我々は 牛胚の染色体分析による性判別法を確立する前段階として マウスおよびチャイニーズ・ハムスタ-の胚盤胞とその二分胚を用い 染色体分析による性判別法について検討を加えたので報告する。

方法：ICR系雌マウスにPMSG 7.5iuを皮下注射、48時間後にhCG 10iuを腹腔内注射、次いで 同系成熟雄マウスと同居させ、翌朝ちつ栓を確認した。ちつ栓確認の日をDay1としてDay4の朝 20%非働化仔牛血清加PB1で子宮を灌流し胚盤胞を採取した。一方、チャイニーズ・ハムスタ-は ちつスメアで性周期をチェックし発情前期の日に成熟雄チャイニーズ・ハムスタ-と同居させ 翌朝ちつスメア中の精子で交尾を確認した。交尾を確認した日をDay1として Day5の17:00-18:00に20%非働化胎児血清加Hanksの塩類溶液で子宮を灌流して胚盤胞を採取した。二分胚はバイオ・メス715を用いて作製した。胚盤胞(全胚)および二分胚(半胚)はコルセミド(0.04 μ /ml)添加 Ham's F10で2時間培養、そして マウス全胚は0.4%プロナ-ゼで、チャイニーズ・ハムスタ-全胚は1%トリプシンで透明帯の弱化処理をした。次いで 60%血清で15分間低張処理し、美甘の方法に従って 標本作製し、25倍希釈ギムザ液で染色後、検鏡した。マウス染色体はStich & Hsuの方法に従って性別を判定した。

結果：マウス全胚と半胚の染色体分析の結果は表1に、染色体の核型は図1に示した。分析した38個の全胚と46個の半胚での総核数は 50.7 ± 12.1 、 22.4 ± 8.8 、中期核板をもつ胚数は35個92%、37個80%で 中期核板数 5.5 ± 4.3 、 3.6 ± 2.9 、性判別された胚数27個77%、32個86%であった。チャイニーズ・ハムスタ-全胚と半胚の染色体分析の結果は表2に示した。分析した12個の全胚と38

個の半胚での総核数は 23.3 ± 6.2 , 11.2 ± 3.0 、中期核板をもつ胚数は 10 個83%、24 個63%で、中期核板数 2.8 ± 1.3 , 1.8 ± 1.1 、性別別された胚数 9 個90%、20 個83%であった。

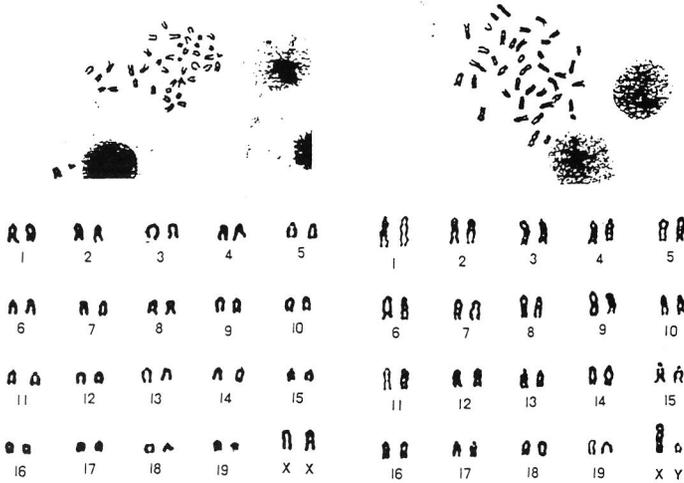


Fig.1, Chromosomal analysis of mouse embryos (left: female, right: male)

Table 1. Sexing of mouse embryos by chromosomal analysis

Embryos	No. of embryos analyzed	Total no. of nuclei	No. (%) of embryos with metaphases	No. of metaphases	No. (%) of embryos sexed
Whole	38	50.7 ± 12.1	35 (92)	5.5 ± 4.3	27 (77)
Half	46	22.4 ± 8.8	37 (80)	3.6 ± 2.9	32 (86)

Table 2. Sexing of chinese hamster embryos by chromosomal analysis

Embryos	No. of embryos analyzed	Total no. of nuclei	No. (%) of embryos with metaphases	No. of metaphases	No. (%) of embryos sexed
Whole	12	23.3 ± 6.2	10 (83)	2.8 ± 1.3	9 (90)
Half	38	11.2 ± 3.0	24 (63)	1.8 ± 1.1	20 (83)

考察：中期核板の存在するマウスおよびチャイニーズ・ハムスタ-胚盤胞・二分胚で 80-90% の性別別が可能で、従来より高い判別率であった。二分胚では中期核板をもつ胚数が減少し 中期核板数も約半減少した。二分胚での性別別率を増加させるためには二分胚の培養条件の改善や細胞分裂を刺激する物質の添加によって、中期核板数を高めることが必要と思われる。

主要文献：1) 美甘和哉・上口勇次郎 (1985) 卵子の染色体標本作製法、“リプロダクション実験マニュアル” 飯塚理八他編，講談社，p82.

2) Stich, H.F. & Hsu, T.H. (1960) Cytological identification of male and female somatic cell in the mouse. Exp. Cell Res., 20, 248-249.

核型分析によるヤギ X、Y 精子の判別
Identification of goat X- and Y-bearing spermatozoa
by karyotype analysis

阪上 守人、楠 比呂志*、加藤 征史郎、苜田 淳

Morito Sakaue, Hiroshi Kusunoki*, Seishiro Kato and Sunao Kanda

神戸大学農学部、*自然科学研究科

Faculty of Agriculture,

*The Graduate School of Science and Technology,

Kobe University

目的：家畜の性支配技術の開発は、産業上非常に大きな意義を有している。ほ乳動物の性支配の方法としては、初期胚の段階で核型分析によってまたはH-Y抗体を利用して判別する方法、およびX精子とY精子を分離した精液を用いて人工授精を行う方法があげられる。前者は多くの動物種で試みられ、ある程度の成果が得られているが、後者についてはヒトで成功例が報告されているにすぎない。その主な理由は、ヒト以外の動物種ではX精子とY精子の判別法が未だ見出されていないことである。近年、Yanagamachiら¹⁾は、透明帯除去ハムスター卵子に侵入したヒト精子で核型分析が可能であると報告した。今回、我々は、Kamiguchi & Mikamo²⁾の方法に準じてヤギ精子の核型分析を行い、X、Y精子の判別を試みたので報告する。

方法：基本培地としては、3 mg/mlのウシ血清アルブミンを含むBrackett & Oliphant³⁾の媒液を用いた。卵子は過排卵処理を施したゴールデンハムスターから採取し、酵素処理によりか粒膜細胞および透明帯を除去した。雑種雄ヤギから人工ちつ法で採取した精液を用い、楠ら⁴⁾の方法により先体反応を誘起したのちハムスター卵子に媒精した。媒精1時間後に卵子を新しい培地に移し、媒精7～8時間後に雌雄両前核の融合および紡錘糸の形成を阻止する目的でポドフィロトキシン(podophyllo-toxin)およびビンブラスチン(vinblastine)をそれぞれ0.04 μ g/mlになるように添加し、さらに培養を続けた。ついで、前核が消失した第一卵割中期の卵子を染色体標本とし、1,000倍の顕微鏡下で観察してFordら⁵⁾の標準核型と比較し、X精子とY精子の判別を行った。

結果：媒精後31～82% (平均64%) の精子侵入卵子率が得られた。そのうちポドフィロトキシンと

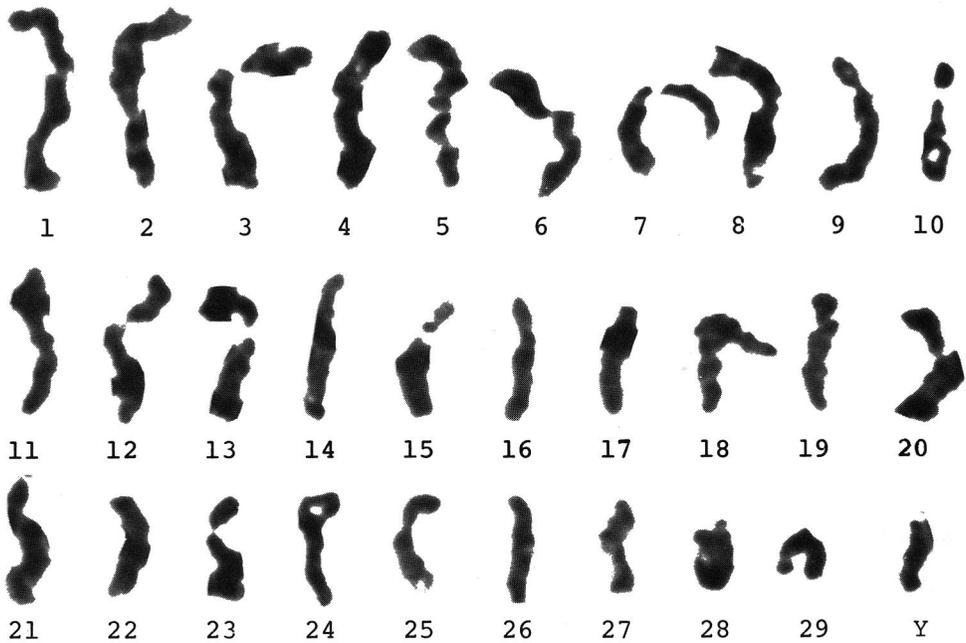


Fig. 1. Karyotype of a goat spermatozoon with Y chromosome

ピンブラスチンとともに培養することにより40~62% (平均50%) の卵子が第一卵割中期に達した。ハムスター卵子核由来およびヤギ精子核由来の核板が明瞭に分かれた標本を観察した結果、Fig. 1に示すようなヤギ精子核由来の染色体像が得られ、X精子とY精子の判別の可能性が示唆された。なお、多精子侵入卵子では、その後の発生能が著しく低下し、一部においては精子が膨化または初期前核の段階で発生を停止した。

文献

- 1) Yanagimachi, R., H. Yanagimachi & B. J. Rogers, *Biol. Reprod.*, 15: 471. 1976.
- 2) Kamiguchi, Y. & K. Mikamo, *Am. J. Hum. Genet.*, 38: 724. 1986.
- 3) Brackett, B. G. & G. Oliphant, *Biol. Reprod.*, 12: 260. 1975.
- 4) 楠(比)、加藤(征)、苅田(淳)、本誌、1987.
- 5) Ford, C. E., D. L. Pollock & I. Gustavsson, *Hereditas*, 92: 145. 1980.

蛋白質無添加培地における

マウス卵子の体外受精

In vitro fertilization of mouse ova in protein-free medium

後藤和文・上野康公・中西喜彦・小川清彦

Kazufumi GOTO, Yasukou UENO, Yoshihiko NAKANISHI and Kiyohiko OGAWA

鹿児島大学農学部家畜繁殖学教室

Lab. of Animal Reproduction, Fac. of Agri., Kagoshima University

目的：哺乳動物卵子の体外受精用培地には各種動物の血清あるいは牛血清アルブミン（BSA）などの蛋白質の添加が必須と考えられている。しかるに、蛋白質の精子あるいは卵子に及ぼす効果、また受精の場での役割については不明である（1）。マウス卵子の体外受精系においても蛋白質の添加がなされている（2-7）。しかし最近、マウス卵子の体外受精および受精卵の胚盤膜までの体外培養系には蛋白質は特に必要でないことがわかった（1）。またマウスの体外受精卵は蛋白質無添加培地内での体外培養でふ化することもわかった（未発表）。そこで本研究では、マウスにおいて、精子の体外での前培養および受精系に蛋白質無添加培地を用い、一般的に用いられている蛋白質添加培地を用いた場合との受精率の比較検討を行った。

方法：供試動物はすべてICR-JCL系成熟マウスで、固形飼料および水を不断給与して飼育したものである。卵子は成熟雌マウス（8-16週齢）にPMSG（5 i u）およびhCG（5 i u）を48時間間隔で腹腔内注射し、hCG注射後15-16時間に屠殺し、卵管膨大部から卵丘細胞に囲まれた卵子塊として取り出し、受精用培地中に導入した。

精子は成熟雄マウス（16-20週齢）を屠殺した後直ちに精巢上部尾部より精子塊として取り出し、流動パラフィン下の精子前培養液（0.4 ml）に導入し、1-2時間、39°C、5 CO₂、95%空気下で前培養した。前培養後、少量の精子懸濁液を卵丘細胞に囲まれた卵子を含む流動パラフィン下の受精培地（0.4 ml）に最終精子濃度が100/μlとなるように添加した。この際本研究においては特に前培養後の精子の活力に注目し、運動が激烈で最活発な前進運動（活力+++、80%以上）を行うもののみを受精系に導入した。精子導入後6時間、上記の条件下で培養後検鏡し、第2極体を放出した卵子の割合をもって受精率とした。

精子の前培養培地には、TYH培地（3）あるいはTYHからBSAを除いた培地 [TYH (-BSA)] を用い、受精用培地には、TYH、TYH (-BSA) あるいはTYH、TYH (-BSA) にEDTA（100 μM）を添加した培地を用いた。なおTYHあるいはTYH (-BSA) のピルビン酸ナトリウムの濃度は0.5 mMに修正（7）したものをを用いた。

結果：精子の前培養および体外受精用に種々の組合せの蛋白質の無添加あるいは添加培地を用いたときの受精率（第2極体放出率）をTable 1に示した。

Table 1. In vitro fertilization of mouse ova from JCL-ICR strain in either protein-free or protein-supplemented medium.

Treatment No.	Medium for preincubation of sperm	Medium for Fertilization	No. of Fertilized ova ¹⁾ /No. of Ova Examined(%)
I (Control)	TYH(-BSA)	TYH(-BSA)	35/48(72.9)
II	TYH(-BSA)	TYH(-BSA) + EDTA	60/78(76.9)
III	TYH(-BSA)	TYH	28/29(96.6**)
IV	TYH(-BSA)	TYH + EDTA	36/44(81.8)
V	TYH	TYH(-BSA)	80/113(70.8)
VI	TYH	TYH(BSA) + EDTA	135/160(84.4)
VII	TYH	TYH	35/41(85.4)
VIII	TYH	TYH + EDTA	53/71(74.6)

** P<0.01 compared to control.

1) No. of ova extruding second polar bodies/No. of ova examined.

精子の前培養培地としてTYH(-BSA)を用い体外受精培地として、TYH(-BSA), TYH(-BSA) + EDTA (100 μM), TYH, TYH + EDTAを用いたときの受精率は各々、72.9 (35/48), 76.9 (60/78), 96.6 (28/29), 81.8 (36/44)%であった。

精子の前培養培地としてTYHを用い、体外受精培地として、TYH(-BSA), TYH(-BSA) + EDTA, TYH, TYH + EDTAを用いたときの受精率は各々、70.8 (80/113), 84.4 (135/160), 85.4 (35/41) および74.6 (53/71)%であった。

考察：マウス精子の前培養培地および卵子の体外受精培地には蛋白質は特に必要がないことがわかった。同様の結果はすでに報告(1)されているが、本実験ではより高い受精率がえられた。これは前培養後の精子の活力に着目し、活力が特に優れている精子のみを受精に供したためと考えられる

主要文献

- Goto K, Takagi Y, Nakanishi Y, Ogawa K (1986): Japan J. Anim. Reprod. 32:48-53.
- Iwamatsu T, Chang M C(1969): Nature 224:919-920.
- Toyoda Y, Yokoyama M, Hoshi T(1971):Japan J. Anim. Reprod. 16:147-151.
- Mukherjee A B(1972): Nature 237:397-398.
- Miyamoto H, Chang M C(1972): J. Reprod. Fert. 30:135-137.
- Hoppe P C, Pitts S(1973): Biol. Reprod. 8:420-426.
- Toyoda Y, Takasugi M (1982): In Genetic Approaches to Developmental neurobiology.(Tsukada Y,ed.) 57-64.

カフェイン添加培地におけるマウス体外受精卵 の補足・過剰精子の出現率

The incidence of supplementary and supernumerary spermatozoa
in the mouse eggs fertilized in caffeine-containing medium

吉沢 緑・野沢えみ子・仲本智之・村松 隆

Midori YOSHIZAWA, Emiko NOZAWA, Satoshi NAKAMOTO, Takashi MURAMATSU

宇都宮大学農学部家畜育種繁殖学教室

Department of Animal Breeding and Reproduction, Faculty of Agriculture, Utsunomiya University

緒言：豊田ら(1971)およびNIWA et al.(1980)は、マウス体外受精卵において、2個以上の侵入精子をもつものが、かなり高率に出現することを報告している。また、MAUDLIN & FRASER(1978)は、マウス体外受精卵においてみられる多倍数体は、多精子侵入によるものがほとんどであるとしている。われわれは、マウス体外受精卵の第1分割期の染色体検索を行なっているが、培地にカフェインを添加すると、多数の精子が侵入した受精卵が多くなることを観察した。しかし、平板化された染色体標本においては、これらの精子の所在、すなわち卵腔内の補足精子か、あるいは卵細胞質内に侵入した過剰精子かを明確に識別することはできなかった。そこで、この両者をまとめて、補足・過剰精子supplementary and supernumerary spermatozoa (以下S.S.S.と略す)とし、その出現率を卵の分割能、多倍数体の出現率との関連においてまとめたので報告する。

方法：豊田らの方法に準じて、以下のように体外受精を行なった。BALB X C57BLのF1成熟雌マウスにPMSGおよびHCGを5IUずつ48時間間隔で腹腔内注射し、HCG注射16時間後に卵管膨大部より卵丘塊に包まれた卵子を取り出し、Jcl:ICR系成熟雄マウスの精巣上体尾部精子(2時間前培養)を用い、精子濃度200/μlとして体外受精を行なった。カフェインは、精子前培養用および媒精用培地に2mMの濃度で添加した。媒精12時間後に第2極体の有無により受精を判定し、受精卵について染色体標本作製した。

結果：S.S.S.を有する受精卵の率はカフェイン添加区で89.7%、無添加区で63.3%であり、前者において有意に高かった。(Table 1.)卵1個あたりのS.S.S.数は添加区において1-86(平均9.7)、無添加区で1-30(平均

Table 1. Incidence of supplementary and supernumerary spermatozoa(S.S.S) in 1-cell mouse eggs fertilized in caffeine-containing and -free media

	Caffeine-containing medium	Caffeine-free medium
No. of eggs examined with S.S.S.	398 357*(89.7%)	390 247*(63.3%)

* P<0.001

3.2)であった。第1分割中期の染色体が観察された卵についてS.S.S.の出現率をみると、添加区89.7%、無添加区65.8%で、添加区の出現率が有意に高かった。(Table 2.)倍数性とS.S.S.の出現率の関連をみると、多倍数体

の出現率は添加区において有意に高い。多倍数体卵におけるS.S.S.の出現率は添加区90.9%、無添加区76.5%であった。(Table 3.)

Table 2. Incidence of supplementary and supernumerary spermatozoa(S.S.S.) in mitotic and un-mitotic 1-cell mouse eggs fertilized in caffeine-containing and -free media

	Caffeine-containing medium	Caffeine-free medium
No. eggs examined	398	390
in mitosis	390	333
with S.S.S.	350*(89.7%)	219*(65.8%)
out of mitosis	8	57
with S.S.S.	7(87.5%)	28(49.1%)

* P<0.001

Table 3. Incidence of polyploidy and supplementary and supernumerary spermatozoa(S.S.S.) in 1-cell mouse eggs fertilized in caffeine-containing and -free media

	Caffeine-containing medium	Caffeine-free medium
No. of eggs in mitosis	390	333
triploid	44*(11.3%)	12
tetraploid	0	4
pentaploid	0	1
triploid with S.S.S.	40 (90.9%)	10 } 13 (76.5%)
tetraploid with S.S.S.	0	3

* P<0.01

考察：島根と村松(1979)は、マウス体内受精卵(第1分割期)におけるS.S.S.の出現率を観察し、過排卵によるマウス卵では6.5%であった。本研究の体外受精カフェイン無添加区では、63.3%で約10倍の出現率である。豊田らは、本研究とほぼ同じ精子濃度で、2時間の前培養を行なった場合には単精子侵入卵は約30%にとどまったと報告し、NIWA et al. も系統によって異なるが、11-73%の卵において2個以上の精子が卵細胞または卵細胞質へ侵入していたと報告している。本研究での無添加区の成績は、これらとほぼ同様であった。しかし、カフェイン添加区の卵は、無添加区に比べS.S.S.を有する卵の率が有意に高かった。また添加区においては第1分割中期卵でも極めて高率にS.S.S.が認められS.S.S.による卵の第1分割への影響はないものと考えられる。マウス体外受精における多精子受精卵の率は、1-29%(NIWA et al.)、あるいは6-9%(豊田ら)と報告されているが、本研究の染色体分析による多倍数体卵の出現率は、無添加区において5.1%と低率であった。同様にマウス体外受精卵の第1分割期の染色体を観察したMAUDLIN & FRASERの成績では、数系統の平均で19.4%という高い値を示している。彼らの用いた精子濃度は、本研究の10倍であり、ここに原因の1つがあると考えられる。

カフェイン添加区においてS.S.S.および多倍数体の出現率が高いのは、カフェインにより精子の運動性および受精能獲得が促進されたため(FRASER, 1979)と考えられる。

主要文献：(1) 豊田 裕、横山峯介、星 冬四郎(1971)：家畜繁殖誌、16、152

(2) NIWA, K., ARAKI, M. & IRITANI, A. (1980)：Biolo.Reprod., 22, 1155

(3) MAUDLIN, I & FRASER, L.R. (1978)：J.Reprod.Fert., 52, 107

(4) 島根 緑・村松 隆(1979)：宇都宮大農学術報告、10、55

(5) FRASER, L.R. (1979)：J.Reprod.Fert., 57, 377

凍結融解マウス卵子の体外受精

およびその後の発生

In vitro fertilization and development of frozen-thawed mouse oocytes

平泉真吾・東貞宏・内藤邦彦・福田芳詔・豊田裕

Shingo Hiraizumi, Sadahiro Azuma, Kunihiro Naito, Yoshinori Fukuda and Yutaka Toyoda

北里大学獣医畜産学部 家畜育種繁殖学教室

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

目的：哺乳動物卵子の凍結保存の研究は、Whittingham がマウス胚の凍結保存に成功して以来急速に発展し、現在ではマウスのみならずウシ、ヤギ、ヒツジなどの家畜でも成功されている。未受精卵子においては、Whittingham によってマウスでの凍結保存が成功して以来凍結条件について研究が続けられている。本研究では、未受精卵子の凍結保存について、1)20%FCSの添加 2)冷却速度3)液体窒素への投入温度について種々の条件で凍結を試み、融解後の体外受精およびその後の発生を検討した。

方法：実験には ICR系成熟マウスを用いた。卵子は、PMSGおよび hCG各 5i.u.を48時間間隔で注射し hCG注射後13時間に卵管膨大部よりヒアルロニダーゼ150 μ /ml を含むPB1 培地内に採取し裸化した凍結用培地は、PB1及び20%FCSを添加した PB1を用いた。耐凍剤は、最終濃度1.5MとなるようにDMSOを室温で添加した。凍結用培地の入った0.25mlストローに卵子を入れ封入し、30分間平衡させ室温から直接-7 $^{\circ}$ Cのアルコールに移し10分間保持し植氷、さらに10分間保持した。凍結は、1分間に 0.5又は 0.3 $^{\circ}$ Cで冷却、-30及び-60 $^{\circ}$ Cで10分間保持し液体窒素中に投入し1~24時間保存した。融解は、37 $^{\circ}$ Cの温水中で30秒間振とによる急速融解法を用いた。DMSOの除去は、0.5M Sucroseを含む PB1に卵子を移し、次いでPB1 で2回洗浄した。さらに TYHに移しそれぞれ10分以上静置後、豊田らの方法に順じ体外受精を行った。授精後6時間にホルマウント標本を作製し、または受精卵と判定されたものを 100 μ MEDTA添加WMに移し 120時間培養を行った。

結果：回収率は、すべての実験区で89.6~98.8%であった。正常卵の割合は冷却速度 0.5 $^{\circ}$ C/minで58.1~67.3%の範囲であり FCSの有無および液体窒素投入温度による差はなかったが、0.3 $^{\circ}$ C/minの

場合は、FCS添加区で74.7%と83.5%であり、無添加区の43.2%と48.6%に対して有意に高い値を示した。受精した卵子の割合は、冷却速度 0.3°C/minの場合、受精卵は得られなかったが、0.5 °C/minの場合、すべての区で受精卵が得られ、とくに FCS添加区が53.6%と44.9%であり無添加区の10.8%と 5.9%より有意に高い受精率を示した (Table 1)。冷却速度 0.5°C/min、20%FCS添加区の受精卵を培養した結果2細胞期への発生率は 34.4 ~47.9%であり、4細胞期への発生率は16.4~26.0%と低下する傾向を示した。4細胞期へ発生した卵子は、ほぼ全てが胚盤胞へ発生した (Table 2)。

Table 1 In vitro fertilization of frozen-thawed mouse oocytes

Cooling rate (C/min)	20%FCS in PBI	Temp(°C) when transferred to -196°C	No. of oocytes		
			recoverd/ frozen(%)	morophologically normal (%)	fertilized/ examined(%)
0.5	+	-30	280/298(94.0)	179(63.9)	96/179(53.6)
	+	-60	205/220(93.2)	138(67.3)	61/136(44.9)
	-	-30	112/125(89.6)	68(60.7)	7/ 65(10.8)
	-	-60	93/100(93.0)	54(58.1)	3/ 51(5.9)
0.3	+	-30	79/ 80(98.8)	59(74.7)	0/ 59(0)
	+	-60	79/ 80(98.8)	66(83.5)	0/ 66(0)
	-	-30	37/ 40(92.5)	16(43.2)	0/ 16(0)
	-	-60	72/ 80(93.0)	35(48.6)	0/ 35(0)

Table 2 Development in culture after in vitro fertilization of frozen-thawed mouse eggs 1)

Temp(°C) when transferred to -196 °C	No. of embryos cultured	No.(%) of embryos developed to :		
		2-cell (24hr) 2)	4-cell (48hr) 2)	Blastocyst (120hr) 2)
-30	96	46(47.9)	25(26.0)	25(26.0)
-60	61	21(34.3)	10(16.4)	9(14.8)

1) Freezing condition:colling rate,0.5°C/min. PBI with 20%FCS.

2) Hours after insemination.

考察：本研究では、未受精卵子の凍結保存は、凍結培地への20%FCS 添加、冷却速度 0.5°C/min液体窒素投入温度-30°Cあるいは-60°Cで良好であり、体外受精により受精卵を得ることが示された。冷却速度 0.3°C/minで受精卵を得ることができず、冷却速度の速い 0.5°C/minで可能であることは、液体窒素に投入するまでの時間が重要であることが考えられる。凍結用培地内での20% FCSの存在は受精およびその後の発生に有効であることが示された。

主要文献

1. Whittingham, D.G., Leibo, S.P. and Mazur, P. (1972): Science, 178:411-414
2. Whittingham, D.G. (1977): J. Reprod. Fert. 49:89-94.
3. 豊田 裕・横山 峯介・星 冬四郎 (1971): 家畜繁殖誌, 16: 59-66

マウスプロラクチンのマウス体外受精および胚発生 に及ぼす影響

The analysis of the effects of prolactin on in vitro
fertilization and embryo development for the mouse

福田愛作, 野田洋一, 森 崇英, *森 千里, *橋本尚詞, *星野一正

Aisaku FUKUDA, Yoichi NODA, Takahide MORI, *Chisato MORI,
*Hisashi HASHIMOTO and *Kazumasa HOSHINO

京都大学医学部婦人科学産科学教室 *解剖学教室第三講座

Department of Gynecology & Obstetrics and *Anatomy, Faculty of
Medicine, Kyoto University

目的: 卵管性不妊症の治療法として開発されたヒト体外受精胚移植法(IVF-ET)は、今や不妊症の治療法の一つとして確立された感がある。プロラクチンについては現在まで主に排卵障害との関係が検討されているが、その卵や精子に与える直接的な影響については殆ど報告はない。そこでヒトIVF-ETを念頭に置き、マウスプロラクチンのマウス体外受精および胚発育への影響を検討した。 **方法:** マウスプロラクチン(PRL)はマウス下垂体の培養液より精製され純化されたものを用いた。培養液にはTYH-280を用い、コントロールにはPRLの含まれないものを、実験群はプロラクチン濃度 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml の3種類とした。培養液はすべてMilli-Q純水製造装置による超純水を用いた。 1. ICR雄の精巣上体尾部精子を採取しその時点での運動率(A)を計測の後、コントロール, PRL 10 ng/ml, 100 ng/ml の培養液中で90分間37°C 5%CO₂ in air で培養し培養後の運動率(B)を計測した。 2. ICR雌に過排卵誘起を行い採卵しPRL非添加培養液の中に入れて置き、ICR雄の精巣上体尾部精子をコントロール, PRL 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml の4種類の培養液中で90分間培養の後、各々の精子を卵の入ったPRL非添加培養液に媒精を行い6時間後に前核により受精の確認を行った。 3. ICR雄の精巣上体尾部精子をPRL非添加培養液中で前培養の後、コントロール, PRL 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml 中の卵に媒精を行い同じく6時間後に受精の判定を行った。 4. ICR雌を過排卵の後同雄と自然交配させ妊娠2日目(腔栓の認められた日を1日目とする)に卵管灌流により後期2細胞期胚を回収しコントロール, PRL 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml 中で培養しExpanded blastocystからHatching blastocystまで観察した。 5. FI(C 57BLXC3H)雌に過排卵誘起を行い採卵しPRL非添加培養液の中に入れて置き、ICR雄の精巣上体尾部精子をコントロールと3種類のPRLを含む培養液中で前培養し媒精した。受精の確認の後、引き続きPRL非添加培養液中で培養しExpanded blastocystからHatching blastocystまで発育を観察した。 6. ICR雄の精巣上体尾部精子をPRL非添加培養液中で前培養の後、コントロール, PRL 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml 中の卵(F1 hybrid)に媒精した。受精の確認の後、引き続き4種類の培養液中で培養しExpanded blastocystからHatching blastocystまで観察した。

Effects of PRL on sperm motility

PRL in medium		Sperm motility Mean ± S.E.M. (No. of Cases)
Prior to incubation		A 77.02 ± 3.20% (15)
After incubation for 90 min.	without PRL	63.25 ± 5.14% (15)
	PRL 10 ng/ml	B 64.25 ± 3.99% (15)
	PRL 100 ng/ml	58.62 ± 4.82% (15)

Table-1

Mouse In Vitro Fertilization : Spermatozoa were preincubated in culture media with different concentration of PRL

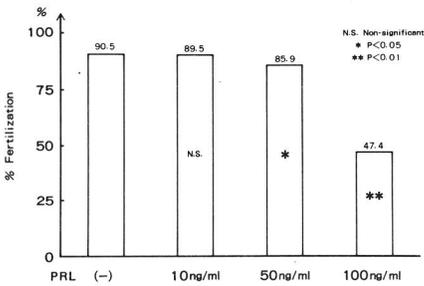


Figure-1

Mouse In Vitro Fertilization : IVF was performed in culture media with different concentrations of PRL

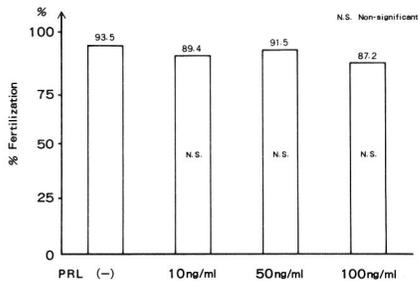


Figure-2

Development of Mouse Late 2-cell Embryos cultured in media with different concentrations of PRL

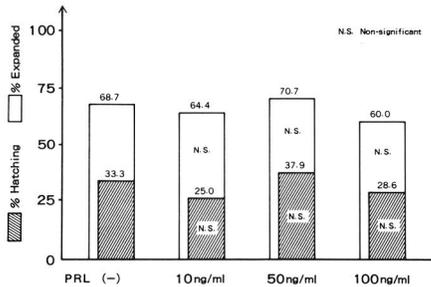


Figure-3

Mouse In Vitro Fertilization and Development of In Vitro Fertilized Eggs Spermatozoa were preincubated with PRL IVF and Culture were performed without PRL

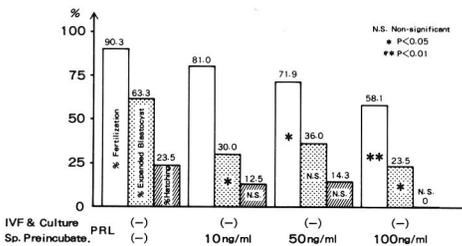


Figure-4

Mouse In Vitro Fertilization and Development of In Vitro Fertilized Eggs IVF and Culture were performed with PRL Spermatozoa were preincubated without PRL

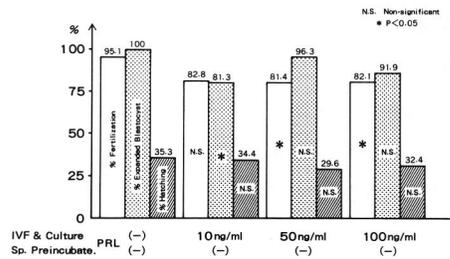


Figure-5

結果：1. 90分間培養後の精子の運動率はコントロールとPRL加培養液との間に有意差は認められなかった (Table-1)。2. PRL 50ng/ml以上の培養液中で前培養された精子では有意に受精が抑制された (Figure-1)。3. コントロールからPRL 100ng/mlまで媒精時のPRL濃度は受精に特に影響を与えなかった (Figure-2)。4. 後期2細胞期胚の発育では% Expanded blastocyst, % Hatching共にPRL濃度による有意な影響は認められなかった (Figure-3)。5. PRL加培養液中で前培養された精子では受精率の抑制 (PRL 50ng/ml以上) と共に % Expanded blastocystも有意に抑制 (PRL 10ng/mlと100ng/ml) された。更に% Hatchingにも抑制傾向が認められた (Figure-4)。6. PRL加培養液中でやや受精率の抑制 (PRL 50ng/ml以上) が認められたが、以後の発育には殆ど影響を与えなかった (Figure-5)。考察：ヒトIVF-ETにおけるPRLの影響については retrospectiveな検討がなされているが一定の結論は未だ得られていない。本実験より、PRLはin vitroでは精子に対しては50ng/ml以上の濃度で前培養された場合にその受精能を抑制することが明らかとなった。一方卵に対しては未受精卵、受精卵共に大きな影響は認められなかった。PRLの精子の受精能抑制の作用機序は全く不明である。しかしPRLが運動能を抑制せずに受精能を抑制していることより、そのcapacitation過程に何らかの影響を与えている可能性も否定できない。今後更に実験を重ね解明されることが待たれる。

- 主要文献： 1. Kohmoto K (1975) : Endocrinol. Japan. 5 : 465 ~ 469.
 2. Kasai K, Minato Y, Toyoda Y (1978) : 1 : 19 ~ 23.
 3. Fukuda A, Noda Y, Tsukui S, Matsumoto H, Yano J, Mori T (1987) : J. Vitro. Fert. Embryo Transfer. 1 : 38 ~ 43.
 4. Azuma K, Yamano S (1985) : Acta. Obst. Gynaec. Jpn. 10 : 2097 ~ 2106.

細胞培養用汎用培地GITによるマウスおよびウサギ胚の培養・凍結および移植試験

Culture and freezing of the mouse and rabbit embryos using GIT

小野寺政一・塩田ゆみ・河野友宏*・角田幸生

Masakazu ONODERA・Yumi SHIODA・Tomohiro KONO*・Yukio TSUNODA

農林水産省畜産試験場 *東京農業大学

National Institute of Animal Industry, *Tokyo University of Agriculture

目的: ほ乳動物初期胚の体外培養成績に及ぼす培地の要因として、水および試薬の純度、BSAあるいは血清のロットや種類および培養液の保存期間などが指摘されている^{1,2)}。

最近開発された市販の細胞培養用汎用培地GITは、使用時にあらたにBSAや血清を添加する必要がなく、またロットによる変動が極めて少ないことや保存性に富むなどの利点があげられている。この培地が初期胚の培養に適用できれば、懸念される培地の要因が少なくなるので有用と考えられる。しかも、この培養液は空気中でもpHが安定なので凍結用培地としての利用価値も十分に考えられる。

そこで本実験では、GITが初期胚の培養および凍結保存に応用できるかどうか、マウスおよびウサギ胚を用いて検討した。

方法: マウスでは、PMSGとhCGで過剰排卵処理後採取した1~8細胞期胚ならびに胚盤胞を、ウサギではFSHとhCG処理³⁾後採取した1細胞期卵をそれぞれ用いた。対照とした培養液は、マウスではM16⁴⁾をウサギでは20%同種非働化血清加M16をそれぞれ用いた。また凍結試験ではPB1⁴⁾を対照とし、宮本ら⁵⁾の方法に若干の修正を加え、プログラムフリーザー(FFP 190, 大阪酸素)を用いて行った。培養および凍結試験によって得られたマウス胚盤胞は、精管結紮雄により偽妊娠を誘起したCD-1系受卵雌の子宮角へ移植した。また、培養によって得られたウサギ桑実胚あるいは胚盤胞は、hCGにより偽妊娠を誘起した同種受卵雌の卵管(hCG後1日目)あるいは子宮角(hCG後3日目)に移植した。

結果: 表1にマウスおよびウサギ胚の培養ならびに移植成績を示した。表から明らかなように、8細胞期以前の胚をGITで培養した場合、胚盤胞への発生率および胎児生産率はM16で得られた成績に比べていずれも有意に低い値を示した($p < 0.001$)。またこの培地では、8細胞期の後期に起こるコンパクション現象に異常が認められた。一方、ウサギ胚ではこのような異常は認められず、胚盤胞への発生率は、血清加M16の成績に匹敵するものであった。また移植試験では、わずかに1例でわあるがGITで培養した胚において生存胎児が観察された。

表1 GITによるマウスおよびウサギ胚の培養ならびに移植成績

動物種	発育段階 (系統)	培養液	培養胚数	胚盤胞数 (%)	移植胚数	生存胎児数 (%)
マウス	1細胞期 (F ₁)	GIT	147	77 (52*)	55	1 (2*)
		M16	109	99 (91)	63	19 (30)
	2細胞期 (F ₁)	GIT	90	71 (79*)	37	5 (14*)
		M16	86	85 (99)	47	27 (57)
	2細胞期 (CD-1)	GIT	167	77 (46*)	48	2 (4*)
		M16	148	118 (80)	63	21 (33)
	8細胞期 (CD-1)	GIT	61	60 (98)	47	10 (21)
		M16	59	58 (98)	43	15 (35)
ウサギ	1細胞期	GIT	100	82 (82)	42	1 (0)
		M16	85	77 (91)	40	0 (0)

* p<0.001

表2 GITを用いたマウス胚の凍結成績

発育段階	培養液	回収胚数	胚盤胞数 (%)	移植胚数	産子数 (%)
2細胞期	GIT	42	0 (0)	—	—
	PB1	40	0 (0)	—	—
8細胞期	GIT	49	43 (88)	15	3 (20)
	PB1	74	63 (85)	25	12 (48)
桑実胚	GIT	34	23 (68*)	10	2 (20)
	PB1	42	37 (88)	18	6 (33)
胚盤胞	GIT	50	24 (48)	18	5 (28)
	PB1	54	29 (54)	24	8 (33)

* p<0.05

次に凍結試験の結果を表2に示した。表から明らかなように、桑実胚をGITで凍結した場合の培養成績以外は、産子生産率を含めてPB1を用いた場合と同様な結果が得られた。

考察：以上の結果より、細胞培養用汎用培地GITはマウス胚の培養には適さないものの、ウサギでは20%血清を加えた場合の成績と同様な結果が得られること、およびマウス胚の凍結に応用できる可能性のあることが示唆された。

(GITを供与いただいた和光純薬工業株式会社に深謝する。)

文 献

- Whittingham, D. G. (1971): J. Reprod. Fert., Suppl. 14:7-21.
- Kane, M. T. (1987): Theriogenology, 27:49-57.
- 角田幸生・入谷明・西川義正 (1978): 日畜会報, 49:89-95
- Whittingham, D. G. (1971): Nature, 233:125-126.
- Miyamoto, H., Miyamoto, Y. and Ishibashi, T. (1986): Jpn. J. Zootech. Sci., 57:250-256.

体外受精に由来する透明帯除去マウス胚の 培養および移植成績について

Viability of zona-free mouse embryos derived
from eggs fertilized in vitro

鈴木宏志・富樫守・宮井達也・岡本道生

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

中外製薬 開発研究所

Drug Development Laboratories, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.

目的：透明帯は、異種間受精および多精子受精の拒否のために働き、さらに着床前の胚の保護作用を担っている。また、マウス胚を用いた研究によって、透明帯は胚の卵管下降に必須な構造物でありコンパクション以前の透明帯除去胚を卵管に移植して産仔を得ることは、困難であることが知られている¹⁻²⁾。透明帯除去胚の発生に関する研究は、透明帯の役割をより明確にし、胚に対する発生工学的操作をより広範囲にする。本実験では、マウス体外受精卵を用い、前核期で透明帯の除去を施した卵子を着床前の全期間を体外培養後、受容雌へ移植し、産仔への発生能について検討した。

方法：卵子および精子提供動物には、(C57BL/6J X C3H/HeN)F1 マウスを用いた。体外受精は、受精用培地としてWhitten's 培地(以下WM)³⁾を用い、その他の操作はすべて豊田ら⁴⁾の方法に従った。授精後6時間に、第2極体の放出および雌雄両前核の認められた卵子を、0.5%プロナーゼを含むWM内で約10分間処理して透明帯を除去した。次いで、透明帯除去卵子を2~3回の洗浄後、流動パラフィンで覆われたテラサキマルチプレート内の20 μ lのWM(P区)およびプラスチックシャーレ内の20 μ l(D-20区)あるいは100 μ lのドロップ(D-100区)に1個ずつ移し、授精後120時間まで培養した。また、対照として、プロナーゼ処理を施さない体外受精卵をP区と同様に培養した。移植は、授精後96時間に発生した胚盤胞を、偽妊娠3日目(膣栓確認日=Day 0)のIVCS系受容雌の子宮角へ注入することにより行った。

結果：各区とも授精後24および48時間には、高率(92-100%)に2および4細胞期に発生した。授精後96時間における胚盤胞への発生率では、P区(58%)が対照区(87%)と比較して有意に低かった($P < 0.05$)が、D-20区(74%)およびD-100区(66%)と対照区との間には差が認められなかった。また、P

区の76個の胚盤胞を8例の受容雌に移植した結果、移植胚の5%に相当する4匹(♀:♂=3:1)の生存産仔が得られた。

Development of zona-free mouse embryos derived from eggs fertilized in vitro after transfer into the uterus of pseudopregnant recipients

No. of embryos ¹⁾ transferred	No. of pregnant/ no. of recipient (%)	No. of implan- tations (%)	No. of new- born(%)
76	5/8(63)	18(24)	4(5)

1) Blastocysts developed in culture for 90 h after removal of zona-pellucida at 6 h after insemination.

考察：前核期から胚盤胞までの着床前の全期間を体外培養後、受容雌の子宮に移植された体外受精¹⁻²⁾に由来する透明帯除去卵子が、産仔への発生能を有していることが明らかになった。これまでの報告と本実験の結果を考え合わせると、受精卵における透明帯は、胚の卵管内の移行に際して、胚の機械的保護や卵管壁への接着、胚同士との融合および割球の分離を防ぐために必要な構造物ではあるが、卵子の発生(卵割)そのものには必須ではないと思われる。

文献

- 1) Bronson, R.A. and McLaren, A. Transfer to the mouse oviduct of eggs with and without the zona-pellucida. J.Reprod.Fert. 22,129-137.(1970)
- 2) Modlinski, J.A. The role of the zona pellucida in the development of mouse eggs in vivo J.Embryol.exp.Morph. 23,539-547.(1970)
- 3) Whitten, W.K. Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro Advan.Biosci. 6,129-141.(1971)
- 4) 豊田裕、横山峯介、星冬四郎 マウス卵子の体外受精に関する研究 I、精巣上体精子による受精成績、家畜繁殖誌 16,147-151.(1971)

豚卵胞卵子の体外受精

In vitro fertilization of porcine follicular oocytes

菅原七郎・亀山賢次・橋本伸二・高木優二

半沢康弘・佐々田比呂志・正木淳二

Shichiro SUGAWARA, Kennji KAMEYAMA, Shinnji HASHIMOTO, Yuji TAKAGI

Yasuhiro HANZAWA, Hiroshi SASADA, Junji MASAKI

東北大学農学部家畜繁殖学教室

Lab. of Anim. Reprod. Fac. of Agric., Tohoku Univ.

目的：豚の体外受精に関する研究は内外で行われており、イギリス¹⁾と日本²⁾では例数は少ないが体外受精卵から産子が得られている。しかし、方法論的に完全に確立されたとは言えず、受精卵子の発生率や培養条件などの点でまだ改善されることが必要である。

演者らは、豚で内視鏡法により受精卵子の移植技術法の確立を前提として成熟卵胞卵子の採取法を試みてきた。また、屠場材料（卵巣）の卵胞卵子を成熟培養して、それら卵子の体外受精法について検討してきた。

今回は卵子の採取条件による受精と発生率との関係を知る目的で、成熟培養した屠場材料の卵胞卵子、過排卵処理し、hCG投与後の採卵時間の異なる卵胞卵子、および排卵卵などについて、体外受精後の発生を比較したので報告する。

材料と方法：卵子の採取：a)屠場材料：市屠場で屠体の内臓除去時に卵巣を取り、30℃に保温したジャーに入れ、研究室に持ち帰った。直ちに、卵巣を滅菌食塩水で洗浄した後、直径2-5mmの卵胞から注射筒で吸引して卵胞卵子を得た。b)内視鏡法による成熟卵胞卵子の採取：過排卵処理（1,000I.U.のPMSGを筋注して72時間後に500I.U.のhCGを投与）した6か月齢の未経産豚（LW）を用い、hCG投与後36-40時間目に既法³⁾に従って卵胞卵子を採取した。

体外受精法：a)精子の前処理：実験の前日に採取した新鮮精液を遠心（1200rpm, 5分間）して精子を分離した後、PBSで2回洗浄して、受精能獲得用培養液（TCM-199 100mlに10mgピルビン酸、90mg乳酸、55mgグルコース、12ml FCSを添加し、pH=7.8に調整、Cheng&Polge 1983）に洗浄精子（ 2×10^8 /ml）を移し、CO₂インキュベーター中で37℃、4-6時間培養した。b)卵子の前処理：屠場卵巣から採取した卵胞卵子は培養液で2回洗浄した後、成熟用培養（Ham's F12 or TCM-199に20%のFCSを添加）に移し、28時間培養し、成熟させた。採取した成熟卵胞卵子はpHを7.4に調整した精子の前培養液に移し、3-5時間培養した。c)媒精と授精培養：上述の如く、前処理したそれぞれの卵子を授精用培養液（精子前培養液pH=7.4）に移した後、受精能獲得処理した精子（ 2×10^6 /ml）を20μl加えて、15-20時間培養した。d)受精卵子の培養：媒精後上記時間帯で機械的に可能な限り、顆粒層細胞を除去し、培養液（BMOC-3）で2回洗浄した後、培養液に移し培養した。

結果と考察：表1は各採取法による卵胞卵子の体外受精後の成績を示した。成熟培養した屠場卵巣の卵胞卵子では媒精後8細胞期まで13.3%発生した。他方、過排卵処理卵巣の卵胞卵子のうち、hCG投与後40時間目のものでは2、4、8細胞期まで発生した割合が最も高く、それぞれ52.4、28.6、9.5%であり、そのうち2個が桑実期に達した。hCG投与後37時間で内視鏡により採取した卵胞内卵子では1/14が8細胞期まで発生した。

これらの結果から屠場卵巣内卵胞卵子のうち適切な条件下で成熟培養し、成熟完了したものは体外受精することにより正常に発生し得ると言える。また、卵胞卵子の体外受精後の発性能はhCG投与後の採取する時間帯と密接に関係していることが示唆された。それらは今後検討によって明確にされる必要がある。

Table 1. In vitro fertilization and subsequent development of porcine oocytes

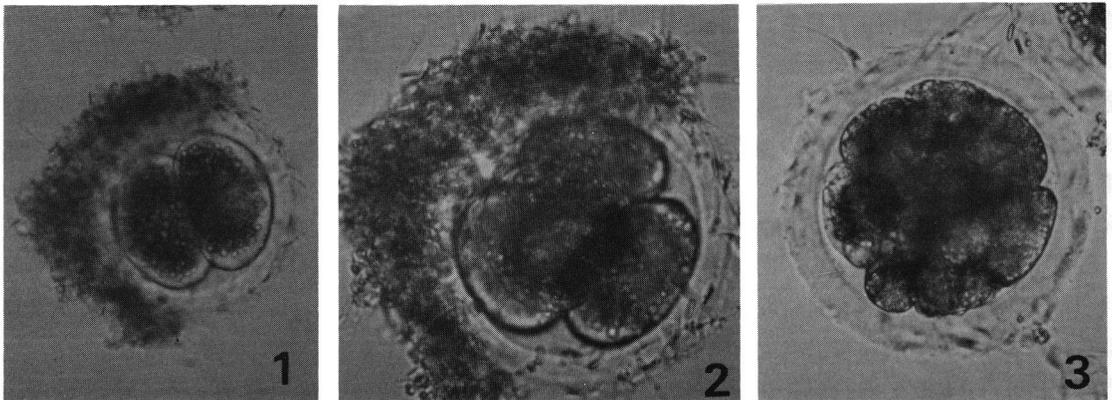
Sources of oocytes	No. of oocytes	Cleavage stage of oocytes fertilized in vitro (%)			
		2-cell	4-cell	8-cell	Morula
ovaries from abattoir	15	5(33.3)	4(26.7)	2(13.3)	0
ovaries 37h after hCG	14	1(7.1)	1(7.1)	1(7.1)	0
ovaries 40h after hCG	21	11(52.4)	6(28.6)	2(9.5)	2(9.5)
oviducts	9	1(11.1)	1(11.1)	1(11.1)	1(11.1)

主要文献

- 1) Cheng, W. T. K. & C. Polge (1983) ARC meeting at Northingham. Sept. 29 : abst
- 2) 吉田光敏 他 (1986) 家畜繁殖学会 70大会講演要旨 p22
- 3) 菅原七郎 他 (1985) 哺乳卵研誌 2:27

(科研費 一般研究A 60440019)

Plate. Porcine embryos from in vitro fertilization



豚体外成熟卵の雄性前核形成能に及ぼす
豚卵胞液の効果

The effects of porcine follicular fluid
on male pronucleus formation
in pig oocytes matured in vitro

内藤邦彦 浜野晴三 金田光稔 石坂 篤
鈴木 真 福田芳詔 豊田 裕

Kunihiko NAITO Seizo HAMANO Mitsunori KANEDA
Atsushi ISHIZAKA Makoto SUZUKI
Yoshinori FUKUDA and Yutaka TOYODA

北里大学獣医畜産学部家畜育種繁殖学教室

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

目的：哺乳類の未成熟卵は体外培養により成熟し、いくつかの種では体外受精によって受精が完了することが確認されている。しかし、豚においては Motlik&Fulka が卵子内への精子の侵入は可能であるが精子頭は膨潤せず、雄性前核形成率が低いことを報告しており (1)、卵細胞質の成熟が不十分であることを想像させる。生体内では未成熟卵は卵胞液中で成熟を達成しており、卵胞液は卵子成熟にとって好適な環境であると考えられるが、これまで卵胞液については卵子成熟分裂再開の抑制作用に注目が集められ(2,3) 卵細胞質の成熟に対する作用は十分検討されていない。そこで本実験では、豚未成熟卵の体外成熟培養に豚卵胞液を使用し、体外受精後の雄性前核形成率を調べた。さらに生体内において卵子成熟に影響を及ぼすと考えられるゴナドトロピンの効果についても併せて探った。

方法：卵子は屠場より入手した未成熟豚の卵巣（卵胞直径2～5mm）より採取し、直ちに48時間の体外成熟培養を行った。培養液は豊田らのマウス体外受精用培地（TYH）を基礎培地とし、これに直径2～5mmの卵胞より採集した豚卵胞液（pFF）を5、25、50%加えたもの、及び100% pFFを使用した。なお培養液にはFSH（0.01AU μ g/ml）、hCG（10IU/ml）の一方又は両者を適宜加えた（Table 1）。体外成熟培養終了後、卵子は2mMカフェインを含むTYH中で体外受精させた。精子は本大学付属牧場の種雄豚より採取し、本研究室で開発した高濃度処理（4）を施して受精能獲得を誘起した後受精に供した。卵子は媒精後20時間で染色標本とし観察した。第二成熟分裂中期以降に達したものを成熟卵、卵細胞質内に二個以上の前核が存在するものを雄性前核形成卵とした。

結果：実験結果は Table 1 に示した。成熟率はゴナドトロピン（GTH）を加えない100%pFFで54.9%と他のすべての区に対し有意に低い値であった。これ以外の区ではほぼ80%台の値を示し、有意差はなかった。雄性前核形成率はTYHのみを培養液とした時35.6%であった。これにGTHを加えた結果、FSH添加区で有意な低下がみられたが、hCG添加区、FSH+hCG添加区ではTYHのみと

有意差はなく、雄性前核形成率を改善することはできなかった。これに対し、TYHにpFFを加えた結果、この率はFSH存在下でpFFの濃度の上昇とともに高まり、100%pFF (FSH添加区) では85.2%と最も高い値が得られた。100%pFFを使用したものについてFSH添加区はGTH無添加、hCG添加両区より有意に高い値であった。

考察：豚卵胞液で未成熟卵を成熟培養した結果、卵子成熟は抑制され、GTHを加えることによってpFFのこの作用が打ち消された。これは卵子成熟に対するpFFの影響を示した以前の報告を支持するものである(2,3)。雄性前核形成率はTYH中で成熟培養した場合30%台と低率であり、本培養系では卵細胞質の成熟が不十分であると考えられた。この雄性前核形成率はMotlik&FulkaがBSA、ピルビン酸、グルコースを含む塩類溶液中で成熟培養を行った時の値とよく一致している(1)。TYHにGTHを加えたが、雄性前核形成率を改善することはできなかった。一方、成熟培養液にpFFを加えた結果、この率はpFFの用量に依存して上昇し、FSHを添加した100%pFFで最も高い値が得られた。これはpFFに雄性前核形成能を促進する作用があることを示すものであり、さらに、pFFの作用はFSHにより増強されることを示唆している。

Table 1. Effect of pFF and GTH on in vitro maturation of pig oocytes

Maturation medium	GTH ^a	No.oocytes examined	No.oocytes matured(%)	No.oocytes sperm penetrated	No.oocytes male PN developed(% ^b)
TYH	—	219	175(79.9)	104	37(35.6)
	FSH	235	194(82.6)	115	17(14.8)
	hCG	88	72(81.8)	27	11(40.7)
	FSH+hCG	99	81(81.8)	55	17(30.9)
pFF 5%	FSH	165	133(80.6)	77	50(64.9)
	FSH	175	142(81.8)	92	67(72.8)
	FSH	107	94(87.9)	46	36(78.3)
100%	—	173	95(54.9)	41	25(61.0)
	FSH	276	240(87.0)	116	99(85.2)
	hCG	67	57(85.1)	38	27(71.1)
	FSH+hCG	72	63(87.5)	30	24(80.0)

a)FSH(0.01AU/ml),hCG(10IU/ml)

b)No.oocytes male PN developed/No.oocytes sperme penetrated

主要文献

- 1.Motlik J,Fulka J (1974):J.Reprod.Fert.36:235-237
- 2.Moor R M,Trounson A O (1977):J.Reprod.Fert.49:101-109
- 3.Tsafiriri A,Dekel N,Bar-Ami S (1982):J.Reprod.Fert.64:541-551
4. 浜野晴三, 豊田 裕 (1987): 家畜繁殖誌 32: (accepted)

豚凍結精子による卵胞卵の体外受精

In vitro fertilization of pig follicular oocytes
by frozen boar spermatozoa

永井 卓・榊田博司・岩崎説雄 *・福島護之 **・花田 章

Takashi Nagai, Hiroshi Masuda, Setsuo Iwasaki *, Moriyuki Fukushima **
and Akira Hanada

農林水産省畜産試験場 *東京農業大学 **兵庫県畜産試験場
National Institute of Animal Industry

目的：豚の体外受精用の精子には、体外でのインキュベーションによって受精能を獲得させた精巣上体および射出精子が用いられている(1,2)。しかし、精巣上体精子は室温では1,2日しか保存できず、射出精子は採取する日によって受精率が異なることがある。常に同じ受精率が期待できる体外受精系の確立およびその繁殖技術への応用には、精液を凍結保存して同じ性質を示す精液をくり返し使用できるようにする必要がある。また、凍結精子を用いれば、毎回射出精液を採取しなくてすむ。実際に、牛の体外受精では既に凍結融解精子が使われている(3,4)。しかし、豚の場合、凍結精子を用いた体外受精についての報告はない。そこで本研究では、凍結融解した射出および精巣上体精子をChengらの方法(2)で処理し、授精後の卵胞卵への精子侵入の有無によって、この方法が凍結精子にも有効であるかどうかを検討した。

方法：卵胞卵は、ト場で採取した未経産豚卵巢の直径2-5mmの卵胞から回収した。コンパクトな卵丘細胞に包まれた卵胞卵を、TCM199液(25mM HEPES, 10%去勢豚血清, LH 10 μ g/ml, E2 1 μ g/ml, 抗生物質を含む)に入れて39 $^{\circ}$ Cの炭酸ガス培養器内で約32時間成熟培養して受精試験に供した。精子は、ト場で採取した精巣上体尾部から回収した精巣上体精子(4頭 A, B, C, D)および射出精子(3頭)を用いた。ベレット法(5)で凍結した精液を37 $^{\circ}$ CのPBS液中で融解した後、Chengらの方法(2)で処理し、炭酸ガス培養器内で4時間前培養した。体外成熟卵胞卵を受精用のB.0液(2mM カフェイン, BSA 10mg/ml添加)に移し、前培養後の精子を2400万/mlの精子濃度で加え授精した。つぎに、卵胞卵に侵入することが明らかになった凍結融解精巣上体精子Aを2,4および6時間前培養し、精子侵入に及ぼす前培養時間の影響について調べた。また、4時間前培養区においてカフェインを0, 2 および10mM含むB.0液内で授精し、カフェイン濃度の影響を調べた。この時、カフェイン濃度2mMの区において授精時の精子濃度を200 および2400万/mlにした。全ての卵子は授精後約12-16時間で固定し、脱脂染色後に、位相差顕微鏡下で精子侵入の有無を調べた。

Table.1 Penetration of pig follicular oocytes in vitro by frozen boar epididymal spermatozoa preincubated in a defined medium

Duration of preincubation (h)	No. of oocytes maturing to M-II at examination	No. of oocytes penetrated			No. of monospermic oocytes (%)*
		Total (%)	with enlarged sperm head(s)	with both pronuclei (%)*	
2	34	6(18) ^a	2	4(67)	3(50)
4	51	21(41) ^b	9	12(57)	20(95)
6	40	5(13) ^a	4	1(20)	3(60)

* Percentage of oocytes penetrated. (P<.05)

結果：凍結融解精巢上体精子A,B,Cは卵胞卵に侵入し、精子侵入卵率は、それぞれ40,40および13%であった。しかし、射出精子および精巢上体精子Dでは精子侵入卵を得ることはできなかった。表1に示すように、精巢上体精子Aは、4時間前培養した場合に高い (P<.05)精子侵入卵率 (41%) を示した。単精子侵入卵率は95%と高く、雌雄両前核形成卵率は57%であった。また、受精培地にカフェインを含まない場合、精子は卵胞卵に侵入不能であったが、カフェイン濃度が2mMおよび10mMの場合に精子侵入卵率は38%であった。授精時の精子濃度を200万/mlにした場合、精子侵入卵率は28%の低い値を示した(P<.05)。

考察：Chengらの方法(2)で処理した凍結融解精巢上体精子の卵胞卵への精子侵入率は、41%であったが、単精子侵入卵率および雌雄前核形成卵率は高く、正常受精卵が多く得られた。従って、この方法は凍結融解精巢上体精子の受精能獲得に有効であることが判明した。射出精子が卵胞卵に侵入不可能な理由として、前培養後の極端な運動性の低下が考えられる。しかし、精巢上体精子Dは授精時に活発な運動性を示したにもかかわらず、卵胞卵に侵入不可能であった。カフェインは、卵胞卵への精子侵入に有効であることが明らかになったが、その濃度が2mMと10mMの場合に同様の精子侵入卵率が得られたことから、さらに高い濃度について検討すべきである。

主要文献

1. Nagai T, Niwa K, Iritani A (1984): J. Reprod. Fert. 70:271-275.
2. Cheng W T K, Moor R M, Polge C (1986): Theriogenology. 25:146.
3. 花田 章 (1985): 計測と制御. 24:953
4. Parrish J J, Susko-Parrish J L, Leibried-rutledge M L, Critser E S, Eyestone W H, First N L (1986): Theriogenology. 25:591-600.
5. 副島明彦・榊田博司・和出 靖・松川善昌 (1983): 人工授精研誌. 5:6-8.

卵丘細胞によって区分した牛未成熟卵胞卵子の
体外受精後の発生能

In vitro fertilization and cleavage abilities of bovine oocytes
classified by cumulus cells and matured in vitro.

塩谷康生・桑山正成*・福島護之**・岩崎説雄***・花田 章

Yasuo SHIOYA, Masashige KUWAYAMA, Moriyuki FUKUSHIMA, Setuo IWASAKI
and Akira HANADA.

農林水産省畜産試験場 *：協同飼料（株） **：兵庫県立畜産試験場 ***：東京農業大学
National Institute of Animal Industry

目的：体外成熟卵子を体外受精によって発生させ、それによって得た牛胚盤胞が正常な子牛に発育することが報告された¹⁾。このような体外成熟卵子は屠場で得られる卵巣の小卵胞から吸引採取される。吸引卵子には緊密な卵丘細胞層を保有する卵子（Aランク）、卵丘の一部（Bランク）または全部（裸化あるいはCランク）が剝離している卵子あるいは膨潤の様を呈するクモの巣状の卵丘に包まれる卵子（Dランク）などがある。これらの卵子の比率はAランクが57.2%、Bランクが9.6%、Dランクが25.7%、Cランクが7.5%であった²⁾。今回、卵巣より吸引採取時点での卵子を卵丘細胞層の保有状況によって区分し、体外成熟、体外受精に供し、発生率を調べたので報告する。

方法：供試した卵子は既に報告^{2,3)}したように、屠場で得た卵巣から注射器で吸引採取した。採取後、実体顕微鏡下で、卵丘細胞層の付着状況によって、A：厚くかつ緊密な卵丘細胞層を保有する卵子、B：保有している卵丘細胞層が薄い卵子及び一部だけでなく大部分の卵丘細胞層が剝離している卵子、C：卵丘細胞層を欠く裸化卵子に区分した。その後25mM HEPES緩衝 TCM 199を主体にする成熟用培養液で22時間、庫温を39℃に設定した炭酸ガス培養器内で培養した。

体外受精には1頭の種雄牛の凍結精子を既報⁴⁾によって処理して用いた。媒精6時間後に発生用培養液に卵子を移した。発生用には去勢牛血清を10%加えた25mM HEPES緩衝TCM199に乳酸ナトリウム（60%シロップ）3.7 μ l/mlとビルビン酸ナトリウム55mg/Lを加えた培養液を用いた。媒精16～18時間後に卵子の一部を抜き取り精子侵入状況を検査した。その際、GV期や染色体の分散が異常の卵子は変性あるいは異常卵子とするとともに侵入精子数や雌雄前核の形成状況を調べた。残る卵子は40時間後に卵丘細胞層を除去あるいはそのまま実体顕微鏡下で検査して分割状況を調べた。

結果及び考察：抜き取り検査の結果によれば、受精途上卵及び第2成熟分裂中期の卵子を合わせた成熟卵子は厚くかつ緊密な卵丘細胞層を保有する卵子（A）と部分的にしか卵丘細胞層を保有していな

い卵子 (B") では97.4% あるいは89.8%であったが、卵丘細胞層を欠く卵子 (C) では52.9% と半分であった。またCランクでは残る半数は第1成熟分裂中期あるいは異常な卵子であった。また、成熟卵子に占める受精卵はA、B" ランクで85% 以上であったが、Cランクでは53.3% と低かった。受精卵 (精子侵入あるいは受精途上卵) の状況はAランクの卵では多精子侵入卵を除き、すべて正常な受精卵であった (29/33)が、B" ランクあるいはCランクでは正常受精卵は65/91 あるいは7/24と減少し、雄性前核形成遅延卵が増加した。これらの実験においては各ランク付けされた卵子の媒精に用いた精子は同一時に処理されたものであるから、この雄性前核形成遅延は精子よりはむしろ卵子側の要因によるものと解される。卵丘細胞層を部分的に保有している卵子は体外培養によって成熟し、受精することは明らかである。このことは精子の受精能検査などには卵丘細胞層を欠く裸化卵子でない限り、供試可能であることを示している。

各ランク付けされた卵子の体外受精後の発生能はAランクでは63.7% が2細胞期以上に発生したが、B" ランクでは29.5%、Cランクでは17.7% といずれも低い発生率であった。発生用の培養液を比較検討したり、胚盤胞以上に発育させることを目的に試験を行う場合には卵丘細胞層が厚くかつ緊密に保有する卵子を選択することが重要である。

In vitro fertilization and cleavage abilities of bovine oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro.

	Cumulus-oocytes complexes		
	with thick and compact cumulus	with samll part of cumulus	denuded
Number of oocytes	39	118	85
matured (unfertilized) o.	5	15	21
matured (fertilized*) o.	33	91	24
fertilization rate*	33/38 (86.8%)	91/106 (85.8%)	24/45 (53.3%)
male and female pronuclei	29	65	7
polyspermy	4	13	0
delayed male pronucleus	0	10	16
both pronuclei delayed	0	0	1
digny	0	3	0
unmatured or abnormal o.	1	12	40
Number of oocytes	364	122	158
No. of cleaved oocytes	232 (63.7%)	36 (29.5%)	28 (17.7%)

*:undergoing fertilization

- 1)花田 章・塩谷康生・鈴木達行: 体外成熟卵子の体外受精により得られた牛胚の非外科的移植による受胎出産例、第78回日本畜産学会大会講要、1986
- 2)花田 章・坂本恭一・塩谷康生・小林 仁: 牛体外成熟卵子の体外受精における二、三の知見、第77回日本畜産学会大会講要、1984.
- 3)花田 章: 家畜とくにウシの体外受精、計測と制御、Vol.24,p.953,1985.
- 4)桑山正成・塩谷康生・上田修二・大田 均・齊藤秀一・花田 章: 屠場で吸引採取した牛卵胞卵子の体外受精後の発生能、第70回家畜繁殖学会、1986.

体外受精由来ウシ2細胞期胚の染色体分析

Chromosomal analysis of bovine 2-cell embryos fertilized in vitro

岩崎説雄・塩谷康生*・桑山正成**・福島護之***・花田章*・中原達夫

Setsuo IWASAKI, Yasuo SHIOYA, Masashige KUWAYAMA, Moriyuki FUKUSHIMA,
Akira HANADA and Tatsuo NAKAHARA

東京農大総研*・農水省畜試**協同飼料(株)*** 兵庫畜試

Tokyo University of Agriculture

目的：ほ乳動物初期胚の染色体に関する研究は、主にマウスを中心として早期性判別や着床前胚死亡と関連した染色体異常(1) などについて行われている。しかし家畜、特にウシの初期胚の染色体に関する報告は少なく、胚移植に関連した性判別としての桑実期または胚盤胞期胚の分析がほとんどである(2)。一方、近年XY精子の分離による性制御の試みが行われ、ヒトではPercollを用いて分離が可能であることが報告されている(3)。ウシにおいても性制御が可能となれば産業上重要な価値をもつと考えられるが、性判別には出生まで長期間を要することから、早期性判別法の開発が望まれる。その一つとしてハムスター卵子へウシ精子を侵入させ、雄性前核の染色体検査により精子の性判別を行うことが試みられているが(4)、この方法ではその後の胚の正常性等を調べることは不可能である。また桑実期以前の胚の染色体分析は未だ確立されていないのが現状である。我々はすでに屠場卵胞卵子を用いた体外受精系を確立し、多数の初期胚を得ることに成功している(5)。そこで体外受精由来の2細胞期胚の染色体分析法を確立するため、空気乾燥法を改良したKamiguchiら(6)の方法に基づき、主に低張処理条件について検討し、性判別を行うとともに胚の染色体構成の正常性を調べた。

方法：屠場で採取した卵巣からの卵胞内卵子の採卵、体外成熟及び体外受精のための精子処理は既報(5)に準じて行い、黒毛和種種雄牛1頭の凍結精液を用いた。媒精の6時間後に卵子を10% ICS 加TCM 199の発生培地に移し、さらに28時間培養した。これによって得られた2細胞期胚を0.08または0.16 $\mu\text{g/ml}$ ビンブラスチン+ポドフィロトキシン、10% ICS 加TCM 199で12時間処理した後、染色体標本作製した。すなわち、0.5%プロナーゼで透明帯を脆弱化し、0.75-1%クエン酸ナトリウムで15-60分間低張処理し、メタノール・酢酸で固定、乾燥後4%ギムザ液で6分間染色した。観察された大型の中部着糸型X染色体及び小型の次中部着糸型Y染色体の構成により性判別を行うとともに、染色体数の異常の有無を観察した。

結果と考察：2細胞期胚 165個のうち、0.08 μ g/ml ビンブラスチン+ポドフィロトキシン処理により分裂中期像がみられたものは69.1%で、薬剤濃度を2倍に上げてても検出率は増加しなかった。

性判別率に及ぼす低張処理条件の影響は、表1に示したように一定の傾向は認められず、総計125個の中期核板像より異常を除く61個で性が判定可能で、性判別率は58.7%だった。しかしながら、染色体像では大きな違いがみられ、クエン酸ナトリウム濃度の低下に伴い細胞質が脆弱化し、染色体は分散した。同時に染色体は細長くなり、収縮または歪みがみられたほか、染色体の間隔が広がり、時にはにじむ傾向がみられた。低張処理時間を短くすると染色体の広がりが抑制され、判別が困難になった。また染色体異常では、特に3倍体が16個(12.7%)と多く検出され、他に2n/4n, 2n+1が各1個(各0.8%)認められた。3倍体の原因は多精子侵入、極体の放出抑制等とされているが、本実験では精子侵入検査の結果から前者の可能性が高いと考えられる。以上の結果から、2細胞期胚の分裂中期像を得るには媒精34時間後 0.08 μ g/ml ビンブラスチン+ポドフィロトキシンで12時間処理し、低張処理は1%クエン酸ナトリウムで60分間行う方法が最適と考えた。

Table 1. Chromosomal analysis of bovine embryos processed by various hypotonic treatments

Sodium citrate		2-cell embryos		Diploid metaphase			Sexing	Anomalies
Conc. (%)	Time (min)	Processed	Analysed	Female	Male	Unsexable	rate (%) *	
1.0	60	84	52	7	18	19	56.8	8
1.0	30	12	8	2	1	2	60.0	3
0.95	60	16	9	3	1	3	57.1	2
0.9	30	23	16	3	4	7	50.0	2
0.9	15	13	13	1	6	5	58.3	1
0.85	60	7	3	0	2	1	66.7	0
0.8	30	6	6	2	2	0	100.0	2
0.8	15	13	11	2	3	5	50.0	1
0.75	60	10	7	2	2	1	80.0	2
Total		184	125	22	39	43	58.7	21

* : No. of male and female/No. of analysed embryos except for anomalies

主要文献

1. Kaufman M H (1973): J. Reprod. Fert. 35: 67-72.
2. Hare WCD, Mitchell D, Betteridge KJ, Eaglesome MD, Randall GCB (1976): Theriogenology 5:243-253.
3. Kaneko S, Yamaguchi J, Kobayashi T, Iizuka R (1983): Fert. Steril. 40: 661-665
4. 浜野光市・立野裕幸・島田昌幸・上口勇次郎・美甘和哉 (1986):第78回日畜大会要旨 27.
5. 花田章 (1985): 計測と制御. 24: 953-958.
6. Kamiguchi Y, Funaki K, Mikamo K (1976): Proc. Japan Acad. 52: 316-319.

体外受精卵卵管内移植の試み

Experience with in vitro fertilization
—embryo tubal replacement (IVF-ETR)

小林善宗 Yoshimune KOBAYASHI 宮川和子 Kazuko MIYAGAWA
本田育子 Ikuko HONDA 井上正人 Masato INOUE
淡路英雄 Hideo AWAJI 藤井明和 Akikazu FUJII
松山毅彦 Takehiko MATSUYAMA

東海大学医学部産婦人科

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

目的：不妊症に対する諸検査の進歩により、不妊原因の詳細が解明される様になった。臨床的には、不妊原因に対する適切な治療法を選択が重要であることはいまでもない。卵管疎通性のある不妊患者に対する配偶子卵管内移植 gamete intra-fallopian transfer (GIFT) も新しい治療法として、各種の難治性不妊に対して有効であることが判った^{1,2}。しかし、GIFTを行っても妊娠しない場合、その不妊原因は受精障害か着床障害と考えられる。われわれは、この様な症例に対して、不妊原因の診断をかねて、体外受精卵卵管内移植 in vitro fertilization-embryo tubal replacement (IVF-ETR) を試み、はじめての妊娠に成功し(第31回日本不妊学会³)、生児を得た。今回、この新しい治療法である IVF-ETR の有効性について検討した。

方法：対象は当科受診中の長期不妊患者で、GIFT 治療無効例22名(S61.1~S62.1)と、2nd lookをかねた2名(S62.1に適応を拡大)を加えた計24名に対して27回のIVF-ETRを行った。対象の24名は、原発性14名、続発性10名で、平均年齢34.3歳(28~39歳)、平均不妊期間9.3年(3~14年)であった。過去に行ったAIH平均回数10.1回(0~42回)、GIFT平均回数1.5回(0~3回)であった。夫側条件は、正常精子16名、乏精子症4名、精子無力症4名であり、zona-freeハムスター卵子を用いた精子受精能力検査(ZSPT)では、ZSPT平均90.7%(56~100%)であった。妻側条件では、正常腹腔6名、卵管周囲癒着6名、子宮内膜症12名(R-AFS分類Ⅰ期9名、Ⅱ期1名、Ⅲ期1名、Ⅳ期1名)であり、いずれも1側の卵管は開存していた。AIH腹腔鏡による卵管内精子輸送検査では、7名に精子輸送障害が存在し、このうち5名には妻側の精子不活化抗体が陽性と認められた。

採卵は、clomid 100mg(月経5日目より5日間投与)又はclomid 100mg(月経2日目より5日間投与)ーHMG 150IU(月経7日目より適時)による刺激周期で、超音波上主席卵胞が20mm程度に発育した時点で入院させ、HCG 5000IU筋注した。HCG注射後36時間で超音波ガイド下に成熟卵子を採取し(平均2.8)、体外受

精を行った。受精卵は、多精子受精卵を除き、採卵後約24時間後に、腹腔鏡を用いて卵管採より約2cm内方の卵管膨大部に注入した。

結果：27回のIVF-ETRにより、8名が妊娠したが、すべて子宮内妊娠であった。对患者妊娠率は33.3%，対施行妊娠率は29.6%で、原発，続発性不妊間では差がなく、年齢・不妊期間でも妊娠・非妊娠群間に差はなかった。妊娠8名では、妊娠初期1名を除く7名のうち5名が妊娠継続し、1名が生児を得て（女兒，2660g），4名は妊娠経過順調である。着床数で見ると、双胎3名を含む11個の胎嚢が確認され、初期2個を除く9個の胎嚢のうち胎児心拍動確認は6個で、胎児発育は5個であった。

夫側条件による妊娠率は、正常精子群25%（4/16），乏精子症群75%（3/4），精子無力症群25%（1/4）であった。妻側条件による妊娠率は、正常腹腔0%（0/6），卵管周囲癒着33%（2/6），子宮内膜症50%（Ⅰ期4名，Ⅱ期1名，Ⅳ期1名妊娠）であった。卵管内精子輸送検査条件による妊娠率では、輸送障害群で57%（4/7）と、輸送障害のない群（18%；3/17）に比べて高かった。また妻側精子不動化抗体陽性症例5名では3名（60%）に妊娠が成立した。

27回のIVF-ETRで、75個（平均2.8）の成熟卵子が採取され、72個（平均2.7）が受精したが（受精率96%）3個は多精子受精卵であった。69個の移植受精卵のうち15個に変形が観察され、移植正常受精卵54個（平均2.0）に対する着床率は20.4%であった。

考察：妊娠成立には、配偶子が受精の場へ到達することが必須条件であるが、GIFTの場合は、この過程に対する治療法である。実際、卵管内精子輸送障害症例あるいは卵子pick up障害症例に対しては高い妊娠率が得られている²。一方、IVF-ETRでは、卵管内精子輸送障害症例で57%，子宮内膜症症例で50%と高い妊娠率が得られた。IVF-ETRを行った卵管内輸送障害症例がすべてGIFT無効例であることから、これらの不妊原因が卵管内受精障害である可能性が強く示唆された。同様に、IVF-ETR施行の子宮内膜症例が、内膜症諸治療後の難治例でありしかもGIFT無効例であることから、難治性子宮内膜症の不妊原因が卵管内受精障害である可能性も示唆された。

IVF-ETRは、同時に受精障害か着床障害かの診断が可能であるばかりでなく、GIFT無効症例に対する新たな治療法として有効であった。またこの方法では、受精卵を前核期の段階で卵管内に移植するため、子宮内に移植する体外受精胚移植（IVF-ET）に比べてより生理的であり、IVF-ETに伴う受精卵の発育の問題や着床の問題もかなり解決されることが期待できる。また、IVF-ET，GIFT，IVF-ETRと様々な方法をもつことは、多様化した不妊原因に対して、より適切な治療法を選択できる点で大きな意義がある。

主要文献：1. Asch, R.H., Balmaceda, J.P., Ellsworth, L.R., and Wong, P.C.: Pregnancy after translaparoscopic gamete intrafallopian transfer. *Lancet* 2: 1034, 1984.

2. 小林善宗, 本田育子, 井上正人, 金子みつ恵, 藤井明和: 配偶子卵管内移植の成績, 哺乳卵研誌 3: 52, 1986.

3. 小林善宗, 以上正人, 本田育子, 松山毅彦, 宮川和子, 村上 優, 内村道隆, 藤井明和: 体外受精卵卵管内移植による妊娠の1例, 第31回日本不妊学会総会抄録集, P190, 1986.

ブタ・ヒト透明帯共通抗原である低分子蛋白質の モノクローナル抗体 3A4 による分析

Characterization of the low molecular protein obtained from porcine zona pellucida
by using monoclonal antibody (3A4) which reacts exclusively
to pig and human zona pellucidae.

長谷川昭子、繁田 実、香山浩二、磯島晋三

Akiko HASEGAWA, Minoru SHIGETA, Koji KOYAMA and Shinzo ISOJIMA

兵庫医科大学産科婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Hyogo Medical College

〔目的〕：哺乳動物の卵透明帯 (ZP) は一般に 3 つの主要な糖蛋白質から構成されるが、ブタ ZP もまた二次元電気泳動 (等電点: SDS) で 3 つの分子群に分離することができる。さらにブタ ZP では、還元条件下で電気泳動を行なうと、第 4 のマイナーな低分子蛋白質 (23Kd) が分離される。本研究では、ブタ・ヒト ZP のみを認識するモノクローナル抗体 (Mab-3A4) が反応する、この 23Kd 低分子抗原の生化学的性質について調べた。〔方法〕：可溶化ブタ ZP (S-PZP) を SDS-PAGE 又は二次元電気泳動で分離し、蛋白質を銀染色するとともに分離蛋白質をニトロセルロース膜にトランスブロット後、酵素抗体法で染色 (Western blot assay) し、Mab-3A4 と反応する抗原を検出した。対応抗原の性状を明らかにするためには、S-PZP を蛋白分解酵素、糖分解酵素で処理した後、プレートにコートし、ELISA 法にて残存抗原活性を測定した。〔結果〕：SDS-PAGE (非還元条件) で分離した蛋白質と Mab-3A4 との反応を調べると、対応抗原は平均分子量約 92Kd に検出されたが、還元条件下では、平均分子量約 92Kd と 23Kd に検出された。さらに還元アルキル化条件では、23Kd へのみ検出された。これは対応抗原が S-S 結合の解離により低分子化したことを示唆する。この現象を確認するため、二次元電気泳動 (非還元・還元) を行なった。一次元では 92Kd 付近に分離された蛋白質の一部が、二次元では 69Kd と 23Kd 分子に分離することがわかった。Western blot assay では、この 2 つの分子のうち低分子の蛋白質にのみ Mab-3A4 に対するエピトープが存在した。二次元電気泳動 (等電点・SDS) で分析すると、非還元条件下では対応抗原は、分子量 92Kd に等電点 3~10 に連続して存在した。(Fig.1-a) 一方、還元条件下では、分子量 20-30Kd の範囲に等電点の異なる 10-11 個のスポットとしてみられた。(Fig.1-b) 以上の結果より、対応抗原は蛋白質の染色と一致して現われるが分子量の範囲が広く糖蛋白質であることが推察されるので、エピトープが蛋白部分か糖部分か見きわめる必要がある。そこで、S-PZP を trypsin (20,40 $\mu\text{g/ml}$) chymotrypsin (20,40 $\mu\text{g/ml}$)、mixed glycosidase (40, 80 $\mu\text{g/ml}$)、endoglycosidase H (0.5U/ml)

endoglycosidase D (0.5U/ml) で処理して、Mab-3A4 との反応性がどの程度残っているか調べた。trypsin, chymotrypsinなど比較的特異性の高い酵素でも蛋白分解酵素では、抗原活性は著しく低下した。これに対し、neuraminidase, endo H では抗原活性の低下はなかった。mixed glycosidase, endo D ではやや抗原性の低下が認められた。次に S-PZPをトリフルオロメタンスルホン酸で化学的に糖鎖を除去し、SDS-PAGE (非還元条件) による蛋白質のパターンと Mab-3A4の対応抗原の位置を調べた。蛋白質のパターンは高分子側にも diffuseな染色が認められたが、主として分子量35Kdと 32Kd に 2本のバンドとして存在した。Western blot assay では、抗原活性はかなり減少するが、32Kd付近に検出された。

〔結語〕：モノクローナル抗体 (Mab-3A4)で認識されるブタ・ヒト ZP 共通抗原の一つである糖蛋白質について以下のことが明らかになった。

1. Mab-3A4の対応抗原エピトープを含む分子 (23Kd) は、非還元条件下ではエピトープを含まない約69Kdの分子とS-S 結合で結合し、約92Kdの分子量で存在する。
2. 二次元電気泳動 (還元) では Mab-3A4の対応抗原は等電点の異なる 10-11個のfamily membersから成る分子群で、分子量は 20-30Kd (平均23Kd) の範囲にある。
3. 抗原エピトープの構造は trypsinに対し感受性が高く、ペプチド部分に大きく依存していると考えられる。
4. 化学的脱糖鎖による分析の結果、対応抗原の core 蛋白質の分子量は非還元条件下で 32Kd と推定される。

IEF

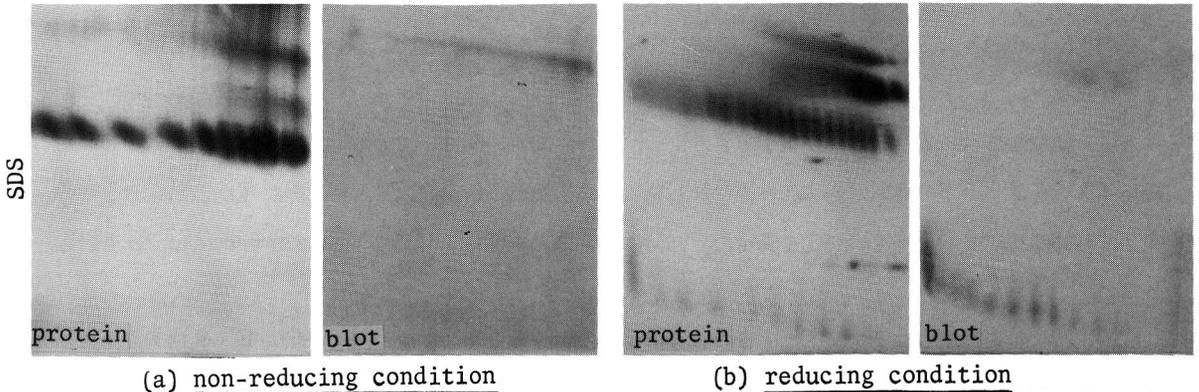


Fig.1 Detection of the antigen corresponding to Mab 3A4 by two dimensional (isoelectric focusing and SDS) PAGE

主要文献

- 1) Hedrick, J.L. and Wardrip, N.J. (1986) Isolation of the Zona Pellucida and Purification of Its Glycoprotein Families from Pig Oocytes *Analytical Biochemistry* 157 63-70
- 2) Koyama, K., Hasegawa, A., Tsuji, Y. and Isojima, S. (1985) Production and Characterization of Monoclonal Antibodies to Cross-Reactive Antigens of Human and Porcine Zona Pellucida. *J.Reprod. Immunol.* 7 187-198

ヒト精子の運動形態に関する研究
— hyperactivation との関連性から —

Movement characteristics of human spermatozoa
— relation to hyperactivation —

柳田 薫 会田都美子 吉松 宣弘 渡辺 清彦
菅野 薫 星 和彦 佐藤 章

Kaoru YANAGIDA Tomiko AITA Nobuhiro YOSHIMATU
Kiyohiko WATANABE Kaoru KANNO Kazuhiko HOSHI
Akira SATO

福島県立医科大学産婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Fukushima Medical College.

目的：hyperactivation がヒト精子にも存在するかを調べ、合わせて acrosome reaction との関連性についても検討した。

方法：精液静置法により運動良好精子を導き出し、15分、30分、60分、120分、300分後の精子の動きを顕微鏡ハイスピードビデオで撮影（1/200秒コマ）した。再生画像から精子の運動形態を特に尾部の動き方より分類し、時間経過にともなうその変化を調べた。同時にハムスターテストを施行し、acrosome reaction も調査した。

成績：精子の運動形態は4つに大別できた。A：活発であるが方向性が極めて不規則、B：直進するが尾部端部の動きが大きい、C：尾部の振幅が小さくなり速度を増す。D：尾部全体が波状にリズムカルに動く。また、各々の平均速度は、 20.1 ± 7.6 , 31.4 ± 8.2 , 38.9 ± 7.4 , $52.3 \pm 7.5 \mu\text{m}/\text{sec}$ であった。そして、各々のタイプが占める割合は、A B C Dの順に示すと、15分後は96%、4%、0%、0%、30分後は53%、47%、0%、0%、60分後は37%、51%、12%、0%、120分後は6%、3%、3%、61%、300分後は9%、4%、26%、61%であった。最初はほとんどがタイプAの動き方を示すが、徐々にB→C→Dと変化していくのが判った。同じ精子を用いたハムスターテストの結果をみると、タイプDの増える120分後では精子侵入が認められず、300分後でわずかに12.5%の侵入率となり、420分後で35.7%に上昇した。

結論：タイプDは極めてダイナミックな動きで明らかに他のタイプと異なり、ヒト精子の hyperactivation と考えられる。そしてその変化は120分頃より認められ、acrosome reaction をおこすかなり前に生ずるものと

思われた。

文献

1. YANAGIMACHI R. (1970) : J. Reprod. Fert. 23 : 193~196
2. Burkman L.J. (1984) : Arc. Andrology. 13 : 153~165
3. Katz D.F., et al (1978) : J. Reprod. Fert. 53 : 259~265
4. Suarez S.S., Katz D.F., et al (1984) : Gamete Res. 10 : 253~265
5. Katz D.F., et al (1986) : Gamete Res. 14 : 333~346

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” 大沢伸昭、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4巻第1号をお届けいたします。

今年は、例年になく暖冬であったことから桜の開花も3月中にみられました。

早いもので本会が研究会に移行いたしましてから3年が経過いたしました。この間会誌の発刊がとどこおることもなく順調に発行できましたことは、会員の皆様のご協力によるものと感謝いたしております。

本号は、原著2編、短報1編の他、第28号哺乳動物卵子研究会の講演要旨を掲載いたしました。

今後とも、会誌の内容充実に努力いたしますので益々のご指導ご鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

(遠 藤 克)

編 集 委 員

委員長： 大 槻 清 彦

委 員： 岩 城 章，石島芳郎，鈴木秋悦，花田 章，遠藤 克

哺 乳 動 物 卵 子 研 究 会 誌

Journal of Mammalian Ova Research

第 4 巻 第 1 号

Vol. 4 No. 1

昭和62年3月25日印刷

昭和62年4月1日発行

(会 員 頒 布)

発行者 哺乳動物卵子研究会
代表 佐久間 勇 次

発行所 哺乳動物卵子研究会
〒252 藤沢市亀井野1866
日本大学農獣医学部獣医生理学教室内
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)

下垂体性性腺刺激ホルモン パーゴナル[®]注 75・150

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



【効能・効果】

間脳性（視床下部性）無月経，下垂体性無月経の排卵誘発

【用法・用量】

1日卵胞成熟ホルモンとして75～150国際単位を連続筋肉内投与し，頸管粘液量が約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



帝国臓器製薬株式会社
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) 卵巣腫瘍及び多のう胞性卵巣症候群を原因とし無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) 多のう胞性卵巣を有する患者
 4. 副作用
 - 1) 卵巣過剰刺激 卵巣腫大，下腹部痛，下腹部緊迫感，腹水・胸水を伴ういわゆる，Meigs様症候群等があらわれた場合には，直ちに投与を中止するなど，適切な処置を行うこと。
 - 2) その他 ときに悪心，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。

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

プベローゲン®

1,500単位
3,000単位
5,000単位
10,000単位

日本薬局方 注射用血清性性腺刺激ホルモン

動物
専用

ピーメックス®

1,000単位

販売元



三共株式会社

東京都中央区銀座2-7-12

製造元



三共ゾキ株式会社

東京都中央区日本橋本町4-1-14

