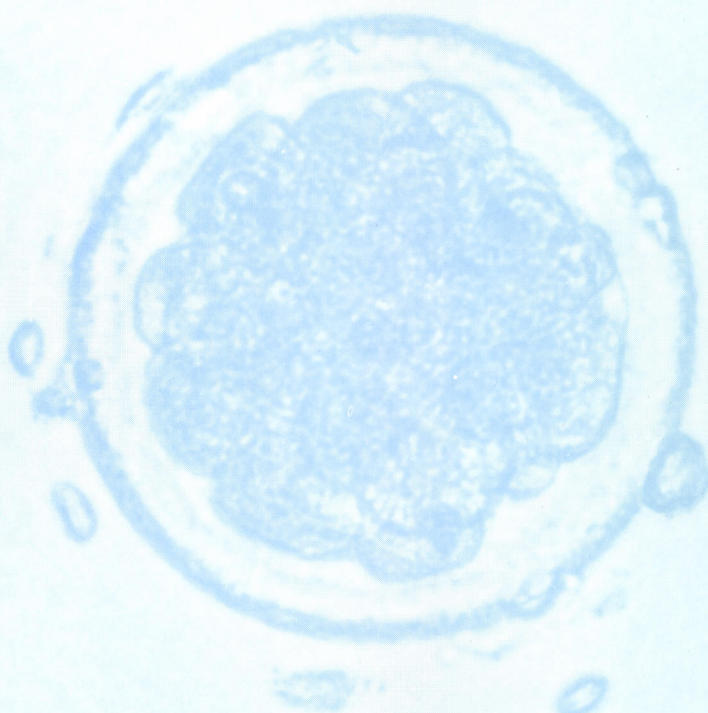


哺乳卵研誌
J. Mamm. Ova Res.

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. 2

October 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、
卵巢静止の治療、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

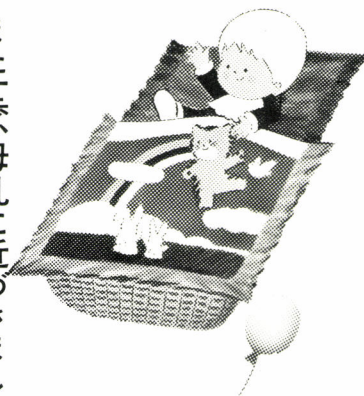
◆牛の繁殖障害の
分野に新しい可能性
—可能性—
!



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ュ
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。

また一步、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。



母乳に多い

感染防御因子

ラクトフェリン新配合

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

第29回 哺乳動物卵子研究会開催のお知らせ

哺乳動物卵子研究会

会長 佐久間 勇 次

下記により第29回哺乳動物卵子研究会および総会を開催いたします。多数の会員
のご参加をお願いいたします。

○日 時：昭和63年4月30日(土) 9:00より

○場 所：日本大学会館大講堂

東京都千代田区九段南4-8-24

TEL 03-262-2271

○一般講演：前回の大会と同様に講演内容をオフセット印刷し、哺乳動物卵子研究会
誌第5巻 第1号に講演要旨として掲載いたします。なお、各演題の抄
録は2ページにおまとめいただきます。

発表時間は1題につき10分、討論5分、を予定しております。

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

○演題申込：締 切 昭和63年1月31日必着

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

抄録原稿の〆切は昭和63年2月29日(厳守)とさせていただきます。

〒252 神奈川県藤沢市亀井野1866

日本大学農獣医学部獣医生理学教室

遠 藤 克 宛

TEL 0466-81-6241 内 332

哺乳動物卵子研究会誌

第4巻 第2号

昭和62年10月

目次

総説

I V F - E R の 展 望

鈴木雅洲 73

原 著

黒毛和種のPMSGによる過剰排卵誘起法へのLH-RHの投与効果について

堀内俊孝, 沼辺 孝 78

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

鈴木宏志, 富樫 守, 宮井達也, 岡本道生 84

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 92

ハムスターの体外培養卵巣における tranexamic acid の排卵抑制効果

山海 直, 渡辺靖浩, 金山喜一, 遠藤 克, 佐久間勇次 98

マウスプロラクチンのマウス配偶子および胚発生におよぼす影響

福田愛作, 野田洋一, 森 崇英, 森 千里, 橋本尚詞, 星野一正 105

ブタ・ヒト透明帯共通抗原に対するモノクローナル抗体の受精阻害作用について

長谷川昭子, 香山浩二, 磯島晋三, 永井 卓, 角田幸生 111

短 報

Lysophosphatidg choline 処理精子による家兎卵子の体外受精 (英文)

佐藤嘉兵 117

Journal of Mammalian Ova Research

Vol. 4 No. 2

October 1987

Contents

Review

The future of IVF-ER.

SUZUKI, M. 73

Originals

Effects of LH-RH analogue on the ovarian response and quality of embryos in the Japanese black cows superovulated with PMSG and PGF₂ α

HORIUCHI, T. & T. NUMABE 78

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

SUZUKI, H., M. TOGASHI, T. MIYAI & M. OKAMOTO 84

Movement characteristics of human spermatozoa

— relation to hyperactivation —

YANAGIDA, K., T. AIDA, N. YOSHIMATSU,
K. WATANABE, K. KANNO, K. HOSHI & A. SATO 92

An inhibitory effect of tranexamic acid on ovulation in hamster ovaries incubated in vitro.

SANKAI, T., Y. WATANABE, K. KANAYAMA,
T. ENDO & Y. SAKUMA 98

The analysis of the effects of prolactin on gametes and zygotes in vitro for the mouse.

FUKUDA, A., Y. NODA, T. MORI, C. MORI,
H. HASHIMOTO & K. HOSHINO 105

Inhibitory effect of monoclonal antibodies to porcine zona pellucida antigen cross-reactive to humans on in vitro fertilization systems.

HASEGAWA, A., K. KOYAMA, S. ISOJIMA,
T. NAGAI & Y. TSUNODA 111

Brief note

In vitro fertilization of rabbit eggs using spermatozoa treated with lysophosphatidyl choline.

SATO, K. 117

総 説

I V F - E R の 展 望

The future of - I V F - E R

鈴 木 雅 洲

Masakuni Suzuki

(東北大名誉教授)

人間に限って体外受精を考えてみる。臨床を行うために新しく病院を作り、体外受精を初めとして不妊症に関する診療を行うことによって、いくつかの問題点があることに気がついた。このように実際に診療を行ったときに感じる問題点を2〜3あげてみる。第一に体外受精・胚移植後に他の病院に転院した場合に種々の問題が生じる。一般の医療施設の産婦人科の診療において、体外受精に関する知識と経験が殆んどないことが実状である。体外受精の場合に、以前は自然排卵を利用していたが、最近では誘発排卵が多く用いられている。そうすると、性腺刺激ホルモンを使うわけで、その後の妊娠状態に変化が認められる。着床しないときには出血、すなわち月経が数日早く出現する。また、着床した場合には、出血しない場合の方が多いが、ときには、出血をともなうこともある。誘起排卵の場合に妊娠しても出血が認められた時に、その出血は微量であるが、従来の医療常識では、妊娠して出血があれば流産として掻爬して出すというのが基本となっている。それが適用されると、体外受精で妊娠した Embryo が掻爬で出されるということがおこりうる。この従来の産婦人科の診療の基本的な考えに、一応の修正を加えなければならないことを痛切に感じる。次に、不妊症専門の病院を作ると、不妊症の患者が遠くから来るようになる。近くの一流病院あるいは大学の付属病院などで診療を受けており、妊娠が不可能と宣告された人たちは、それでもあきらめきれないのが一般的である。妊娠できないと宣告された者の多くは複数の原因をもっており、この人達に治療を試みようとする、日本における倫理基準を変えなければその治療を行うことは困難である場合もある。また、不妊症の診療の場合に保険の点数が低い、十分な診療ができないのが現状である。わが国の現在の健康保険制度では、十分な不妊症の診療は、病院を赤字とする。従って、我々の病院を尋ねてくる患者の多くは、検査が十分でないまま治療が行われることが多い。何処の病院においても医療技術上から大変複雑な不妊症の診療を、確実に遂行出来ない社会状況におかれているものと考えられる。外国と違って、我国における不妊症に対する診療方針は殆ど過去に見直されることなく現在にいたっている。この辺で国家的レベルで再検討する必要があるものと考えられる。

国際的な立場からみて、体外受精がどの程度進んでいるかということを考慮すると、少なくともヒトに対する臨床としての体外受精の技術開発は終わったものと考えられる。しかし、それをとりまく周辺の問題がま

だ残っており、また、社会的普及という問題が残されている。

次に、ヒトの Embryo を凍結したのち、それを融解して再移植するということに関する国際調査 (A. C. Van Stirteghem, 1987) によれば、オーストラリア6施設、ベルギー2、フランス2、イスラエル1、イタリア2、ノルウェー1、スペイン1、ニュージーランド4、英国2、米国2、で行なわれている。その国際的追跡調査によると、凍結したものを胚移植して、その結果妊娠した子のアンケートによると、妊娠例数が163例である。世界の実数の数は、おそらくこれよりももう少し多いのではないかと思われる。子供の誕生が63例で、流産が43例、子宮外妊娠が6例であり、現在、妊娠を継続中のものが60例、少なくともこれ以上の妊娠数が国際的にはあるものと考えられる。

卵子については、凍結卵子総数が228個、解凍して受精させ胚移植が可能となった胚数が70個である。施設については、凍結保存卵子を受精させ、胚移植を実施している施設が33施設である。この妊娠数で確認されたものは4例であった。このことから考えると Embryo を凍結した場合よりも卵子を凍結した方が、妊娠の成績がかなり悪い結果となる。

その次は、他人の卵子を提供して行う妊娠について述べる。「提供卵子を使う方法は合法的」として認められている国は、米国、オーストラリア、東独、イスラエルの諸国である。これらの国家にはそれぞれ倫理基準があるものと考えられる。提供卵子を使って体外受精させ、それを移植する訳である。J. G. Shenker (1987) によれば、胚移植を行った症例が統計上185例であるが、おそらくこれ以上の数があるものと考えられる。それからこれらを実際に臨床として行っている施設・病院の数は18ヶ所で、現在までわかっている妊娠例数が13例、現実にはこれを越えているものと考えられる。

次に体外受精の国際情勢を見ると、その1つとして、オーストラリアでは全国の体外受精登録制度を行っている。登録を管理しているのはオーストラリア不妊学会であり、これまでオーストラリアで行われた体外受精による妊娠総数が1,000例を越えており、登録済みである。そして、臨床妊娠の流産率は、25%である。この流産率は、妊娠した患者の年令とかなり相関があり、25才未満では15%、40才以上では45%程度の頻度で発生する。また子宮外妊娠が5%であり、流産率は他の国でもだいたいこの程度である。単胎妊娠の場合には早産が18%であるが、多胎妊娠の場合では23%である。一般的には異常に高いと考えられる。先天異常は2.6%で単胎妊娠の場合に1.8%、多胎妊娠の場合には3.4%となる。オーストラリアの国自体での結論は、色々な意味における異常妊娠は、多胎妊娠に極端に多いということであった。

フランスのJ. Cohenが行った体外受精の国際アンケート調査では、超音波採卵が23%、腹腔鏡採卵が77%であり、数年前に比べて状況が変わってきている。数年前は殆んど全部が腹腔鏡採卵であり、超音波採卵は試験的に行われていた程度であった。この傾向をみると、おそらく数年中に超音波採卵が増え過半数が超音波採卵で占める時代が来るものと予想される。

体外受精妊娠によって生まれた世界各国の子供数の推定値は、2年前にオーストラリアのメルボルンで行われた国際会議の報告では、約2,000名という結果がでている。それ以後の国際統計調査はない。今回の米国ノーフォークにおける国際会議の各国の報告から推定すると、現在では4,000～5,000名の体外受

精妊娠による人間の子供が生まれているものと推定される。

子宮内膜における胚の受け入れの状態に関する予知法は、大変重要である。受精卵を体外で培養するわけであるが、もどす時に子宮の中の状態が判らないと種々の障害がおこると考えられる。子宮内膜の状態の変化をいかに予知するかということが現在の研究課題になっている。子宮内膜の状態を知る方法としては種々の試みがあり、どのようにして知るかということが重要な課題となっている。子宮内膜状態の予知法の可能性として考えられている方法は、(1)胚移植前の子宮内膜の生検、(2)血中の sex steroid の測定、(3)分泌期子宮内膜で産生される蛋白質を、血液中から測定する。これには、色々あるが、たとえば endometrial insulin-like growth factor-binding protein、あるいは endometrial β -lactoglobulin などが研究されている。その他いろいろな試みが世界の各国で行われており、いずれ近い将来に何らかの解決策が見い出されるものと考えられる。

次に、体外受精の適応に関する国際統計は、これまでに何回も行われている。これらの統計の特徴としては、卵管性不妊が大部分を占めること、男性側の原因(精子数が足りないとか、精子運動率が悪いとか、奇形が多いとか、いろいろある。)によって体外受精を行うことはだんだん減ってきているのが、1つの特徴だといわれている。精子の状態が大変悪い場合には、体外受精を行ってもほとんど妊娠は認められない。男性不妊症で体外受精で妊娠するような場合には、それ以外の方法でも妊娠出来ることが多い。重症の男性不妊症では、体外受精はほとんど役に立たないことが判明し、体外受精の適用として男性不妊症というものの占める割合は、段々低下しつつあると考えられる。

重症の男性不妊症では殆んど妊娠できない。AIDでは妊娠可能となるが、夫婦は夫の精子で妊娠を希望する。このために、現在、新しい方法が開発されつつある。精子を卵子に直接注入する方法で、マイクロマニピュレーターを用いる。この方法に関して、実際にヒトに応用する際には、一つの倫理基準をつくらない限り、第三者の一般社会人から抵抗をうけるものと考えられる。しかし、この方法の臨床応用の可能性は充分あるものと考えられ、これを microfertilization とよんでいる。透明帯を除去する方法には、いろいろな問題点があり、簡単に人体への応用は困難と考えられる。より可能性の高いのは、microfertilization である。「マイクロマニピュレーター」を使う方法では、その適応症として、高度の乏精子症、奇形精子症、運動不能精子症、などがある。このとき、精子に奇形があっても運動性がなくても、染色体なり遺伝子に異常がなければ受精は可能である。まず最初に、精子の染色体分析を行って染色体異常がないことが確認されたら、この方法を応用することが可能である。この方法に関しては合法的であると認めた国はまだ世界に一国も存在しない。将来、各国ともこの方法が合法的であるかどうかという倫理基準の作製が行われるものと考えられる。実際には、オーストラリアの A. Trouson の報告があり、人の精子と人の卵子間で、成熟卵7個中5個が受精したとの報告があり(これは受精だけでとめており)、技術的には可能な段階まで進んでいる。

臨床の問題では、人間に関する体外受精の採卵の問題を記載する。採卵法の比較では、人間の場合超音波による方法と腹腔鏡によるものがあり、それぞれ特徴がある。超音波の場合、操作が簡単であるが採卵で

きない場合もある。他方は癒着のとき可能であるが、広範囲の癒着では不可能である。過去に妊娠率は腹腔鏡による採卵の方法が明らかに高いという結果であったが、最近幾つかの施設で同等の成績が得られており、今後超音波採卵法の改良により腹腔鏡と全く同じ成績が得られる可能性がある。超音波で採卵する方法には、非常に沢山の種類が存在する。経腹経膀胱法は一番初めに開発された方法であり(1982)、次に経腔直採法(1984)、経腔経膀胱法(1984)なども開発されている。さらに、経尿道経膀胱法が開発されたが(1985)それぞれに一長一短が認められる。経腔直接法はトランスジューサーから卵巢までの距離が短く、膀胱を充満させる必要がないという特徴が認められる。技術的には比較的容易であるということと卵子の中に尿が混ざる危険性がないということなどもあり、最も多く用いられているのが経腔直接法である。経腔直接法は極めて安全度が高い。

次に最近数年間に妊娠成功率を上げるために超音波採卵にいろいろな改良が行われ、超音波採卵における妊娠率が向上してきた。超音波採卵では M. Wikland のグループが採卵周期数286例の超音波採卵を行い、卵子数1490個中受精卵1017個(68%)の受精率が得られ、そのうちの950個が分割しており、分割率93%、胚移植252例で妊娠39例(16%)の妊娠率を得ている。また、経腔直接法を用いたフランスの P. Dellenbach のグループの693例、経腔以外の超音波採卵420例合計1113例についてみると、102例が妊娠している。超音波採卵による障害はほとんどなく、多数卵採取方法、排卵誘発法の種類、および術者の技術によって、妊娠率が高くなることを明らかにした。また、ベルギーの A. Wisanto のグループでは、超音波採卵が120例、妊娠が27例であり、腹腔鏡採卵が87例でその妊娠が15例であった。超音波採卵の妊娠率は腹腔鏡採卵よりも低いという従来の報告を変える成績を示している。したがって、数年後には超音波採卵が腹腔採卵にとって変わる可能性があるものと考えられる。

超音波断層法の採卵以外の応用法が新しく開発されており、胚移植時のカテーテル挿入と胚注入の監視に用いられている。現在、受精卵を子宮内に移植するには、頸管法が用いられているが、その際にカテーテルの位置を確認すること、それから、移植している最中に胚を監視するのに、超音波断層法が使われるようになった。

超音波採卵針は子宮外妊娠時において卵管内にメソトレキセートを注入するのに使ったという報告もあり、また、胚移植時に頸管を通さずに超音波採卵針内にカテーテルを通して子宮壁筋層を通過して子宮腔内に移植する方法も開発された。頸管は胚を汚染する危険性があるので、これを防止するためには超音波で監視しながら移植する方法である。この外にも新しい移植法が開発されるだろう。次に超音波ギフト法についてのべる。超音波で監視しながら、カニューレを子宮内に挿入し、卵管角のところまで先端をもっていき、そこで、細いカテーテルの中に卵子・精子が入っており、卵管角または卵管角から少し入ったところから卵管の内へ送る方法がある。腹腔鏡の操作はいっさい使わないGIFT法が開発された。この方法でも妊娠例が報告されているので、将来、超音波は体外受精の中に大きく入りこんでくるものと予想される。

実際に人間を治療する場合には、家畜の場合と違い、第三者である社会の一般人の感情問題が入ってくる。それに対する対応が必要となってくる。臨床の新技术としては、2種類(AIHとAID)の人工受精があ

り、GIFTとVIFという方法で husband と wife の間だけで行われる場合と、donor sperm を使う場合、donor egg を使う場合、donor embryo を使う場合とがある。さらに凍結保存の方法では、sperm の凍結保存と preembryo の場合とがある。その外に、surrogate mother という方法がある。精子の人工受精による方法を surrogate mother といい、surrogate gestational mother という方法は、ヒトの embryo を他の女性の子宮内に移植するものである。称して「不妊症新治療技術」という。この不妊症技術に対しては、少くとも一般大衆の中で反対する意見が多く、反対意見が強いままに実施すると、色々と問題を起すことになる。反対する意見というのは、感情的に反対する人も多く、また、全く経験がないことから、予想もつかないようなことを言って反対する者も認められる。さらに宗教上からの反対が認められ、宗教も宗派によって全くその中身が違っている。それから、社会家族制度に混乱をきたすということで反対する者もある。感染とか遺伝上のことで反対する例も認められる。新しい技術を臨床の治療に導入する場合には、反対する意見が多く、反対する意見の人たち全部というわけにはいかないが、それらの人達の過半数に理解してもらわなければならない。そうした状態で、新しい技術を治療の中に導入することが可能となるわけであり、その方法として特別の倫理をつくらなければならない。もう一つは、法律的問題の検討と解釈であり、社会世論に対するいろいろな対応を充分に検討し、それらに対する理解を求めることと医学的安全性をどう実証するか、という具体的な例を示すことによって、全員を賛成者にすることができる。不妊症の治療の技術に対するとする倫理の構成では、必要性に対する理解、この方法でないと治らない疾患であるという理解、養子縁組が現代の社会構造において極めて困難であるということの理解、などがある。今後については、親子関係の法的整備が必要である。また、治療内容に対する患者のプライバシーの保護ということが必要となってくる。医学的には、感染防止(ことにSTD)、適応と禁忌を明らかにし、また、遺伝病の予防対策、血族結婚防止対策、が行われているということを明らかにするとともに、妊娠率が自然妊娠を下まわることはなく、自然妊娠と同等以上であることを医学的に示すことが必要である。その他患者の同意書も必要であり、提供精子卵子、あるいは、提供胚の売買に対しては規制が必要であり、記録の保存などを整えるとともに、このためのプライバシー保護も配慮しなければならない。このことを決めたものに国際的に有名な基準がある。一つは、united kingdom の Warnock 委員会(1984)であり、IVFは正しいことであるということ、卵子精子提供をしたIVFは正しいということ、それから、提供者は誰であるかということは教えないとか、いろんな内容のことが記載されている。米国においては American Fertility Society の倫理委員会において、1986年に、donation、surrogate その他、非常に詳細な基準を発表して、不妊症新技術は倫理的に正しいことを結論している。1987年カナダでは、the Ontario Law Reform Commission が不妊症治療新技術の倫理基準を発表している。こういうことによって、初めて、臨床に実現できるわけである。

今回は、ヒトのみについて、体外受精をめぐる諸問題について講演した。その概要を以上にまとめて記載した。内容が断片的であり、読みにくい点についてお詫びしたい。

この総説は、第28回哺乳動物卵子研究会において特別講演いただいた内容を鈴木教授に加筆いただき掲載したものである。

黒毛和種のPMSGによる過剰排卵誘起法への LH-RHの投与効果について

Effects of LH-RH Analogue on the Ovarian Response and Quality of Embryos
in the Japanese Black Cows Superovulated with PMSG and PGF₂ α

堀内俊孝・沼辺 孝

Toshitaka HORIUCHI and Takashi NUMABE

宮城県畜産試験場・酪農肉牛部

〒989-64 宮城県玉造郡岩出山町南沢字樋渡1

Miyagi-ken Experimental Station of Animal Science, Iwadeyama,
Miyagi-ken 989-64, JAPAN

Summary

The present experiment was designed to examine the effects of LH-RH analogue on the ovarian response and the number of embryos recovered in Japanese Black Cows superovulated with PMSG and PGF₂ α .

The injection of LH-RH analogue was given 3-4 hours after initiation of standing heat. Embryos were recovered non-surgically from uterus seven days after estrus.

A single injection of 400 μ g of LH-RH analogue was increased the number of transferable embryos significantly and the percentage of embryos classified as excellent and good morphologically.

A single injection or double injections of 200 μ g of LH-RH analogue was not increased the number of transferable embryos. The double injections of 200 μ g of LH-RH analogue was decreased the percentage of excellent and good embryos.

The administration of 200 μ g, 400 μ g or the double injections of 200 μ g of LH-RH analogue was increased the percentage of morula and blastocysts.

諸 言

牛受精卵移植技術において、過剰排卵誘起法は安定的な移植を行うため重要な技術のひとつである。

牛の過剰排卵誘起法は卵胞刺激ホルモン (FSH) や妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) が用いられる。FSHによる方法は投与回数が多く、また投与牛群のうち約1/3は移植可能卵が回収されないが、PMSGによる方法よりも平均回収卵数、平均移植可能卵数が多いことが報告されている^{1,2)}。一方、PMSGによる方法は発情後に遺残卵胞が残りやすく、移植可能卵数は低下するが、1回の投与で過剰排卵誘起が可能で、牛受精卵移植技術の省力化のため非常に魅力があり、この方法の改良が望まれている。

最近、LH-RHの強い排卵促進効果が注目され、牛受精卵移植での過剰排卵誘起にLH-RHが用いられている。Takahashi & Kanagawa (1984)⁴⁾はホルスタイン種において、PMSG 2500 iuの場合、合成LH-RHの2回投与が有効であると報告し、Newcomb (1980)⁵⁾はフリーシアン種においてLH-RHの1回投与では効果が見られなかったと報告した。このように、LH-RHの投与効果については必ずしも一致した結果が得られておらず、またLH-RHの投与量、投与回数に関して詳細に検討した報告も少ない。

本研究は、黒毛和種においてPMSGを用いた過剰排卵誘起法へのLH-RHの投与を試み、卵巣反応、回収卵数および受精卵の質におよぼす効果について、LH-RHの投与量、投与回数に関連づけて検討を加えた。

材料および方法

供試牛は、宮城県畜産試験場にけい養している黒毛和種(2~8才)で、10頭は1回のみ、他の10頭は50~80日の間隔で2~4回用いた。過剰排卵処理は発情日を0として、性周期の9~14日目にPMSG(セロトロピン; 帝国臓器またはビーメックス; 三共製薬) 3500~3800iuを筋肉内に投与し、48~50時間後にPGF₂α(パナセランF; 第1製薬) 30mgを筋肉内に1回投与した。スタンディング発情の開始後3~4時間でLH-RH(コンセラル; 武田製薬) 200 μg, 400 μgを1回または200 μgを1.5時間の間隔で2回、筋肉内に投与した。人工授精はスタンディング発情開始後8~10時間および22~24時間に0.5 ml凍結精液ストローを各2本注入した。

卵回収は、発情後7日目にバルーン・カテーテル(バーデックス社製)を用い、鈴木らの方法⁶⁾で行なった。灌流液は修正ダルベッコウのリン酸緩衝塩類溶液(Dulbecco's PBS)を用い、灌流後実体顕微鏡下で卵を検索した。受精卵の形態は倒立培養顕微鏡下でElsdenら(1978)⁷⁾の基準に従って、優(A)、良(B)、可(C)、未受精卵または退行卵(D)の4段階に分類した。また、受精卵の発生段階はLinder & Wright (1983)⁸⁾の基準に従って、32~64細胞期、桑実期、胚盤胞期の3段階に分類した。

卵巣反応を判定するため、黄体数は発情後7日目の卵回収時に、直腸検査法により数えた。

結 果

卵巣反応、回収卵数、移植可能卵数についての結果は表1に示した。対照区 (LH-RH投与せず) LH-RH 200 μ g 1回投与区、LH-RH 400 μ g 1回投与区、LH-RH 200 μ g 2回投与区における平均黄体数は、各 11.0 ± 4.9 , 8.7 ± 2.4 , 9.8 ± 3.3 , 9.7 ± 3.2 で卵巣反応に差はなく、また平均回収卵数は、各 5.3 ± 4.6 , 5.3 ± 2.4 , 7.5 ± 3.1 , 4.7 ± 3.6 で有意な差はなかった。しかし、平均移植可能卵数は、各 2.2 ± 2.2 , 3.7 ± 2.4 , 4.7 ± 2.2 , 2.1 ± 1.8 で LH-RH 400 μ g 1回投与区と対照区および LH-RH 200 μ g 2回投与区の間で有意な差 ($P < 0.05$) が認められ、LH-RH 400 μ g 1回投与によって平均移植可能卵数は増加した。

Table 1. Effect of LH-RH analogue on the superovulatory responses in Japanese Black Cow treated with PMSG and PG

Dose of LH-RH(μ g)	No. of cows treated	No. of CL	No. of embryos recovered	No. of transferable embryos
0	10	11.0 ± 4.9	5.3 ± 4.6	$2.2 \text{ b} \pm 2.0$
200	6	8.7 ± 2.4	5.3 ± 2.4	3.7 ± 2.4
400	10	9.8 ± 3.3	7.5 ± 3.1	$4.7 \text{ a} \pm 2.2$
200X2	10	9.7 ± 3.2	4.7 ± 3.6	$2.1 \text{ b} \pm 1.8$

CL:Corpus Luteum

200X2:Double injections of 200 μ g of LH-RH analogue.

a,b; $p < 0.05$

移植可能卵の形態的分類についての結果は表2に、発生段階についての結果は表3に示した。

形態的分類では、対照区はAランク50%、Bランク14%、Cランク36%、LH-RH 200 μ g 1回投与区では、各50%、5%、45%、LH-RH 400 μ g 1回投与区では、各62%、23%、15%、LH-RH 200 μ g 2回投与区では、各43%、5%、52%で、LH-RH 400 μ g 1回投与区ではA・Bランクの移植可能卵は85%で、LH-RH投与によって、優と良の受精卵の割合が増加する傾向にあった。

Table 2. Effect of LH-RH analogue on the morphological normality of embryos with superovulating treatment of PMSG-PG in Japanese Black Cow

Dose of LH-RH(μ g)	No. of embryos	Evaluation of embryos (%) a		
		A	B	C
0	22	50	14	36
200	22	50	5	45
400	47	62	23	15
200X2	21	43	5	52

a:A:Embryos did not have any extraneous degenerating cells.

B:Embryos had small imperfections such as extraneous degenerating cells.

C:Embryos had more extraneous degenerating cells but still contained a mass of cells that appeared viable.

200X2:Double injections of 200 μ g of LH-RH analogue.

発生段階では、対照区で32～64細胞期32%、桑実期54%、胚盤胞期14%、LH-RH 200 μ g 1回投与区で、各9%、77%、14%、LH-RH 400 μ g 1回投与区で、各9%、70%、21%、LH-RH 200 μ g 2回投与区で、各19%、81%、0%でLH-RH投与区で発情後7日目の移植に適する桑実期、胚盤胞期に集中する傾向にあった。

Table 3. Effect of LH-RH analogue on the development stage of transferable embryo with superovulating treatment of PMSG-PG in Japanese Black Cow

Dose of LH-RH(μ g)	No. of embryos	The stage of development (%)		
		32-64 cell	morula	blastocyst
0	22	39	54	14
200	22	9	77	14
400	47	9	70	21
200X2	21	19	81	0

200X2; Double injections of 200 μ g of LH-RH analogue.

考 察

黄体形成ホルモン放出ホルモン (LH-RH) はSchally ら (1971)⁹⁾、Guillemin ら (1972)¹⁰⁾、によって、豚、緬羊の視床下部から抽出、単離されて以来、その類縁化合物に関して活発に研究され、わが国でもLH-RH類縁化合物 (Des-Gly¹⁰-LH-RH-ethylamide、酢酸フェルチレリン) が合成され、牛の排卵遅延や卵巣のう腫などの治療に広く用いられている。¹¹⁾

本研究は、黒毛和種の過剰排卵誘起法 (PMSG-PG法) へのこの合成LH-RHの投与を試み、発情期におけるLH-RH 400 μ g の1回投与が移植可能卵数を増加させることを明らかにした。また、形態的にも良好で、発生段階も移植可能範囲の中に集中する傾向が見られた。これらのことは、LH-RHの投与によって排卵に要する時間のバラツキが小さくなった可能性が考えられる。

過剰排卵誘起法へのLH-RHの投与効果については、Takahashi & Kanagawa (1984)⁴⁾ はホルスタイン種において、PMSG 2500iu 投与区で、LH-RHの200 μ g と400 μ g を90分間隔で2回投与することで、排卵数、回収卵数、移植可能卵数を増加させたと報告し、Guay & Bedoya (1981)¹³⁾ もLH-RHの2回投与は、受精した卵数を増加させたと報告している。本研究ではLH-RH 200 μ g の2回投与は、逆に移植可能卵数を減少させた。

LH-RHを90分間隔で2回投与すると血中LHレベルが、ブースター的に上昇するというFoster¹⁵⁾ (1978) の報告から、本研究でのLH-RH 200 μ g の2回投与においても同様なLHの上昇が起ったものと推察され、LHサージのレベルの上昇のみが移植可能卵数の増加に関与するものではないかもしれない。

本研究でのLH-RH 200 μ g の2回投与では、1回目の投与が発情開始後3～4時間で、2回目の投与はさらに1.5時間後であったが、過剰排卵処理でのLHサージが発情初期に認められるものの卵³⁾ 巣反応は良く、移植可能卵が多く回収できることを示唆した報告があり、本研究でのLH-RH 200 μ g

の2回投与で移植可能卵が減少したことは血中LHサージの時期の遅延に起因しているのかもしれない。

LH-RHの投与量については、200 μ gの1回投与では効果が認められなかったが、400 μ gの1回投与では効果が認められた。卵胞のう腫などの治療では100～200 μ gの投与がおこなわれており、今回の過剰排卵での400 μ gの投与は比較的多量ではあるが、この投与範囲では、LH-RHの投与量の増加に伴う血中LHレベルの増加が報告されている。¹⁴⁾

今回行ったPMSG-PG法での黒毛和種の過剰排卵誘起では、他の報告と同様な回収卵数であったが、移植可能卵数は多少すくない傾向であった。PMSGに対する卵巢反応は、PMSGの投与量や製品などによる差があるので単純に他の報告と比較することはできないが、系統や飼養条件などの相違も考えられる。

本研究において、過剰排卵誘起法へのLH-RH 400 μ g 1回投与が有効であることが明らかになったが、さらにPMSGの投与量との関連やLH-RHの投与時期について検討する必要があると思われる。

要 約

PMSG-PG法による過剰排卵誘起法の改良のため、発情期での合成LH-RHの投与を試みた。

PMSG-PG法(対照区)に比べ、LH-RH 400 μ gの1回投与は、移植可能卵数(正常卵数)を有意に($P < 0.05$)増加させ、また形態的に優と良に分類した受精卵の割合を増加させた。

一方、LH-RH 200 μ gの1回または2回投与は、移植可能卵数を増加させる効果は認められなかった。LH-RH 200 μ gの2回投与は、形態的に優と良に分類した受精卵の割合を減少させた。

LH-RH 200 μ g、400 μ gの1回投与または200 μ gの2回投与は、桑実胚と胚盤胞胚の割合を増加させる傾向にあった。

引 用 文 献

- 1) Donaldson, L. E. (1982) Success rates. In Embryo Transfer in Cattle, Edited by L. E. Donaldson, San Antonio, Rio Vista Int. Inc., P. 54.
- 2) 鈴木達行・下平乙夫・藤山雅照・強谷雅彦(1983) 和牛におけるPMSGとFSHによる過剰排卵処理法の比較とその発情発現までの日数、畜産の研究37、1461～1462.
- 3) Schams, D., Menzer, Ch Schallenberger, E. Hoffmann, B., Hahn, J. and Hahn, R. (1978) Some studies on pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle. In Control of Reproduction in Cow, Edited by J. R. Sreenan, The Hague, Martinus Nijhoff, P. 122.
- 4) Takahashi, Y. and Kanagawa, K. (1984) Effect of LH-RH analogue on the ovulation rate and embryo quality in heifers superovulated with PMSG and PGF $_2\alpha$. Jpn. J. Vet. Res. 32, 183～189.
- 5) Newcomb, R. (1980) Investigation of factors affecting superovulating and non-

surgical embryo recovery from lactating British Friesian Cows. Vet. Res. 106, 48~52.

- 6) 鈴木達行・下平乙夫 (1985) “家畜人工授精講習会テキスト (家畜受精卵移植編)” P. 120.
- 7) Elsden, R. P., Nelson, L. D. and Seidel, Jr. G. E. (1978) Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. Theriogenology 9, 17-26.
- 8) Linder, G. M. and Wright, R. W. Jr. (1983) Bovine embryo morphology and evaluation. Theriogenology 20, 407-416.
- 9) Schally, A. V., Arimura, A., Baba, Y., Nair, R. M. G., Matsuo, H., Redding, T. W., Debeljuk, L. and White, W. F. (1971) Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormones. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 393~399.
- 10) Burgus, R., Butcher, M., Amos, M., Ling, N., Monahan, M., Rivier, J., Fellows, R., Blackwell, R., Vale, W. and Guillemin, R. (1972) Primary structure of the ovine hypothalamic Luteinizing-Hormone-Releasing Factor (LHF). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 278~282.
- 11) 武田薬品工業(株)畜産研究開発部 (1981) 獣医界 120, 93~108.
- 12) Nakao, T., Tsurubayashi, M., Horiuchi, S., Nomura, T., Ishibashi, Y., Kubo, M. and Kawata, K. (1979) Effects of a systematic application of human chorionic gonadotropin, gonadotropin-releasing hormone analogue and bovine anterior pituitary gonadotropin in cows with cystic ovarian disease. Theriogenology 11, 385~397.
- 13) Guay, P. and Bedoya, M. (1981) Effect of Gn-RH on blood serum hormone concentrations, ovulation rates and embryo production in lactating cows treated with PMSG. Can. J. Comp. Med., 45, 352~356.
- 14) Schams, D., Hofer, F., Schallenberger, E., Hartl, M. and Karg, H. (1974) Pattern of luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) in bovine blood plasma after injection of synthetic gonadotropin-releasing hormone (Gn-RH). Theriogenology 1, 137-151.
- 15) Foster, J. P. (1978) Plasma LH concentrations after single or double injections of synthetic LH-RH in dairy cows, J. Reprod. Fert. 54, 119~121.

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

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 OKAMOTO

中外製薬 開発研究所

Drug Development Laboratories, Chugai

Pharmaceutical Co., Ltd.

Summary

The aim of the present study was to determine the potential for the further development of zona-free mouse zygotes fertilized in vitro. Zona-pellucida of (C57BL/6J X C3H/HeN)F1 mouse eggs were removed with 0.5% pronase 6 hr after insemination. Each one of zona-free eggs were cultured for 114 hr in 20 μ l medium in Multiplate-Terasaki and 20 μ l and 100 μ l drops in dish. At 96 hr after insemination 58%, 74% and 66% of these eggs, respectively, developed into the blastocyst stage. After transfer to the uterus of foster-mothers, 4(5%) of 76 blastocysts cultured in 20 μ l medium in Multiplate-Terasaki, developed into newborns. It was concluded that the zona-pellucida is not essential for development into the young from the zygotes fertilized in vitro.

序論

透明帯は異種間受精および多精子受精の拒否に働き、さらに着床前の胚の保護作用を担っている。これまでのマウス胚を用いた研究により、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〕。また、マウス透明帯除去胚の体外培養に関しても、種々の検討がなされており〔3-10〕、現在ま

でのところ2細胞期で透明帯を除去後、2分離された胚(1/2胚)由来の胚盤胞から1卵性双仔の作出が報告されている〔11,12〕。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するとともに、胚に対する発生工学的操作を一層広範囲なものにする。本実験では、前核期で透明帯の除去を施したマウス体外受精卵を着床前の全期間を体外培養後、受容雌へ移植することによって、産仔への発生能について検討した。

材料および方法

受精用培地としてWhitten 培地 (以下、WMと記す)〔13〕を用い、その他の体外受精操作はすべて豊田ら〔14〕の方法に従った。卵子は、(C57BL/6J X C3H/HeN)F1成熟雌マウスに48時間間隔でPMSG(PMSゼンヤク; 日本全薬工業) およびhCG(プベローゲン; 三共ゾーキ) 各5 i.u.を投与して過排卵誘起を施し、hCG 投与後、15-16 時間に卵管膨大部より採取した。精子は、F1成熟雄マウスの精巢上体尾部より採取し、2時間のブレインキュバート後、卵子を含む0.4mlのWMに5 μ l添加して体外受精を行った。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前核期の卵子を、0.5%プロナーゼ〔6〕(アクチナーゼ; 科研製薬)を含むWM内で、約10分間処理して透明帯の除去を行った。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(住友ベークライト)内の20 μ lの培地(以下、P区と記す)およびプラスチックシャーレ(35mm X 10mm: Falcon)内の20 μ l(以下、D-20区と記す)あるいは100 μ lのドロップ(以下、D-100区と記す)に1個ずつ移し、37°C、5%CO₂、95%空気の気相下で、授精後120時間まで培養した。また、対照としてはプロナーゼ処理を施さない体外受精卵を、テラサキマルチプレート内の各々のウエルで、1個ずつ同様に培養した。胚の発生経過は、倒立顕微鏡下で24時間間隔で観察した。以下の実験は、特にことわりのない限り、すべてP区を用いて行った。移植は、授精後96時間に発生した胚盤胞について、以下の方法で行った。すなわち、偽妊娠3日目(Plug確認日=Day 0)のIVCS受容雌に対し、ペントバルビタールナトリウム(ネンプタール; アボットラボラトリーズ)の腹腔内注射により麻酔を施したのち、腰背部を切開して卵巣、卵管および子宮を引き出した。次いで、実体顕微鏡下で子宮卵管接合部付近の子宮壁を注射針で穿孔し、マウスピースに接続したガラス毛细管ピペットを用いて、少量(1 μ l以下)の培地とともに、子宮一側あたり3-5個の胚を注入した。また、透明帯除去胚の4細胞期における胚の形態を、割球同士の接着点数によって、タイプA(接着点=3)、タイプB(接着点=4)、タイプC(接着点=5)およびタイプD(接着点=6)に分類し、タイプ別の出現頻度および胚盤胞への発生率について観察した。さらに、加藤と田中〔15〕の染色体検査法を一部修正して、授精後96時間に発生した胚盤胞の細胞数を算定した。培養成績の統計処理は、 χ^2 -検定によって行った。

結果

体外受精由来透明帯除去胚の授精後120 時間までの培養成績をTable 1 に示した。各実験区とも授精後24および48時間には、対照区と同様に、高率に2および4細胞期胚に発生した。授精後96時間における胚盤胞への発生率は、P区が対照区と比較して有意に低かった($P < 0.05$) が、D-20区およびD-100区と対照区との間には、差が認められなかった。また、各実験区間の発生率には差がなかった。授精後120時間の胚盤胞への発生率については、96時間の成績と同様の傾向であった。P区においては、桑実胚以降の発生率が対照区と比較して有意に低かったが、D-20区では着床前の全期間を通じて対照区の発生率と差のない値であった($P > 0.05$)。透明帯除去胚の4細胞期における各タイプ(Fig.

Table 1. Preimplantation development of zona-free mouse embryos fertilized in vitro

Vessel	Volume of media (μl)	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to :				
			2-cell (24hr) ³⁾	4-cell (48hr) ³⁾	Morula (72hr) ³⁾	Blastocyst	
						(96hr) ³⁾	(120hr) ³⁾
Plate ¹⁾	20	52	49(94) ^a	48(92) ^a	23(44) ^a	30(58) ^a	36(69) ^a
Dish ²⁾	20	42	41(98) ^a	39(93) ^a	32(76) ^{b,c}	31(74) ^{a,b}	32(76) ^{a,b}
Dish ²⁾	100	38	38(100) ^a	37(97) ^a	24(63) ^{a,b}	25(66) ^{a,b}	31(82) ^{a,b}
Control(zona-intact) Plate ¹⁾	20	30	29(97) ^a	30(100) ^a	28(93) ^c	26(87) ^b	28(93) ^b

1) Multiplate-Terasaki. 2) 35 X 10 mm, Falcon. 3) Hours after insemination.

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

2)別の出現頻度は(Table 2)、タイプBおよびCがそれぞれ29% および42% であり、直鎖状に4個の割球が配列したタイプAは、14% であった。また、対照胚で最も多く観察された立体構造を呈するタイプDは、15% であった。対照胚では、タイプAおよびBは全く観察されなかった。透明帯除去胚の4細胞期における胚の形態と胚盤胞への発生率との関係を、Fig. 1に示した。授精後96時間の成績では、各タイプともほぼ同程度の発生率を示した。また、授精後120時間では、接着点の数が増えるに従って、胚盤胞への発生率が高くなる傾向が認められたが、タイプAからも形態的に正常と思われる胚盤胞へ67%の胚が発生し、この値はタイプD(86%)と有意差のない値であった($P > 0.05$)。授精後96時間における細胞数検査の結果(Table 3)、透明帯除去胚では53.4個、対照胚では56.1個と、ほぼ同程度の細胞数を有していた。移植成績は、Table 4に示す通りであった。P区の76個の胚盤胞を

Table 2. Total cell contact data in 4-cell embryos¹⁾

Treatment (numbers)	Percentage of 4-cell groups			
	A	B	C	D
Zona-free ²⁾ (478)	14	29	42	15
Zona-intact (78)	0	0	13	87

1) Cultured in Multiplate-Terasaki for 48hr after insemination.

2) Zona-pellucida was removed 6hr after insemination.

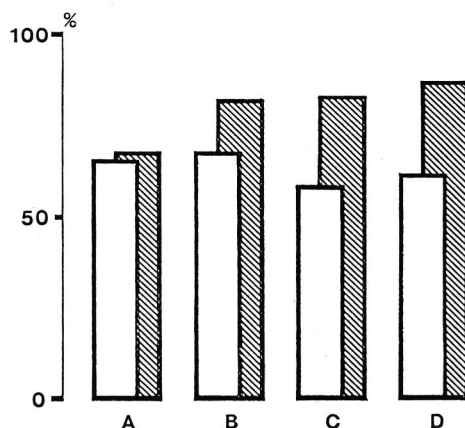


Fig. 1. In vitro development of various types 4-cell embryos without zona-pellucida to the blastocyst stage (□: 96hr and ▨: 120hr after insemination). 4-cell embryos were classified into 4 types according to the total points of contact between the 4 blastomeres. A, B, C and D have 3, 4, 5 or 6 points of contact, respectively.

Table 3. Total cell numbers in blastocyst¹⁾

Treatment (numbers)	Mean cell number±S.D.
Zona-free ²⁾ (14)	53.4±12.1
zona-intact (18)	56.1±13.4

1) Cultured in Multiplate-Terasaki for 96hr after insemination.

2) See the footnote in Table 2.

8例の受容雌に移植した結果、5例が妊娠に至ったが、このうち2例は死産および分娩遅延による胎仔死亡が観察された。残り3例の受容雌では正常分娩が観察され、総移植胚の5%に相当する4匹（♀：♂=3：1）の生存産仔が得られた。

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に由来する透明帯除去胚が、産仔への発生能を有していることが明らかになった (Table 4)。コンパクション以前の卵割期にある胚では、透明帯を除去したのち受容雌の卵管に移植して産仔を得ることは非常に困難なことが報告されている [1, 2]。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の移行に際して、胚の機械的保護 [1] や卵管壁への接着 [2]、胚同士の融合 [6] およ

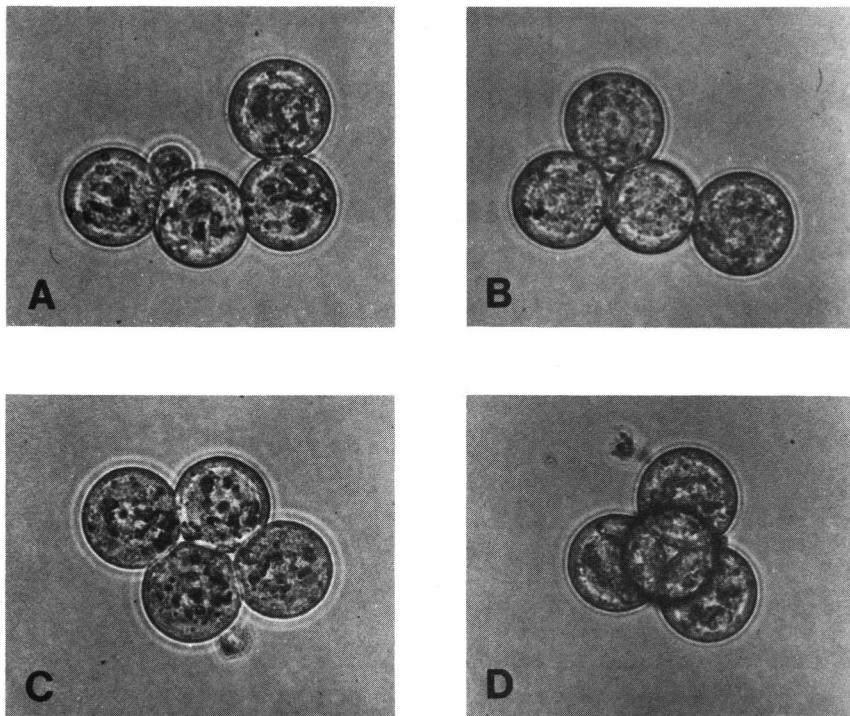


Fig. 2. 4-cell stage embryos (A, B, C and D) developed in culture for 18hr after removal of zona-pellucida 6hr after insemination. 4-cell stage embryos were classified into 4 types according to the total points of contact between the 4 blastomeres. That is namely, A, B, C and D have 3, 4, 5 or 6 points of contact, respectively.

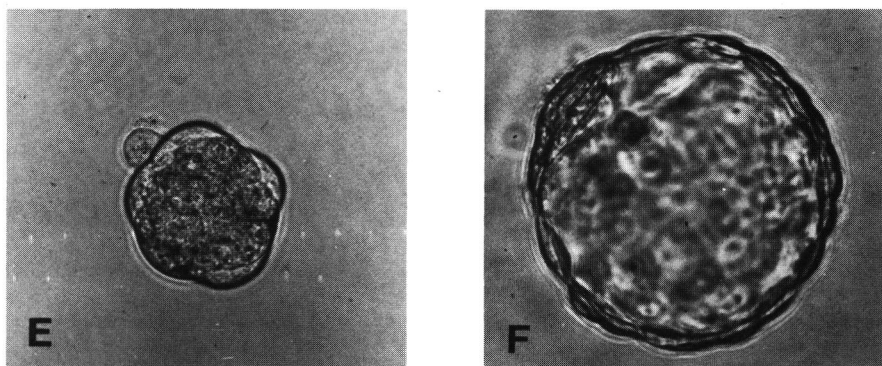


Fig. 3. Morula (E) and blastocyst (F) developed in culture for 66hr and 114hr respectively after removal of zona-pellucida. The two photographs represent the same embryo.

Table 4. 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- borns (%)
76	5/8 (63)	18 (24)	4 (5)

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

び割球の分離〔1〕を防ぐために必要な構造物ではあるけれども、初期胚の発生(卵割)そのものには必須ではないことを明示していると思われる。また、排卵された卵子の透明帯の機能のひとつと考えられている卵細胞に接する微小環境(囲卵腔)の調節〔16〕は、少なくとも受精卵にとっては、必要ではないと思われる。今回の実験条件においては、培養容器および培養液量の違いによって、透明帯除去胚の前核期から胚盤胞までの発生率には差が認められず、また、D-20およびD-100区においては、対照区との間にも差が認められなかった(Table 1)。さらに、細胞数検査の結果(Table 3)では透明帯除去胚と対照胚との間に差は認められなかった。このことは、体外培養条件下における透明帯の有無は、胚の着床前の発生に影響を及ぼさないことを明瞭に示している。これまで報告されている2分離胚の培養に関する研究では、コンパクション時の胚の立体構造が内部細胞塊の形成に影響を及

ばすため、透明帯の欠如によって生じた割球配置の異常が、着床後の胚の発生を阻害すると推察している〔17〕。本実験では、コンパクション時の胚の形態について詳細な観察はされなかったが、4細胞期における胚の形態（割球の接着点数）と胚盤胞への発生率との関係(Fig. 1)をみると、直鎖状に4個の割球が配列したタイプAと立体構造を呈していたタイプDとの値に差がなかった($P>0.05$)。したがって、4細胞期における透明帯除去胚の割球配列の様式は、胚盤胞までの発生には影響しないと思われる。しかしながら、胚盤胞への発生率に比して産仔への発生が低率であったことの原因や、形態別に胚移植を試みることによって、割球配列と産仔への発生能との関係を明確にすることが今後の課題と考える。

謝辞

本論文を御校閲いただいた東京大学医科学研究所 獣医学研究部長 豊田 裕博士に感謝いたします。

要約

前核期で透明帯の除去を施したマウス体外受精卵の、体外培養および産仔への発生能について検討した。授精後6時間に透明帯を除去した(C57BL/6J X C3H/HeN)F1体外受精卵をテラサキマルチプレート内の20 μ lの培地(P-区)および20 μ l(D-20区)および100 μ lのドロップ(D-100区)内で、それぞれ1個ずつ授精後120時間まで培養した。授精後96時間における胚盤胞への発生率は、P区(58%)が透明帯の除去を施さない対照区(87%)と比較して有意に低率であったが、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。P区の76個の胚盤胞を8例の受容雌に移植した結果、4例(♀:♂=3:1)の生存産仔が得られた。以上の結果、受精卵における透明帯は、卵子の発生(卵割)そのものには必須ではないと考えられる。

文献

- [1] Bronson, R.A. and McLaren, A. (1970). Transfer to the mouse oviduct of eggs with and without the zona-pellucida. J.Reprod.Fert., 22, 129-137.
- [2] Modilinski, J.A. (1970). The role of the zona pellucida in the development of mouse eggs in vivo. J.Embryol.exp.Morph., 23, 539-547.
- [3] Tarkowski, A.K. (1959). Experiments on the development of isolated blastomeres of

mouse eggs. *Nature*, 184, 1286-1287.

- [4] Tarkowski, A.K. (1959). Experimental studies on regulation in development of isolated blastomeres of mouse eggs. *Acta Theriologica*, 3, 191-267.
- [5] Tarkowski, A.K. (1961). Mouse chimaeras developed from fused eggs. *Nature*, 190, 857-860.
- [6] Mintz, B. (1962). Experimental study of the developing mammalian egg: Removal of zona pellucida. *Science*, 138, 594-595.
- [7] Tarkowski, A.K. and Wroblewska, J. (1967). Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J. Embryol. exp. Morph.*, 18, 155-180.
- [8] Bowman, P. and McLaren, A. (1970). Viability and growth of mouse embryos after in vitro culture and fusion. *J. Embryol. exp. Morph.*, 23, 693-704.
- [9] Fiser, P.S. and Macpherson, J.W. (1976). Development of embryonic structures from isolated mouse blastomeres. *Can. J. Anim. Sci.*, 56, 33-36.
- [10] Rottmann, O.J. and Lampeter, W.W. (1981). Development of early mouse and rabbit embryos without zona pellucida. *J. Reprod. Fert.*, 61, 303-306.
- [11] Mullen, R.J., Whitten, W.K. and Carter, S.C. (1970). Studies on chimeric mice and half-embryos. In *Annual Report of the Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME*, P. 67.
- [12] 富樫守、鈴木宏志、宮井達也、岡本道生 (1987). マウスの2細胞期胚分離による一卵性双生仔の作出、*家畜繁殖誌*, 33, 51-57.
- [13] Whitten, W.K. (1971). Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro. *Advan. Biosci.*, 6, 129-141.
- [14] 豊田裕、横山峯介、星冬四郎 (1971). マウス卵子の体外受精に関する研究 I、精巢上体精子による受精成績、*家畜繁殖誌*, 16, 147-151.
- [15] 加藤基恵、田中憲穂 (1980). 優性致死誘発機序に関する1細胞期胚染色体異常と不定期DNA合成、*日本遺伝学誌*, 55, 55-65.
- [16] 豊田裕 (1975). 哺乳動物の卵子(8)、畜産の研究、29, 85-90.
- [17] 長嶋比呂志、加納康彦、尾川昭三 (1984). 初期胚の顕微手術による哺乳類一卵性双生仔の作出実験、*哺乳類の発生工学*, P. 111-124.

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

Movoment 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.

Abstract

Good spermatozoa were introduced by the layering method from six semen samples, and movement of the spermatozoa 15 to 300 minutes after introduction was recorded with a microscopic high-speed video camera (1/200 sec. frame). From the frame-by-frame analysis movement characteristics of spermatozoa's flagellum were classified into 4 types (A , B , C , D). Time-course changes were studied. At the beginning, most of the spermatozoa showed a type A or B, but later the pattern gradually changed from A to B , C and D. And these types got up speed in alphabetic order. At the same time, the hamster test was carried out for examination of the acrosome reaction. That results revealed no sperm penetration 120 minutes after when the number of spermatozoa showing type D increased. The type D showed an extremely dynamic movement, being definitely different from the other types, and it was considered as hyperactivation of human spermatozoa. This changes probably occurred much earlier than onset of the acrosome reaction.

緒 言

受精現象の成立には、卵子、精子にそれぞれの条件が必要と考えられている。精子の条件としては、受精能獲得 capacitation・先体反応 acrosome reaction・尾部の運動性があげられ、これら3条件のうち1つでも欠ければ受精が成立しない。

運動性に関しては、有る種の哺乳動物の精子は卵子に受精する頃に、尾部の運動がより活発になることが知られており、この現象は hyperactivation と呼ばれている。Hyperactivation がすべての哺乳動物に認められるか否かは不明で、ヒト精子についても同様である。

今回、我々は、顕微鏡ハイスピードビデオを導入することにより、ヒト精子に於いて hyperactivation が存在するか否かを検討した。合わせて、capacitation・acrosome reaction との時間的關係についても検討を加えた。

研究方法

6人の健康成人男子から用手法にて精液を採取し、30分室温に置くことで十分液化させた。

小試験管に2.0mlの modified Biggers, Whitten and Whittingham 液 (以下 mBWW と略す) を入れ、その管底に1.0mlの精液を静かに注入する。試験管口をシールし、30度の傾斜で37°C, 5% CO₂ in air に静置する。下層の精液より mBWW の中へ swim up してきた運動性良好精子について、swim up 開始から15分後、30分後、60分後、その後は5時間後迄1時間おきにそれぞれ精子を回収して検体とした。これらの検体を37°C に保温した Makler の精子計算盤に滴下し直ちに位相差顕微鏡にセットし、顕微鏡ハイスピードビデオで1視野数秒ずつ、精子が100匹以上となる迄録画した。このビデオシステムでは毎秒200コマの超高速録画が可能のため、1/200秒毎の精子の動きが詳細に観察出来、我々は特に尾部の動きから精子の運動形態を分類し、経過時間による変化を検討した。

それと同時に、ハムスターテストを行ない capacitation・acrosome reaction と、精子尾部の運動形態との時間的関連について検討した。ハムスターテストの概略については図1に示した。

結 果

ハイスピードビデオの再生画像より、ヒト精子の培養液内運動パターンは、図2の如く4つのタイプに分類出来た。図2のそれぞれの精子のシェーマは1/40秒毎の精子の動きをトレースしたものである。ここでいうタイプAとは、運動は活発であるが、尾部の動きかた精子の進行方向ともに極めて不規則なものである。タイプBは、直進はするが尾部末端部の振幅の大きい動きが目立ち、それが有効な推進力となっていない。タイプCは、尾部末端部の振幅が小さくなり速度が増加する。タイプDは、尾部全体が波を打つようにリズムカルな動きとなり速度もさらに一段と増加する。

培養液中の精子は、上記の4つのタイプが混在するが、時間経過にともなうそれらの割合の変化を図3に示した。グラフの縦軸はswim up開始後からの経過時間を、横軸は各タイプの占める割合を百分率であらわした。症例1, 2, 3のグラフから、15分後ではほとんどがAタイプ、Bタイプで、時間経過につれて両タイプが減少しCタイプが出現するようになり、さらに特長的なことは、60分から120分以後にはタイプDが出現し、以後は著増することである。症例4, 5についても同様であり、症例6でもタイプDへの変化の割合は低値であるが、180分後より認められている。

次に、各タイプ毎の平均精子速度を求めた。そのために1/10秒毎に1秒間、録画画像より精子の動きをトレースし、各症例の各タイプ毎の精子10匹について平均速度を求めると表1の如くである。表より各タイプ別の速度を比較すると、症例6を除いてA→B→C→Dの順に速度が増加することがわかる。

図4は各症例で行なったハムスターテストの成績を侵入率 (penetration rate) で表わし、侵入率とタイプDの占める割合の推移を同じグラフ上に示したものである。各症例とも大半の精子がタイプDへの変化をおこしている120~300分の時点でも侵入率は0、もしくは低値であった。

考 察

精子の hyperactivation は Yanagimachi が1970年に、ハムスターの精子が受精能を獲得し、先体反応を起こす頃に以前にも増して尾部の動きが活発になることを発見して名付けたものである。^{1) 2)} 現在では、ハムスターの他にモルモット、マウス、イヌ、イルカ、ウサギ、コウモリ、ヒツジの精子でも確認された。^{3) 5) 6) 12)} この hyperactivation の持つ意味はまだ明確にされていないが cumulus oophorus と zona pelluchda を通過するために必要であ

表1 培養液内精子のタイプ別平均速度
($M \pm SD$ $\mu\text{m}/\text{sec}$)

type	case 1	case 2	case 3	case 4	case 5	case 6
type A	19.3 \pm 9.6	17.7 \pm 4.6	20.1 \pm 7.6	13.9 \pm 7.3	27.4 \pm 8.1	14.8 \pm 5.7
type B	38.8 \pm 6.3	29.5 \pm 4.0	31.4 \pm 8.2	28.7 \pm 9.3	41.2 \pm 11.3	23.9 \pm 6.1
type C	53.0 \pm 10.3	56.4 \pm 7.1	38.9 \pm 7.4	45.2 \pm 7.9	62.7 \pm 11.5	30.6 \pm 6.7
type D	59.5 \pm 8.3	64.1 \pm 10.0	52.3 \pm 7.5	51.7 \pm 4.6	66.3 \pm 10.7	26.4 \pm 9.6

図1 ハムスターテスト

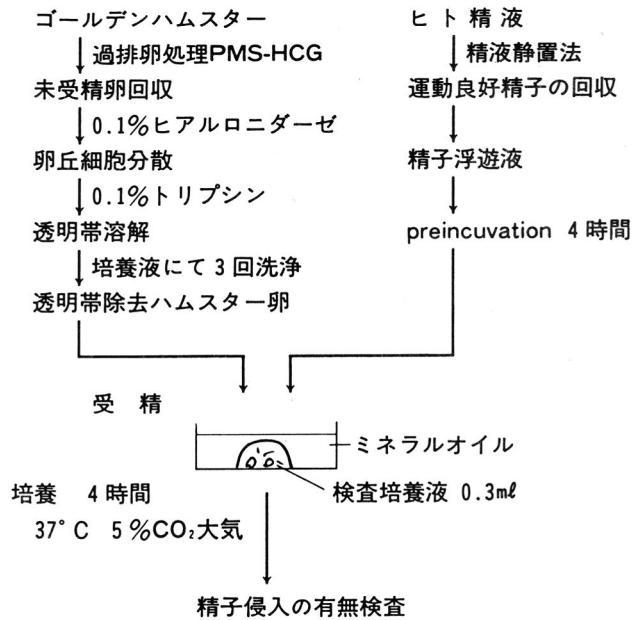


図2 培養液内精子の運動タイプ分類とその特徴 (0.025秒毎の動きを示す)

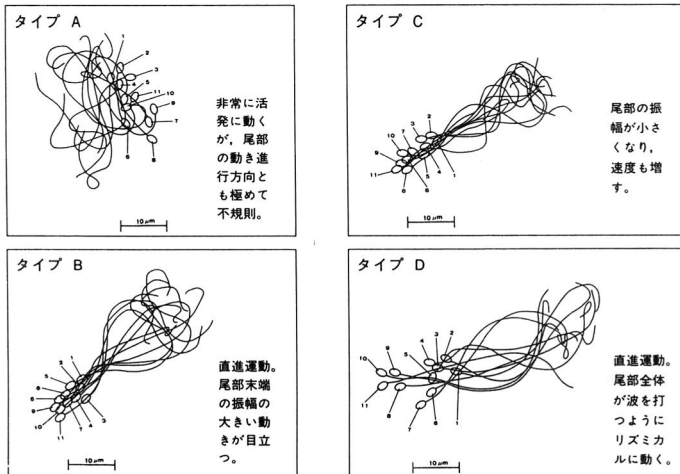


図3 時間経過と精子の運動タイプの推移

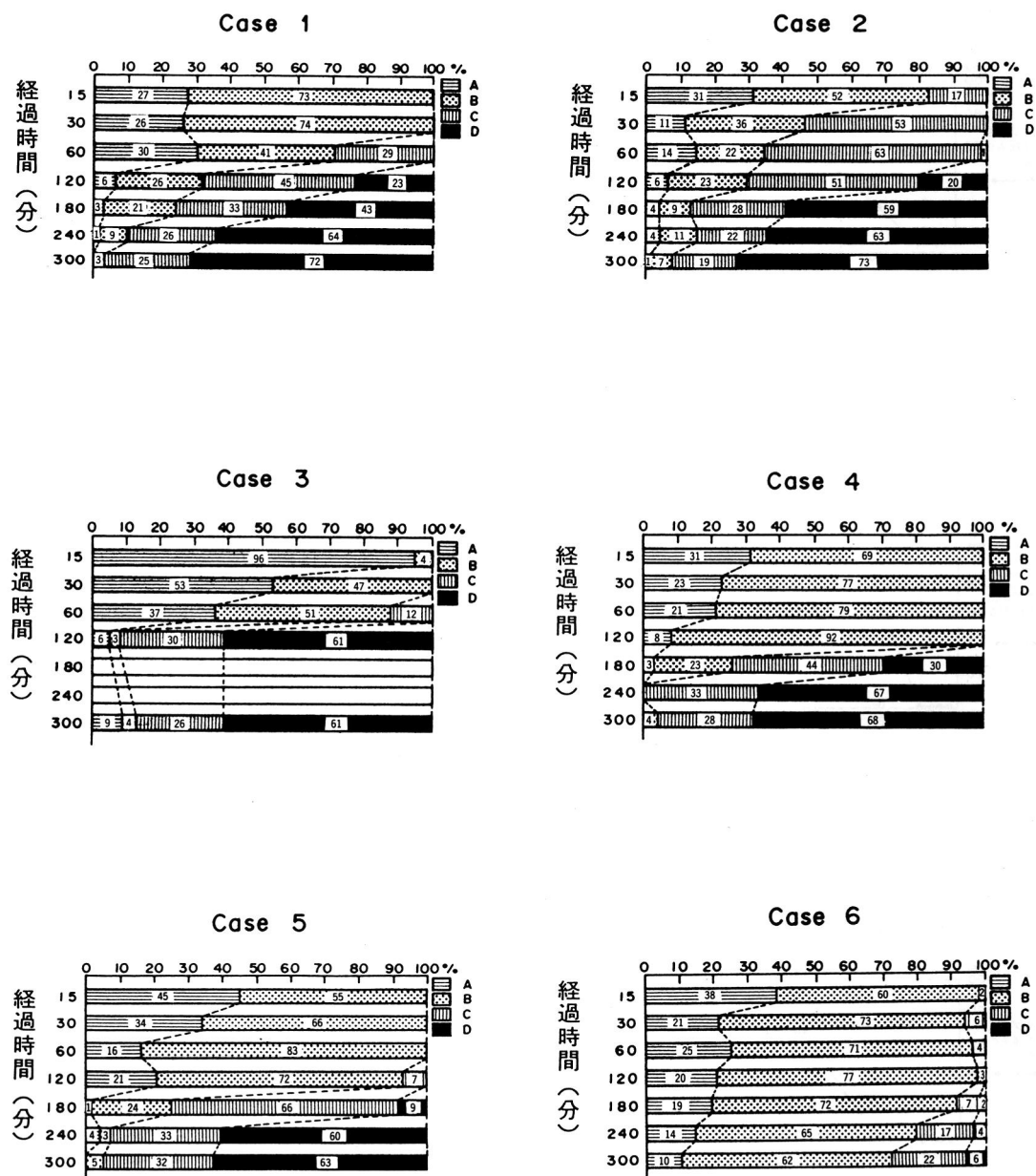
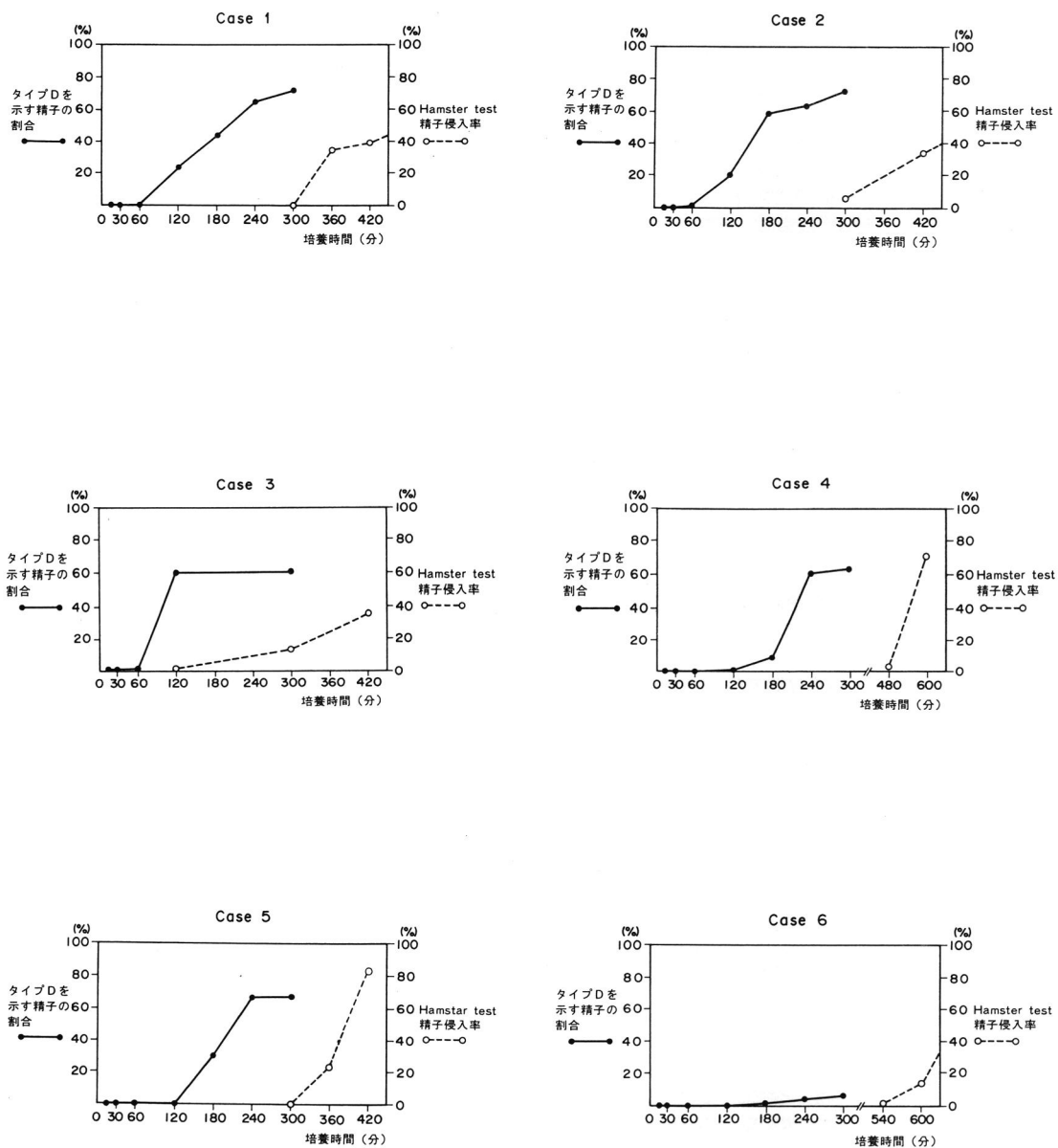


図4 ヒト精子のHyperactivationとCapacitation, Acrosome reaction



ろうと考えられている。

ヒト精子の hyperactivation の存在の有無は異論のあるところであるが, time-exposure photomicrography, microcinematography, videomicrography と近年の解析装置の進歩により精子の運動形態は明確にされつつある。今回、我々はハイスピードビデオを使用し、培養液内の精子運動パターンは初めはタイプA, Bがほとんどで、時間の経過とともにB→C→Dと変化し、速度もこの順序で増加するが、タイプDの動きは明らかに他のタイプと異なり非常に力強くスピーディで、尾部運動の大きな変化という点から考慮して、タイプDへの変化をヒト精子の hyperactivation として良いのではないかと考えられる。タイプDは培養開始後120～180分後から現れ、180～240分で大部分を占めるようになる。また、acrosome reaction との関連をハムスターテストの結果からみてみると、既に大半の精子が hyperactivation を起こしている180～300分の時点でも侵入率は極めて低く、おそらくヒトの場合は acrosome reaction の起こるかなり前の時期に hyperactivation が起こるものと考えられる。

文 献

- 1) A. Okada, et al. (1986) Hyperactivation of human sperm and zona-free hamster egg penetration assay. Z.mikrosk.-anat. Forsch. 100, 233～240
- 2) A. Okada, et al. (1985) Hyperactivation of human spermatozoa. Andro. 17(6), 583～586
- 3) A. D. Fleming & R. Vanagimachi (1982) Fertile life of acrosome-reacted guinea pig spermatozoa. J. Exp. Zool. 220, 109～115
- 4) Amnon Makler (1980) Use of the elaborated multiple exposure photography method in routine sperm motility analysis and for research purposes. Fertil. steril. 160～166
- 5) D. F. Katz & R. Yanagimachi, et al. (1978) Movement characteristics and power output of guinea-pig and hamster spermatozoa in relation to activation. J. Peprod. Fert. 52, 167～172
- 6) D. F. Katz, et al. (1981) Movement characteristics of hamster and guinea pig spermatozoa upon attachment to the zona pellucida. Biol. Reprod. 15, 785～791
- 7) D. F. Katz, et al. (1981) Sperm motility assessment by videomicrography. Fertil. Steril. 35(2), 188～193
- 8) D. F. Katz, et al. (1981) Variations within and amongst normal men of movement characteristics of seminal spermatozoa. J. Reprod. Fert. 62, 221～228
- 9) J. W. Overstreet, D. F. Katz, et al. (1979) A simple inexpensive method for objective assessment of human sperm movement characteristics. Fertil. Steril. 31(2) 162～172
- 10) L. J. Burkman (1984) Characterization of hyperactivated motility by human spermatozoa during capacitation: comparison of fertile and oligozoospermic sperm populations. Arch. Andro. 13, 153～165
- 11) R. J. Aitken, et al. (1982) An analysis of sperm function in cases of unexplained infertility: conventional criteria, movement characteristics, and fertilizing capacity. Fertil. Steril. 38(2), 212～221
- 12) R. Yanagimachi (1970) The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. J. Reprod. Fert. 23, 193～196

ハムスターの体外培養卵巣における
tranexamic acid の排卵抑制効果

An inhibitory effect of tranexamic acid on ovulation
in hamster ovaries incubated in vitro

山海 直、渡辺靖浩、金山喜一、遠藤 克、佐久間勇次

Tadashi SANKAI, Yasuhiro WATANABE, Kiichi KANAYAMA, Tuyoshi ENDO
and Yuzi SAKUMA

日本大学農獣医学部獣医生理学教室

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

Abstract

It is reported as a hypothesis that, in the final stage of ovulation, the plasminogen activator acts on the follicular wall to rupture it up and thus to induce ovulation. The authors applied the excited ovary to tranexamic acid, which is an anti-plasminogen activator, to examine if it would inhibit ovulation. Ovaries were obtained from golden hamsters and incubated in vitro. Tranexamic acid was added to the medium at a concentration of 0.1%. In ovaries excited at 21:00 and 23:00 of proestrus of the estrus cycle, ovulation rate was 25.0% and 91.6%, and the average numbers of ova ovulated were 0.25 ± 0.12 and 1.58 ± 0.26 , respectively. The number of ova was significantly fewer than the control.

In this study, it was clear that tranexamic acid inhibited ovulation from ovaries in vitro. The present results indicated that ovulation in cultured ovaries was inhibited by blocking plasminogen activator.

緒 言

生殖の一現象である排卵は、LHサージ後に成熟卵胞の卵胞壁組織が開裂することによって起こる。この卵胞壁開裂の排卵機序については多くの研究者によって詳細な検討がなされているが、未だ明確でない部分が多い。

Espey(1980)¹⁾ は、家兎、ラットを用いて詳細な検討を試み、LHサージの後に、adenyl cyclaseによってcAMPが産生され、それが卵胞の旧莢膜細胞と顆粒膜細胞からのステロイド合成を誘起すると共に、histamine、serotoninなどを産生し、その後、prostaglandin $F_2\alpha$ が繊維芽細胞に作用し、さらにprostaglandin E_2 とhistamine、serotoninなどの作用によって卵胞に炎症状態が誘起され、その結果、産生された蛋白分解酵素によって卵胞壁結合組織の変性がおこることによって排卵が誘起されることを明らかにした。また、バルビツレートなどの薬物による中枢抑制などによってLHサージを抑制すると排卵は遅延すること、さらにまた、非ステロイド系抗炎症剤である indomethacin を投与し prostaglandin の産生を抑制することによって排卵を抑制できることが、人、豚、家兎、ラットにおいて報告されている。これらはEspeyの排卵機構モデルを裏付けるものである。しかしEspeyら²⁾ は、炎症状態の卵胞および増殖した繊維芽細胞から分泌される蛋白分解酵素、すなわち plasminogen activatorによるcollagenaseの活性化に対して、その阻害作用を有するtranexamic acidを用いて、排卵抑制効果について検討しているが、排卵および plasminogen activator の活性化の抑制は認められなかったと報告している。

著者らは、tranexamic acid の排卵抑制作用について、より直接的に卵巣に作用させる方法として、ハムスターの摘出卵巣を用いて体外培養液に tranexamic acid を添加することによって、その排卵抑制効果について検討を試みた。

材料および方法

供試動物は、ゴールデンハムスターの成熟未経産の雌で、70日齢以上の体重100~160 g のものを用いた。また、排卵日の朝にハムスターに特徴的に認められる Post-ovulatory vaginal discharge を指標にし、規則正しい4日の性周期を連続して3回以上繰り返したもののみを供試した。飼育は、金属ケージに4~5匹ずつ収容し、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。

実験に先立ち、卵巣の摘出時刻を設定する目的で、proestrusの19:00、21:00、22:00および23:00の4試験区を設けて、摘出した卵巣を体外培養し、翌朝10:00に排卵の有無について観察した。最も排卵成績の良好であったのは23:00の95.8%であり、ついで22:00の90.4%、21:00の75.0%であった。19:00は全く排卵しなかった。これらの成績から、供試卵巣はproestrus の21:00と23:00を用いることにして、放血と殺して、直ちに卵巣を無菌的に摘出し、培養液中で脂肪、血液などを丁寧に除去した。組織培養用シャーレ (Organ Tissue Culture Dish 60×15mm、内径30mm : Falcon社) に100メッシュの金網をおき、その上に卵巣をのせ、上部約80%が液面上に露出するように培養液を注入して、37℃、5%CO₂下で培養した(Fig.1,2)。培養液は、森岡ら³⁾ の報告を参考にし、TCM199(日水社) 1ml中にグルコース3.0mg、L-グルタミン0.1mg、アスコルビン酸0.05mg、重炭酸ソーダ1.9mgおよびストレ

プトマイシン0.12mgを添加して調製し、それに0.1% w/w tranexamic acid を添加して供試した。同一個体から摘出した2個の卵巢のうち1個は tranexamic acid 無添加mediumで培養して対照区とし、他の1個は tranexamic acid 添加mediumで培養した。検索は翌日の10:00に実体顕微鏡下で行った。排卵の有無を確認した後、卵巢から卵子を遊離する目的で卵巢を0.1%ヒアルロニダーゼ添加mediumに約10分間放置し、卵巢表面、金網上および培養液中に遊離した卵子数を算定した(Fig.3)。

結 果

体外培養卵巢における卵巢摘出時刻と排卵との関係を検討した結果は Table 1に示すように、proestrus の19:00、21:00、22:00および23:00に摘出した卵巢の排卵率はそれぞれ0、75.0、90.4 および 95.8%であり、平均排卵数は0、 1.90 ± 0.24 、 1.76 ± 0.63 および 3.96 ± 0.15 個であった。排卵率は、in vivo において排卵が開始される時刻に近いほど、すなわち、排卵直前の卵巢ほど高値を示した。平均排卵数についても同様の傾向が認められ、23:00摘出卵巢の平均排卵数は21:00、22:00のものと比較して有意に高値を示した。しかし、in vivo における正常な排卵数と比較するとやや少なかった(Fig.4)。

卵巢を tranexamic acid 添加mediumで体外培養した結果は Table 2に示すように、21:00に卵巢を摘出し体外培養した tranexamic acid 添加区で供試12個のうち3個が排卵し排卵率は25.0%であり、対照区の83.3%に比べて著しく低値であった。また、平均排卵数についても tranexamic acid 添加区は 0.25 ± 0.12 個であり、対照区の 2.00 ± 0.78 に比べて有意な減少が認められた(Fig.5)。排卵直前の23:00に摘出した卵巢では、対照区の12個の卵巢の全例に排卵が認められ、tranexamic acid 添加区では、12個のうち11個(91.6%)の卵巢に排卵が認められ、tranexamic acid の顕著な影響は認められなかった。しかし、平均排卵数は、 1.58 ± 0.26 個で対照区の 3.83 ± 0.61 と比較して有意な低下が認められた(Fig.6)。

Table 1 Results of ovulation in hamster ovaries explanted at 19:00, 21:00 and 23:00

Time of explantation	No. of ovaries	No. of ovaries ovulated(%)	Total No. of ova ovulated	Ave. No. of ova ovulated (/ovary)
19:00	4	0(0.0)	0	0
21:00	20	15(75.0)	38	1.90 ± 0.24
22:00	21	19(90.4)	37	1.76 ± 0.63
23:00	24	23(95.8)	95	3.96 ± 0.15

Values are mean \pm S.E.

Table 2 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 ovulated	Ave. No. of ova/ovary
21:00	0.0 (control)	12	10(83.3)	24	2.00±0.78
	0.1	12	3(25.0)	3	0.25±0.12
23:00	0.0 (control)	12	12(100.0)	46	3.83±0.16
	0.1	12	11(91.6)	19	1.58±0.26

Valuse are mean±S.E.

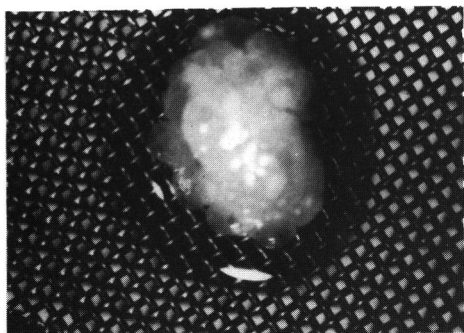


Fig.1 A hamster ovary cultured in vitro

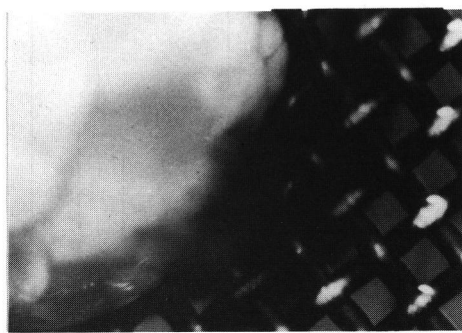


Fig.2 A matured follicle in in vitro cultured ovary

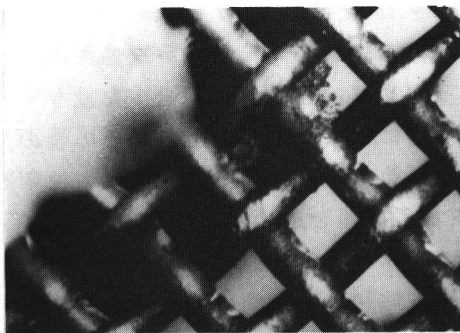


Fig.3 An ovulated ovum from ovaries cultured in vitro

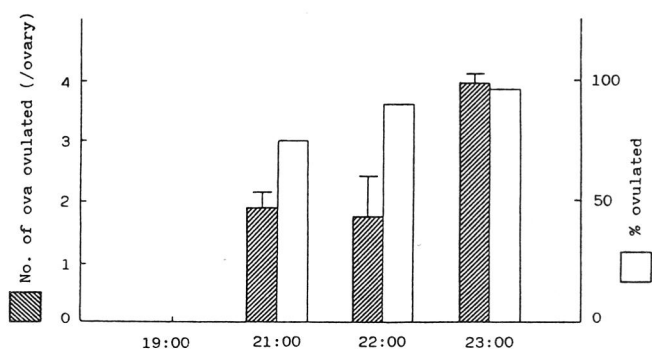


Fig.4 Rate of ovulation in hamster ovaries explanted at 19:00, 21:00, 22:00 and 23:00

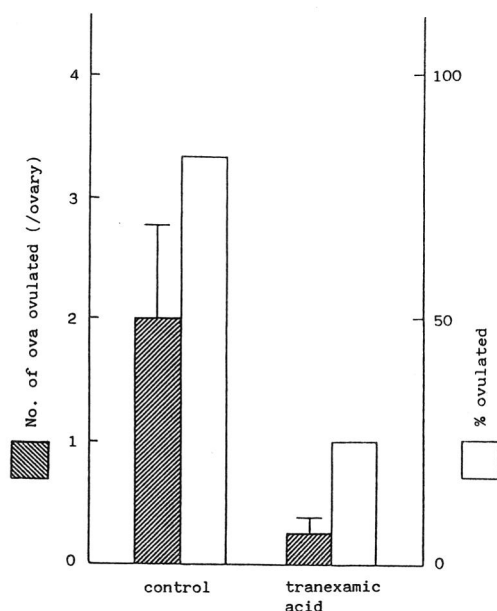


Fig.5 Effect of tranexamic acid on ovulation in hamster ovaries explanted at 21:00

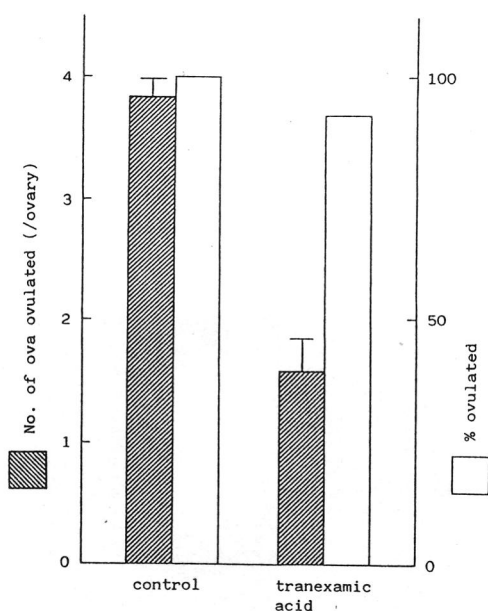


Fig.6 Effect of tranexamic acid on hamster ovaries explanted at 23:00

考 察

排卵の遅延および抑制に関する研究は古くから試みられており、Mikamo⁴⁾はアフリカツメガエルで遅延排卵を観察し、濾胞内過熟卵における染色体不分離を示唆した。また、FugoとButcher⁵⁾は発情前期のラットにペントバルビタールを投与することによりLHサージを抑制して遅延排卵を誘起し、卵胞内における卵子の過熟がその後の受精異常の原因となることを示唆している。また、LHサージ後の卵胞開裂機構で重要な役割をもつものと考えられているprostaglandinの産生を抑制して排卵を遅延する試みも行われており、Espey²⁾は非ステロイド系抗炎症剤であるindomethacinにより排卵が抑制されることを確認している。さらに、川村ら⁶⁾はindomethacinで排卵を抑制した家兎にprostaglandin $F_2\alpha$ を外因性に持続静注法で多量に投与することで一度停止した排卵現象が回復すると報告している。

本研究は、排卵現象の最終段階において関与していると思われる plasminogen activator

の合成阻害作用をもつ tranexamic acid による排卵抑制効果および排卵機構の解明と薬物投与による排卵遅延の可能性について検討したものである。本研究においては、tranexamic acid を卵巣に直接作用させる目的で、卵巣の体外培養法を用いて tranexamic acid の plasminogen activator 阻害による排卵抑制効果について実験を試みたものである。哺乳動物の *in vitro* における排卵誘起についての報告は少ないが、1975、1976年に Baranczuk と Fainstat^{7,8)} はハムスターを用いて低率であるが体外培養卵巣からの排卵誘起に成功している。また、Osman と Noordanus⁹⁾ はラットとハムスターの摘出卵巣を体外培養することによって排卵率を大幅に向上させた。さらに、1982年には森岡、市川³⁾ はハムスター卵巣を用いて 21:00 以降に摘出培養した卵巣での排卵率 100%、平均排卵数も約 5 個と優れた成績を得ている。本研究は、森岡、市川の報告に準じて行ったものであるが、21:00、22:00 および 23:00 に摘出し培養した成績では、卵巣の排卵率が、それぞれ 75.0、90.4、95.8% で、平均排卵数は 1.90、1.76 および 3.96 個であり、いずれも森岡、市川の報告より低値であった。また、本研究において、卵巣を摘出培養する時刻が *in vivo* における排卵時刻に近づくにつれて排卵率、排卵数とも増加する傾向が認められた。このことは、他の同様の研究成績にも共通した傾向が認められ、Espey の提唱する排卵機序¹⁾ におけるいわゆる排卵因子の卵巣内への蓄積が重要な意義を有するものと理解される。本研究において 19:00 に摘出し、培養した卵巣からは排卵が認められず、この時刻までの卵巣には循環血液中の因子が必要と考えられ、排卵過程において必要な因子がまだ卵巣内に十分蓄積されていないことが示唆される。また、卵巣を摘出した時間が 23:00 と 22:00 の間に有意な差が生じたが、同様に排卵因子の蓄積量の差であるものと推察される。また、体外培養卵巣からの排卵数は、*in vivo* における正常排卵数と比較して少なく、培養方法にまだ検討の余地が残されていることを示唆するものである。

本研究では、plasminogen activator 合成阻害剤である tranexamic acid を体外培養卵巣の medium に添加し、その排卵に及ぼす抑制効果について検討した。Espey ら²⁾ はこの物質をラットに投与し、排卵に対する影響について検討しており、その結果、排卵抑制効果は認められないことを報告しているが、著者らの予備実験においても同様の成績であった。本研究では、卵巣の培養開始時刻による tranexamic acid 感受性の違いを考慮にいれ、proestrus の 21:00 と 23:00 の 2 試験区を設けた。21:00 に培養を開始した卵巣では、顕著な排卵率の低下と平均排卵数の減少を認め、23:00 に培養を開始した試験区では平均排卵数が減少するのを認めたが、排卵率にはほとんど差が認められなかった。

以上のことから、tranexamic acid の排卵抑制作用は卵巣の培養開始時刻によりその影響が異なることが明らかとなり、排卵因子の卵巣内蓄積量および plasminogen activator の出現時刻と何らかの関連性があるものと考えられる。*in vitro* 条件下における方法を用いる場合、*in vivo* 排卵との相違、培養液が卵胞あるいは卵子に及ぼす影響など多くの検討課題が残されているが、tranexamic acid により排卵が抑制され、Espey¹⁾ の排卵機構モデルの一部を裏づける成績が得られた。また、近年、非ステロイド系の抗炎症剤である indomethasin が多用されており、ヒト、家畜で plasminogen activator 阻害薬による排卵遅延を誘起できる可能性が示唆された。

文 献

- 1) Espey, L. L. (1980). Ovulation as an inflammatory reaction-a hypothesis. Biol. Reprod., 22, 73~106.
- 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.
- 3) 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.
- 4) Mikamo, K. (1968). Mechanism of non-disjunction of meiotic chromosomes and of degeneration of maturation spindles in eggs affected by intrafollicular overripeness. Experientia, 24, 75~78.
- 5) Fugo, N. W. and Butcher, R. L. (1966). Overripeness and the mammalian ova. Fertil. Steril., 17, 804~814.
- 6) 川村直行、姫野憲雄、岡村 均、森 崇英、福本 学、翠川 修(1986). インドメサシン投与家兎の排卵とcollagenolytic enzymes活性へのPGF₂ αの効果、日産婦誌、38, 81~87.
- 7) Baranczuk, R. J. and Fainstat, T. (1975). Influence of timing of explantation upon ovulation of hamster ovaries in vitro. J. Endocr., 65, 449~450.
- 8) Baranczuk, R. J. and Fainstat, T. (1976). Progesterone-induced ovulation of the hamster ovary in vitro. J. Endocr., 70, 317~318.
- 9) Osman, P. and Noordanus, C. L. (1980). Ovulation from rat and hamster ovaries in vitro. J. Reprod. Fert., 59, 431~436.

健保適用

下垂体性性腺刺激ホルモン パーゴナル[®]注75・150

- 強力な卵胞成熟ホルモン（FSH）作用により、卵胞の発育と成熟を促し、胎盤性性腺刺激ホルモン（HCG）との組合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



帝國臓器製薬株式会社
東京都港区赤坂二丁目5番1号

【使用上の注意】

1. 一般的注意

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

マウスプロラクチンのマウス配偶子
および胚発生におよぼす影響

The Analysis of the Effects of Prolactin on Gametes and
Zygotes in Vitro 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3講座

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

ABSTRACT

Recently, human in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) has been established as one of the treatments for some selected infertile patients. However, the effect of prolactin on gametes during in vitro fertilization has not been elucidated. In the present study, the effect of mouse prolactin on the motility of spermatozoa, in vitro fertilization and in vitro development of the embryos were investigated in mice using the media containing three different concentrations (10 ng/ml, 50 ng/ml and 100 ng/ml) of prolactin. The development of unfertilized and fertilized oocytes (embryo) were not affected in vitro by prolactin regardless of the amount of prolactin added to culture media. However, the fertilizing capacity of the spermatozoa was suppressed when they were preincubated for 90 min in culture media containing 50 ng/ml and 100 ng/ml of prolactin. The motility of the spermatozoa was not affected by prolactin. The present study indicates that prolactin may have some effects on capacitation process of spermatozoa preincubated in vitro.

緒 言

プロラクチン(PRL)は下垂体前葉ホルモンの1つであり, 生理的には乳汁分泌の維持に不可欠であると考えられていた。しかし, ヒトPRLのRadioimmunoassay¹⁾が可能となってからはヒトにおけるPRLの生理作用や病的状態におけるPRLの意義等の研究が急速に進展し高プロラクチン血症が排卵障害の一因であることが明かとなった。また, Bromocriptin (CB 154)の開発は高プロラクチン血症による不妊症にとって大きな福音となった。近年, 不妊症治療法の1つとして体外受精胚移植法(IVF-ET)²⁾や配偶子卵管内移植法(GIFT)³⁾が確立されつつある。IVFやGIFTでは通常, 配偶子(精子, 卵子)の培養には母体血清⁴⁾や臍帯血清⁵⁾の添加された培養液が用いられている。しかし, PRLの配偶子や胚に与える影響はまったく分かっていないのが現状である。そこで著者らは, マウスPRLをマウス体外受精胚培養系に加えてその影響を検討した。

実験方法

1. マウスPRLおよび培養液

マウスPRLはマウス下垂体培養液より抽出純化したものを用いた⁶⁾。マウス体外受精および胚培養には豊田らにより開発されたTYH-280⁷⁾を用いた。なお、本実験に用いたすべての培養液はMillipore超純水製造装置(Organex型)を通して得られた超純水⁸⁾を用いて作成した。Control培養液としてはPRLの含まれないTYH-280を用いた。PRL含有培養液はPRL濃度10ng/ml, 50ng/ml, 100ng/mlの3種類とした。

2. 精子運動率の測定

ICR系成熟雄マウスの精巣上体尾部精子をcontrol培養液中に採取し、精子懸濁液を作成し、直後に運動率を計測した。次に、この精子懸濁液より20 μ lを400 μ lのcontrolおよびPRL 10ng/mlおよび100ng/ml含有培養液に加え、90分間37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ in airにて培養後に運動率を計測した。

3. マウス体外受精

ICR系の4週齢の雌マウスにPMSG 7.5 i.u. (Serotropin: 帝国臓器 K.K.) およびhCG 7.5 i.u. (Pergonal: 帝国臓器 K.K.) を48時間間隔で腹腔内投与し、hCG投与16時間後に卵管卵を卵丘細胞と共に採取した。0.1% Hyaluronidase 加TYH-280にて卵丘細胞を除去後、第1極体の認められるものを体外受精実験に用いた。精子はICR系成熟雄マウスの精巣上体尾部より採取した。この精巣上体尾部精子は90分間の前培養の後体外受精実験に用いた。400 μ lの培養液中に卵を入れておき、そこに前培養した精子を最終精子濃度が1 \times 10⁶/mlとなるように媒精した。媒精6時間後に倒立顕微鏡(ノマルスキー微分干渉装置付き)下に雌雄両前核を認めたものを受精卵と判定した。

3-a. 精巣上体尾部精子はcontrol培養液およびPRL含有培養液(PRL 10ng/mlおよび100ng/ml)中にて90分間の前培養の後、体外受精実験に用いた。体外授精はPRLの含まれない培養液中にて行った。

3-b. 精巣上体尾部精子はcontrol培養液中にて90分間の前培養の後、体外受精実験に用いた。体外受精はPRLの含まれない培養液中およびPRL含有培養液(PRL 10ng/ml, 50ng/mlおよび100ng/ml)中にて行った。

4. 体外受精および受精卵培養

F₁ hybrid (C3H \times C57BL)⁹⁾ 4週齢雌マウスをPMSGおよびhCGにて過排卵誘起し、精子はICR系成熟雄マウスより採取、他の操作は3.と同様におこない体外授精を施行した。約6時間後に受精の判定を行った後、受精卵のみをそれぞれ媒精を行ったのと同じ400 μ lの培養液に移し、さらに120時間培養しExpanded BlastocystからHatching Blastocystまで観察した。

4-a. 精巣上体尾部精子はcontrol培養液およびPRL含有培養液(PRL 10ng/mlおよび100ng/ml)中にて90分間の前培養の後、体外受精実験に用いた。体外授精および受精卵の培養はPRLの含まれない培養液中にて行った。

4-b. 精巣上体尾部精子はcontrol培養液中にて90分間の前培養の後、体外受精実験に用いた。体外授精および受精卵の培養はPRLの含まれない培養液中およびPRL含有培養液(PRL 10ng/ml, 50ng/mlおよび100ng/ml)中にて行った。

5. 後期2細胞期胚および8細胞期胚培養

ICR系4週齢雌マウスをPMSGおよびhCGにて過排卵誘起し、hCG投与直後にICR系成熟雄マウスと自然交配させ翌日(Day 1)腔栓の認められたものを胚提供マウスとした。Day 2の午後およびDay 3に卵管および子宮を灌流し、後期2細胞期胚と8細胞期胚をそれぞれ採取して培養に供した。それぞれの胚は400 μ lのcontrolおよびPRL含有培養液(PRL 10ng/ml, 50ng/mlおよび100ng/ml)にて96時間

(8細胞期胚)から120時間(2細胞期胚)培養し, Expanded Blastocyst および Hatching Blastocyst への発育を観察した。

6. 統計処理

統計学的検討は, 精子の運動率については Student's t 検定を用い, 受精率および胚発育については chi-square 検定を用いて行った。

結 果

精子運動率の変化

採取10分後の精巣上体精子の運動率は77.0%であった。90分間培養後の運動率はcontrol培養液では63.3%となった。PRL 10ng/mlでは64.2%, PRL 100ng/mlでは58.6%となったが, この両者共にcontrol培養液との間に有意差を認められなかった。数値には現れていないが, 90分間の培養後の運動性を観察した印象ではPRL添加群でcontrolに比して良好であった(表-1)。

体外授精後の受精率

3-a. control培養液中で前培養した精子による受精率は90.5%であった。PRL添加群では89.6%(PRL 10ng/ml), 85.9%(PRL 50ng/ml), 47.4%(PRL 100ng/ml)であり, PRL 50ng/ml以上の群で有意に受精が抑制された(PRL 50ng/ml: $P < 0.05$, PRL 100ng/ml: $P < 0.01$)(表-2)。

3-b. 精子の前培養はPRL非添加培養液で行い, 授精の場にcontrol培養液およびPRL添加培養液を用いたところ, すべての受精率は93.9%から87.2%でPRL添加群とcontrolとの間に有意の差は認められなかった(表-3)。

体外授精後の受精率および体外受精卵の培養成績

4-a. control培養液中で前培養した精子による受精率は90.3%であった。PRL添加群では81.0%(PRL 10ng/ml), 71.9%(PRL 50ng/ml), 58.1%(PRL 100ng/ml)であり, PRL 50ng/ml以上の群で有意に受精が抑制された(PRL 50ng/ml: $P < 0.05$, PRL 100ng/ml: $P < 0.01$)。この体外受精卵を引き続きPRL非添加培養液中で培養したところ, % Expanded Blastocyst (%Exp)および% Hatching Blastocyst (%Hatch)の双方でPRL添加前培養群において抑制の傾向がみられると共に, %ExpではPRL 10ng/mlとPRL 100ng/mlとで有意に抑制

表-1. 90分間培養前後の精子運動率の変化

	培 養 液	精子運動率 _a (%+S.E.M.)
90分間 培養後	培養前 TYH-280	77.02±3.20
	コントロール _b	63.25±5.14
	PRL 10 ng/ml	64.25±3.99 ^{N.S.}
	PRL 100 ng/ml	58.62±4.82 ^{N.S.}

a: ICR雄精巣上体尾部精子

b: PRL非添加TYH-280

Student's t test against control.

N.S.: Not significant.

表-2. PRL加培養液中で前培養した精子の受精率

精子前培養液 _a	媒精培養液	媒精卵数 _b	受精卵数	受精率(%)
コントロール _c	TYH-280	74	67	90.5
PRL 10 ng/ml		77	69	89.6 ^{N.S.}
PRL 50 ng/ml		71	61	85.9*
PRL 100 ng/ml		76	36	47.4**

a: ICR雄精巣上体尾部精子

b: ICR雌卵子

c: PRL非添加TYH-280

Chi-square test against control.

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, N.S.: Not significant.

表-3. PRL加培養液中で媒精した卵の受精率

精子前培養液 _a	媒精培養液	媒精卵数 _b	受精卵数	受精率(%)
TYH-280	コントロール	114	107	93.9
	PRL 10 ng/ml	85	76	89.4 ^{N.S.}
	PRL 50 ng/ml	82	75	91.5 ^{N.S.}
	PRL 100 ng/ml	86	75	87.2 ^{N.S.}

a: ICR雄精巣上体尾部精子

b: ICR雌卵子

Chi-square test against control.

N.S.: Not significant.

された ($P<0.05$) (表-4)。

4-b. 精子の前培養はPRL非添加培養液で行い、授精の場にcontrol培養液およびPRL添加培養液を用いたところ、受精率はcontrolとPRL 10ng/mlでは95.1%と82.8%とで有意の差は認められなかったが、PRL 50ng/mlとPRL 100ng/mlでは81.4%と82.1%とで有意に抑制された。この体外受精卵を引き続き授精の場と同様の培養液中で培養したところ、%ExpでPRL 10ng/mlにおいて有意に抑制された ($P<0.05$) のを除き、%Expおよび%Hatchの双方でPRL添加培養群において有意の抑制は認められなかった (表-5)。

後期2細胞期胚および8細胞期胚培養成績

後期2細胞期胚からの培養による % Expanded Blastocyst (% Exp) は control および PRL 添加群で60.0%から70.7%と有意差は認められず、また % Hatching Blastocyst (% Hatch) も25.0%から37.9%と有意の差は認められなかった (表-6)。同じく、8細胞期胚からの培養では% Expで92.9%から100%、% Hatchでも53.8%から66.7%と両者ともに有意の差は認められなかった (表-7)。

考 察

PRLは血液¹⁰⁾のみならず臍帯血¹¹⁾、精液¹²⁾、子宮頸管粘液¹³⁾、脳脊髄液¹⁴⁾、乳汁¹⁵⁾などさまざまなものに含まれている。PRLと排卵障害との関連については多くの報告が見られるが、精液や子宮頸管粘液など受精現象に非常に関係の深いところにPRLが含まれているにもかかわらず、その精子や卵に及ぼす影響は殆ど明らかではない。また近年、不妊症治療法の一つとして定着した感のあるヒトIVF-ET法²⁾においても、母体血清⁴⁾や臍帯血清¹⁶⁾が培養液に添加されるのが常である。ヒトIVF-ET法における血清PRL濃度と受精率や妊娠率との関係については、東らは一過性高PRL血症のある患者では採取された卵の成熟度には差はないが、受精率、卵割率および妊娠率は低かったと報告している¹⁷⁾。しかし、Forman et al.¹⁸⁾や小田ら¹⁹⁾は一過性高PRL血症は卵の受精率、分割率また妊娠率に影響を与えないと報告している。

表-4. PRL 加前培養精子の受精率および受精卵の発育

表-4. PRL 加前培養精子の受精率および受精卵の発育		精子前培養液 ^a	雄精・培養液 ^b	雄精卵数 ^b	受精卵数 (%)	胚盤胞 (%)	孵化 (%)
	TYH-280	コントロール ^c		72	65 (90.3)	17/27 (63.0)	4/17 (23.5)
		PRL 10 ng/ml		58	47 (81.0) ^{N.S.}	9/30 (30.0)*	3/24 (12.5) ^{N.S.}
		PRL 50 ng/ml		57	41 (71.9)*	9/25 (36.0) ^{N.S.}	3/21 (14.3) ^{N.S.}
		PRL 100 ng/ml		62	36 (58.1)**	4/17 (23.5)*	0/14 (0) ^{N.S.}

a: ICR雄精巢上体尾部精子
b: F₁ hybrid (C57BL×C3H) 雌卵子
c: PRL非添加 TYH-280
Chi-square test against control.
*: $P<0.05$. **: $P<0.01$. N.S.: Not significant.

表-5. PRL 加培養液中での卵の受精率および受精卵の発育

精子前培養液 ^a	雄精・培養液 ^b	雄精卵数 ^b	受精卵数 (%)	胚盤胞 (%)	孵化 (%)
TYH-280	コントロール ^c	61	58 (95.1) ^{N.S.}	34/34 (100)	12/34 (35.3)
	PRL 10 ng/ml	58	48 (82.8) ^{N.S.}	26/32 (81.3)*	11/32 (34.4) ^{N.S.}
	PRL 50 ng/ml	59	48 (81.4)*	26/27 (96.3) ^{N.S.}	8/27 (29.6) ^{N.S.}
	PRL 100 ng/ml	67	55 (82.1)**	34/37 (91.9) ^{N.S.}	12/37 (32.4) ^{N.S.}

a: ICR雄精巢上体尾部精子
b: F₁ hybrid (C57BC×C3H) 雌卵子
c: PRL非添加 TYH-280
Chi-square test against control.
*: $P<0.05$. **: $P<0.01$. N.S.: Not significant

表-6. 後期2細胞期胚培養成績

培養液	培養胚数 ^a	胚盤胞 (%)	孵化 (%)
コントロール ^b	67	46 (68.7)	8/24 (33.3) ^{N.S.}
PRL 10 ng/ml	73	47 (64.4) ^{N.S.}	6/24 (25.0) ^{N.S.}
PRL 50 ng/ml	82	58 (70.7) ^{N.S.}	11/29 (37.9) ^{N.S.}
PRL 100 ng/ml	93	53 (60.0) ^{N.S.}	10/35 (28.6) ^{N.S.}

a: ICR雄×ICR雄交配卵子
b: PRL非添加 TYH-280
Chi-square test against control.
N.S.: Not significant

表-7. 8細胞期胚培養成績

培養液	培養胚数 ^a	胚盤胞 (%)	孵化 (%)
コントロール ^b	15	15 (100)	10 (66.7)
PRL 10 ng/ml	14	13 (92.9) ^{N.S.}	9 (64.3) ^{N.S.}
PRL 50 ng/ml	14	14 (100) ^{N.S.}	8 (57.1) ^{N.S.}
PRL 100 ng/ml	13	13 (100) ^{N.S.}	7 (53.8) ^{N.S.}

a: ICR雄×ICR雄交配卵子
b: PRL非添加 TYH-280
Chi-square test against control.
N.S.: Not significant

一方, Laufer et al.²⁰⁾は卵胞液中のPRL濃度についてではあるが, PRL濃度の高い卵胞から採取された卵においてより高い受精率と妊娠率が得られたとし, PRLの卵成熟への関与を示唆している。このようにPRLの配偶子への影響については, ヒトIVF-ET法の成績のretrospectiveな検討では, 現在のところまだ結論は得られていない。マウス胚を用いた実験的検討では, 吉田ら²¹⁾はヒトPRLをマウスの胚培養に添加したところ胚発育が抑制されたと報告しているが, マウスPRLとヒトPRLとの構造の違い²²⁾を考えると同種のPRLを用いた実験系が必要となる。今回の実験結果より, in vivo 受精卵(2細胞期卵および8細胞期卵)の発育には全く影響を与えなかった。また, 精子の前培養にPRLを加えず媒精およびin vitro 受精卵の培養にPRLを加えても受精や胚発育を抑制しなかったことより, 未受精卵に対する受精阻害作用などは認められなかった。一方, 精子の前培養にPRLを加えたところ通常の前培養時間では受精能を抑制したことから, PRLの前培養過程におけるcapacitationへの影響が強く示唆された。しかし脳下垂体移植による高PRL血症雄マウスの精巣上体尾部精子による体外受精においてはcontrolとの間に差が認められなかったという成績²³⁾を考慮すると, in vivoとin vitroにおけるPRLの作用の違いというものを考えなければならないかもしれない。今後PRLのin vitroにおける配偶子への影響をさらに明らかにすることは, 生殖現象におけるPRLの役割を解明するばかりでなく, ヒトIVF-ET法による臨床成績の向上をももたらすものと期待される。

REFERENCES

- 1) Hwang, P. Guyda, H. and Friesen, H. (1971). A radioimmunoassay for human prolactin. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 68, 1902~1907.
- 2) Lopata, A. Johnston, I.W. Hoult, I. J. and Speirs, I.P. (1980). Pregnancy following intra-uterine implantation of an embryo obtained by in vitro fertilization of preovulatory egg. Fertil. Steril., 33, 117~121.
- 3) Asch, R. H. Balmaceda, J. P. Ellsworth, L. R. Wang, P. C. (1984). Pregnancy after trans-lapaloscopic gamete intrafallopian transfer. Lancet, 2, 1034~1035.
- 4) Leung, P. C. S. Gronow, M. J. Kellow, G. N. Lopata, A. Spiers, A. L. McBain, J. C. du Plessis, Y. P. and Johnston, I. (1984). Serum suppliment in human in vitro fertilization and embryo development. Fertil. Steril., 1, 36~39.
- 5) Condon-Mahony, M. Wortham, J.W. E. Jr. Bundren, J. C. Witmyer, J. and Shirley, B. (1985). Evaluation of human fetal cord sera, Ham's F-10 medium, and in vitro culture material with a mouse in vitro fertilization system. Fertil. Steril., 4, 521~525.
- 6) Kohmoto, K. (1975). Mouse prolactin obtained by pituitary organ culture in a serum free medium. Endocrinol. Japon., 5, 465~469.
- 7) Kasai, K. Minato, Y. and Toyoda, Y. (1978). Fertilization and development in vitro of mouse eggs from inbred strains and F1 hybrids. Jap. J. Anim. Reprod., 1, 19~28.
- 8) Fukuda, A. Noda, Y. Tsukui, S. Matsumoto, H. Yano, J. and Mori, T. (1987). Influence of water quality on in vitro fertilization and embryo development for the mouse. J. Vitro. Fert. Embryo. Transfer., 1, 38~43.
- 9) Toyoda, Y. and Takasugi, M. (1982). Early development of mouse embryos fertilized in vitro. in Genetic Approach to Developmental Neurobiology, Y. Tsukada (ed). Tokyo, Tokyo University Press. pp 57~64.

- 10) Franchimont, P. Dourcy, C. Ligros, J. J. Reuter, A. Vrindts-Gevart, Y. Van Cauwenberge, J. R. and Gaspard, U. (1976). Prolactin levels during menstrual cycle. Clin. Endocri., 5, 643~650.
- 11) Gluckman, P. D. Ballard, P. L. Kaplan, S. L. Liggins, G. C. and Glumbach, M. M. (1978). Prolactin in umbilical cord blood and the respiratory distress syndrome. J. Pediatr., 4, 1011~1014.
- 12) Sheth, A. R. Mugatwala, P. P. Shah, G. V. and Rao, S. S. (1975). Occurrence of prolactin in human semen. Fertil. Steril., 9, 905~907.
- 13) Sheth, A. R. Vaidya, R. A. and Raiker, R. S. (1976). Presence of prolactin in human cervical mucus. Fertil. Steril., 4, 397~398.
- 14) Schroeder, L. L. Johnson, J. C. and Malarkey, W. C. (1976). Cerebrospinal fluid prolactin. J. Clin. Endocr. Metab., 43, 1255~1260.
- 15) Gala, R. R. Forsyth, I. A. and Turvey, A. (1980). Milk prolactin is biologically active. Life. Sci., 26, 987~993.
- 16) Jinno, M. (1986). Comparison of media used for human in vitro fertilization and embryo transfer programs. — A new method of serum preparation —. Acta. Obst. Gynaec. Jpn., 1, 102~110.
- 17) 東 敬次郎, 山野修司 (1985). 血中プロラクチン分泌動態とヒト卵の受精, 分割能に関する研究. — 一過性高プロラクチン血症がヒト卵の受精, 分割におよぼす影響 —. 日本産婦人科学会誌, 10, 2097~2106.
- 18) Forman, R. Fishel, S. B. Edwards, R. G. and Waters, E. The influence of transient hyperprolactinemia on in vitro fertilization in humans. J. Clin. Endocrinol. Metab., 60, 517.
- 19) 小田高久, 吉村慎一, 原 利夫, 原 澄子, 矢作, 松本千秋, 大野虎之進, 中村幸雄, 角 ゆかり, 末岡 浩, 田辺清男, 飯塚理八 (1987). 体外受精・胚移植における過排卵周期の一過性高プロラクチン血症. 日本産婦人科学会誌, 1, 113~120.
- 20) Laufer, N. Botero-Ruiz, W. DeCherney, A. H. Haseltine, F. Polan, M. L. and Berman, H. R. (1984). Gonadotropin and Prolactin levels in follicular fluid of human ova successful fertilized in vitro. J. Clin. Endocrinol. Metab., 3, 430~434.
- 21) 吉田耕治, 林 炯旻, 大塚治夫, 岡村 靖 (1986). 第4回日本受精着床学会講演. 於・山形市.
- 22) Kohmoto, K. Tsunasawa, S. and Sakiyama, F. (1984). Complete amino acid sequence of mouse prolactin. Eur. J. Biochem., 138, 227~237.
- 23) Mori, C. Hashimoto, H. Hoshino, K. Fukuda, A. Noda, Y. and Mori, T. (1987). Influences of prolactin upon spermatogenesis and spermatozoa during in vitro fertilization. J. Vitro Fertil Embryo Transfer (pending publication).

ブタ・ヒト透明帯共通抗原に対するモノクローナル
抗体の受精障害作用について

Inhibitory effect of monoclonal antibodies to porcine zona pellucida antigen cross-reactive to
humans on in vitro fertilization systems

長谷川 昭子¹⁾、香山 浩二¹⁾、磯島 晋三¹⁾、永井 卓²⁾、角田 幸生²⁾

Akiko HASEGAWA¹⁾, Koji KOYAMA¹⁾, Shinzo ISOJIMA¹⁾, Takashi NAGAI²⁾ and Yukio TSUNODA²⁾

¹⁾ 兵庫医科大学産科婦人科学教室、²⁾ 農林水産省畜産試験場繁殖部

¹⁾ Department of Obstetrics and Gynecology, Hyogo Medical College, Nishinomiya

²⁾ National Institute of Animal Industry, Tsukuba

Anti-fertility effect of three monoclonal antibodies (3A4-2G1, 1D5-2B7, 1F2-1B8) produced to porcine zona pellucida (PZP) antigens cross-reactive to humans was studied by using in vitro fertilization system of porcine and human eggs. Polyclonal mouse antiserum to PZP had a strong inhibitory effect on both porcine and human eggs. However, only two monoclonal antibodies (3A4-2G1, 1D5-2B7) on porcine eggs and no monoclonal antibodies on human eggs did show the inhibitory effect. When the monoclonal antibody-treated human eggs were further treated with anti mouse γ -globulin serum as a second antibody, two of the three monoclonal antibodies (3A4-2G1, 1D5-2B7) showed an inhibitory effect on sperm binding and penetration to ZP of human eggs. These results suggest that the antigen epitopes corresponding to the monoclonal antibodies with anti-fertility activity might be located densely or close to the sperm receptors on ZP of porcine and human eggs.

【緒言】

哺乳動物の卵周囲を取り巻く透明帯(ZP)は精子の種の認識(精子receptor)、多精子受精の阻止、受精卵の保護といった生殖生理学上重要な役割を担っている。またZPは一般に3種の糖蛋白質から成り、マウスでは各糖蛋白質と機能との関係が明らかになりつつある。¹⁾ 一方、ZPに対する抗体は、in vivoまたはin vitroにおいて強い受精阻害作用を示すことが実験動物で報告されている。^{2) 3) 4) 5)} 更に、1977年、Sacco がブタZPとヒトZPの交叉反応性を見出し⁶⁾ またShivers が原因不明不妊婦人血中にブタ卵を使った蛍光抗体法で検出される抗卵抗体の存在を発表⁷⁾して以来、ブタZPの避妊ワクチンへの応用を目的とした基礎的実験が数多く成されてきた。^{8) 9)} しかし最近、可溶化したブタZPまたはその主成分をサル、犬、ウサギに免疫した場合、免疫動物は不妊にはなるが、卵巢機能障害を起こすことが明らかになり、ブタZPの不純抗原を避妊ワクチンとして利用することは危険であることが解ってきた。ワクチンの開発には卵巢機能障害を起こさないでしかも精子と卵のinteractionのみを阻害して不妊を起こすような抗原の精製が求められる。本研究では、ヒトZPと抗原性を交叉するブタZPに対するモノクローナル抗体を作製し、ブタおよびヒト卵と精子のinteractionに及ぼす抗体の影響を検討するとともに、抗体の受精阻害機序について考察した。

【実験材料と方法】

1. モノクローナル抗体

単離ブタZPを免疫したBALB/cマウスの脾臓細胞をマウスミエローマ細胞(P3/x63Ag8UI:P3UI)と細胞融合し、定法に従いHybridomaを樹立し、その産生するモノクローナル抗体を実験に用いた。実験に用いたモノクローナル抗体(3A4-2G1, 1D5-2B7, 1F2-1B8)は、いずれも蛍光抗体法で特異的にブタとヒトZPと反応し、ハムスター、ラット、マウスZPとは反応しない抗体である。1D5-2B7(IgG₁)はモノクローナルであるにも拘らず、ゲル内沈降反応で可溶化ブタZPと沈降線を形成した。

2. in vitro 受精実験法

ブタのin vitro受精はNagai らの方法¹⁵⁾に従った。即ち、卵細胞を28時間4mg/mlのBSAを含むmKRB中で培養し成熟させた後、5mg/mlの抗体を30分間処理し、充分リンスし、終濃度 1×10^8 /mlのブタ精子で媒精し22時間後に卵を固定染色し観察した。ヒト精子のin vitroにおけるヒトZPへの結合実験は著者らの方法¹⁴⁾に準じて行なった。即ち、婦人科疾患により摘出された卵巢から卵細胞を取り出し40~48時間7%非働化ヒト血清を含むmKRB中で培養し、ブタの場合と同様に処理した。終濃度 1×10^6 /mlのヒト精子で媒精し15時間後、卵を充分ピペティングし、直ちに位相差顕微鏡下で付着および進入精子数をカウントした。

【実験結果】

ブタ卵のin vitro受精実験では表1に示すように、正常マウス血清から精製したControl IgGを用いた場合、24個の卵のうち22個(92%)の卵に膨化精子頭部または雄性前核が認められた。これに対し、抗ブタZPポリクローナル抗体(マウス抗血清)を処理した卵では受精率はわずか8%で、強い受精阻害が認められた。モノクロー

表1

Effect of the monoclonal antibodies on in vitro fertilization of porcine eggs

antibodies	No. of examined eggs	No. (%) of eggs penetrated			mean No. of sperm / egg
		total	with enlarged sperm head	with both pronuclei	
control IgG	24	22 (92)	21	1	3.0
anti-PZP ¹⁾	26	2 (8)	2	0	1.0
Mab-3A4	42	15 (36)	15	0	1.5
Mab-1D5	37	0 (0)	0	0	0
Mab-1F2	38	32 (84)	31	1	2.7

¹⁾ anti-PZP; mouse antiserum to porcine zona pellucida

表2

Effect of monoclonal antibodies on human sperm binding
and penetration to ZPe of human eggs

antibodies to PZP ¹⁾	anti- mouse Ig ²⁾	No. of examined eggs	No. of bound sperm/egg	No. of penetrated sperm/egg
control ³⁾	—	9	>50	2.1±3.0 (1~9)
anti-PZP ⁴⁾	—	5	0	0
Mab-3A4	—	2	>50	2.0±1.4 (1~3)
Mab-1D5	—	3	>50	2.3±1.2 (1~3)
Mab-1F2	—	2	>50	5.5±3.5 (2~9)
control ³⁾	+	3	>50	8.0±3.5 (3~14)
Mab-3A4	+	4	0	0
Mab-1D5	+	4	0	0
Mab-1F2	+	3	>50	6.0±2.5 (3~11)

¹⁾ PZP; porcine zona pellucida

²⁾ Ig; immunoglobulin

³⁾ control; ascites from a mouse inoculated with P3U1 cells

⁴⁾ anti-PZP; mouse antiserum to porcine zona pellucida

ナル抗体の場合、3A4-2G1, 1D5-2B7, 1F2-1B8 抗体処理卵の受精率はそれぞれ15/42 (36%), 0/37 (0%), 32/38 (84%) で抗体によりその受精阻害率は著しく異なっていた。受精阻害作用の認められた3A4-2G1 または 1D5-2B7 を処理した卵ではポリクローナル抗体を処理した卵と同様な沈降帯がZP表面に形成されていたが、受精阻害作用の認められなかった1F2-1B8 を処理した卵では沈降帯の形成はなかった。

表2はin vitroでのヒトZPへのヒト精子の結合性および貫通性に対するモノクローナル抗体の影響を見たものである。ミエローマ細胞P3UIを腹腔に移植して得たマウス腹水を処理した対照卵では9個のうちすべての卵に卵一個当たり50以上の精子が結合し、また明らかにZPに進入しつつある精子も平均 2.1 ± 3.0 認められた。抗ブタポリクローナル抗体 (anti-PZP) を処理した卵ではZP表面に沈降帯が形成され、精子の結合も進入も全く認められなかった。モノクローナル抗体の場合は、3種の抗体いずれも、モノクローナル抗体単独の処理では精子のZPへの結合・進入に対し全く抑制効果を示さなかった。しかし、モノクローナル抗体を処理した卵にさらに第二抗体として抗マウスγ-グロブリン抗体を処理すると、3A4-2G1と1D5-2B7の2つの抗体でZPへの精子の結合阻害が見られた。1F2-1B8 では第二抗体を用いても阻害作用は見られなかった。ヒト卵とモノクローナル抗体のみの反応では沈降帯は形成されなかったが、第二抗体を反応させた場合には、3A4-2G1, 1D5-2B7を処理した卵において沈降帯の形成が見られた。

【考察】

精子とZPのinteractionとして、認識(attachment)、結合(binding)、進入(penetration)の3ステップが想定されているが、抗ZP抗体が受精を阻害するのはどのステップを障害するのだろうか。精子の認識と結合には精子receptorが関与しており、これは種特異的な反応と考えられるので、本実験で用いた3つのモノクローナル抗体はブタ・ヒト共通抗原を認識することから、精子receptorそのものに対する抗体とは考え難い。ブタ卵の受精阻害を示した2つの抗体(3A4-2G1, 1D5-2B7)の作用機序としては、精子receptor近くの抗原エпитープに結合してreceptorがマスクされた可能性が強い。また認識の後に続くbindingに関与した機能を持つZPの分子に抗体が結合し、受精が阻害された可能性もある。また更に、ZPの構造蛋白質に抗体が結合することにより、精子がZPを通過するのに必要な酵素の作用標的がブロックされ、精子進入が阻害された可能性も考えられる。しかし、受精を阻害された卵には必ずZP表面に沈降帯が形成されていたことから、その機序は精子receptorに近接した抗原エпитープに大量の抗体が結合することによって引き起こされる非特異的な精子receptorのマスキングが大きく関与していると考えられる。ヒト卵の場合、3A4-2G1と1D5-2B7は単独で処理しても精子の結合・進入を障害しなかったが、第二抗体を反応させると沈降帯の形成と同時に強い阻害が起こった。このことはおそらくヒト卵のZPではブタ卵のZPにおけるほど、両抗体に対する抗原エпитープが密に存在していないため、モノクローナル抗体が結合したうえにさらに第二抗体が結合することにより初めて精子receptorがマスクされたものと考えられる。

モノクローナル抗体単独では受精阻害を起こさないが、第二抗体を加えて受精阻害を起こすモノクローナル抗体であっても、その対応抗原はヒトの避妊ワクチンを考える上では重要である。というのは3A4-2G1や1D5-

2B7 抗体の対応抗原エピトープのようにヒト精子receptorに近接しているエピトープであれば、それらモノクローナル抗体を指標として分子全体を精製し動物に免疫し、受精阻害作用を持つ副反応の少ないポリクローナル抗体を得ることが可能であるからである。最近、ZPの精子receptorは糖蛋白質の糖部分であるとする報告が多い。^{1) 16) 17)} また一般にポリクローナル抗体IgG は強い受精阻害作用を示すが、そのFab はブタを除いて受精阻害を示さない。^{5) 8) 9)} これらのことから、精子receptorは免疫原性が低くreceptorそのものを認識する抗体は産生されにくいと思われる。したがって精子receptorそのものよりもreceptorを含んだ糖蛋白質全体を標的としたほうが良いと考えられる。精子receptorは卵と精子の認識機能分子であるから、ZPに特異的と考えられるが、糖蛋白質全体となると複数のエピトープが存在し、ほかの組織との交叉反応による副作用が問題となる。従って、十分な避妊効果を持つ最少エピトープ数の抗原分子を調製することが重要である。最近マウスZP3 のcDNAがクローニングされたが、²⁰⁾ このような遺伝子工学的方法により合成したペプチドを用いれば、安全なワクチンの生産も可能となろう。現在我々はこのような条件を満たす抗原分子として3A4-2G1 の対応抗原について分析を進めている。

(Reference)

- 1) Wassarman, D.M. (1987) The biology and chemistry of fertilization. Science, 235:553-560
- 2) Gwatkin, R.B.L., Williams, D.T. and Garto, D.J. (1977) Immunization of mice with heat-solubilized hamster zonae : production of anti-zona antibody and inhibition of fertility. Fertil. and Steril., 28:871-877
- 3) Tsunoda, Y. and Chang, M.C. (1978) Effect of antisera against eggs and zonae pellucidae on fertilization and development of mouse eggs in vitro and in culture. J.Reprod.Fertil., 54:233-237
- 4) Sacco, A.G. (1977) Inhibition of fertility in mice by passive immunization with antibodies to isolated zonae pellucidae. J.Reprod.Fertil., 56:533-537
- 5) Tsunoda Y., Sugie, T., T., Mori, J., Isojima, S. and Koyama, K. (1981) Effect of purified zona antibody on fertilization in the mouse. J.exp.Zool., 217:103-108
- 6) Sacco, A.G. (1977) Antigenic cross-reactivity between human and pig zona pellucida. Biol.Reprod., 16:164-174
- 7) Shivers, C.A. and Dunbar, B.S. (1977) Autoantibodies to zona pellucida : A possible cause for infertility in women. Science, 197:1082-1084
- 8) Sacco, A.G., Subramanian, M.G. and Yurewicz, E.C. (1981) Active immunization of mice with porcine zona pellucida : Immune response and effect on fertility. J.exp.Zool., 218:405-418

- 9) Drell, D.W., Wood, D.M. and Dunbar, B.S. (1984) Immunological comparison of antibodies to porcine zona pellucida in rats and rabbits. *Biol.Reprod.*, 30:435-444
- 10) Sacco, A.G., Subramanian, M.G., DeHayo, F.J. and Dukelow, W.R. (1983) Heteroimmunization of squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) with a purified porcine zona antigen (PPZA) : immune response and biologic activity of antiserum. *Fertil.Steril.*, 39:350-358
- 11) Mahi-Brown, C.A., Yanagimachi, R., Haffman, J.C. and Huang Jr, T.F.H. (1985) Fertility control in bitch by active immunization of estradiol and progesterone levels in estrous cycles. *Biol.Reprod.*, 32:761-772
- 12) Skinner, S.M., Mill, T., Kirchick, H.J. and Dunbar B.S. (1984) Immunization with zona pellucida proteins results in abnormal ovarian follicle. *Endocrinology*, 115:2418-2432
- 13) Isojima, S., Koyama, K., Hasegawa, A., Tsunoda, Y. and Hanada, A. (1984) Monoclonal antibodies to porcine zona pellucida antigens and their inhibitory effects on fertilization. *J.Reprod.Immunol.*, 6:77-87
- 14) Koyama, K., Hasegawa, A., Tsuji, Y. and Isojima, S. (1985) Production and characterization of monoclonal antibodies to cross-reactive antigens of human and porcine zonae pellucidae. *J.Reprod.Immunol.*, 7:187-198
- 15) Nagai, T., Niwa, K. and Iritani, A. (1984) Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization in vitro of pig follicular oocytes. *J.Reprod.Fertil.*, 70:271-275
- 16) Shalgi, R., Matityahu, A. and Nebel, L. (1986) The role of carbohydrates in sperm-egg interaction in rats. *Biol.Reprod.*, 34:446-452
- 17) Lopez, L.C., Bayna, E.M., Litoff, D. Shaper, N.L., Shaper, J.H. and Shur, B.D. (1985) Receptor function of mouse sperm surface galactosyltransferase during fertilization. *J.Cell Biol.*, 101:1501-1510
- 18) Ahuja, K. and Tzartos, S.J. (1981) Investigation of sperm receptor in the hamster zona pellucida by using univalent (Fab) antibodies to hamster ovary. *J.Reprod.Fertil.*, 61:257-264
- 19) Aitken, R.J., Holme, F., Richardson, D.W. and Hulme, M. (1982) Properties of intact and univalent (Fab) antibodies raised against isolated, solubilized, mouse zona pellucida. *J.Reprod.Fertil.*, 66:327-334
- 20) Ringuelette, M.J., Sobieski, D.A., Chamow, S.M. and Dean, J. (1986) Oocyte-specific gene expression : Molecular characterization of a cDNA coding for ZP-3, the sperm receptor of the mouse zona pellucida. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 83:4341-4345

In Vitro Fertilization of Rabbit Eggs Using Spermatozoa Treated with Lysophosphatidyl Choline

Kahei SATO

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

Guine pig spermatozoa can be induced by exposing to lysophosphatidyl choline(LC) in Ca^{2+} -free medium for 60-75 min(Fleming and Yanagimachi,1982). This effect of LC was confirmed in hamster spermatozoa (Ohzu and Yanagimachi,1982). Rabbit spermatozoa has been considered to be comparatively difficult inducing capacitation under in vitro conditions(Yanagimachi,1983). Thus, it is of interest to examine the effect of LC on capacitation of rabbit spermatozoa under in vitro conditions.

Materials and Methods

Mature Japanese white female and male rabbits were used. Females (2.3-2.7 kg body wt.) were housed in individual cages for 17 days to eliminate the chance of pseudopregnancy before use. The egg donors were superovulated by PMSG and hCG using our method reported previously(Sato, 1984). Eggs were recovered 14.5 hr after hCG injection. Almost of them had compact cumulus cells. To remove the cumulu cells, the eggs were placed in the dish containing the medium with 1% hyaluronidase and then rinsed thoroughly. Before insemination, the eggs were placed in the fresh medium for less than 20 min.

Semen was collected using an artificial vagina(Sato,1984). Individual ejaculates were pooled in a modified Tyrode's solution(Sato and Suzuki,1985). Only 80 or more % progressive motile spermatozoa were used. For in vitro capacitation, spermatozoa were washed in the medium by centrifugation(800 r.p.m., 8 min) and then the spermatozoa were incubated in the medium containing 0-50 ug/ml of LC for 15 min at 37°C(5% CO_2 in air).After exposing to LC, the spermatozoa were separated from the supernatant by centrifugation and resuspended in the fresh medium. Further, the sperm suspension was incubated for 3 hr at 37°C under 5% CO_2 in air.

In vitro fertilization was performed according to a previous report(Sato and Suzuki,1985). To examine sperm motility, at various times after the start of incubation a drop of the sperm suspension

was transferred onto a slide glass and the % of motile spermatozoa was determined with a phase-contrast microscope (Nikon).

Results and Discussion

When examined between 0.5 and 1 hr after incubation, the control spermatozoa did not display active movement. Some of them agglutinated head to head. At 3 hr after incubation, the control spermatozoa showed the active beating of their tails. On the other hand, about 40% of LC-treated spermatozoa were displaying the active motility within 1 hr after sperm incubation. The survival rate of the spermatozoa treated with LC declined rapidly with the advance of the incubation time, as compared with the control spermatozoa.

Results on fertilization in vitro of rabbit eggs using LC-treated spermatozoa were presented in Table 1. The present results indicate the stimulatory effect of LC on capacitation of rabbit spermatozoa.

Table 1. In Vitro Fertilization of Rabbit Eggs by Spermatozoa Incubated in mT Containing Lysophosphatidyl Choline (LC)

Observation time(hr) after insemination	Dose of LC (μ g/ml)	No. of eggs inseminated	No. of eggs fertilized (%)	No. of fertilized eggs showing swollen pronucleus sperm formation head(%) (%)
3	0	20	18(40.0)	4(22.2) 0
3	10	17	11(64.7)	3(27.3) 0
3	20	12	12(100.0)	6(50.0) 0
3	50	20	20(100.0)	9(45.0) 0
6	0	20	20(100.0)	10(50.0) 2(10.0)
6	10	16	16(100.0)	7(43.8) 3(18.8)
6	20	21	20(95.2)	7(35.0) 6(30.0)
6	50	20	20(100.0)	3(15.0) 15(75.0)
3	0	28	2(7.1)	0 0

mT: A modified Tyrode's solution

*: Spermatozoa were preincubated for 1 hr in mT

References

- Fleming, A.D. and Yanagimachi, R.: Effect of various lipids on the acrosome reaction and fertilizing capacity of guinea pig spermatozoa with special reference to the possible involvement of lysophosphatidyl lipids in the acrosome reaction. *Gamete Res.*, 4: 253, 1981.
- Ohzu, E. and Yanagimachi, R.: Acceleration of acrosome reaction in hamster spermatozoa by lysolecithin. *J. EXP. Zool.*, 4: 224, 1982.
- Yanagimachi, R.: In vitro fertilization and embryo transfer. (eds. Crosignani, P.G.C. and Rubbin, B.L.) p65, Academic Press and Grune & Stratton. 1983.
- Sato, K.: In vitro capacitation of ejaculated rabbit sperm cells. *Jap. J. Fert. Ster.*, 29: 197, 1984.
- Sato, K and Suzuki, Y.: In vitro-fertilization of rabbit eggs by ejaculated spermatozoa capacitated in a modified Tyrode's solution. *J. Mamm. Ova Res.*, 2: 149, 1985.

哺乳動物卵子研究会役員

(62. 4. 1 ~ 64. 3. 31)

会 長	佐久間 勇 次 (日 大)		
副 会 長	岩 城 章 (東邦大)		
理 事	石島 芳郎 (東農大)	石田 一夫 (新潟大)	石橋 功 (山口大)
	井上 正人 (東海大)	入谷 明 (京 大)	小栗 紀彦 (農水省)
	加藤征史郎 (神戸大)	金川 弘司 (北 大)	香山 浩二 (兵庫医大)
	佐藤 和雄 (埼玉医大)	菅原 七郎 (東北大)	鈴木 秋悦 (慶 大)
	堤 義雄 (広島大)	豊田 裕 (東 大)	野田 洋一 (京 大)
	福田 芳昭 (北里大)	星 和彦 (福島医大)	
監 事	木 下 佐, 杉 江 侑		
幹 事	遠 藤 克 (日大) 佐 藤 嘉 兵 (日大)		
編集委員	委員長：豊 田 裕		
	委 員：石 島 芳 郎 井 上 正 人 岩 城 章		
	遠 藤 克 香 山 浩 二 鈴 木 秋 悦		
	花 田 章		

哺乳動物卵子研究会会則

名 称

第 1 条 本会は、哺乳動物卵子研究会と称する。

事 務 局

第 2 条 本会の事務局は、東京都内または近隣県内に置く。

目 的

第 3 条 本会は、哺乳動物卵子の研究およびその成果の普及を図ることを目的とする。

事 業

第 4 条 本会は、前条の目的を達成するために、次の事業を行う。

- (1) 研究会の開催
- (2) 会誌の発行
- (3) 研究に関する情報の交換
- (4) その他本会の目的達成に必要な事業

会 員

第 5 条 本会は、次の会員をもって組織する。

- (1) 正会員は哺乳動物卵子に関する研究に従事しているか、または関心を有する者。
- (2) 賛助会員は本会の主旨に賛同する法人、およびこれに準ずる者で理事会が認めたもの。
- (3) 本会には名誉会員をおくことができる。名誉会員は本会に多大の貢献のあった正会員で理事会で推薦し、総会で承認された者。

入 会

第 6 条 本会に入会しようとする者は、所定の申込用紙に必要事項を記入し、入会費および会費を添えて事務局に申し込むものとするものとする。

退 会

第 7 条 会員で退会しようとする者は、退会届けを事務局に提出し、その年度までの会費を納入しなければならない。

第 8 条 会員は、次の事項に該当する時は会員の資格を失う。

- (1) 会費未納の場合
- (2) 会員として不適当と理事会が認め、総会でこれを承認した場合。

役 員

第 9 条 本会に次の役員を置く。

会 長 1 名

副 会 長 1 名

理 事 若干名

監 事 2 名

幹 事 2 名

第 10 条 会長は、本会を代表し、会務を統括する。副会長は会長を補佐し、会長に事故があるときはその職務を代行する。

2. 理事および監事は、理事会を組織し、本会運営の重要事項について審議する。
3. 監事は、本会の業務および会計の執行について監査する。
4. 幹事は、本会の会務に従事する。

第 11 条 役員の選出は、次によって行う。

- (1) 会長および副会長は、理事の互選による。
- (2) 理事および監事は、理事会で推薦し、総会で決定する。
- (3) 幹事は、会員中より会長が委嘱する。

第 12 条 役員の任期は 2 年とし、再任を妨げない。

総 会

第 13 条 総会は毎年 1 回開催する。ただし、会長または理事の過半数が必要と認めたときは、臨時にこれを開くことができる。

2. 総会は会長が召集し、その議長となる。
3. 総会は正会員の 5 分の 1 以上の出席で成立し、出席者の過半数の賛成によって議決する。

第 14 条 総会は次の事項を審議し、決定する。

- (1) 事業報告および決算
- (2) 事業計画および予算
- (3) 役員等の選任および解任
- (4) 名誉会員の推薦
- (5) 会費の金額および徴集方法の決定、変更
- (6) 会則の変更
- (7) その他の必要事項

会 計

第 15 条 本会の会計年度は、毎年 4 月 1 日に始まり翌年 3 月 31 日に終わる。

2. 本会の経費は会費、寄付金およびその他の収入をもってこれにあてる。

附 則

この会則は、昭和 59 年 4 月 5 日に制定し、昭和 62 年 4 月 25 日に全面改定し、同日から施行する。

哺乳動物卵子研究会誌投稿規定

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

雑誌の場合

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

単行本の場合

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

〒252

神奈川県藤沢市亀井野 1866

日本大学農獣医学部獣医生理学教室内

TEL 0466-81-6241 内線 332

哺乳動物卵子研究会編集委員会

編 集 後 記

大先輩の大槻先生から編集委員長の重責を引きつぐことになりました。不慣れのため種々御迷惑をかけることと思いますが、精一杯頑張る覚悟です。

哺乳動物卵子に関する最近の研究の進歩はまことに目覚ましく、医学および獣医畜産領域における I V F / E T の実用化、実験動物ではトランスジェニックマウスの作出をはじめとする種々の胚操作技術の開発など、まさに止まる所を知らぬ勢いです。しかし、一方では、先を急ぐあまり基礎的な面の検討が置き去りにされている感があります。マウスとウサギ以外の実験動物では初期胚の培養さえ満足にできないのが、その一例です。

誕生してから日の浅い本誌が、世界にも類を見ないユニークな哺乳動物卵子の専門誌として、その速報性とノート代りに投稿できる気安さを保ちながら、国際的に通用する水準も維持して行くという、やゝ悠の深い目標に向って努力したいと考えております。何卒、会員の皆様の絶大なる御支援をお願い申し上げます。

豊 田 裕

編 集 委 員

委員長：豊 田 裕

委 員：石島芳郎，井上正人，岩城 章，遠藤 克

香山浩二，鈴木秋悦，花田 章

哺 乳 動 物 卵 子 研 究 会 誌

Journal of Mammalian Ova Research

第 4 卷 第 2 号

昭和62年9月25日印刷

昭和62年10月1日発行

V o l . 4

N o . 2

(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)

メ

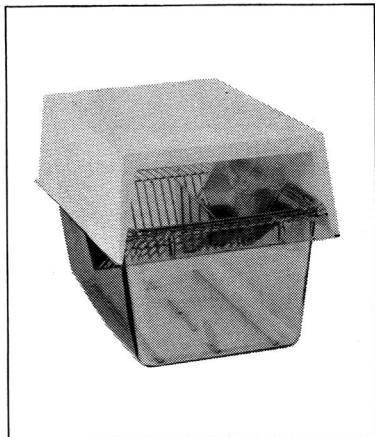
七

Lined paper template with horizontal ruling lines.

NEW!

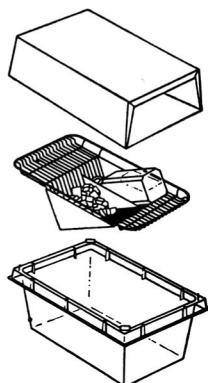
M-7 (Isocage & Isocap)

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

わが国初認可 プロゲステロンの測定をわずか2時間に短縮。

牛乳に試薬を加えるだけでプロゲステロン値を高感度に測定して牛の妊娠診断ができます。

新発売



家畜の黄体機能を推測する上で、血中プロゲステロン濃度の測定は有力な手段です。この測定にはRIA法などいろいろな方法がありますが、測定感度、操作の煩雑さ、所要時間、特殊な施設などそれぞれに問題点がありました。これに対して「オブチェック」は、牛乳中のプロゲステロンを簡単な固相法EIA（酵素免疫法）によって約2時間で科学的に直接測定する画期的なキットです。

牛乳中プロゲステロン測定キット

動物用医薬品

オブチェック牛乳用EIAキット

体外診断用

■特 長

- 検査には、採材し易い牛乳(全乳)を用います。
- 牛乳中プロゲステロンを、高感度で測定でき、再現性が高いEIAキットです。
- 操作が簡便で、短時間(約2時間)で測定できます。
- 機器による定量測定だけでなく、目視判定ができます。
- RIA(放射免疫法)及び二抗体EIA法との相関が良好です。
- 放射性同位元素を用いないので、特殊な設備を必要としません。
- アメリカやヨーロッパではすでに牛の早期妊娠診断に広く普及しています。

お問い合わせ先 ▶ 営業部 統括課 ☎044-266-0400

製造元 **ケンブリッジ ライフ サイエンス社**
Cambridge Veterinary Sciences
a division of Cambridge Life Sciences plc

輸入発売元



デンカ製薬株式会社
神奈川県川崎市川崎区中瀬3丁目19番11号 〒210

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

フベローゲン®

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



三共ゾーキ株式会社

東京都中央区日本橋本町4-1-14

