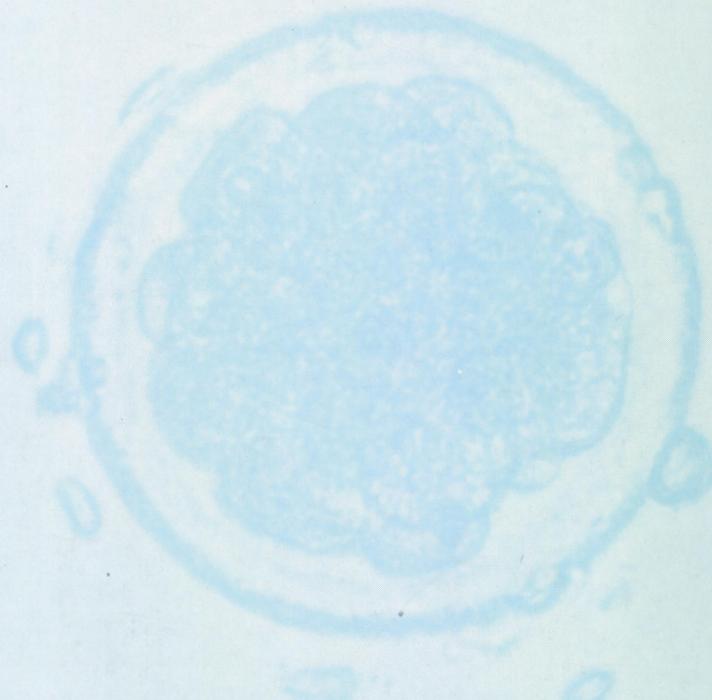


哺乳動物卵子研究会誌

Journal of Mammalian Ova Research



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

Vol. 5 No. 1
April 1988



牛の繁殖障害の
分野に新しい可能性！



タケダのすぐれた合成技術が生んだ

LH放出ホルモン製剤

動物用医薬品

コンセラール[®]注射液

牛の卵胞のう腫、排卵障害、
卵巣静止の治療、排卵促進に

(要指示)

製造発売元
武田薬品工業株式会社

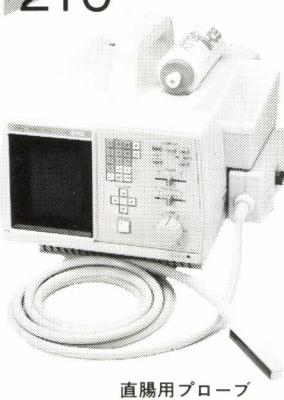
提携
帝国臓器製薬株式会社

FHK スーパーアイ SSD-210・610・630

動物用電子走査超音波診断装置

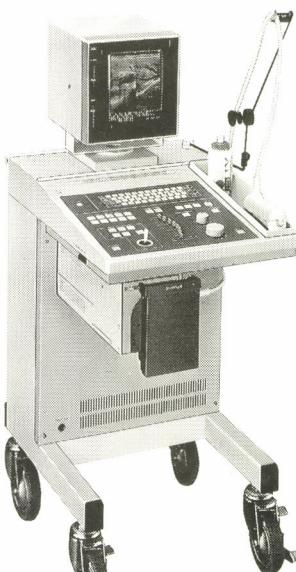
卵巣の状態・早期妊娠診断・双胎の確認などを鮮明な画像により知ることができます

210



- 持ち歩ける超音波診断器
- 2画像表示機能

- リニア電子走査
- 表示モード：B
- 周波数/視野
3.5MHz/95mm
5.0MHz/56mm
- 消費電力
100VAC 約60VA
- 重量 約8kg
- 各種プローブ
(オプション)



610

- リニア電子走査
- 表示モード：B M
- 周波数/視野
3.5MHz/96mm(他)
- ワイドなファンクション内蔵
- 高品位画像
- 各種プローブ(オプション)

630

はリニア走査に
加えてコンベックス走査・
セクタ走査ができます

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 ファクシミリ(03)812-3663

哺乳動物卵子研究会誌

第5巻 第1号

昭和63年4月

目 次

原 著

家兎受精卵の補足精子と極体の観察（英文）

東 賢一、前田照夫、堤 義雄 1

2細胞期胚の分離によるマウス一卵性双子の作出

中村克彦、石島芳郎 8

スナネズミ (Mongolian gerbil; *Meriones unguiculatus*)

卵管内における精子の分布と先体反応について（英文）

佐藤嘉兵、森下克則 14

第29回哺乳動物卵子研究会講演要旨

家兎のLH-RH静脈内点滴投与による過排卵誘起の試み

小林由美子、高井尚治、細水 明、山海 直、金山喜一、
遠藤 克、佐久間勇次 26

ハムスター卵巣の体外培養における培養液の検討

大谷智弘、山海 直、金山喜一、遠藤 克、佐久間勇次 28

マウス卵透明帯における糖質の組織化学的研究

小川健司、木村順平、月瀬 東、岡野真臣 30

マウス胚におけるプロスタグランジン合成酵素の組織化学的検出

新村末雄、石田一夫 32

マウス初期発生に及ぼす卵管の影響

鈴木 治、河本 鑿 34

| | |
|---|----|
| 着床期胚における fibronectin の意義と培養の及ぼす影響 竹内一浩、森 明人、鵜木康資、永田行博 | 36 |
| B S A 無添加培地におけるマウス胚の培養および移植成績 高木優二、菅原七郎、正木淳二 | 38 |
| 豚卵胞液中にみられる成熟分裂促進活性成分について 石崎芳彦、吉田光敏、小島義夫、河岸洋和、水野 卓 | 40 |
| 豚卵胞液中で体外成熟した豚卵子の発生能 内藤邦彦、上野 隆、大脇達也、椎名隆次郎、福田芳詔 | 42 |
| ラット凍結卵巣の卵巣嚢内への移植 利部 聰、牧田登之、萬場光一 | 44 |
| グリセリンーショ糖液で凍結した体外受精マウス胚盤胞の 生存性に及ぼす凍結速度と液体窒素投入温度の影響 平泉真吾、石井秀信、花田千仁、市川優樹、内藤邦彦 福田芳詔 | 46 |
| Vitrification によるラット 2 細胞期胚の低温保存 平林真澄、茶谷伸夫 | 48 |
| ハムスターの卵核胞崩壊前後の有核及び無核卵片に侵入した 精子核の変化 平尾幸久 | 50 |
| 異属間および異科間(マウス、ラット、ハムスター) 集合キメラ胚の走査型電子顕微鏡による観察 添田 聰、中村のゆみ、高橋寿太郎、安田泰久 | 52 |
| ウサギ精子のハムスター卵子細胞質内注入による受精 塩田和也、後藤 勤、佐藤嘉兵 | 54 |
| マイクロマニピュレーションの体外受精-胚移植への応用 斎藤英和、佐藤文彦、平山寿雄、斎藤隆和、楊 美貴 広井正彦 | 56 |

| | |
|--|----|
| 裸化マウス卵子の受精能に及ぼす DMSO の影響 河野恵子、東 貞宏、豊田 裕 | 58 |
| 顆粒膜細胞あるいは胎児腎細胞と共に培養した豚卵子の体外受精 吉田光敏、石崎芳彦、番場公雄、小島義夫 | 60 |
| ヒト体外受精における精子運動能の分析 淡路英雄、井上正人、小林善宗、本田育子、佐々木史 出口しのぶ、松井素子 | 62 |
| 体外受精卵卵管内移植の成績 小林善宗、本田育子、井上正人、淡路英雄、松山毅彦 津田朋男、藤井明和 | 64 |
| 牛胚の染色体分析による性判別法の検討 堀内俊孝、大久範之、沼辺 孝、高田直和、石川勇志 | 66 |
| ブタ、ヒト透明帯共通抗原(23Kd)に対する マウス抗血清のヒト <i>in vitro</i> 受精系に及ぼす影響 長谷川昭子、香山浩二、磯島晋三 | 68 |

Journal of Mammalian Ova Research

Vol. 5 No. 1

April 1988

Contents

Originals

Observations on supplementary sperm and the polar body in rabbit
fertilized ova.

HIGASHI, K., T. MAEDA & Y. TSUTSUMI 1

Production of monozygotic twin mice by separating of 2-cell
stage embryos

NAKAMURA, K. & Y. ISHIJIMA 8

Sperm distribution and the acrosome reaction in oviducts during
in vivo fertilization in the mongolian gerbil.

SATO, K. & K. MORISHITA 14

Proceeding of the 29th Annual Meeting of Japan Society for Mammalian Ova Research.

A trial on superovulation by LH-RH drip infusion intraveneously
in the rabbit.

KOBAYASHI, Y., N. TAKAI, A. HOSOMIZU, T. SANKAI,
K. KANAYAMA, T. ENDO & Y. SAKUMA 26

General reports

Study of medium on surface culture of the hamster ovary
in vitro.

OTANI, T., T. SANKAI, K. KANAYAMA, T. ENDO
& Y. SAKUMA 28

Histochemistry of glycoconjugates in mouse zonae pellucidae.

OGAWA, K., J. KIMURA, A. TSUKISE & M. OKANO 30

Histochemical demonstration of prostaglandin synthetase in pre-
implantation mouse embryos.

NIIMURA, S. & K. ISHIDA 32

| | | |
|--|--|----|
| Effect of oviduct on the development of early mouse embryos. | SUZUKI,O. & K.KOHMOTO | 34 |
| Significance of fibronectin in the peri-implantation embryos and the effect of culturing on the expression of fibronectin. | TAKEUCHI,K., A.MORI, Y.UNOKI & Y.NAGATA | 36 |
| Viability of mouse embryos cultured in BSA - free medium. | TAKAGI,Y., S.SUGAWARA & J.MASAKI | 38 |
| Meiosis promoting activity in porcine follicular fluid. | ISHIZAKI,Y., M.YOSHIDA, Y.KOJIMA , H.KAWAGISHI & T.MIZUNO | 40 |
| The developmental capacity of porcine oocytes matured in porcine follicular fluid in vitro. | NAITO,K., T.UENO, T.OHWAKI, R.SHIINA & Y.FUKUDA | 42 |
| Transplantation of rat ovary into ovarian bursa after freezing and thawing | GAGABU,S., S.MAKITA & K.MAMBA | 44 |
| Effects of cooling rate and plunging temperature into LN ₂ on survival of mouse blastocysts fertilized in vitro and frozen in glycerol--sucrose | HIRAIZUMI,S., H.ISHII, C.HANADA, M.ICHIKAWA, K.NAITO & Y.FUKUDA | 46 |
| Cryopreservation of rat two-cell embryos by vitrification | HIRABAYASHI,M. & N.CHAYA | 48 |
| Changes of sperm heads incorporated into nucleate and anucleate fragments of hamster oocytes before and after the germinal vesicle breakdown. | HIRAO,Y | 50 |
| Scanning electron microscopic study of interspecific chimaeric blastocysts. | SOETA,S., N.NAKAMURA, J.TAKAHASHI & Y.YASUDA..... | 52 |
| Fertilization of hamster eggs by microinjection of rabbit spermatozoa | SHIOTA,K., T.GOTO & K.SATO | 54 |

Application of micromanupulation for *in vitro* fertilization and embryo transfer.

SAITO,H., F.SATO, T.HIRAYAMA, T.SAITO,
M.YOH & M.HIROI 56

Effect of DMSO on fertilizability of cumulus free mouse oocytes.

KOHNO,K., S.AZUMA & Y.TOYODA 58

In vitro fertilization of pig oocytes cocultured with granulosa cells and fetal kidney cells.

YOSHIDA,M., Y.ISHIZAKI, K.BAMBA & Y.KOJIMA 60

Sperm movement characteristics in human IVF.

AWAGI,H., M.INOUE, Y.KOBAYASHI, I.HONDA,
H.SASAKI, S.DEGUCHI, & M.MATSUI 62

Results of *in vitro* fertilization-embryo tubal replacement(IVF-ETR).

KOBAYASHI,Y., I.HONDA, M.INOUE, H.AWAGI,
T.MATUYAMA, T.TSUDA & A.FUJII 64

Sexing of bovine embryos by chromosomal analysis.

HORIUCHI,T., N.OHISA, T.NUMABE
N.TAKADA & Y.ISHIKAWA 66

Influence of antiserum raised to she common antigen(23Kd)in porcine and human *zona pellucidae* on *in vitro* fertilization system in humans.

HASEGAWA,A., K.KOYAMA & S.ISOJIMA 68

Observations on Supplementary Sperm and the Polar Body
in Rabbit Fertilized Ova

Kenichi Higashi, Teruo Maeda and Yoshio Tsutsumi

Animal Reproduction Laboratory, Faculty of Applied Biological Science,
Hiroshima University, Higashihiroshima-shi, Hiroshima 724, Japan

Abstract Rabbit eggs from the 1-cell to the expanding blastocyst stage were examined for a study of the distribution of supplementary sperm and polar bodies. A total of 252 eggs was recovered from 37 does from 18 to 160 hours following mating; 237 of them were fertilized. Supplementary sperm persisted in 221 of the fertilized eggs (93.2%). Mean number of supplementary sperm in all fertilized eggs was 6.5 ± 5.8 , and of those recovered at 160 hrs *post coitum* was 3.2. Though the proportion of eggs with agglutinated supplementary sperm was over 50% in the 1-cell to the 16-cell eggs, the proportion significantly decreased after the 32-cell stage. Three polar bodies were observed in 27 eggs (19%) out of 142 during the 2-cell to the morula stage. Although the polar body was always located peripherally in the perivitelline space in the 2-cell stage, some eggs with one or two polar bodies located centrally among the blastomeres were found in both the 4-cell and the 8-cell stages in the present study. The same phenomenon was observed during *in vitro* culture of the 2- or the 4-cell stage eggs, also. It was noted that one to five sperm appeared in some blastocoelic cavities.

Introduction

Pincus and Enzmann¹⁾ found supplementary sperm located in the perivitelline space of the rabbit ovum at 12 3/4 hours after copulation. The numbers of supplementary sperm in rabbit ova were reported to be 5.5 per egg at 20 to 23 hours after mating by Bedford²⁾, and 20 in the 16-cell stage at 50 hours after mating by Adams³⁾. Numerous supplementary sperm in rabbit 8-cell eggs showed intact microscopic morphology⁴⁾. In an ultrastructural study by Oh and Brackett⁵⁾, the inner acrosomal membrane and the equatorial segment of the supplementary sperm in an ovum 1 1/2 hours after insemination *in vitro* were clearly evident. And in fertility trials, insemination with 1,000,000 epididymal spermatozoa in 1 ml serum/Ringer solution showed that the number of supplementary sperm was 4.2 per egg recovered 18 hrs after mating⁶⁾. These reports are fragmentary and do not clarify how long supplementary sperm persist in developing rabbit embryos.

The chromosomes of the first polar body in rabbit ova sometimes undergo the second meiotic division, causing three polar bodies in an ovum⁷⁾. Assheton⁸⁾ reported that one polar body occasionally mingled with the segments of the rabbit 8-cell eggs and placed itself within them, while the other remained in the perivitelline space. And Gregory⁹⁾ re-

ported that in about 25 to 27 eggs, the polar bodies appeared to occupy the depressions between cells; and in one or two cases they appeared to have been forced to occupy a position with the cells which are enclosed. However, it is not yet clear whether such a phenomenon commonly occurs in the rabbit.

In the present study, rabbit eggs in various developmental stages from the 1-cell to the expanding blastocyst were examined with respect to number and shape of supplementary sperm and polar bodies, which may change during 18 hrs to 160 hrs after mating.

Materials and Methods

Thirty-seven female Japanese White rabbits were bred twice with fertile bucks by natural matings and injected intravenously with 20 I.U. of hCG to insure ovulation. The eggs were recovered *in vivo* by flushing the oviducts at 18 hours *post coitus* (hrs *p.c.*) (4 does), 24 hrs *p.c.* (6 does), 30 hrs *p.c.* (5 does), 38 hrs *p.c.* (6 does), 48 hrs *p.c.* (3 does), and 60 hrs *p.c.* (3 does), by flushing both oviducts and uteri at 72 hrs *p.c.* (2 does), and by flushing uteri at autopsy 90 hrs *p.c.* (3 does), 120 hrs *p.c.* (2 does), 144 hrs *p.c.* (2 does), and 160 hrs *p.c.* (one doe) using Ringer's solution supplemented with 20% rabbit serum.

Eleven of those cleaved ova recovered from oviducts at 18 hrs *p.c.* and 9 at 24 hrs *p.c.* were taken for *in vitro* culture. After recovery, these eggs were washed two or three times with Ham's F12 medium (GIBCO) and then introduced into droplets of 0.5 ml of the same medium, which included 20% (v/v) inactivated rabbit serum and 100 I.U./ml K-penicillin G and adjusted to a final pH of 7.4 by dropwise addition of 7.5% (w/v) NaHCO₃ under liquid paraffin in petri dishes (35 mm in diameter). The eggs were cultured at 38°C in a humidified gas phase of 5% CO₂ and 95% air for 48 hrs and observed every 6 hrs.

All eggs, except those cultured *in vitro*, were transferred to glass petri dishes and viewed by an inverted microscope using differential interference to count the number of supplementary sperm and to locate the polar bodies. The number of supplementary sperm was counted very carefully. Second or third polar bodies, small spherical cellular bodies nearly as large as the first polar body, mainly situated in the perivitelline space, were also located, if present. Then the eggs were fixed in 2.0% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylic acid buffer for 2 hrs at 4°C. After washing with 0.2 M cacodylic acid buffer for 8 hrs, they were postfixed in 2% OsO₄ in cacodylate solution for 1 hr at 4°C, and were put into agar blocks (1-1.5% w/v), dehydrated in ascending concentrations of acetone up to 100% to embed in Epok 812. Successive sections (1 μm in thickness) were made using an automatic ultramicrotome (Porte-Blum, Sorvall). The sections were stained with 1% (w/v) toluidine blue solution in 1% (w/v) sodium borate solution (pH=10.2), and examined for supplementary sperm and polar bodies using a phase-contrast microscope.

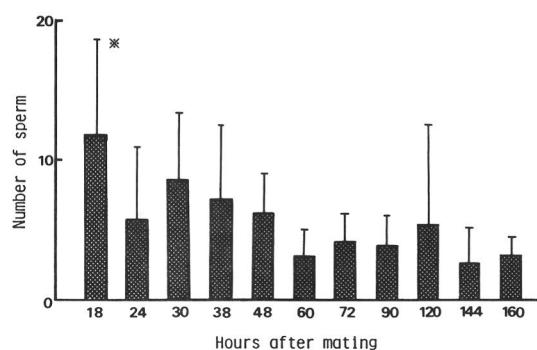
Results

A total of 252 eggs was recovered from 37 does; 237 of them were fertilized. The mean number of eggs recovered per doe was 9.4±2.6 (mean±S.D.) (range 4-14). Supplementary

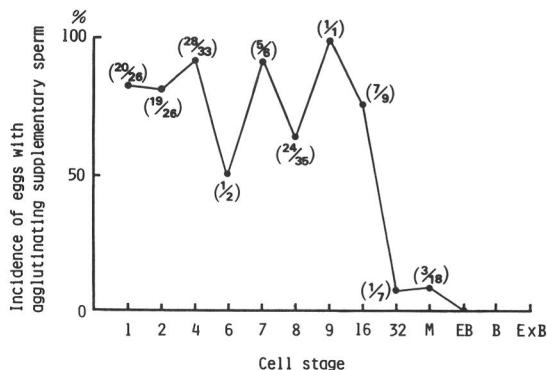
sperm could not be found in 16 (6.8%) fertilized eggs; the mean number was 6.5 ± 5.8 in all fertilized eggs. The mean numbers of supplementary sperm counted in eggs recovered at each time after mating are illustrated in Text-Fig. 1 (range, 13.1-2.6). All supplementary sperm observed by light microscopy were intact and well preserved in the perivitelline space (Figs. 1-4). It was also evident that one to five sperm appeared in the blastocoel cavity; that is, 2.0 ± 1.4 sperm in 5 out of 6 early blastocysts, 2.0 ± 1.0 sperm in 5 of 10 blastocysts, and 2.7 ± 1.5 sperm in 11 of 47 expanding blastocysts (Fig. 6).

Although two or more supplementary sperm appeared agglutinated together in many 1-cell eggs at recovery, a few eggs in this stage demonstrated that sperms which were swimming separately in the perivitelline space just after recovery showed agglutination of sperm, mostly in proximity to the polar body, within one hour after recovery. In the 2-cell eggs, most agglutinated sperms were located in the bipolar and wider perivitelline space formed by the junction of two adjacent blastomeres. Changes in incidence (%) of eggs possessing agglutinated sperm in each cell stage are shown in Text-Fig. 2. The proportion of these eggs was briefly over 50% during the 1-cell to the 16-cell stage, and afterward it sharply decreased to the morula stage. In the early blastocyst, it was difficult to find supplementary sperm.

Three polar bodies were located in 27 (19%) eggs out of 142 from the 2-cell to the morula stage (Table 1). It was impossible to identify the polar body in the early blastocyst stage, because of the extremely narrow perivitelline space and the small cell-size of the blastomere. Although the polar body was always located peripherally in the perivitelline space in the 2-cell stage, eggs with one polar body located centrally among the blastomeres were sparsely found in both the 4-cell and the 8-cell stages in the present study (Figs. 5 & 6). In the *in vitro* experiment, it was clarified that the third polar body appeared in the 4-cell stage and one of the polar bodies sometimes moved into the central portion among blastomeres, with the exception of one case in which two polar bodies were located in the central portion among blastomeres, also.



Text-Fig. 1. Mean numbers of supplementary sperm in eggs recovered at various times after mating.
* standard deviation.



Text-Fig. 2. Incidence of eggs with agglutinating supplementary sperm in various cell stages. The numbers in parentheses indicate the ratio of number of eggs with agglutinating supplementary sperm to eggs observed. M; Morula, EB; Early Blastocyst, B; Blastocyst, ExB; Expanding Blastocyst.

Table 1. Incidence of three polar bodies and location of the polar bodies in eggs

| Cell stage | No. of eggs with 3 polar bodies / No. of eggs observed | | No. of eggs possessing polar bodies located in the central portion among the blastomeres (%) |
|------------|--|---|--|
| | (%) | | |
| 1-cell | 0 | / | — |
| 2-cell | 2 | / | — |
| 4-cell | 11 | / | 13 (39.4) |
| 6-cell | 0 | / | 0 |
| 7-cell | 1 | / | 0 |
| 8-cell | 7 | / | 7 (18.9) |
| 9-cell | 1 | / | 0 |
| 16-cell | 2 | / | 0 |
| 32-cell | 0 | / | 0 |
| morula | 3 | / | 0 |
| Total | 27 | / | 20 (14.1) |

Discussion

According to photographs of rabbit fertilized eggs by Soupart⁴⁾, agglutination of supplementary sperm is evident in the perivitelline space. In spite of a high incidence (over 50%) of rabbit eggs with sperms agglutinated in the 1-cell to the 16-cell stage, it is curious that no description appears hitherto on the agglutination of supplementary sperm. Reasons for the occurrence of agglutination of supplementary sperm in cleaving eggs are not clear and remain to be explored.

In the present study, three polar bodies were recognized in some eggs later than the 2-cell stage (Table 1), and *in vitro* egg culture showed that the third polar body appeared in the 4-cell stage. Therefore, the third polar body may appear during the 2-cell to the 4-cell stage, and incidence of eggs having the third polar body was about 20%.

Gregory⁹⁾ suggested that in the undivided egg to the 2-cell stage egg, the polar bodies are often found in close proximity to each other and in the 4-, 8- and later cell stages they are often found separate, and in many cases very far removed from each other to occupy the concavity formed by the junction of two adjacent cells. This trend is in reality demonstrated in the present study, also. Gulyas¹⁰⁾ suggested that rotational cleavage occurs in one of two blastomeres during the second cleavage in the rabbit. It was also reported that one of two polar bodies was mingled with the segments of the egg⁸⁾. Therefore, it is speculated that the migration of the polar body directed to the central portion among blastomeres may be related to rotational cleavage, and that this phenomenon frequently may appear in the 4-cell to the 8-cell stage. Gregory⁹⁾ observed that in rabbit eggs of about 25 to 27 cells, the polar bodies appear to be living and always occupy the depressions between cells; and in one or two cases they have been forced to occupy a position with the cells which are enclosed. Batta *et al.*¹¹⁾ demonstrated that the second polar body in the rhesus monkey egg was located among the blastomeres. Gregory⁹⁾ assumed that the variation in positions of the polar bodies is due to segmentation, pressure and readjustment, because the polar bodies may be shifted more readily by very small pres-

sure than are larger cells.

Nozawa^{1,2)} noted that rabbit embryos do not hatch from the zona pellucida *in vivo* before implantation which begins later than 168 hrs after mating^{1,3)}. In the present study, sperm were found both in the perivitelline space and in the blastocoelic cavity of five expanding blastocysts recovered 160 hrs *p.c.*, and these sperm seemed to be intact in light microscopy. Therefore, it is of interest to determine the fate of these sperm *in vivo* at and after implantation.

Acknowledgment

We are grateful to Professor Emeritus W. J. Mellen, Department of Veterinary and Animal Sciences, University of Massachusetts, U.S.A., for kindly reviewing the manuscript.

References

- 1) Pincus, G. & Enzmann, E. V. (1932). *J. Exp. Biol.*, 9, 403-408.
- 2) Bedford, J. M. (1971). *J. Reprod. Fert.*, 25, 211-218.
- 3) Adams, C. E. (1955). *Studies on Fertility*, 7, Blackwell Scientific Publications, Oxford, P.130-138.
- 4) Soupart, P. M. D. (1970). *Fertil. Steril.*, 21, 724-756.
- 5) Oh, Y. K. & Brackett, B. G. (1975). *Fertil. Steril.*, 26, 665-685.
- 6) Bedford, J. M. (1963). *J. Reprod. Fert.*, 6, 245-255.
- 7) Austin, C. R. (1959). In "Reproduction in Domestic Animals", edited by H. H. Cole and P. T. Cupps, I, New York and London, Academic Press, P.399-432.
- 8) Assheton, R. M. A. (1894). *Quart. J. Micr. Sci.*, 37, 113-164.
- 9) Gregory, P. W. (1930). *Contributions to Embryology*, 125, 141-168.
- 10) Gulyas, B. J. (1975). *J. Exp. Zool.*, 193, 235-248.
- 11) Batta, S. K., Stark, R. A., and Brackett, B. G. (1978). *Biol. Reprod.*, 18, 264-278.
- 12) Nozawa, A. (1976). *Jap. J. Fert. Ster.*, 21, 359-369. (in Japanese).
- 13) Denker, H. -W. (1977). *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*, 53, New York, Springer-Verlag, P.15-26.

EXPLANATION OF FIGURES

1. 1-cell egg recovered from the oviduct at 18 hrs *p.c.*, showing supplementary sperms (small arrows), two polar bodies (large arrows), two polar bodies (small arrows), zona pellucida (ZP), and two pronuclei (PN) ($\times 704$).
2. 2-cell egg recovered from the oviduct at 24 hrs *p.c.*, showing agglutinating sperms (small arrow) in the perivitelline space and the polar body (large arrow) occupied the concavity formed by the two adjacent cells ($\times 1067$).

3. 4-cell egg cultured *in vitro* for 12 hrs after recovery of 2-cell egg, showing agglutinating sperms (small arrows) and a polar body (large arrow), which is just as a transparent round body located centrally among the blastomeres ($\times 533$).
4. A semi-thin section of 4-cell egg recovered from the oviduct at 30 hrs *p.c.*, showing agglutinating supplementary sperms (small arrows) in the perivitelline space, one polar body (large arrow) located centrally among four blastomeres, and another polar body (large arrow) remained out of shape in the perivitelline space ($\times 994$).
5. 8-cell egg cultured *in vitro* for 30 hrs after recovery of 2-cell egg, showing agglutinating supplementary sperms (small arrow) in the perivitelline space and one polar body as a small round body located centrally among the blastomeres (large arrow) ($\times 704$).
6. A sperm found in the blastocoelic cavity of an expanding blastocyst recovered from the uterus at 90 hrs (small arrow) ($\times 500$).
7. A supplementary sperm (small arrow) located between the inner cell-mass and the zona pellucida of an expanding blastocyst recovered from the uterus at 90 hrs *p.c.* ($\times 1067$).
8. A semi-thin section of an expanding blastocyst recovered from the uterus at 90 hrs, showing a supplementary sperm (small arrow) between the trophoblast and the zona pellucida ($\times 560$).

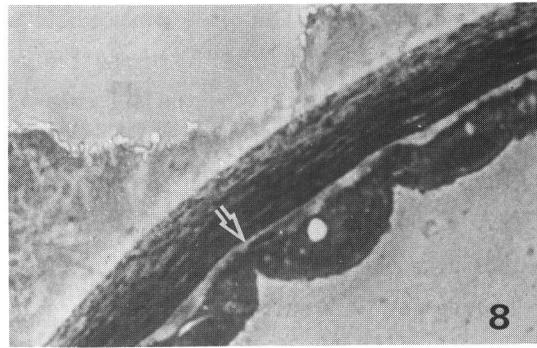
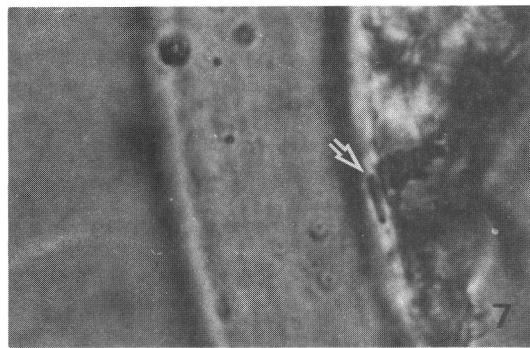
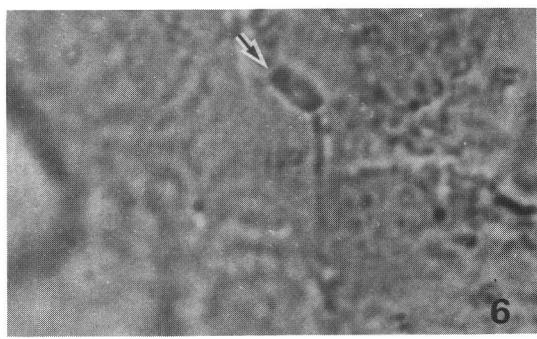
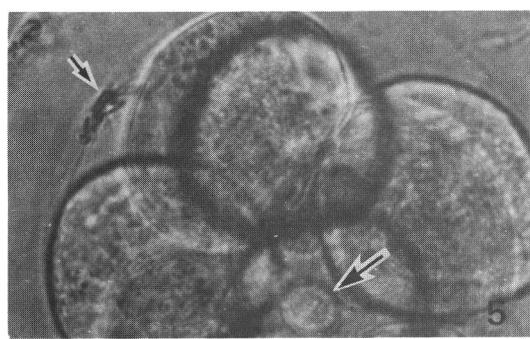
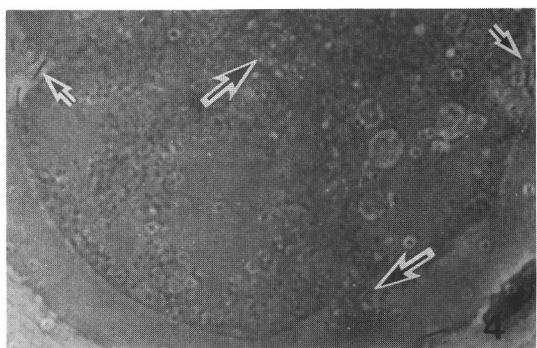
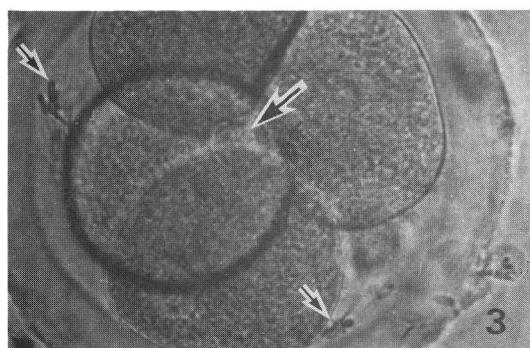
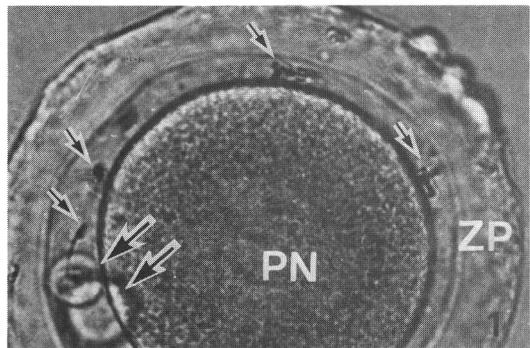
家兔受精卵の補足精子と極体の観察

東 賢一, 前田 照夫, 堤 義雄

広島大学生物生産学部家畜繁殖学教室

交配後 18時間から160時間で回収された1細胞期から拡張胚盤胞 (Expanding Blastocyst) 期までの家兔卵の補足精子及び極体の分布状態を観察した。

37羽の家兔から合計252個の卵が回収され、その内237個が受精卵であった。補足精子は受精卵のうち221個 (93.2%) で観察され、受精卵1個あたりの補足精子数は 6.5 ± 5.8 個であり、160時間後に回収された卵においても、平均 2.6 個の補足精子が認められた。1細胞期卵の卵胞腔内補足精子は短時間の間に凝集するものが多く、凝集した補足精子を有する卵の割合は、1細胞期から16細胞期までの卵では50%以上にも及んだが、32細胞期以降の卵はその割合は著しく低下した。2細胞期から桑実胚期の一部の卵では3個の極体を有し、さらに4細胞期と8細胞期の一部の卵では、1個あるいは2個の極体が割球間の中央間隙に位置するものがみられた。なお、早期胚盤胞期以降の胞胚腔内に1～5個の精子が観察されるものがあった。



2細胞期胚の分離によるマウス 一卵性双子の作出

Production of Monozygotic Twin Mice by separating of 2-cell Stage Embryos

中村克彦・石島芳郎

Katsuhiko NAKAMURA and Yoshiro ISHIJIMA

東京農業大学畜産学科家畜繁殖学研究室

Laboratory of Animal Reproduction, Department of Zootechnical science,

Tokyo University of Agriculture

The present study was examine the viability of separated mouse embryos at 2-cell stage, including production of monozygotic twins.

Two-cell embryos were collected from superovulated donor of three types: CF#1 females which were mated with CF#1 males (#1 embryo), CF#1 females which were mated with C57BL/6 males (F1 embryo) and F1(CF#1 × C57BL/6) females which were mated with C57BL/6 males (BC embryo). Zona pellucida were removed in Hanks solution containing 0.2 ~0.5 % pronase. After removal of zona pellucida, the embryos were separated into two halves by pipetting in Ca⁺ and Mg²⁺ free Hanks solution containing 0.02 % EDTA. Separated blastomeres were cultured in drops of cultur medium(M16) covered with paraffin oil at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂, 95 % air for 72 hours. Then a monozygotic pair of half embryos developed into blastocysts were transferred to CF#1 recipient on Day 4 or 5 of pseudpregnancy.

The results were as follow: 1) The proportion of single blastomeres developd into blastocysts, for the #1 embryo, F1 embryo and BC embryo were 72.8, 74.2 and 78.5, and the proportion of a monozygotic pair of embryos developed into blastocysts were 61.1, 61.5 and 70.1%, respectively. 2) The cell numbers of half embryos after 72 hours culture, for the #1 embryo, F1 embryo and BC embryo were 51.6 ± 2.0, 59.0 ± 3.7 and 63.8 ± 2.1, while the cell numbers of normal embryos were 108.6 ± 5.5, 128.8 ± 3.7 and 136.6 ± 4.6, respectively. 3) By transfer of a monozygotic pair of half embryos into recipients, number of pups were obtained 3 (16.7%), including one pair of twins for the F1 embryo and 1 (5.6 %) for the BC embryo. By transfer of a pair of embryo plus eight of normal embryos into recipient, number of pups were obtainind 5 (25.5 %), including 2 pair of twins for the F1 embryo and 1 (3.6%) for the BC embryo. Three sets of monozygot twins were produced.

緒言

著者らは、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細胞期胚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、CF#1系マウスの2細胞期胚から分離した割球が培養により大部分胚盤胞に発育すること、さらにそれらの胚を移植することにより低率ながら胎子に発育することを報告した（中村、石島 1986, 中村、亀山、石島 1987）。

その後、この移植成績の改善を目的に、一般に発生能の高いとされる交雑卵の分離割球を用いて移植法を再検討した結果、3組の双子を含む産子を得るのに成功した。これは、すでに富樫、鈴木、宮井、岡本（1987）がC57BL/6J×C3H/HeAのF1の2細胞期胚を分離して7組の双子を得たのに次ぐ好成績と思われる所以報告する。

材料および方法

1) 供試胚

供試胚には、CF#1系雌にC57BL系雄を交配して得た2細胞期胚（F1胚）、CF#1系雌×C57BL系雄のF1雌にC57BL系雄をバッククロスして得た2細胞期胚（B胚）およびCF#1系より得た2細胞期胚を用いた。これらの胚は、すべて前報と同様の過排卵処理を施して採取した（中村、石島 1986）。

2) 透明帯の除去

透明帯の除去は、採取した2細胞期胚を0.2～0.5%のプロナーゼ（アクチナーゼE、科研製薬）を含むHanks液の入ったプラスチックシャーレに入れ、実体顕微鏡下で行った。

3) 割球の分離

割球の分離は、透明帯を除去した胚をHanks液で洗浄後、EDTA（第一化学）0.02%を含むCa[#]、Mg[#]欠Hanks液中に移し、数回ピッティングすることにより行った。

4) 培養

培養は、シリコンコーティングされた小プラスチックシャーレ（35×10mm, Lux社製）に、数箇所に分け培養液を滴下し流動パラフィンを覆った小滴を作り、各小滴に1割球を入れる微小滴培養法を用いた。培養液にはM16液を用いた。培養条件は、炭酸ガス5%，空気95%，湿度100%，温度37℃とした。培養はいずれも72時間行った。

5) 細胞数の算定

培養72時間の胚を対象に、以下の方法で細胞数を算定した。

すなわち、培養胚を40%ウサギ血清中に15分浸して低張処理した後、固定液（メタノール：酢酸：蒸留水=3:1:4）の底に低張液を入れた液に移し5分間一次固定し、ついで固定液のみで数秒間固定した。固定終了後、胚を少量の固定液とともに直径5mmの丸印をつけたスライドグラスの上に1個ずつ置き、微細針で丸印の範囲で割球を広げながら乾燥させ、ついでギムザ液で5分前後染色し、顕微鏡下でそれぞれの割球の数を算定した。

6) 分離胚の移植

移植には、培養後72時間に双方が対で発育したF1胚およびBC胚由来の胚盤胞を用いた。レシピエントにはCF#1系の雌マウスをあてた。移植は、1) 偽妊娠4または5日のレシピエントの右子宮角に分離胚を1対のみ移植、または、2) レシピエントの左子宮角にCF#1系由来の無処理胚5、右子宮角に同様の無処理胚3個と分離胚1対を移植する2通りを行った。

結果

1) 分離割球の培養成績

F1胚、BC胚および比較のためのCF#1系胚の分離割球の培養成績はTable 1に示す通りである。Table 1から明らかなように、分離した割球の胚盤胞への発生率は、F1胚由来のものが74.1%、BC胚由来のものが78.5%で、CF#1系よりいくぶん良好であった。また、胚盤胞に発育した分離割球のうち、対で発育した率は、F1胚が61.5%、BC胚が70.1%で、BC胚のみCF#1系のものよりいくぶん高い傾向を示した。

Table 1 Development of blastomeres isolated from 2-cell embryos

| Donor embryo | No. of embryo | No. of developed | No. of monozygotic pairs | | |
|--------------|---------------|------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|
| | | | | half (or pair) | half embryos |
| | | | | to blastocyst (%) | to blastocyst (%) |
| CF#1 × CF#1 | 1110 (555) | 808 (72.8) | 339 (61.1) | | |
| CF#1 × C57BL | 550 (275) | 408 (74.2) | 169 (61.5) | | |
| F1 × C57BL | 214 (107) | 168 (78.5) | 75 (70.1) | | |

2) 分離胚の細胞数

培養72時間の胚盤胞の細胞数を、CF #1系由来の分離胚と交雑胚由来の分離胚とで比較した (Table 2)。いずれの分離胚の細胞数も無処理胚の約半数を示したが、交雑胚由来の細胞数の方がCF #1系由来のものより有意に多い結果であつた。またF1胚とBC胚では、BC胚の方が細胞数が多かった。

Table 2 Cell number of splitted embryos which developed to blastocysts after in vitro culture for 72 hr

| | Cell number | | |
|--------------|------------------|-----------------|-------------|
| | Donor embryo | Normal embryo | Half embryo |
| CF#1 × CF#1 | 108.6±5.5 (n=16) | 51.6±2.0 (n=28) | |
| CF#1 × C57BL | 128.8±3.7 (n=30) | 59.0±3.7 (n=14) | |
| F1 × C57BL | 136.6±4.6 (n=21) | 63.8±2.1 (n=11) | |

3) 分離胚の移植成績
対で発育した胚盤胞を、レシピエントに1対のみ、または1対にCF #1系由来無処理胚8個を加えて移植し、一卵性双子の作出を試みた。その結果、Table 3に示すように、1レシピエントに1対の分離胚を移植した場合は、F1胚では妊娠率が44.4%で、移植した胚から3匹(16.7%)の産むが得られ、そのなかに双子が1組含まれていた。BC胚で

Table 3 Results of transfer of blastocysts following culture in blastomeres isolated from 2-cell embryos

| Donor embryo | No. of embryos transferred/ recipient | No. of pairs/ | | | No. of pairs of monozygotic twins (%) | |
|--------------|--|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|---|--|
| | | No. of embryo transferred | No. of recip- ients | No. of pregnant (%) | | |
| | | | | | | |
| CF#1 × CF#1 | half 2 | 14/24 | 14 | 0(0) | 0(0) 0(0) * | |
| CF#1 × C57BL | half 2 | 9/18 | 9 | 4(44.4) | 3(16.7) 1(11.1) | |
| | half 2 + normal 8 | 10/20 | 10 | 6(60.0) | 5(25.5) 2(20.0) | |
| F1 × C57BL | half 2 | 9/18 | 9 | 5(55.6) | 1(5.6) 0(0) | |
| | half 2 + normal 8 | 14/28 | 14 | 11(78.6) | 1(3.6) 0(0) | |

* previous data

は妊娠率が55.6%とF1胚より高くなっていたが、移植した胚からは1子(5.6%)しか得られなかった。1対の分離胚を対照の無処理胚8個と共に移植した場合は、F1胚では妊娠率が60%と1対のみの移植より増加し、移植した胚から5匹(25.5%)の産子が得られ、そのうち双子が2組含まれていた。

BC胚では妊娠率は78.6%と1対のみの移植より増加すると共に、他の区に比べ最も高い率を示したが、移植した胚からは1子(3.6%)しか得られなかった。したがって、今回の移植では、F1胚からのみではあったが、3組の一卵性双子が作出された。



Fig. 1 Monozygotic twin mice produced by the transfer of a pair of blastomeres of an 2-cell embryo into recipient.

考察

本実験では、先に行ったCF#1系由来の分離胚の移植による胎子への発育率が低いことから(中村、亀山、石島 1987)，その改善策として、一般に胚の発生能が高いとされる交雑卵を用いて再検討を行った。交雑卵は、分離割球由来の子が毛色で識別できるよう、CF#1系雌にC57BL系雄を交配して得たF1胚、さらにCF#1系雌×C57BL系雄のF1雌にC57BL系雄をバッククロスして得たBC胚を用いた。まず、それぞれの2細胞期胚の分離割球の発育能を、CF#1系のものと培養により比較したところ、胚盤胞への発育率および分離割球双方が胚盤胞へ発育する率は、CF#1系胚と比べて遜色なく、発育能は若干高い傾向がみられた。しかし、C57BL/6J×C3H/HeAのF1同志の交配で得た2細胞期胚の分離割球を、著者らとほぼ同様な方法で培養した富樫、鈴木、宮井、岡本(1987)の成績(97.1~100%)、さらにはC57BL/crS1c系雌にDBA/2S1c系雄を交配して得たF1での成績(87.8%)にはおよばなかった。おそらく、これは雌にCF#1系マウスを用いていることも一因と考えられる。

次に、培養72時間の無処理胚(正常胚)および分離胚の細胞数をそれぞれに比較した。その結果、いずれの分離胚の細胞数も正常胚の約半数を示し、Rands(1985)の報告を裏付けた。供試胚間で比較すると、正常胚、分離胚とともに、BC胚>F1胚>CF#1系胚の順となった。このことは交雑胚由来の方が発生速度の早いことを示していた。このことが、

先のBC胚, F1胚の分離割球の胚盤胞への発生率を高めた要因と考えられる。

対で発育したF1胚およびBC胚由来の分離胚をレシピエントに1対ずつ移植した結果, CF#1系の分離胚で果たせなかった妊娠に成功した。妊娠率は、前者が44.4%, 後者が55.6%で、BC胚の移植の方が妊娠率は上回った。移植した分離胚が産子になった率は、前者が16.7%(3/18), 後者が5.6%(1/18)で、妊娠率とは逆にF1胚の方が上回り、前者からは一卵性双子が1組得られた。これらの妊娠率は、いずれも富樫ら(1987)の26.9%よりは高いものであったが、移植した分離胚の産子になる率は、F1胚のみが富樫ら(1987)の9.6%をわずかに上回ったにとどまった。本実験では、結局レシピエント当たり1対の分離胚を移植する方法では、都合18対の分離胚から1組の双子しか得られなかったが、これは、富樫ら(1987)が26対の分離胚の移植で1組得たのと余り変わらなかった。

一方、1対の分離胚を対照の無処理胚(CF#1胚)8個と共に移植した結果、妊娠率はF1胚が60.0%, またBC胚が78.5%と、共に1対のみの移植より向上し、前者では移植した20胚から5匹(25.5%)の産子が得られたが、妊娠率の高かった後者からは28胚中1子(3.6%)しか得られなかった。前者の産子には2組の双子が含まれていた。このことは、移植胚数が多い方が妊娠しやすいことを示唆していた。この点は、先のCF#1系分離胚での実験とも一致した(中村, 亀山, 石島 1987)。これらの結果、本実験で3組の一卵性双子の作出に成功した。これは、富樫ら(1987)が上記の1組と、妊娠雌に分離胚を1対移植して6組の双子を得ている成績に次ぐものであった。

以上のことから、透明帯を除去したマウス2細胞期からの分離胚を体外で培養して移植しても子が得られることが本実験でも裏付けることができた。

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) 中村克彦, 亀山祐一, 石島芳郎(1987)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, 哺乳卵研誌, 4, 33-34.
- 3) Rands, G.F. (1985) Cell allocation in half- and quadruple-sized preimplantation mouse embryos. *J. Exp. Zool.*, 236, 67-70.
- 4) 富樫 守, 鈴木宏志, 宮井達也, 岡本道生(1987)マウスの2細胞期分離による一卵性双生仔の作出, 家畜繁殖誌, 33, 51-57.
- 5) Tojo, H., Ogita, Z. and Momose, Y. (1985) Comparison of the in vitro development of mouse single blastomeres with and without the zona pellucida. *Experientia*, 41, 108-109.

Sperm Distribution and the Acrosome Reaction in
Oviducts During In Vivo Fertilization in the
Mongolian Gerbil

Kahei SATO and Katunori MORISHITA

Department of Applied Biological Science and

Department of Animal Science, College of Agriculture
and Veterinary Medicine, Nihon University

Kameino, Fujisawa 252, Japan

Abstract

In the present study, sperm distribution in oviducts and the status of their acrosome caps in the mongolian gerbil after artificial insemination were examined. Adult females of Mongolian gerbil were superovulated with PMSG-hCG treatment. At 2 hr after hCG injection artificial insemination was performed by exposing the uteri of females anesthetized with sodium pentobarbital and then, 0.05 ml of a dense sperm suspension was injected into each uterus. At 0.5 hr after artificial insemination, motile spermatozoa were observed in the lower isthmus of oviducts. At 1 hr after the insemination, motile spermatozoa were seen in the upper isthmus and the first appearance of motile spermatozoa in the ampulla were observed 7 hr after the insemination. Motile spermatozoa recovered from the lower isthmus 3 hr after the insemination were not occurred the acrosome reaction. While, in motile spermatozoa recovered from

the ampulla of oviducts after 11 hr of the insemination the acrosome reaction was observed.

Introduction

Since Yanagimachi and Chang(1963, 1964) first reported successful in vitro fertilization in the golden hamster, a considerable amount of information has been accumulated on the processes and mechanisms of sperm capacitation, the acrosome reaction and fertilization, using in vitro techniques. However, little is known about during in vivo fertilization at the present time.

In the rabbit some spermatozoa may reach the ampulla within a minute of coitus; most of the "vanguard" spermatozoa, however, are dead, pass out to the peritoneal cavity, and do not participate in fertilization(Overstreet and Cooper, 1978). Fertilizing rabbit spermatozoa stay in the lower segment of the oviduct and do not ascend to the ampulla until about the time of ovulation(Harper, 1973; Overstreet et al., 1978). When female rats(Blandau and Money, 1944), hamsters(Yamanaka and Soderwall, 1960), and guinea pigs(Florey and Walton, 1932) are mated before ovulation, some spermatozoa may reach the ampulla within 15 min of coitus, but it is doubtful whether such spermatozoa remain alive to effect fertilization. In fact, recent studies in rats(Shalgi and Kraicer, 1976) mice(Zamboni, 1972), guinea pigs(Yanagimachi and Mahi, 1976), and hamsters(Cummins and Yanagimachi, 1982, 1985) have demonstrated that the fertilizing spermatozoa do not ascend to the ampulla until at about the time of ovulation.

In the present study, from interesting on in vivo fertilization mentioned above, using Mongolian gerbils sperm distribution in oviducts and the status of their acrosomal caps during fertilization after artificial insemination were examined.

Materials and Methods

Animals: Mature female(9-10 months old,70-80 g body wt.) and males(7-8 months old,70-100 g body wt.) of Mongolian gerbils were used. All animals used were housed in cages by a pair or groups(5-6 heads/group). All animals were provided with laboratory food(Labo MR Stock,Kurea Co.,) and water ad libitum. They were raised and maintained in a temperature-controoled room(20 + 2 C) with a 14 hr light phase(0600-2000 hr) and 10 dark phase.

Induction of ovulation and artificial insemination: Mature females of Mongolian gerbils were superovulated by an intra-peritoneal injection of 20 IU pregnant mare serum gonadotropin (PMSG,Teikoku Zoki Co.)followed 52 hr later by an intraperitoneal injection of 15 IU human chorionic gonadotropin(hCG,Teikoku Zoki Co.). Ovulation occurs between 10 to 12 hr after hCG injection(Ishijema et al.,1979). By this method, an average number of ovulated eggs was 9.8(7-15).

Artificial insemination was carried out 2 hr after hCG injection by exposing the uteri of the females anesthetized with sodium pentobarbital(Abott Co.). About 0.05-0.06 ml of dense suspensions of spermatozoa collected from the cauda epididymidis of mature males(spermatozoa were suspended in saline at a concentration

of $2-4 \times 10^6/\text{ml}$ and then injected into each uterus using a 1ml tuberculin syringe with 27 gauge needle.

Examination of sperm distribution in oviucts: In the first experiment, females were killed at 0.5, 1, 3, 5, 7, 9, and 11 hr after artificial insemination, and oviducts were excised from a point slightly proximal to the uterotubal junction. The fat surrounding oviducts was removed and each oviduct was cut to divide at 3 regions of lower, upper isthmus and ampulla (Fig. 1). The oviducts were mounted on a slide glass by four pillars of a paraffin-vaseline mixture and moderately compressed on a coverslip. When spermatozoa were found, sperm distribution in oviducts and the status of their acrosomal caps were examined using a phase-contrast microscope. In the 2nd experiment, females were killed 3 and 11 hr after artificial insemination. The oviducts were removed on the same method used in first experiment. Each oviduct was cut to divide 3 regions and each oviduct was flushed with warm saline. After the flusshing when motile spermatozoa were found, the spermatozoa were immediately covered with coverslips and the status of their acrosomal caps was examined with the phase-contrast microscope.

Scanning electron microscopic observation of oviducts:

In order to examine the status of spermatozoa in oviducts after artificial insemination, gerbil eggs were fixed at a temperature of 4 C in fresh phosphate buffered 2.5% glutaraldehyde for 12 hr at various times after the insemination. After fixation the speciemns were dehydrated rapidly in a graded aceton series and placed in 100% isoamyl aceton. The samples were mounted on a slide glass (about 5.5 mm aquare) coated with

poly-L-lysine(Sigma) and they were dried. Specimens were placed on the supporter and coated with gold to about 350 Å with the ion coater(Eiko Inc.). Observations and photography were executed using Hitachi S-450 scanning electron microscope.

Results

Results of sperm distribution in oviducts were shown in Table 1. At 0.5 hr after artificial insemination motile spermatozoa were observed in the lower isthmus(33.3%). However, at same time, in the upper isthmus and ampulla we could not find motile spermatozoa. At 1 hr after the insemination, in the upper isthmus motile spermatozoa were observed. While, in the ampulla motile spermatozoa were not found, until 5 hr after the insemination. The first appearance of motile spermatozoa in the ampulla were at 7 hr after the insemination.

Results of the 2nd experiment were shown in Table 2. Motile spermatozoa recovered from the lower isthmus 3 hr after artificial insemination had intact acrosomes, but the acrosome intact spermatozoa decreased in observations of 11 hr after the insemination. About 50% of motile spermatozoa recovered from the upper isthmus 3 hr after the insemination had intact acrosomes. In the other hand, 75.0% of motile spermatozoa recovered from the upper isthmus 11 hr after the insemination had modified or reacted acrosomes. Further, 11 after the insemination about 86.0% of motile spermatozoa recovered from the ampullar portion were modified or reacted acrosomes.

Table 1. Sperm distribution in oviducts at various times after artificial insemination

| Portion of the oviduct | Hours after artificial insemination | | | | | | |
|------------------------|-------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 0.5 | 1 | 3 | 5 | 7 | 9 | 11 |
| Lower isthmus | 2/6(33.3) | 10/10(100.0) | 11/11(100.0) | 12/12(100.0) | 12/12(100.0) | 14/14(100.0) | 17/17(100.0) |
| Upper isthmus | - | 3/10(30.0) | 5/11(45.5) | 9/12(75.0) | 10/12(83.3) | 12/14(85.7) | 16/17(94.1) |
| Ampulla | - | - | - | - | 3/12(25.0) | 6/14(42.9) | 11/17(64.7) |

Note. Numbers in parentheses represent percentage.

Table 2. The status of acrosomal caps of mobile spermatozoa recovered from oviducts 3 and 11 hours after artificial insemination

| Portion of the oviduct | Hours after artificial insemination | | | | | | | |
|------------------------|-------------------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|--------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|
| | 3 | | | | 11 | | | |
| | Total No. of sperm | Acrosome intact sperm | Acrosome modified sperm | Acrosome reacted sperm | Total No. of sperm | Acrosome intact sperm | Acrosome modified sperm | Acrosome reacted sperm |
| Lower isthmus | 106 | 98(92.5) | 8(7.5) | - | 32 | 20(62.5) | 12(37.5) | - |
| Upper isthmus | 50 | 29(58.0) | 17(34.0) | 4(8.0) | 78 | 20(25.6) | 33(42.3) | 25(32.1) |
| Ampulla | - | - | - | - | 86 | 12(14.0) | 29(33.7) | 45(52.3) |

Note. Numbers in parentheses represent percentage

Spermatozoa in oviducts 3 and 11 hr after aetificial insemination were observed by an scanning electron microscope. At 3 after the insemination, in the upper isthmus of the oviduct many spermatozoa attached by their heads to the epithelial cells were observed and in most majority of them heads penetrated into the epithelial cells (Fig. 2). In the lower isthmus a considerable number of spermatozoa were observed. While, 11 hr after the insemination few spermatozoa penetrated to the epithelial cells were observed.

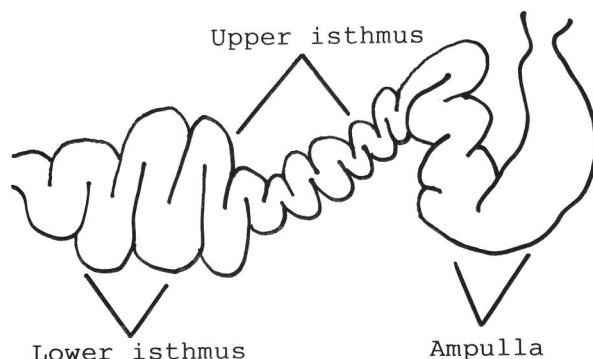


Fig. 1.

Diagrammatic drawing of oviducts of Mogolian gerbils

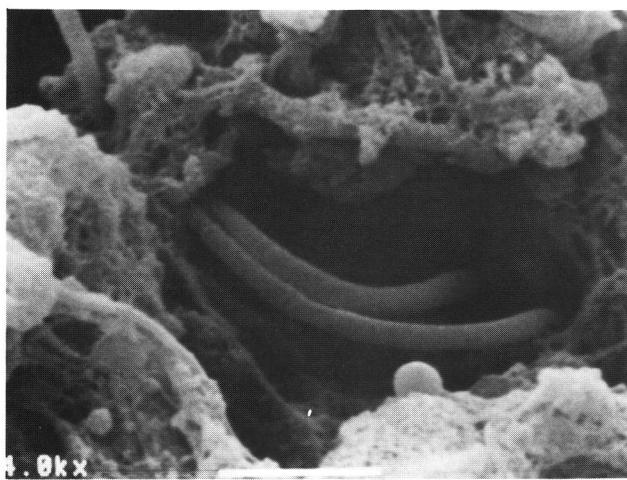


Fig. 2.

Spermatozoa penetrated into the epithelia cells of the upper isthmus of the oviduct

Discussion

In most eutherian mammals, the zona pellucida of freshly ovulated eggs is surrounded by the cumulus oophorus consisting of numerous

follicle cells and their viscous matrix. Under ordinary in vivo conditions, fertilizing spermatozoa must pass through these investments before fusing with the egg membrane. Under ordinary conditions, the cumulus and/or substances associated with the cumulus may well be among the most important factors triggering the completion of acrosome reactions of fertilizing spermatozoa. Although it is well established that spermatozoa must complete their acrosome reactions before entering the zona pellucida, the site where spermatozoa begin and complete their acrosome reactions has been a subject of controversy. According to Austin and Bishop(1958), hamster and guinea pig spermatozoa actively swimming in the ampullary fluids usually have intact acrosome caps, whereas those swimming within the cumulus have either modified or no caps at all. A similar result in the hamster has been reported by Cummins and Yanagimachi(1982). In the mouse, on the other hand, all the motile spermatozoa in the ampullary fluid are reported to have intact acrosome caps(Bryant,1974). In the rabbit the vast majority of spermatozoa in the ampullary fluid about the time of fertilization had been reported to have intact acrosome caps(Bedford,1972; Overstreet and Cooper,1979; Suarez and Katz,1982).

In the present study, ovulation occurs about 8 to 10 hr after artificial insemination and fertilizing spermatozoa reached the ampulla at 1 to 3 hr before ovulation. The large number of spermatozoa reached the upper isthmus of oviducts within 1 hr of the artificial insemination and after 0.5 hr of the insemination spermatozoa were seen only in the lower isthmus. The first appearance of motile spermatozoa in the ampulla was observed 7 hr of

the insemination. In female hamsters mated naturally spermatozoa could reach the upper isthmus within 3 hr of mating and at 12 hr of mating spermatoza were found in the ampulla(Sato and Yanagimachi,1985,unpublished data). From these results, it seems that after artificial insemination before ovulation, the ascending of spermatozoa from the isthmus of oviducts to the ampulla in female gerbiles is earlier than that of the hamster. Gerbil spermatozoa also arrived at the ampulla before 1-3 hr of ovulation.

At 3 hr after artificial insemination spermatozoa in the upper oviduct showed morphological modification of their acrosomes or the acrosome reaction. But, acrosomes of the spermatozoa in the lower isthmus was intact at same time after the insemination. At 11 hr of the artificial insemination, the majority of spermatozoa recovered from the upper isthmus and the ampulla were modified acrosomes or the acrosomes reacted. In hamsters it is observed that spermatozoa entred into the ampulla are ready underdoing the acrosome reaction, and complete the reaction while passing through the cumulus or shotoly before, or after contacting the surface of the zona pellucida(Cummins and Yanagimachi,1982). In contrast, in rabbits 98% of motile ampulla spermatozoa has been reported to have acrosome caps in the cumulus cell matrix(Suarez et al.,(1982)). In the present study, the vast majority of gerbil spermatozoa in the ampulla were undergoing the acrosome reacting or acrosome reacted. From this result, in gerbils, the status of sperm acrosomes in oviducts was a similar pattern,as compared to the of the hamster.

References

- Austin, C.R. and Bishop, M.W.H.(1958) Roles of the rodent acrosome and perforatorium in fertilization. Proc. R. Soc. Ser. B, 149: 241-248.
- Bedfored, J.M.(1972) An electron microscopic study of sperm penetration into the rabbit egg after natural mating. Am. J. Anat., 133, 213-254.
- Bryant, J.D.H.(1974) Capacitation in the mouse: The response of murine acrosome to the environment of the female genital tract. Biol. Reprod., 10: 414-421.
- Cummins, J.M. and Yanagimachi, R.(1982) Sperm-egg ratios and the site of the acrosome reaction during in vivo fertilization. Gamete Res., 5: 239-256.
- Florey, H. and Walton, A.(1932) Uterine fistula used to determine the mechanism of ascent of the spermatozoa in the female genital tract. J. Physiol.(London), 74: 5-6.
- Harper, M.J.K.(1973) relationship between sperm transport and penetration of eggs in the rabbit oviduct. Biol. Reprod., 8: 441-450.
- Ishigima, Y., Nonaka, S., Mori, C. and Higa, H.(1979) Induction of superovulation in the adult Mongolian gerbil(in Japanese). Jap. J. Anim. Reprod., 24: 146-148.
- Overstreet, J.W. and Cooper, G.W.(1978) Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit. 1. The rapid transit phase of transport. Biol. Reprod., 19: 101-114.
- Overstreet, J.W. and Cooper, G.W.(1979) The time and location of the acrosome reaction during sperm transport in the female rabbit. J. Exp. Zool., 97-104.

- Overstreet, J. W., Cooper, G.W. and Katz, D.F.(1978) Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit. 2. The sustained phase of transport. Biol. Reprod., 19: 115-132.
- Shalgi, R. and Kraicer, P.F.(1978) Timing of sperm transport, sperm penetration, and cleavage in the rat. J. Exp. Zool., 204: 353-360.
- Suarez, S.S. and Katz, D.F.(1982) Movement characteristics and acrosomal status of population of rabbit spermatozoa recovered at the site and time of fertilization. Biol. Reprod., 26 (Suppl.,1): 146A(Abstract 220).
- Yamanaka, H.S. and Soderwall, A.L.(1960) Transport of spermatozoa through the female genetal tract of hamster. Fert. Steril., 11: 470-474.
- Yanagimachi, R. (1981) Mechanisms of fertilization in mammals. In Mastoroianni, L. and Biggers, J. D. eds.: "Fertilization and Embryonic Development in vitro". New York, Plenum Press, 81-182.
- Yanagimachi, R. and Chang, M.C.(1963) Fertilization of hamster eggs in vitro. Nature 200: 281-282.
- Yanagimachi, R. and Chang, M.C.(1964) In vitro fertilization of golden hamster ova. J. Exp. Zool., 156: 361-376.
- Yanagimachi, R. and Mahi, C.A.(1976) The sperm acrosome reaction and fertilization in the guinea pig: A study in vivo. J. Reprod. Fert., 46: 49-54.
- Zamboni, L.(1972) Fertilization in the mouse. Moghishssi, K.S. and Hafez, E.S.E.(eds): " Biology of Mammalian Fertilization and Implantation". Springfield, Charles Thomas Publisher, pp 213-262.

スナネズミ (*Mongolian gerbil*; *Meriones unguiculatus*) 卵管内における
精子の分布と先体反応について

佐藤 嘉兵¹、森下克則²

日本大学農獣医学部 応用生物科学科¹、畜産学科²

精巣上体尾部精子を用いて人工授精を行い、その後のスナネズミ卵管内における精子の分布と先体反応について調べた。成熟雌スナネズミにPMSGとhCGを用いて過排卵処理を行い、hCG注射後2時間目に麻酔下で開腹し、子宮内に精子懸濁液を注入して人工授精を行った。精子注入後30分に運動精子の多くは卵管狭部下部 (lower isthmus) に認められた。そして、1時間後には大多数のものが上部狭部に移動していた。しかし、卵管膨大部に初めて精子が認められたのは授精後7時間目であった。授精3時間後にlower isthmusから回収した精子においては先体反応は観察されず、11時間後の卵管膨大部の精子では、ほとんどのものが先体反応を開始していたか誘起していた。この時期には、排卵した卵子ではすでに受精が観察された。

第 29 回
哺 乳 動 物 卵 子 研 究 会

講 演 要 旨 集

会 期 昭和63年4月30日
会 場 日 本 大 学 会 館

家兎のLH-RH静脈内点滴投与による過排卵誘起の試み
A trial on Superovulation by LH-RH Drip Infusion
Intraveneously in the Rabbit

小林由美子、高井尚治、細水 明、山海 直、金山喜一
遠藤 克、佐久間勇次

Yumiko Kobayashi, Naoharu Takai, Akira Hosomizu, Tadashi Sankai, Kiichi Kanayama
Tuyoshi Endo and Yuzi Sakuma

日本大学農獸医学部獸医学教室
Department of Veterinary Physiology, College of Agriculture
and Veterinary Medicine, Nihon University

【目的】 家畜および実験動物において過排卵誘起を目的とした卵胞の発育処理には、FSHまたはPMSGが多用されているが、演者らは、視床下部ホルモンであるLH-RHを用いてマウスの過排卵誘起を試み、良好な成績が得られることを報告してきた。本研究では、家兎においてLH-RHによる過排卵誘起が可能であるか否かについて検討を試みた。

【方法】 供試家兎は、体重3kg前後の日本白色種26例で、実験に際し頸静脈に内径2mmのT字型カニューレの装着手術を施し、長時間の点滴がストレス負荷にならないよう配慮した。LH-RH(コンセラール、武田)の投与時間は、48、72および96時間とした。なお、家兎は交尾排卵動物であることから、卵巣には常時卵胞が存在しているため、卵胞からのインヒビンの分泌を減少させる目的で、LH-RHの投与開始12時間前にhCG(ゴナトロピン、帝臘)75iuを投与して排卵を誘起する試験区を48および72時間の投与区でそれぞれ設けた。LH-RH投与後、排卵を誘発する目的で、直ちに交配しその直後にhCG75iuを投与した。また、LH-RHの72時間投与区で、投与後24時間を経過したのち交配とhCGを投与した試験区を設けた。以上の6試験区について、交配後30時間目に開腹して卵巣を観察し、さらに卵管および子宮を摘出、灌流して卵子を回収し、受精の有無および胚の発育ステージについて観察した。

【結果】 LH-RHを48、72および96時間の投与後、直ちに交配あるいは24時間後に交配した成績はTable 1に示すとおりである。15個以上の過排卵を示した例数は、LH-RH投与後直ちに交配した試験区ではいずれも4例中1例であり、72時間投与後24時間目に交配した試験区では、6例のうち過排卵とみなせる15個以上の個体は認められなかった。平均排卵数は、それぞれ10.3、14.3、11.0および6.2個であり、未破裂卵胞数は全試験区とも多く、また、LH-RHの持続投与で誘起された排卵が全試験区で認められた。

Table 1 Ovulatory response by administration of LH-RH in rabbits

| Administration duration of LH-RH | No. of Anim. examined | No. of Anim. superovulated* | Total No. of ruptured points (Ave.) | Total No. of unruptured points (Ave.) | Total No. of hemorrhage follicles(Ave.) | Total No. of ruptured points induced by LH-RH(Ave.) |
|----------------------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|---|---|
| 48 | 4 | 1 | 31(10.3) | 55(13.8) | 13(3.3) | 22(5.5) |
| 72 | 4 | 1 | 57(14.3) | 98(24.5) | 23(5.8) | 30(7.5) |
| 96 | 4 | 1 | 44(11.0) | 28(7.0) | 2(0.5) | 33(8.3) |
| 72** | 6 | 0 | 37(6.2) | 113(18.8) | 15(2.5) | 36(6.0) |

*: More than 15 ova

**: Mating 24 hrs after administration of LH-RH

Table 2 Ovulatory response by administration of LH-RH in rabbits induced hCG before

| Administration duration of LH-RH | No. of Anim. examined | No. of Anim. superovulated* | Total No. of ruptured points (Ave.) | Total No. of unruptured points (Ave.) | Total No. of hemorrhage follicles(Ave.) | Total No. of ruptured points induced by hCG(Ave.)** |
|----------------------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|---|---|
| 48 | 4 | 1 | 47(11.8) | 27(6.8) | 28(7.0) | 39(9.8) |
| 72 | 4 | 1 | 36(9.0) | 14(3.5) | 48(12.0) | 23(5.8) |

*: More than 15 ova

**: hCG was injected 12 hrs before LH-RH administration and all of the animals examined showed ovulation points

LH-RH投与12時間前にhCGを投与した成績はTable 2に示すとおりである。48および72時間の試験区とも4例中1例に過排卵を認めただけで、平均排卵数は、11.8および9.0個であった。

【結論】これまでに、マウスを用いて、LH-RHの投与により過排卵を誘起するのに十分な多数の卵胞を発育させ得ることを初めて明らかにし報告した。本実験では、家兔を用いてLH-RHを持続的に静脈内に投与したが、満足のいく排卵数の増加は認められなかった。また、マウスにおける検討で得られた知見をもとに、インヒビンの減少を期待して、排卵誘起後にLH-RHの点滴を行った試験区においても卵巣に十分な卵胞を発育させることはできなかった。

以上のように、不完全性周期を示すマウスとは異なり、交尾排卵動物である家兔ではマウスと同様のLH-RHの投与方法では過排卵を誘起することは困難であり、さらに検討を要する課題であると思われる。

主要文献

1. 金山喜一、遠藤 克、小林軍次郎、佐久間勇次 (1984). LH-RHによるマウスの過排卵誘起に関する研究、日不妊会誌、29, 273~278.
2. Kanayama, K., Endo, T. and Sakuma, Y. (1983). Superovulation in mice by administration of LH-RH preparation. Proceedings of WCAP., 2, 271~272.

ハムスター卵巣の体外培養における培養液の検討

Study of medium on surface culture
of the hamster ovary in vitro

大谷智弘、山海 直、金山喜一、遠藤 克、佐久間勇次

Tomohiro Otani, Tadashi Sankai, 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】哺乳動物の排卵機構に関しては、Espeyらの統括的な報告があるが、これらの報告ではいまだ明確でない部分も多く、この機序解明のために組織化学的、生理学的、生化学的な面から種々の検討が試みられている。卵巣を体外培養して排卵を誘起する方法には、還流培養法などがあるがからならずしも簡便な方法ではない。卵巣の体外培養法は、Baranczukらによって報告され、その後、森岡らによって改良された簡易的方法であり、排卵機序の解明、薬物を卵巣に直接的に作用させる方法として適しているものと考えられる。これまでに演者らは、この卵巣体外培養法を用いてtranexamic acidの排卵抑制効果について検討したが、その際、tranexamic acid無添加区(対照区)の排卵数が、in vivoでの成績より低い結果であった。今回は、体外培養卵巣における排卵の至適条件を検討して排卵数を増加させる目的で、培養液量、卵巣摘出時間および培養液について検討を試みた。

【方法】供試動物は、成熟未経産ゴールデンハムスターであり、charge(POD)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60日齢以上(体重 98~180g)の摘出卵巣41個を用いた。卵巣は、ハムスターをエーテル麻酔下で、頸動脈を切断、放血したのち無菌的に採取し、培養液を満たした時計皿内で付着脂肪、卵巣嚢を除去し培養液中でていねいに洗浄した。その後、培養液約8mlを入れた組織培養用シャーレ(ペトレイ 60×15mm: テルモ)にステンレス製の金網台(100mesh)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を行った。卵巣の摘出と培養は、発情期の0:00に行い、培養は、95%air、5%CO₂、37°Cの条件下で10時間培養し10:00に検索した。検索は、卵巣および金網台を0.1%ヒアルロニダーゼを含む培養液中に10分間放置した後、培養液中に遊離した卵子を数えた。培養液は、TCM199(日水)の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、インスリン0.035mg、重炭酸ソーダ1.9mgおよびストレプトマイシン0.12mgを添加した修飾TCM199とイーグルMEM(日水)の1ml中にL-グルタミン0.292mg、重炭酸ソーダ1.9mgおよびストレプトマイシン0.12mgを添加した培養液を用い、それぞれ3mg/mlの牛血清(BSA: シグマ)を添加したものと、無添加の培養液および生理食塩水の5種について検討を試みた。

Table Effect of medium on the in vitro ovulation on hamster ovaries explanted at 24:00

| Medium | No. of ovaries | No. of ovaries ovulated(%) | No. of ova ovulated | Ave. No. of ova/ovary |
|----------------|----------------|----------------------------|---------------------|-----------------------|
| m-TCM199 | 9(1)* | 9(100) | 52 | 5.8±0.54 |
| m-TCM199 +BSA | 9(3) | 9(100) | 43 | 4.8±0.32 |
| Eagle MEM | 9(2) | 9(100) | 45 | 5.0±0.68 |
| Eagle MEM +BSA | 10(1) | 10(100) | 47 | 4.7±0.39 |
| Saline | 4(1) | 3(75) | 5 | 1.3±0.47 |

* No. of ovary ovulated before ovaries explanted (mean±S.E.)

【結果】発情期の0:00に卵巣を摘出し、培養液8ml中で体外培養した成績はTableに示すとおりである。修飾TCM199、修飾TCM199+BSA、イーグルMEMおよびイーグルMEM+BSAの各試験区における排卵陽性率は、いずれも100%であり、平均排卵数は、それぞれ5.8、4.8、5.0および4.7個で、修飾TCM199において最も良好な成績が得られた。また、生理食塩水を用いて体外培養したものでは、排卵陽性率75%、平均排卵数1.3個であり、他の4試験区と比較して有意に低値であった。なお、本実験で用いた41個の卵巣のうち8個に卵巣摘出時において排卵が認められたが、その排卵数はいずれも1個であった。

【結論】本研究は、これまで約1mlの修飾TCM199を用いて、19:00、21:00、22:00および23:00に卵巣を摘出し体外培養した成績を報告してきたが、in vivoにおける排卵数と比較して低値であった。本実験では、培養液を約8ml、卵巣摘出時間を発情期の0:00とすることによって、in vivoに近い排卵数が得られた。とくに、修飾TCM199で良好であり、血清を添加したものでは排卵数の低下が認められた。また、生理食塩水においても排卵が認められたがいずれも低値であった。

以上のように、発情期の0:00に卵巣を摘出し、約8mlの修飾TCM199を用いて、卵巣の上部約80%が液面に露出する状態で培養を行うことで、in vivoと同程度の排卵数が得られることが、本実験により明らかとなった。

主要文献

1. Espey, L. (1980). Ovulation as an inflammatory reaction- A Hypothesis. *Biol. Reprod.*, 22, 73~106.
2. Baranczuk, R., Fainstat, T. (1975). Influence of timing of explantation upon ovulation of hamster ovaries *iv vitro*. *J. Endoc.*, 65, 449~450.
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. 山海直、渡辺靖浩、金山喜一、遠藤克、佐久間勇次(1987).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、哺乳卵研誌、4, 98~104.

マウス卵透明帯における糖質の組織化学的研究

Histochemistry of Glycoconjugates in Mouse Zonae Pellucidae

小川健司・木村順平・月瀬 東・岡野真臣

Kenji OGAWA, Junpei KIMURA, Azuma TSUKISE, Masaomi OKANO

日本大学農獣医学部獣医学科獣医解剖学研究室

Department of Veterinary Anatomy

College of Agriculture and Veterinary Medicine

Nihon University

目的：哺乳類卵透明帯(zona pellucida)は、卵の保護、種間の認識および多受精の阻止などにおいて重要であり、また数種の動物においては精子の先体反応を引き起こし、正常な受精に不可欠なものであることが報告されている。また、透明帯と精子の間の認識機構においては、糖鎖部分が重要であることが示唆されている。透明帯は、排卵とともに変化を起こすが、これは卵管上皮の分泌物が関与しているものと考えられている。本研究ではマウスにおいて、排卵に伴う透明帯の化学的な変化を、糖鎖と特異的に反応するレクチンを含む糖質組織化学的な方法によって検討した。また、シアル酸を糖鎖末端とするダイマーを検索する目的でシアリダーゼ消化法も併用した。

方法：ICR系8週令雌マウスにPMSGとhCGを48時間間隔で投与し、hCG投与後18時間後に卵巣及び卵管を摘出し、2%酢酸カルシウムを含む10%ホルマリン(4°C)で4-6時間固定した。常法に従いエタノール上昇系列にて脱水、パラフィン包埋したのち厚さ3-5μmの切片として、糖の局在を明らかにする目的で次のような染色および酵素消化を施し観察した。過ヨウ素酸-Schiff (PAS)、アルシアン青(AB) pH1.0、AB pH2.5、ペルオキシダーゼ標識-レクチン-ジアミノベンチジン (PO-LT-DAB) 法を中性糖、酸性糖および糖鎖末端の検索の目的で行った。なお、レクチンとしては UEA-1、PNA、MPA、SBA、DBA、BPA、Con A および WGA を適用した。また、糖の性質を明らかにするためシアリダーゼ消化法(SIAL)をAB pH2.5および PO-LT-DAB法について併用して行った。

本研究に使用したレクチンの性状はTable 1に示すとおりである。

結果：マウス卵透明帯に適用した糖質の組織化学反応の結果は Table 2 および Table 3 のとおりである。すなわち、透明帯は、PAS、AB pH1.0、AB pH2.5、sialidase-AB pH2.5 および PO-LT-DAB、sialidase-PO-LT-DAB に対して種々の反応を示し、卵胞内卵と卵管内卵との間に染色性の差異が認められた。

Table 1 Lectins used in histochemical studies

| Lectin/Agglutinin | Sugar specificity | Inhibitory Sugar |
|------------------------------------|--|------------------|
| Ulex Europeus Agglutinin (UEA-I) | α -D-Fuc | α -Fucose |
| Peanut Agglutinin (PNA) | β -D-Gal(1 \rightarrow 3)-D-GalNAc | Lactose |
| Maclura Pomifera Agglutinin (MPA) | α -D-Gal | Gal |
| Soy Bean Agglutinin (SBA) | α -D-GalNAc $>$ β -D-GalNAc | Gal |
| Dolichos Biflorus Agglutinin (DBA) | α -D-GalNAc | GalNAc |
| Bauhinia Purpurea Agglutinin (BPA) | D-GalNAc | GalNAc |
| Concanavalin A (Con A) | α -D-Man $>$ α -D-Glc $>$ α -D-GlcNAc | Glucose |
| Wheat Germ Agglutinin (WGA) | β -D-GlcNAc(1 \rightarrow 4)GlcNAc $>$ β -D-GlcNAc | GlcNAc |

*Lectins were obtained from E.Y. Laborotories, U.S.A.

Table 2 Histochemical reactions of glycoconjugates in the mouse zona pellucida

| | PAS | AB pH1.0 | AB pH2.5 | SIAL-AB pH2.5 |
|------------|-----|----------|----------|---------------|
| Follicular | 3 | 1-2 | 2 | 1 |
| Oviductal | 3 | 1-2 | 2-3 | 2 |

1-4=The number being proportional to the intensity of reaction.

Table 3 PO-LT-DAB reactions of the mouse zona pellucida

| | UEA-I | PNA | MPA | SBA | DBA | Con A | BPA | WGA |
|------------|-------|-----|-----|-----|-----|-------|-----|-----|
| SIAL | - | + | - | + | - | + | - | + |
| Follicular | 0 | 0 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 3 |
| Oviductal | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2-3 | 2-3 |

0=Negative reaction 1-4=The number being proportional to the intensity of reaction.

考察：マウス卵透明帯は種々の中性ならびに酸性複合糖質を含み、またこれらは卵胞内卵よりも卵管内卵透明帯により多く含まれていた。また、PO-LT-DABの結果からマウス卵透明帯はその末端に α -D-Mannose, α -D-Galactose, N-acetyl-D-Galactosamine, N-acetyl-D-Glucosamineなどの糖残基を含み、卵胞内卵と卵管内卵の糖鎖末端には差異があることが示された。PO-MPA-DABの結果から、卵胞内卵及び卵管内卵透明帯の糖鎖末端には、シアル酸-ガラクトースのダイマーが存在することが示唆された。また、卵管内卵にはBPAと特異的に結合する糖残基の存在が明らかにされ、これは、卵管上皮に由来するのではないかと思われ、透明帯の機能上重要な役割を果たしているものと考えられる。

主要文献：

- 1.Araki, Y., Kurata, S., Oikawa, T., Yamashita, T., Naiki, M. and Sendo, F.: A monoclonal antibody reacting with the zona pellucida of the oviductal egg but not with that of the ovarian egg of the golden hamster. J Reprod Immunol. 1987; 11: 193-208
- 2.Florman, H and Storey, B.: Mouse gamete interactions: the zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. Devl Biol. 1982; 91: 121-130
- 3.Spicer, S.S., Horn, R.G. and Leppi, T.J.: Histochemistry of connective tissue mucopoly saccharides. In : The Connective Tissue. 1967, pp 251-303. Ed. Wagner, B.M. and Smith, D.E. Williams and Wilkins, Baltimore.

マウス胚におけるプロスタグランジン 合成酵素の組織化学的検出

Histochemical demonstration of prostaglandin synthetase
in preimplantation mouse embryos

新村末雄・石田一夫

Sueo NIIMURA and Kazuo ISHIDA

新潟大学農学部畜産学科

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Niigata University

目的：哺乳動物胚におけるプロスタグランジン（PG）の検出は、1975年にDickmann and Spilmanによってはじめて試みられた。彼らはウサギの胚盤胞にPGE-A とPGF が含まれていることをラジオイムノアッセイによって調べた。その後、各種のPGがウサギ、ウシ、ヒツジおよびブタの胚盤胞でラジオイムノアッセイを用いて、また、1 細胞期から胚盤胞期までのマウス胚で間接蛍光抗体法を用いて検出されている。さらに、ウサギ、ウシ、ヒツジおよびブタのin vitroの胚盤胞はPGを合成・分泌することも知られている。最近、これらの動物の胚盤胞はアラキドン酸からPGを合成する能力を持っていることが確かめられている。一方、ウサギとヒツジの胚盤胞のPG合成はインドメサシンによって抑制されるといわれており、胚盤胞にPG合成酵素の存在することが示唆される。しかしこれまで、哺乳動物胚ではPG合成酵素の検出は試みられていない。そこで、本研究では未受精期から胚盤胞期までのマウス胚について、アラキドン酸を基質に用いてPG合成酵素の組織化学的検出を試みた。

方法：供試動物としてICR系マウスを使用した。卵と胚は過排卵処置を施したマウスから採取した。すなわち、PMSG 5 i.u.を腹腔内に注射し、48時間後にhCG 5 i.u.を腹腔内に注射して、未受精卵採取の場合を除き同系統の成熟雄と交配させた。観察した卵と胚は、未受精卵、前核卵、2細胞胚、4細胞胚、8細胞胚、桑実胚および胚盤胞で、未受精卵を除きそれぞれhCG 注射後24時間、48時間、60時間、67時間、80時間および96時間で卵管または子宮を0.1 M リン酸緩衝液（pH7.4）でかん流して採取した。未受精卵は雄と交配させない雌からhCG 注射後24時間で卵管から採取した。PG合成酵素を検出するための基質液は、Janszen and Nugterenが使用した処方に準じて作成した。すなわち、アラキドン酸 0.4mg、ジアミノベンチジン 2.0mg、シアノ化カリウム 0.65mg、0.2 M トリス塩酸緩衝液（pH8.0）10ml である。卵および胚の基質液への浸漬は35°Cで3時間行った。なお、対照として

基質を含まない液に浸漬した卵および胚を用いた。

結果：未受精期から胚盤胞期までのマウス胚を、PG合成酵素検出のための基質液に浸漬すると、淡褐色の反応生成物が細胞質全域に少量観察された（図-1）。この反応生成物は基質を含まない液に浸漬した卵および胚の細胞質には出現しなかったので（図-2）、この反応生成物がPG合成酵素活性を現



図-1 PG合成酵素検出の基質液に浸漬
したマウス2細胞胚 $\times 250$



図-2 基質を含まない液に浸漬したマ
ウス2細胞胚 $\times 250$

わしていることが確認された。反応生成物の量は、未受精期から胚盤胞期を通して変わらなかった。また、胚盤胞においては、内細胞塊と栄養膜の細胞の間で反応生成物の量に相違はみられなかった。

考察：これまで、ウサギ、ウシ、ヒツジおよびブタの胚盤胞はアラキドン酸からPGを合成することが確かめられているが、哺乳動物胚にPG合成酵素が存在するか否かについては明らかではなかった。本実験において、未受精期から胚盤胞期までのマウス胚について、アラキドン酸を基質に用いてPG合成酵素の検出を試みたところ、酵素活性は胚盤胞ばかりでなく未受精期から桑実胚期までの胚にも観察された。このことから、マウス胚は初期発生を通してアラキドン酸からPGを合成する能力を有しており、マウス胚に存在するPGE₂は胚自身が合成したものであることが確かめられた。

主要文献：

1. Dickmann, Z. and Spilman, C.H.: Prostaglandins in rabbit blastocysts. *Science* 1975;190:997-998.
2. Marcus, G.J.: Prostaglandin formation by the sheep embryo and endometrium as an indication of maternal recognition of pregnancy. *Biol. Reprod.* 1981;25:56-64.
3. Niimura, S. and Ishida, K.: Immunohistochemical demonstration of prostaglandin E-2 in pre-implantation mouse embryos. *J. Reprod. Fert.* 1987;80:505-508.
4. Janszen, F.H.A. and Nugteren, D.H.: Histochemical localization of prostaglandin synthetase. *Histochemie* 1971;27:159-164.

マウス初期発生に及ぼす卵管の影響

Effect of oviduct on the development of early mouse embryos

鈴木 治・河本 馨

Osamu SUZUKI and Kaoru KOHMOTO

東京大学農学部家畜育種学講座

Department of Animal Breeding, Faculty of Agriculture
University of Tokyo

〔目的〕現在、マウス初期胚培養用として化学合成培養液が各種用いられているが、一般にはいわゆる“*in vitro* 2-cell block”が生じるため、全ての系統で有効な培養液は存在しない。本研究ではこの発生停止の機序を明らかにするために、本来初期胚が存在する“卵管内環境”が初期発生に及ぼす影響を調べた。現在の体外受精を用いた実験系ではマウス卵子の採取は大抵卵管膨大部より行なわれており、排卵から採卵までの間の卵管の影響を考慮していないように思われるため、特にこの点について調べた。

〔材料と方法〕前核期胚は未成熟雌マウス（3-4週令）に過排卵処理をした後、排卵卵子を採取し、成熟雄マウス（12週令以上のJcl:ICR）の精巣上体精子を用いて体外受精することにより得た。体外受精にはWhitten培地(WM)¹⁾を用いた。胚の培養は流動パラフィンで覆ったWM内で37°C、CO₂ 5%+空気の気相下で媒精後120時間まで行った。

卵管の器官培養には、Grid法を用いた。培養液には通常の初期胚培養の条件に極力近づけるため、WMを用いた。器官培養用培養皿（Falcon, No.3037）に約1.2mlのWMを入れ、その上にステンレスメッシュを載せ、メッシュ上で卵管を培養した。卵管は未成熟Jcl:ICR雌より摘出し、直線状に引き延ばした状態で培養した。初期胚の卵管内培養はこの器官培養卵管内に初期胚を注入することにより行なった。

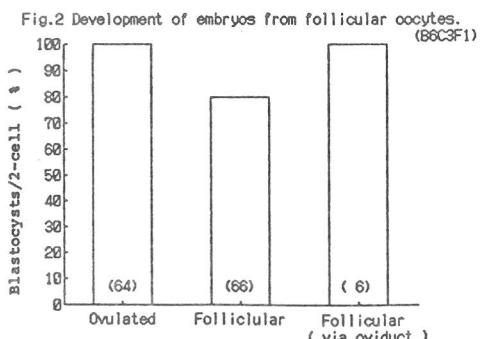
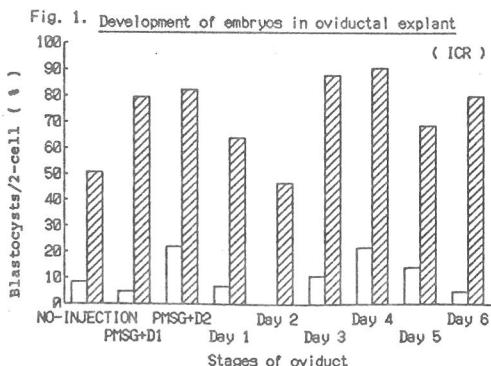
卵胞由来卵子は、hCG投与後約10時間に雌マウスから卵巣を摘出し、WM内で 27G の注射針を用いて大卵胞を裂くことにより得た。回りにゆるく大量の卵丘細胞が付着している卵子を卵胞由来成熟卵子として用いた。媒精時刻まで流動パラフィンでおおったWM中に置き、排卵卵子と同じスケジュールで体外授精に供し、卵胞卵子由来前核期胚を得た。

〔結果〕実験1：未成熟Jcl:ICR雌に由来する前核期胚を器官培養卵管内で1日培養し、その後WM内で媒精120時間まで培養したところ、胚盤胞までの発生が高率に見られた（Fig. 1）。更に卵管の性周期の影響を調べたが、特に性周期の時期による発生支持作用の変化はなかった。実験2：未成熟B6C3F₁

:S1c(B6C3F₁)の卵胞卵子を用いて前核期胚を得、媒精120時間まで培養した。対照として用いた排卵卵子由来胚、卵胞卵子由来胚、そして卵管内培養（1日間）を経た卵胞卵子由来胚の全てが高率に胚盤胞へ発生した（Fig. 2）。

〔考察〕卵管内環境にICR前核期胚を戻すと、“*in vitro* 2-cell block”が生じなかった（実験1）。このことは、卵管内環境がICR胚の初期発生を促進することを示している。つまり、発生停止を起こす系統の前核期胚は、卵管の発生促進作用を欠くために体外で発生できないことが示唆される。一方、発生停止を起こさない系統が発生できる理由としては、排卵から採卵までの間の卵管の影響のみで十分であるからという可能性が考えられる。そこで、卵管の影響を全く受けていないF₁卵胞卵子由来胚の培養を行なった（実験2）。しかし、“*in vitro* 2-cell block”を示さない系統においては初期発生と卵管の影響の有無とに関連性は見られなかった。

以上のことから、マウス初期胚には系統的に“卵管依存型”と“卵管非依存型”とも言うべき2型があることが示唆される。ICRなどに代表される“卵管依存型”卵子由来胚では、発生に際し何らかの卵管因子を必須とするが、B6C3F₁に代表される“卵管非依存型”卵子由来胚では全く独立して発生が進行すると考えられる。発生進行時には、前核期から2細胞期にかけての胚細胞質の質的変化が必要であると言われている²⁾。卵管依存型卵子では卵管因子が細胞質の質的変化を誘導し、この細胞質性変化が2細胞期以降への発生を促すが、卵管非依存型ではこの細胞質の質的変化には卵管因子を必須としないのであろう。



References

1. Whitten, W.K. (1971). *Adv. Biosci.*, 6, 129-139.
2. Muggleton-Harris, A., Whittingham, D.G. and Wilson, L. (1982). *Nature (Lond.)* 299, 460-462.

着床期胚における fibronectin の意義と 培養の及ぼす影響について

Significance of fibronectin in the peri-implantation embryos and the effect of culturing on the expression of fibronectin

竹内一浩・森 明人・鵜木康資・永田行博

Kazuhiro TAKEUCHI, Akito MORI,
Yasushi UNOKI, Yukihiko NAGATA

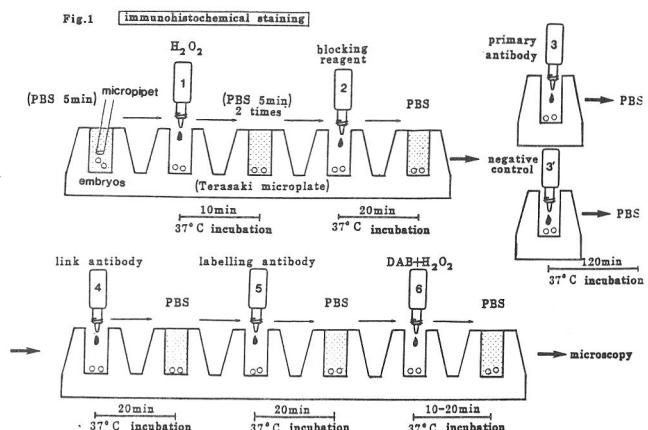
鹿児島大学医学部産科婦人科学教室

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

目的：Fibronectin は 1948 年に Morrison らによって血液中の糖タンパク質として発見されたが、細胞接着、走化性、細胞移動、組織の修復など多岐にわたる作用を有し、あらゆる方面から多くの研究者に注目されている。胚の着床においても fibronectin は重要な役割を演じていると言われているが、その報告は少なく、受精卵における fibronectin の出現時期について少数の報告^{1)～3)}がなされているのみである。今回我々はヒト体外受精・胚移植の基礎的研究として着床前期胚における fibronectin の局在を観察し、また in-vivo embryos (体内胚) と in-vitro cultured embryos (体外培養胚) での相違点を観察し知見を得たので報告する。

方法：ICR 系 6 週齢雌マウスに PMS 及び hCG を 48 時間間隔で腹腔内投与し、同系成熟雄マウスと交配させ、翌朝、腔栓が確認できたものを day 1 とした。day 2 より day 5 まで卵管及び子宮を灌流し、2 細胞期胚より後期胚盤胞まで採取し、この群を体内胚群とした。これに対して 2 細胞期胚より 10% 仔牛血清を含む modified Whitten's medium にて後期胚盤胞まで追加培養した群を体外培養胚群とした。これら体内及び体外培養群の各 stage 胚は acid Tyrod's 液にて透明帯を除去した後、直ちに 10% 中性ホルマリンにて固定した。次に酵素抗体法による染色手順を Fig. 1 に示した。なお染色は Avidin-Biotin Kit (Biogenix 社 : mouse anti-human fibronectin ; monoclonal antibody) を用い、胚の操作は、Terasaki-microplate 上で、micropipet を用いて実体顕微鏡下に行った。

結果：体内胚群及び体外培養胚群における



fibronectin の出現時期と局在を Fig.2 に示した。体内胚群では 2 細胞期及び 4 細胞期で fibronectin の局在は認められず、桑実胚でも fibronectin の局在はまったく見られなかった。しかし初期胚盤胞期になって、その内部細胞塊に初めて顆粒状に fibronectin が染色された。また後期胚盤胞では、内部細胞塊のみならず栄養外胚葉も強く染色された。しかし体外培養胚では、胚盤胞の時期になっても fibronectin の局在はまったくみられなかった。

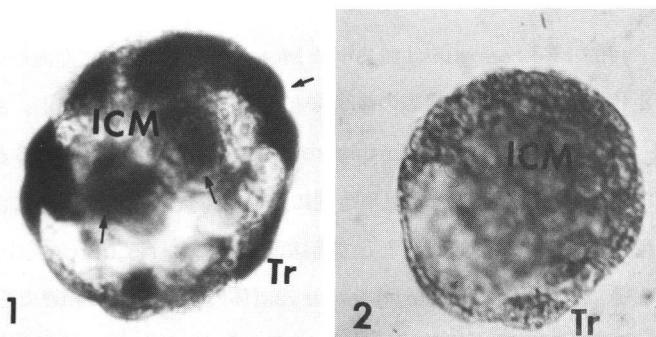
考察：Fibronectin が胚のどの時期に出現するかは、Wartiovaara^{1), 2)} や Zetter³⁾ らがすでに述べているが、マウス胚では胚盤胞になって始めて検出されるとした。我々の実験でも彼らの結果と同様であった。これらの研究結果からみて、fibronectin が胚盤胞で出現することは、ほぼまちがいなく、着床期胚で重要な意義をもつことも推察される。しかし、体外培養胚において、fibronectin が通常出現する時期を越えて後期胚盤胞になんでも出現しなかったことは非常に重要な所見であると考えられる。現在ヒトにおける不妊症領域で盛んに行われている体外受精・胚移植の低い着床・妊娠率が問題になっている。この体外培養胚での fibronectin の局在の消失は、fibronectin が着床にどの程度関与しているかを別にしても、体外培養胚では着床に必要な factor が十分に得られていない可能性も考えられる。今後さらに着床に関する in-vitro 実験モデルを用いた検討が必要であり、また胚内の fibronectin がどの細胞に由来して作られるのか明らかにしていく必要がある。

文献：

- 1) Wartiovaara, J., Leivo, I. and Vaheri, A.: Expression of the cell surface-associated glycoprotein, fibronectin, in the early mouse embryo. *Develop Biol* 1979; 69: 247-257
- 2) Leivo, I., Vaheri, A., Timpl, R. and Wartiovaara, J.: Appearance and distribution of collagens and Laminin in the early mouse embryos. *Develop Biol* 1980; 76: 100-114
- 3) Zetter, B.R. and Martin, G.R.: Expression of a high molecular weight cell surface glycoprotein (LETS protein) by preimplantation mouse embryos and teratocarcinom stem cells. *Cell* 1978; 5: 2324-2328

Fig.2 Comparison of expression of fibronectin(FN) between in-vivo embryos and in-vitro cultured embryos

| embryonic stages | FN expression | |
|------------------|---------------|------------|
| | (in-vivo) | (in-vitro) |
| Two-cell | (-) | (-) |
| Four-cell | (-) | (-) |
| Eight-cell | (-) | (-) |
| Morula | (-) | (-) |
| Early blastocyst | | |
| Inner cell mass | (+) | (-) |
| Trophectoderm | (±) | (-) |
| Late blastocyst | | |
| Inner cell mass | (++) | (-) |
| Trophectoderm | (+) | (-) |



〈写真説明〉

1. 後期胚盤胞(体内胚群)
内部細胞塊(ICM)及び栄養外胚葉(Tr)に fibronectin の局在が強くみられる(矢印)。×200
2. 後期胚盤胞(体外培養胚群)
ICM 及び Tr のいずれにも fibronectin の局在はみられない。×200

BSA無添加培地におけるマウス胚の培養 および移植成績

Viability of mouse embryos
cultured in BSA-free medium

高木優二・菅原七郎・正木淳二

Yuhji TAKAGI, 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 University

目的：各種哺乳動物卵子の培養には必ず血清や BSA（牛血清アルブミン）などの血液製剤が培養液に添加されている。しかし、動物種や薬物のロット間変動が大きく、研究者、研究機関によっても効果に対する評価が異なっている。また、ウサギ、ハムスター、赤毛ザルでは胚盤胞までの発生において培養液にアミノ酸やタンパク質の添加を必要としているが¹⁾、マウスでは添加しなくても胚盤胞まで発生することが報告されている^{2, 3)}。そこで本研究では、 BSA無添加培地でマウス胚を培養し、胚の割球数および移植後の胎児への発生能との関連で胚の発生に対する BSAの効果を調べた。

方法： ICR系雌マウスを、PMSG-hCGで過排卵処理し、hCG投与後48時間、66時間および90時間に、2細胞期胚、8細胞期胚、桑実胚・胚盤胞期胚を採取した。培養液は、対照区としてBMOC-III液を用い、実験区として BSA無添加のBMOC-III(BSA-free)液および BSAの代わりに FCSを10%添加したBMOC-III液を用いた。採取した胚は灌流後BMOC-III+HEPES液で一回洗浄し、BMOC-III+HEPES(BSA-free)液で二回洗浄後、0.35mlの培地に移し拡張胚盤胞からハッチングまで発育を観察した。割球数は、2細胞期から66時間、8細胞期から24時間および48時間培養した胚を固定・染色⁴⁾して調べた。移植は、2細胞期から66時間、8細胞期から48時間培養した胚盤胞を偽妊娠3、4日齢の子宮に片側7個ずつ計14個注入し、分娩時あるいは移植後16-18日に屠殺して生存胎児数を調べた。

結果：2細胞期から胚盤胞への発生率は、対照区、 BSA無添加区、 FCS添加区でそれぞれ 79.0% (523/662)、87.9%(420/478)、41.7%(25/60)で、有意差が認められたが、8細胞期からでは94.3%(481/510)、96.4%(188/195)、86.7%(26/30)と差は認められなかった。桑実胚・胚盤胞期から培養した場合のハッチング率はそれぞれ28.8%(38/132)、0%(0/73)、80.0%(24/30)と BSA無添加区で1例も認められず、 FCSを添加することにより有意に高い値を示した。また、2細胞期から培養を継続した場合

のハッチング率と同様の傾向が見られた。培養胚の割球数については表1に示したとおり、8細胞期から24時間培養したものでは BSA無添加区で有意差が見られたが、2細胞期および8細胞期から66時間培養した場合では差はなかった。また、FCS添加区では有意に割球数は少なく抑制効果が見られた。移植後の胎児までの発生については表2に示した。全ての実験群で有意差は認められなかった。

Table 1 Number of blastomeres in embryos cultured in BSA-free and 10% FCS medium

| Embryo stage at beginning | Culture period (h) | Group | No. of embryos | No. of blastomeres (Mean±SD) |
|---------------------------|--------------------|----------|----------------|------------------------------|
| 2-cell | 66 | Control | 74 | 69.7±28.4 |
| | | BSA-free | 39 | 70.3±28.4 |
| 8-cell | 24 | Control | 56 | 36.2±11.9 ^a |
| | | BSA-free | 38 | 47.4±15.2 ^b |
| | | 10%FCS | 16 | 19.8±5.2 ^c |
| 8-cell | 48 | Control | 14 | 104.7±16.7 ^a |
| | | BSA-free | 27 | 109.1±20.2 ^a |
| | | 10%FCS | 26 | 37.0±12.5 ^b |

p<0.01

Table 2 The viability of mouse embryos cultured in BSA-free medium and then transferred to recipient mice

| Embryo stage | Culture period (h) | Group | Day of pseudo-pregnancy | No. of recipient | No. of pregnancy (%) | No. of embryos transferred ¹⁾ | No. of live fetuses (%) | No. of live fetuses per mouse (Mean±SD) |
|--------------|--------------------|----------|-------------------------|------------------|----------------------|--|-------------------------|---|
| 8-cell | 48 | Control | Day3 | 8 | 7(87.7) | 98 | 54(55.1) | 7.7±2.2 |
| | | BSA-free | | 5 | 5(100) | 70 | 47(67.1) | 9.4±0.8 |
| 2-cell | 66 | Control | Day3 | 7 | 7(100) | 98 | 51(52.0) | 7.3±3.0 |
| | | BSA-free | | 9 | 8(88.9) | 112 | 66(58.9) | 8.3±3.2 |
| | | Control | Day4 | 10 | 9(90.0) | 126 | 62(49.2) | 6.9±1.8 |
| | | BSA-free | | 8 | 6(75.0) | 84 | 40(47.6) | 6.7±2.8 |

1) No. of embryos transferred to recipients becoming pregnancy

考察：胚盤胞期までの培養には BSAを添加しなくても対照区と変わらない発生を示し、また、胚自体の胎児までの発生能にも影響しないことが明らかとなった。しかし、胚盤胞以降の発生にはさらに多くのアミノ酸やタンパク質あるいは胚の成長を促進する因子などの物質が必須であることが示唆された。

- 主要文献：1) Kane, M.T. (1987) In "The Mammalian Preimplantation Embryo" ed Bavister, B.D., Plenum Press, New York and London, p193-217.
 2) Cholewa, J.A. & Whitten, W.W. (1970) J. Reprod. Fert., 22, 553-555.
 3) Goto, K., Takagi, Y., Nakanishi, Y., Ogawa, K., (1986) Japan J. Anim. Reprod., 32, 48-53.
 4) 美甘和哉・上口勇次郎 (1985) "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.

豚卵胞液中にみられる成熟分裂促進活性成分について

Meiosis Promoting Activity in Porcine Follicular Fluid

石崎芳彦・吉田光敏・小島義夫・河岸洋和*・水野 卓*

Yoshihiko ISHIZAKI, Mitsutoshi YOSHIDA, Yoshio KOJIMA, Hirokazu KAWAGISHI*, Takashi MIZUNO*

静岡大学農学部家畜繁殖学教室,* 生物化学教室

Laboratory of Reproductive Physiology, * Laboratory of Biochemistry,
Faculty of Agriculture, Shizuoka University

目的: 豚卵胞卵子を体外で成熟培養し、その受精能や発生能が盛んに研究されている。しかし、体外成熟豚卵子は高い受精能を有するが、多精子受精、多卵核受精などの異常受精の割合が高く雄性前核形成率も低いなどの問題点がある。これらのこととは、卵子の核や細胞質の成熟が不十分であることが一因として考えられる。演者らは、日本畜産学会第80回大会において、豚卵胞卵子の体外成熟培地に豚卵胞液(pFF)を10%添加することにより、卵母細胞の成熟分裂が促進され36h培養後の成熟率が大幅に改善されると同時に、多卵核受精卵の割合も低下することを報告した。そこで今回は、pFF中にみられる成熟分裂促進活性成分について検討した。

方法: 豚卵子は屠場採取の卵巣卵胞(直径2~5mm)より採取した。体外成熟培地には10%FCS加1mTCM199にホルモン(PMSG, hCG, E₂)を添加したものを用いた。豚卵胞液(pFF)は上記の卵胞より採取し酢酸エチル可溶部を除去後、凍結乾燥した。pFF脱脂乾燥粉末は2次蒸留水に懸濁し、PM-10(Amicon)で限外濾過して実験に供した。そして、成熟培地に①凍結乾燥したpFF(FD), ②限外濾過膜非透過のpFF成分(NUF:Mr>10,000), ③限外濾過膜透過のpFF成分(UF:Mr<10,000)、をそれぞれ10%加えた。また分子量10,000以上のpFF分画の一部は、DEAE-Toyopearl 650M(10mM Tris-HCl, pH8.0)ガムクロマトグラフィーを用いて分離し、UV280nmの吸光度を測定してクロマトグラムを作成し、得られたピーク各々についても検討した。卵子は36h成熟培養し、卵丘細胞層膨潤化(CME)の状態を観察した後、媒精し、18h後に成熟・受精の状況を調べた。精子は2頭の大ヨーク種雄豚からの濃厚部精液を使用し、前培養(4h)終了後、5×10⁵/mlの精子濃度で媒精した。精子の前処理、培地、培養条件は既報('87, YOSHIDA)¹⁾に従った。なお、推計学的分析は χ^2 検定を行った。

結果:CMEの割合は、FD区およびNUF区でそれぞれ90.0%、91.1%と対照区の72.5%に比べ有意($p<0.01$)に高かった。一方、UF区では69.4%と対照区と差がみられなかった。表に示すように、成熟率は対照区に比べFD区

および NUF区で有意に高く、UF区では差がみられなかった。受精率はUF区で有意に低かった。また、多卵核受精卵の割合は、対照区と比べFD区および NUF区で有意に低かった。一方、雄性前核形成率はFD区および NUF区では対照区と差が認められなかったが、UF区では有意に低かった。分子量10,000以上の pFF分画について、クロマトグラフィーで分離した結果、非吸着部(NA)と吸着部4ピーカー(A1~A4)が得られた。それらについて同様に検討した結果、CMEの割合はNA区で78.1%、A1~A4区では18~55%とCMEを促進する活性は検出できなかった。一方、NA区における成熟率、受精率および多卵核受精率はそれぞれ、92.5%、80.6%、5.3%であり、成熟分裂促進活性が検出された。しかし、A1~A4区ではいずれの区においても顕著な活性は検出できなかった。

表. 限外濾過膜透過・非透過卵胞液成分の添加が成熟・受精に及ぼす影響 (実数)

| 豚卵胞液a) | | 多精子 | 多卵核 | 雄性前核 | |
|---------------|------------------|----------------|---------------|--------------|-----------------|
| 添加成分 | 成熟率% | 受精率% | 受精率%b) | 受精率%b) | 形成率%b) |
| - | 66.2(51/77) | 89.6(69/77) | 84.1(58/69) | 17.4(12/69) | 50.7(35/69) |
| FD | 84.3(140/166)*** | 84.9(141/166) | 72.3(102/141) | 7.1(10/141)* | 48.9(69/141) |
| NUF(Mr>10000) | 88.8(150/169)*** | 90.5(153/169) | 73.9(113/153) | 7.8(12/153)* | 49.7(76/153) |
| UF(Mr<10000) | 58.8(94/160) | 78.1(125/160)* | 79.2(99/125) | 28.0(35/125) | 20.8(26/125)*** |

a)FD: 脱脂乾燥粉末、NUF: 限外濾過膜非透過成分、UF: 限外濾過成分 b) /受精卵 *p<0.05, **p<0.01

考察: 豚卵胞液中にはこれまで卵母細胞成熟抑制因子(OMI), Inhibinなどの物質の存在が報告²⁾されている。また、豚卵胞液中には、卵丘細胞層の膨潤化の発現に必要な成分と卵核胞崩壊抑制成分が存在し、これらの物質はともに分子量10,000以下であるとの報告³⁾がある。しかし、卵母細胞の成熟・受精に及ぼす卵胞液の効果については、まだ詳しく解明されていない。今回の実験では、卵胞液中に卵丘細胞層を膨潤化させ、卵母細胞の成熟分裂を促進すると同時に多卵核受精卵の割合を低下させる活性が存在した。これらの成分は、卵胞液中の脂質を除く分子量10,000以上の分画に存在することが示された。透明帯は分子量1600以上の物質を通過させないことから、この活性成分はまず卵丘細胞層に作用し、卵母細胞の成熟に関与すると考えられる。また、陰イオンクロマトグラフィーの非吸着部(NA)に高い活性が認められた。一般に酸性の糖、蛋白などの物質は吸着されることから、成熟分裂促進活性成分は中性あるいは塩基性の糖あるいは蛋白などの物質と考えられる。しかし、CMEを促進する活性はNAおよび4ピーカーとも検出できず、操作過程上で失活あるいは消失した可能性が示唆された。卵胞液中には雄性前核形成を促進する物質の存在が報告⁴⁾されているが、今回の結果からはその活性は認められなかった。この原因として、使用した培地や判定基準の違いが考えられた。

主要文献: 1)M. Yoshida: Jpn. J. Vet. Sci. 49(4):711-718, 1987, 2)J. J. Ireland: J. Reprod. Fertil., Suppl. 34: 39-54, 1987, 3)渡芳明、豊田裕: 日畜会報53(8):515-520, 1982, 4)内藤邦彦ら: 哺乳卵研誌4(1):59-60, 1987

豚卵胞液中で体外成熟した豚卵子の発生能

The developmental capacity
of porcine oocytes matured
in porcine follicular fluid in vitro

内藤邦彦・上野 隆・大脇達也

椎名隆次郎・福田芳詔

Kunihiko NAITO, Takashi UENO, Tatsuya OHWAKI,
Ryuhjiroh SHIINA and Yoshinori FUKUDA

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：演者らは、第28回の本研究会において、豚卵子の成熟培地に豚卵胞液(pFF)を使用することにより、媒精後18時間で観察した雄性前核形成率が約30%から約80%へと高まることを報告した(1)。本実験ではpFF中で体外成熟した豚卵子の、体外受精後の発生能について検討した。

方法：卵子は屠場より入手した未成熟豚の卵巣の直径2~5mmの卵胞より採取し、直ちに37°C、5%CO₂95%空気の条件下で48時間の成熟培養を行った。成熟培地には主にpFFにFSH(0.01AU/ml)を添加したものを使用した。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。精子は本大学付属農場の種雄豚より採取し、高濃度処理(2)を施して受精能を獲得させた後に受精に供した。卵子は媒精後6時間に発生用培地であるBMOC-2に移し替え発生を観察した。[実験1] 成熟培地としてTYH、TYHにpFFを25%加えたもの、および100%pFFに、それぞれFSH(0.01AU/ml)を加えた培地で成熟した卵子を、媒精後48時間まで37°Cで培養して発生能を比較した。媒精後48時間に卵子の染色標本を作製し、各割球に1つの核が存在することをもって正常卵割卵とした。[実験2] 媒精後96時間まで37°Cで培養を続け、発生段階を倒立顕微鏡で観察した。[実験3] 発生培養を37°C、39°C、および媒精後6時間まで37°C、その後39°Cとしたもの(それぞれ37区、39区、37-39区)、の3種類について培養して媒精後48時間まで倒立顕微鏡で観察し、発生速度を比較した。

結果：[実験1] 結果をTable 1に示した。媒精後48時間に見られた正常卵割卵の割合は100%pFF区で他の2区に比べ有意に高かった。その大部分は2細胞期胚であった。100%pFF区の媒精後48時間に見られた2細胞期胚の例をFig. 1に、また4細胞期胚の1例をFig. 2に示した。[実験2] 100%pFF区の胚の培養を続けた結果、媒精後66時間に8細胞期胚が見られた(Fig. 3)。しかし、その発生率は低かった(2/120)。2細胞期以降への発生率は媒精後66時間で最高となり、以後は退行に向かい桑実胚や胚盤胞は見られなかった。[実験3] 37

区、39区および37-39区において、2細胞期胚の多くはそれぞれ媒精後33、30および27時間から見られた。2細胞期以降への発生率は37-39区、39区とも42時間で最高となり、それぞれ46.2%、39.5%、であった。

考察：豚卵子をFSH 0.01AU/mlを含む100%pFF 中で成熟した時の正常卵割卵の割合は35.6%であった。この値を既に報告した(1) 本培養系における成熟率、精子侵入率、雄性前核形成率（それぞれ約85%, 50%, 85%）から判断すると、雄性前核が形成された卵子のほとんどは、媒精後48時間には2細胞期以降へ発生したと考えられる。これらの胚をさらに培養したが8細胞期を越えて発生するものはなかった。豚では体内成熟-体内受精卵においても1細胞期から体外で培養すると、この段階で発生が止まることが報告されており(3)、これを確認する結果となった。今回、37°Cで培養した場合2細胞期胚が出現するのは多くは33時間以降であり、生体内と比較し著しく遅かった(4)。培養温度を39°Cにすることにより若干速まったが生体内に匹敵する値ではなかった。この原因の一つとして精子の侵入時期の遅れが考えられ(2)、今後の検討課題である。

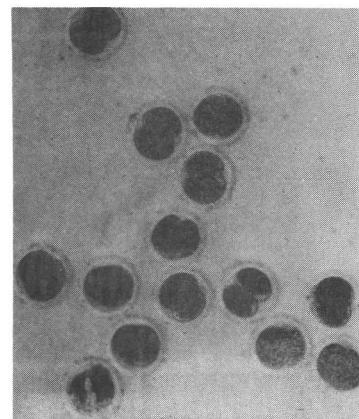


Fig. 1

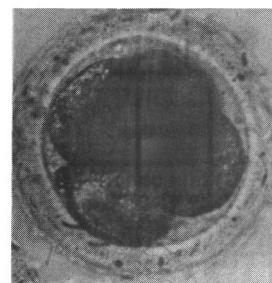


Fig. 2

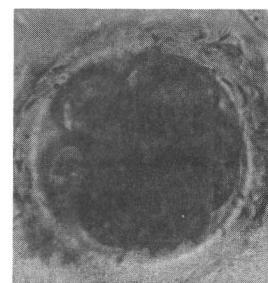


Fig. 3

Table 1. Development of in vitro matured and fertilized porcine oocytes cultured for 48h after insemination

| Maturation medium | No. of oocytes inseminated | Developmental stage | | | | | | Frag. or Deg. |
|-------------------|----------------------------|---------------------|-----------|----|----|----|----|---------------|
| | | 1-cell | 2- | 3- | 4- | 5- | 6- | |
| T Y H | 138 | 98 | 16 | 1 | 1 | | | 22 |
| | | | (13.0%) a | | | | | |
| pFF 25% | 88 | 24 | 9 | 6 | 3 | | | 46 |
| | | | (20.5%) a | | | | | |
| pFF 100% | 118 | 39 | 29 | 4 | 4 | 2 | 3 | 37 |
| | | | (35.6%) b | | | | | |

All maturation media contained FSH (0.01AU/ml)
a, b) Significant difference is present between a and b

主要文献

- 内藤邦彦 他 (1987) 第28回哺乳動物卵子研究会講演要旨 p59
- 浜野晴三, 豊田 裕 (1987) 家畜繁殖誌 32: 177-183
- Lindner G M, Wright R W Jr (1978) J. Anim. Sci. 46: 711-718
- Hunter R H F (1974) Anat. Rec. 178: 169-186

ラット凍結卵巣の卵巣嚢内への移植

Transplantation of rat ovary into ovarian bursa
after freezing and thawing

利部 聰・牧田登之・萬場光一
KAGABU Satosi, MAKITA Takashi and
MAMBA Kouichi

山口大学 農学部 獣医学科

Department of Animal Anatomy, Faculty of
Veterinary Medicine, Yamaguchi University
Yamaguchi 753

目的：ラットでは1匹あたり35000個の卵母細胞が存在しているが、大部分は閉鎖卵胞となり排卵によって得られる卵子は、ごく一部にすぎない。閉鎖してしまう卵胞を成熟させ排卵させるためには、卵巣の凍結保存は有効な方法と思われる。ParkesとSmith (1953) は、未成熟ラット卵巣を-79°Cに凍結し移植後卵巣組織が生着したことを報告している。

近年、受精卵子の凍結保存がガラス化法による超急速無段階凍結法 (RallとFahy, 1985) が用いられ、好成績が得られている。一方、演者らは、この方法で卵巣を凍結保存し、皮下に自家移植後、組織が生着したことを見報告した (利部ら, 1987)。本報告は、凍結・融解後の卵巣を卵巣嚢内へ移植し、その後の生着状態を調べたものである。

方法：実験にはウイスター・今道系ラットの交配後22日目の胎児卵巣を用いた。卵巣を移植されるレシピエントも同系統のラットである。卵巣移植に際しては、Stevensの方法を改良した野口・野口の方法によった。

胎児から卵巣を取出して、PBI中に卵管等をとり除く。次に12.5%VS1（注）に15分間静置した後25%VS1に15分間静置する（以上、室温下）。その後冷50%VS1、冷100%VS1にそれぞれ15分間静置してから精液用ストローに移しかえて、直接液体窒素中へ投入し凍結した。

液体窒素中で約1週間保存した卵巣を氷水中で融解した後、以下の方法で凍結保護剤の除去を行った。すなわち、冷50%VS1・10分間→冷25%VS1・10分間→室温PBIで2回洗浄した。

移植では、最初にレシピエントの卵巣を除去した。除去に際して卵巣嚢の切開部分をできるだけ小さくし、卵巣門をキルナー氏剪刀で切断してから胎児卵巣をスポンゼル（山之内製薬）を支持体として用い移植した。移植後6週間で卵巣をパラフィン切片にして生着状態を観察した。非閉鎖卵胞が存在しているものを生着卵巣とみなした。閉鎖卵胞の判定はBrawとTsafririの基準によった。すなわち果粒膜細胞に核濃縮が認められる

ものを閉鎖卵胞とした。

結果：15匹のラットに凍結卵巣を卵巣嚢内へ移植して11例に生着を認めた。一方、凍結処理をしないでそのまま移植した対照実験区では、15例中13例に生着を認めた。また、排卵が実験区、対照実験区の一部に認められた。

考察：以上の結果から、VS 1による超急速無段階凍結法により凍結保存した卵巣は、移植後生着することが確められた。しかし、生着した卵胞が少ないとこと（直径50 μ m以上の卵胞は22.5／卵巣）や、凍結方法が未だ頻雑である等、改良すべき点が残されている。

（注）VS 1： DMSO 20.5%W/V, アセトアミド 15.5%

W/V, プロピレングリコール 10%W/V, ポリエチレン

グリコール 6%W/VとしてPBIに溶かしたもの。これを100%VS 1としてPBIでさらに希釈した。

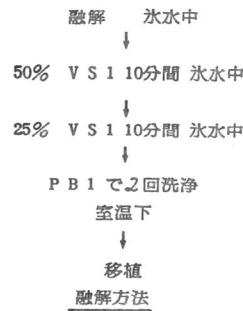
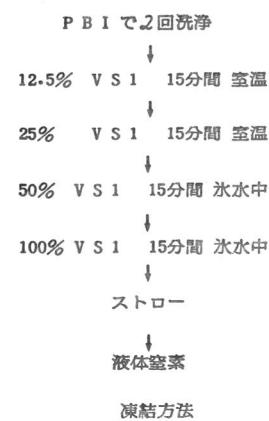
主要文献

利部聰・牧田登之・萬場光一：ラット卵巣の凍結保存、秋季家畜繁殖学会、1987。

野口基子・野口武彦：胎仔卵巣移植、実験生殖生理学の展開、268, 1982。

Parkes,A.S. and Smith,A.U.:Regeneration of rat ovarian tissue grafted after exposure to low temperatures, Proc.Roy.Soc. B, 140, 455, 1953.
Rall,W.F and Fahy,G.M.:Ice free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification, Nature, 313, 573, 1985.

Stevens,L.C.:A modification of Robertson's technique of homoiotopic ovarian transplantation in mice, Transpl.Bull., 4, 106, 1957.



グリセリンーショ 糖液で凍結した体外受精マウス胚盤胞の
生存性に及ぼす凍結速度と液体窒素投入温度の影響

Effects of cooling rate and plunging temperature into LN₂
on survival of mouse blastocysts fertilized in vitro and
frozen in glycerol-sucrose.

平泉真吾・石井秀信・花田千仁・市川優樹・内藤邦彦・福田芳詔

Shingo Hiraizumi, Hidenobu Ishii, Chihiro Hanada, Masaki Ichikawa,
Kunihiko Naito and Yoshinori Fukuda

北里大学獣医畜産学部 家畜育種繁殖学教室

School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Kitasato University

目的：マウス受精卵の凍結保存技術は、畜産の分野では牛受精卵の凍結保存に応用され、受精卵移植で実用化されている。凍結融解胚の生存にとって耐凍剤除去は重要な因子の一つであり、耐凍剤を除かないで移植してもまったく受胎しない。最近、Massipら(1984,1987)は、耐凍剤のグリセリンと一緒にショ糖を添加した凍結用培地で凍結保存した牛の受精卵を、融解後耐凍剤の除去なしで直接移植し、産子を得たと報告した。本研究では、体外受精由来マウス胚盤胞を用いて、グリセリンとショ糖を含む培地で凍結する場合の最適な冷却速度と液体窒素投入温度を検討した。

方法：卵子は過排卵処理 Jcl:ICR系成熟マウスから採取し、常法に従って体外受精を行った。授精後5～6時間に倒立顕微鏡下で受精途上卵を判定し、Whitten 培地に移し替えてCO₂ インキュベーター（37°C, 5%CO₂, 95%空気）内で培養した。授精後96時間に得られた胚盤胞と拡張胚盤胞を実験に供した。凍結用培地は、20%FCS と 0.25Mショ糖を含むPB1に耐凍剤として10%グリセリンを添加したものを使用した。受精卵は室温下（20°C）で直接、凍結用培地に移し、ただちに 0.25ml ストローに収め30分間平衡した。-7°Cのメタノール槽に移して3分間保持後、植氷した。植氷後10分間保持した後 0.3°C/分、 0.5°C/分および 0.8°C/分の速度で冷却し、-15°C、-20°C、-25°Cおよび-30°Cに達した時点で液体窒素中に投入した。液体窒素中で1日間保存した後、37°Cの温湯中で30秒間振とうして急速融解し、ただちにストロー内の受精卵を凍結用培地とともに時計皿に排出したグリセリンの除去は、20%FCS-PB1を徐々に加えて等量希釈した後、20%FCS-PB1に移して10分間、次いで Whitten培地に移して10分間それぞれ静置して行った。受精卵は Whitten培地で24時間培養し拡張～孵化中胚盤胞へ発生したものを生存胚とした。

結果：凍結融解後、すべての実験区で94.1～100%の胚が回収された (Table 1)。液体窒素投入温度が-15℃、-20℃、-25℃および-30℃における胚の生存率は、冷却速度が0.3℃/分の場合、それぞれ1.3%、48.6%、73.3%および72.6%；0.5℃/分の場合、それぞれ22.5%、77.9%、97.5%および96.2%；0.8℃/分の場合、それぞれ9.4%、63.4%、88.5%および76.3%であった。各冷却速度において、液体窒素投入温度が-25℃まで低くなるにつれて生存率は急激に上昇した。しかし、-30℃まで低くしても生存率は-25℃の場合と有意差がなく、ほぼ同じか若干低い値を示した。冷却速度0.5℃/分の-25℃と-30℃の2区ではほとんどが生存し、0.3℃/分と0.8℃/分に比べて、それぞれ有意に高い生存率を示した。

Table 1 Effects of cooling rate and plunging temperture into LN₂ on survival of mouse blastocysts.

| Cooling rate (°C/min) | Plunging temp. into LN ₂ (°C) | No.embryos recovered/ No.embryos frozen(%) | No.embryos survived ¹⁾ / No.embryos recovered(%) |
|--------------------------|---|---|--|
| 0.3 | -15 | 78/80 (97.5) | 1/78 (1.3) |
| | -20 | 70/70 (100) | 34/70 (48.6) |
| | -25 | 75/75 (100) | 55/75 (73.3) |
| | -30 | 84/85 (98.8) | 61/84 (72.6) |
| 0.5 | -15 | 89/89 (100) | 20/89 (22.5) |
| | -20 | 95/95 (100) | 74/95 (77.9) |
| | -25 | 81/83 (97.6) | 79/81 (97.5) |
| | -30 | 78/80 (97.5) | 75/78 (96.2) |
| 0.8 | -15 | 85/87 (97.7) | 8/85 (9.4) |
| | -20 | 93/94 (98.9) | 59/93 (63.4) |
| | -25 | 96/99 (97.0) | 85/96 (88.5) |
| | -30 | 80/85 (94.1) | 61/80 (76.3) |

1) No.embryos developed to expanded and hatching blastocysts in culture for 24 hr after thawing.

考察：以上の結果より、マウス胚盤胞は、10%グリセリンと0.25Mショ糖および20%FCSを含む培地を用い、冷却速度0.5℃/分、液体窒素投入温度-25～-30℃の条件下で凍結保存することにより融解後、極めて高い生存率が得られることが明らかになった。Massip and Van Der Zwalm (1982)は、マウス胚盤胞を10%グリセリンと0.25Mショ糖を含むPBSを用い、冷却速度0.3℃/分、液体窒素投入温度-25℃で凍結し、47.1%の生存率を得たと報告している。本試験の冷却速度0.3℃/分液体窒素投入温度-25℃の成績がよかったのは、凍結用培地に血清を加えたためと考えられる。

主要文献

1. Massip,A. and Van Der Zwalm,P.(1982):Cryo-Letters,3:326
2. Massip,A. and Van Der Zwalm,P.(1984):Vet.Rec.,115:327-328
3. Massip,A. Van Der Zwalm,P. and Ectors,F.(1987): Theriogenology,27:69-79

Vitrificationによるラット2細胞期胚の低温保存

Cryopreservation of rat two-cell embryos by
vitrification

平林真澄・茶谷伸夫

Masumi HIRABAYASHI, Nobuo CHAYA

雪印乳業株式会社生物科学研究所

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

目的：1985年、Ra11 and Fahy¹⁾は、Vitrification法によってマウス胚が保存できることを報告した。

しかしながら、このVitrification法は、凍害保護物質の添加ならびに希釈が多段階であり、操作が複雑なため実用面で方法の簡略化が必要と考える。

我々は、先にラット胚の凍結保存において2細胞期胚での保存が効率的であること²⁾、さらに、2細胞期胚では融解後、凍結保護物質の希釈に一段階希釈を行い、高い生存率が得られること³⁾を報告した。

本実験では、Vitrification法によるラット2細胞期胚の保存を試みた。また、保存後の凍害保護物質の除去には、一段階希釈法も行い比較検討した。

方法：実験にはWistar系成熟ラットを用いた。2細胞期胚は、過排卵誘起を施した雌の卵管から採取した。

Vitrification法による胚の保存は、Ra11らの方法⁴⁾に準じて行った。すなわち、採取した胚は、HB1液⁴⁾あるいはHER液⁵⁾で洗浄後、25% VS1液室温；20分間、50% VS1液 4°C；10分間、90% VS1液 4°C；5分間の順に移した。次いで、90% VS1液90μlとともに0.25mlプラスチックストローに胚を充填し、封入後、液体窒素中に1～14日間保存した。

加温は、2°Cの冷水中で急速に行った。VS1液の希釈は、Ra11らの方法⁴⁾（A法）と室温下で一段階希釈（B法）を行った。A法では、50% VS1液3ml 4°C；10分間、25% VS1液 4°C；10分間、12.5% VS1液室温；10分間の順に胚を移した。B法では、室温下でHB1液あるいはHER液3mlにストロー内の胚を含むVS1液を回収し、15分間静置した。A法ならびにB法で回収した胚は、HB1液あるいはHER液で洗浄後、実体顕微鏡下で形態を観察した。正常形態を示す胚は、培養せずに偽妊娠1日目のレシピエント卵管内に移植した。また、対照群として、無処置の2細胞期胚をレシピエントに移植した。移植後、レシピエントは、妊娠18～20日に屠殺し、胎仔を確認した。一部のレシピエントについては、分娩させ産仔を離乳時まで観察した。

Table 1. Survival of 2-cell rat embryos after vitrification.

| Treatment ¹⁾ | No. of embryos | | |
|-------------------------|----------------|---------------|----------------------------|
| | vitrified | recovered (%) | morphologically normal (%) |
| A | 46 | 46 (100) | 42 (91.3) |
| B | 60 | 57 (95.0) | 51 (85.0) |

1) A : Stepwise dilution.

B : One-step dilution.

Table 2. In vivo development of 2-cell rat embryos after vitrification.

| Treatment ¹⁾ | No. of embryos | No. of recipients ²⁾ | No. of implantation sites (%) ³⁾ | No. of normal fetuses (%) ³⁾ | No. of live young (%) |
|-------------------------|----------------|---------------------------------|---|---|-----------------------|
| | transferred | | | | |
| A | 13 | 1 | 11 (84.6) | 9 (69.2) | — |
| | 29 | 2 | — | — | 19 (65.5) |
| B | 28 | 2 | 15 (53.5) | 10 (35.7) | — |
| | 23 | 2 | — | — | 16 (69.6) |
| Untreated control | 32 | 2 | — | — | 26 (81.3) |

1) See Table 1.

2) All recipients were pregnant.

3) Number of implantation sites and number of normal fetuses were examined on Day 18-20 of gestation.

結果と考察：実験の結果をTable 1 およびTable 2 に示した。Vitrification 法による保存胚の97% が加温後に回収され、A法およびB法の希釈法を用いても85% 以上が正常形態を示していた。保存胚の移植の結果、実験区間に差はみられたが、すべてのレシピエントから生存胎仔および産仔を得ることができた。産仔への発生率は、両実験区とも約70% と高値であり、対照群での約80% に比較して特に大きな差は認められなかった。これは、我々が先に報告したラット2細胞期胚の凍結保存法とほぼ同程度であった³⁾。

このことから、ラット2細胞期胚において、このVitrification 法は、従来の凍結保存法と同様に胚保存法として適用できるものと考える。また、凍害保護物質の除去を一段階で行うことが可能になれば、一部方法の簡略化ができ、さらに実用的な方法として期待できる。

主要文献 1) Rall WF and Fahy GM (1985) : Nature 313:573.

2) 水野敦子, 星 雅樹, 平林真澄 (1987) : 日本疾患モデル動物研究会記録 3:42.

3) 水野敦子, 星 雅樹 (1986) : 雪印乳業研究所報告 83:15.

4) Rall WF, Wood MJ, Kirby C and Wittingham DG (1987) : J. Reprod. Fert. 80:499.

5) Ogawa S, Satoh K, Hamada M and Hashimoto H (1972) : Nature 238:270.

ハムスターの卵核胞崩壊前後での有核及び無核卵片 に侵入した精子核の変化

Changes of sperm heads incorporated into nucleate and anucleate fragments of hamster oocytes before and after the germinal vesicle breakdown

平 尾 幸 久

Yuki-hisa HIRAO

和歌山県立医科大学生物学教室

Department of Biology, Wakayama Medical College

目的：哺乳動物の排卵された成熟卵に侵入した精子核は、卵細胞質中でただちにその膨化(SND)が始まり、次いで雄性前核(MP)が形成される。精子核を膨化させる能力の出現について、これまで多くの観察が行われてきた(1-6)。一般に卵核胞(GV)期に侵入した精子は決して膨化を起さないが、卵核胞の崩壊(GVBD)が起るとこの時期を起点として、SNDとMPの形成が始まる。このことは卵核の成熟と関連していることを示している。Balakier and Tarkowski(6)はMouse卵を用いて、成熟途上の卵を二分することによって、有核及び無核卵片を作り、その卵片に侵入した精子核の変化を観察した。そこで本観察はHamster卵で、有核及び無核卵片を一度に多数作ることのできる密度勾配遠心法を利用し、目的の卵片を作り、それぞれの卵片に侵入した精子核の変化を追跡し、先に行われたMouse卵のそれと比較した。

方法：Golden HamsterのGV期の卵を得るために、発情周期のDay 1の午前にPMSG(30 I.U)を腹腔内に注射したあと、Day 4の午前10~11時の間に卵巢を切り出し、大きな卵胞を針で破って卵子を取り出した。Promet-IかMet-Iの卵を得るためにPMSGの注射のあと、Day 4の午前中にHCG(25 I.U)を注射してから7~8時間後に卵巢から同様な方法で卵子を得た。Met-IIの卵子を得るためにPMSGの注射のあとDay 3の夕方にHCGを注射してから、15時間後に輸卵管から卵子を回収した。

有核及び無核卵片の作製：各々のStageの卵子は酵素処理によって、Zona-freeの裸の卵子にした。Percoll(pharmacia)をPBS(Dulbecco's)で希釈し30%及び25%溶液を作製した。ポリエチレンの遠心管(1.6×6.0 cm)の底に30%溶液(1容)を、次いで25%溶液(2容)を加え、更に最上部にはPBS(1容)を加えて密度勾配を作った。遠心の時、裸の卵を最上部のPBS中に静かに導入して、8,000 rpm(5,080 g)で5~10分間遠心した。遠心後ただちに遠心管の全液を時計皿に移し、二分された卵片を回収した。但しGV期の卵子を遠心する時、裸にした卵を0.01 mMのCytochalasin Dで5分間処理したあと、遠心管に導入した。遠心で二分された卵

子は、比較的小型で透明な卵片と、大きくて細胞質に富んだ卵片とに区別された。

人工媒精：媒精に用いた精子は、精巣上体尾部から取り出した精子をYanagimachi(7)の方法に従って、m-TAPL溶液中で3~4時間培養した。先の方法で得た卵片は、小型のグループと大型のグループに分け、0.3mLのm-TAPL溶液中に移し、この中で媒精した。媒精後凡そ5分で、新しく用意したm-TAPL液に卵片を移し、37°Cで5%CO₂ガスの下で3~4時間培養した。媒精後3~4時間目に、卵片中に侵入した精子核の変化を観察した。

結果：Zona-freeの卵片の多精受精を出来るだけ防ぐために、先に述べたように媒精後5分で、再び新しい溶液中に卵片を移し変えることによって、40~60%は確実に単精受精卵を得ることが出来た。従って観察は主に単精受精のケースに注目して行った。GV期での有核及び無核卵片に侵入した精子核は（但しこのstageでの受精率は15~20%）、それぞれの細胞質中で膨化はまったく起らなかった。これに対してPromet-Iの卵子ではいずれの卵片においても精子核は皆膨化を起した。しかしこの時点ではMPの形成は見られなかった。更にMet-IIの卵子では、両方の卵片共侵入した精子核は膨化を起し、MPの形成が始った。これらの結果をまとめると

Table 1. Fertilization of nucleate and anucleate fragments at three stages of oocyte maturation

| Stages | Egg fragments | | | | | |
|------------------|---------------|---|-----------|---|---|---|
| | Nucleate | | Anucleate | | S | N |
| | S | N | D | M | P | |
| Germinal Vesicle | — | — | — | — | | |
| Prometaphase-I | + | — | + | — | | |
| Metaphase-II | + | + | + | + | | |

SND; Sperm nucleus decondensation. It shows that SND was observed(+) or wasn't(−).
MP; Male pronucleus. It shows that the formation of MP occurred(+) or didn't(−).

細胞質に分散したと看做し得る。事実この時期の卵片に侵入した精子核はいずれの場合も膨化を起した。このことはGV期の卵片ではいずれのケースにおいても膨化は見られなかったので、膨化を起す要因(SND)が核質に由来すると考えて良い。これはMouseの場合とよく一致する(5,6)。しかしHamsterではこの時期にはMP形成はまったく見られなかった。一方Met-IIの卵子で、初めてMPの形成が見られた。これらの観察から、精子核の膨化を起させる要因がGVBDから出現すること、MPの形成はMet-IIになって現われること、つまり

SND能とMP形成能の獲得には時間的なずれがあることが判った。卵細胞質中に出現するこれら二つの要因は、その特性が違うことが以前に指摘された(4)が、本観察からもそのことが頷ける。

Table 1に要約される。精子核の膨化はGVBDと共に起り、MPの形成はMet-IIで最大となることが判った。しかもControlに用いたMet-IIの二分しない卵子では、侵入した精子核は大きな前核を形成した。同時に第2極体の放出と雌性前核(FP)の形成も観察された。これに対して卵片の場合は第2極体の放出は異常となった。

考察: HCGの注射後7時間で卵子は既にGVBDを起し、Promet-IかMet-IIに達していた。従ってGV-materialが

- 主要文献 1. Iwamatsu,T. and M. C. Chang (1972) : J. Reprod. Fert. 31: 237-247.
2. Niwa,K. and M. C. Chang (1975) : J. Reprod. Fert. 43: 435-451.
3. Usui,N. and Y. Yanagimachi (1976) : J. Ultrastruct. Res. 57: 276-288.
4. Hirao,Y. and Y. Yanagimachi (1979) : Zool. Mag. (Tokyo), 88: 24-33.
5. Tarkowski,A.K. (1980) : Exp. Cell Res. 128: 73-77.
6. Balakier,H. and A.K. Tarkowski (1980) : Exp. Cell Res. 128: 79-85.
7. Yanagimachi,R. (1982) : In "In Vitro Fertilization and Embryo Transfer" (eds. E.S.E. Hafez and K. Semm), pp.65-76. MTP Press Limited, Lancaster, UK.

異属間および異科間（マウス、ラット、ハムスター）集合キメラ胚の

走査型電子顕微鏡による観察

Scanning Electron Microscopic Study of Interspecific Chimaeric Blastocysts

添田 聰・中村のゆみ・高橋寿太郎・安田泰久

Satoshi SOETA, Noyumi NAKAMURA, Jutaro TAKAHASHI
and Yasuhisa YASUDA

岩手大学農学部動物育種学教室

Laboratory of Animal Breeding, Faculty of Agriculture, Iwate University

目的：当研究室では、マウス、ラット、ハムスター間の集合キメラ胚の作成を試みてきた。そして、光学顕微鏡下で、その発生段階を経時的に観察することにより、また統合後の胚の大きさを正常胚と比較することにより2つの胚が集合したと結論してきた。しかし、光学顕微鏡下の観察では、キメラ胚と断定するのは困難であり、また、異なる由来の細胞の分布状態を判定することはできない。Tachi & Tachi は、透過型電子顕微鏡（TEM）を用いて、ラット、マウス間のキメラ胚を観察し、細胞内微細構造を指標に各細胞の由来を同定した。本研究では、走査型電子顕微鏡（SEM）を用いて、集合キメラ胚の発生段階を追って観察することによって、割球表面構造の違いから、由来の異なる細胞群の分布状態、細胞間相互作用の解析を試みた。

方法：交配確認日を0日目として、マウス、ハムスターは2日目、ラットは3日目の16時から19時に、放血屠殺し、摘出子宮を灌流することによって8細胞期の胚を採取した。胚は、透明帶除去後、植物性凝集素を用いて接着し、37°C、湿度100%、5%二酸化炭素95%空気混合気相下で培養した。培養液には0.3%BSA添加ダルベッコ変法イーグル培地を用いた。培養12時間、36時間後に2.5%グルタールアルデヒド固定を行い、常法に従って試料を作成し、SEMで観察した。

結果：培養12時間後のマウス、ラット、ハムスター胚を比較した。マウス胚では、細胞表面が球状に盛上がり、皺襞状を呈していた。細胞表面には、微絨毛をほとんど見ることができず、細胞1つ1つは割球の形を残していた。ラット胚では、微絨毛が多く存在し、マウス胚に比べ、細胞は平盤に近い形をしていた。ハムスター胚では、微絨毛はラット胚よりも少なく、マウス胚よりは多かった。また、細胞間境界はラット、マウス胚ほど明瞭ではなかった。この傾向は培養36時間後の胚にも見られ、微絨毛はラット胚の方がマウス胚よりも多く、またマウス、ラット胚は細胞が密に接着し、細胞間境界も明瞭で稜状に盛上がっていた。ハムスター胚は、微絨毛がラット胚よりは少なく、マウス胚よりは多く存在し、太く短いものであった。培養後の同時期における各動物の胚の表面構造の差異に基づいて、統合がおこったと思われる胚を調べると、胚盤胞期においても各動物由来細胞の分布状態が判断された。Fig.1は、培養36時間後のマウス↔ラットキメラ胚である。微絨毛の少ないマウス由来細胞と、微絨毛の多いラット由来細胞が、集塊を成してモザイク状を呈し、統合が進んでいるものと判断された。またマウス由来細胞はラット由来細胞よりも大きいと思われた。Fig.2は、培養36時間のマウス↔ハムスターキメラ胚であり、微絨毛の少ないマウス由来細胞と、微絨毛の多いハムスター由

来細胞が混合していると思われた。

考察: SEMを用いて、胚細胞表面の微絨毛の分布、細胞の大きさを観察することによって、キメラ状態の確認、同一培養条件下における細胞分布の状況の解析が可能であると思われる。

主要文献:

1. Tachi, S. and Tachi, C.: Electron microscopic study of blastocysts experimentally produced by aggregating blastomeres of rat and mouse embryos. *Develop. Biol.* 1980;80:18-27.
2. Tarkowsky, A. K.: Mouse chimaeras developed from fused eggs. *Nature* 1961;190:857-860.

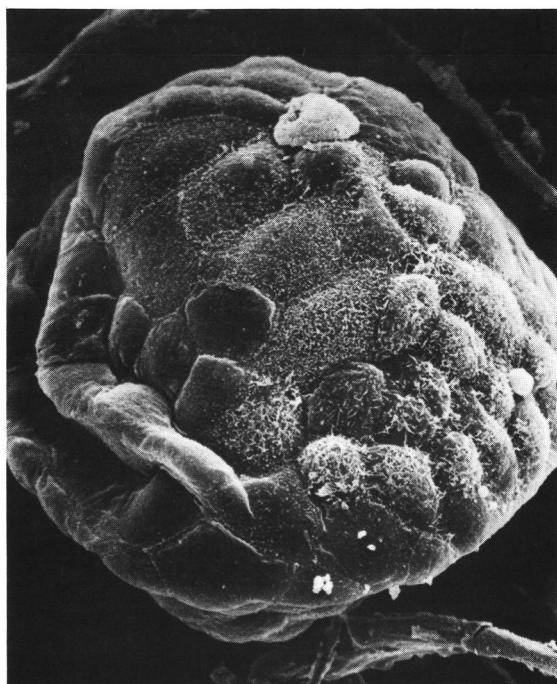


Fig. 1: Scanning electron micrograph of aggregated embryo (mouse↔rat) after 36 hours of culture.
Completely integrated expanded blastocyst. Surface of embryo is covered with two types of cells. A group of cells of which surface is densely covered with microvilli (upper half portion of embryo) is derived from rat embryo. The other group of cells of which surface (lower half portion of embryo) is covered with a few microvilli is derived from mouse embryo.



Fig. 2: Scanning electron micrograph of aggregated embryo (mouse↔hamster) after 36 hours of culture.
Partially integrated expanded blastocyst. Some degenerated cells adhere to trophoblast surface. Surface of embryo is covered with two types of cells. The one type of cells of which surface is covered with thick microvilli is derived from hamster embryo. The other type of cells of which surface is moderately covered with microvilli is derived from mouse embryo. Trophoblast cells derived from mouse embryo occupy almost region of embryo.

ウサギ精子のハムスター卵子細胞質内注入による受精

Fertilization of hamster eggs by microinjection of rabbit spermatozoa

塩田和也¹、後藤勤¹、佐藤嘉兵²

Kazuya Shiota¹, Tsutomu Goto¹ and Kahei Sato²

日本大学農獸医学部 畜産学科家畜繁殖学教室¹,応用生物科学科動物細胞学教室²

Department of Animal Science¹ and Department of Applied Biological Science²,
College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University
Fujisawa 252, Japan

目的：現在、capacitationの間接的な判定方法として、透明帶除去ハムスター卵子へ異種精子が進入することを利用したハムスターテストが広く用いられている。しかし、ハムスターテストにおいて、運動性の弱い精子の受精能力の判定は、精子が卵子細胞質内に侵入し難い事が多く、正確に受精能力の判定を行うことができない。このようなケースでは、精子を直接卵子細胞質に注入することにより、このような障害は取り除かれ受精能力を正確に判定することができると考えられる。Uehara and Yanagimachi(1976)は、ハムスター卵子細胞質内に精子核を注入して正常な受精が起こることを報告した。

本実験では、マイクロマニュピレーターを使用し凍結融解または、lysophosphatidyl choline(LC)によって先体反応を誘起したもので、ともに運動性を消失させたウサギ精子をハムスター卵子内に注入し、その受精能力について調べた。

方法：卵子は生後12週齢以上の成熟した経産または未経産の雌のゴールデンハムスターにPMSG-hCGによって過排卵処理を行い、卵管灌流法により採卵した。採取した卵子は0.1%hyaluronidaseを含むm-TALP培養液中で卵丘細胞を除去し、マイクロインジェクションまで37°C, 5%CO₂ 95%airの条件で培養を行った。

精子は生後6ヶ月齢以上のNewzealand-white種の雄から人工腔を用いて採取した射出精子を用いた。凍結処理の場合m-TALP培養液で希釈後、洗浄のために遠心分離を行い、CO₂培養器内でswim upした。その精子を-20°Cで3時間以上m-TALP培養液中で凍結し、先体膜を破壊するとともに運動性を消失させた。一方、LC処理は1/10BSAm-TALP培養液で希釈後、洗浄、swim upした後、前培養1,3時間を行いLC濃度0 μg/ml(control), 50 μg/ml, 100 μg/mlに15分間感作し、Ohzu and Yanagimachi(1982)の方法により先体反応を誘起した。感作後、洗浄操作を行い、運動性のあるものは運動性を消失させてマイクロインジェクションに用いた。また、凍結処理した精子は38°Cで融解しマイクロマニュピレーターを用いて、ハムスター卵子内に注入した。注入後、m-TALP培養液中で37°C, 5%CO₂ 95%airの条件で培養を行い、注入後1,3,5時間で卵子を観察し、精子頭部の膨化および雄性前核を形成したものを受けたものと判定した。

Table 1 Fertilization of hamster eggs injected with sperm cells

| Sperm treatment | Observation time(h) | No. of eggs examined | No. of eggs with swollen spermatozoa(%) | No. of eggs with male pronucleus formation (%) |
|-------------------|---------------------|----------------------|---|--|
| Frozen-Thawed | 1 | 48 | 14(29.2) | 4(8.3) |
| | 3 | 51 | 13(25.5) | 7(13.7) |
| | 5 | 42 | 10(23.8) | 11(26.2) |
| [Control] | | | | |
| Preincubation(1h) | 1 | 20 | 0 | 0 |
| + | 3 | 20 | 0 | 0 |
| saline | 5 | 20 | 0 | 0 |
| Preincubation(1h) | 1 | 36 | 8(22.2) | 1(2.8) |
| + | 3 | 35 | 5(14.3) | 5(14.3) |
| LC(50 μg/ml) | 5 | 46 | 6(13.0) | 6(13.0) |
| Preincubation(1h) | 1 | 24 | 5(20.8) | 2(8.3) |
| + | 3 | 28 | 6(21.4) | 5(17.9) |
| LC(100 μg/ml) | 5 | 30 | 5(16.7) | 7(23.3) |

LC:Lysophosphatidyl Choline

結果および考察：精子の注入による受精結果は、Table 1に示した。このように処理の違いにより精子頭部膨化率及び雄性前核形成率に多少の差はみられるものの、凍結処理とLC処理100 μg/ml, 50 μg/ml の間には、有意な差は見られなかった。Controlにおいては、いずれの時間においても注入した精子には変化が見られなかった。この結果はいわゆるacrosome-intact 精子を卵子細胞質内に注入しても受精は起こらず、先体は雄性前核形成の妨げになることを示唆している。

一般に精子の受精能力を判定する上で、その運動性が大きな影響を占めるが、この精子注入法を用いれば運動性と切り離して精子核の前核形成能を知ることが可能である。ただし、この方法を用いる場合注意すべき点は卵子に物理的なダメージを与えることである。この点を改善できれば、より有効な手段となるものと思われる。

文献: Uehara,T. and Yanagimachi,R.(1976) Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. Biol.Reprod.,15,467-470.

Ohzu,E. and Yanagimachi,R.(1982) Acceleration of acrosome reaction in hamster spermatozoa by lysolecithin. J.Exp.Zool.,224,259-263.

マイクロマニピュレーションの体外受精 －胚移植への応用

Application of Micromanupulation for in Vitro
Fertilization and Embryo Transfer

齊藤英和・佐藤文彦・平山寿雄・齊藤隆和・楊 美貴・広井正彦

Hidekazu SAITO, Fumihiko SATO, Toshio HIRAYAMA
Takakazu SAITO, Miki YOH, Masahiko HIROI

山形大学医学部産科婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology Yamagata University School of Medicine

目的：体外受精－胚移植は不妊症の治療法として普及しているが、その際に通常は受精が行われると二つの前核が卵細胞質内に認められるが、時々前核が三つ以上認められることがある。この原因としては非生理的濃度の精子が媒精に用いられていることや、卵胞内卵が用いられていること等が考えられている。これら前核が3個以上認められた卵でも分割をくり返すことはすでに報告されている。しかしこれらの卵を体内に移植すると大多数は着床せずに終るが、たとえ着床したとしても、empty sacに終るために胚移植に用いることはできない。最近マイクロマニピュレーションを使用して細胞への物質の注入や、細胞からの物質の抽出が可能となり、卵への物質の注入等が行われている。我々はこのマイクロマニピュレーションを使用して、前核が3個以上となった卵より余分な前核を摘出し、前核が2個とする試みを行ない、その方法の可能性や、その方法の侵襲度について検討した。

方法：卵胞刺激方法は月経第3日目よりヒト閉経性性腺刺激ホルモン（hMG）を150単位連日筋注し、卵胞発育モニターは超音波断層装置を用いて卵胞直径の測定と、血中LHの測定にて行った。卵胞直径の平均が18mm以上の卵胞が2個以上発育した時、hMGを中止し、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG）10,000単位投与し、3-4時間後に採卵手術を施行した。hMGを中止した時点でLHサーボを認めた場合は、直ちにhCGを補充投与し24時間後に採卵を行った。卵はその周囲を取り囲む卵丘塊、放線冠の状態によって成熟・未熟の二群に分類した。採卵二時間後に精液を採取し二回の遠心法にて精子を洗浄後、50万/mlの濃度にて媒精した。16時間後卵周囲の顆粒膜細胞を除き受精の有無を確認した。前核が3個以上認めた卵は、患者の同意を得て実験に用いた。マイクロマニピュレーションはナルシゲ製を用いた。

結果：第1例目は、7個の卵が採取され、そのうち6個が成熟卵であった。3個の前核を認めた卵は2個あり、この2個とも採卵時の卵成熟度は成熟卵であった。精液所見は、 $120 \times 10^6 / ml$ の濃度であり、運動率は58%

%であった。3個の前核を持った卵の前核を摘出した際に、1個の卵は前核1個を完全に摘出し得たが、卵からの細胞質の流出が多く卵細胞は崩壊した。もう1個の卵も前核1個を摘出したが、細胞質の流出は軽度

表1. 多前核卵となった卵のその他のパラメーター

| 症例 | 採卵数 | 成熟卵数 | 正常受精 | 多精子受精卵 | | 精子 | |
|----|-----|------|------|--------|-----|-------------------|-----|
| | | | | 数 | 成熟度 | 数 | 運動率 |
| 1 | 7 | 6 | 2 | 2 | 成熟 | 120×10^6 | 58% |
| 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 未熟 | 41×10^6 | 68% |
| 3 | 10 | 9 | 6 | 1 | 成熟 | 59×10^6 | 81% |

であった。この卵をさらに72時間培養し、24時間ごとに観察したが、2個の前核はともに消失することはなく、細胞も1細胞のままで分裂しなかった。第2例目は、2個の卵が採取され、うち1個が成熟卵であった。3個の前核を持った卵の採卵時の成熟度は未熟卵であった。精液所見は $41 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率は68%であった。3個前核を持つ卵の前核1個を摘出しようとしたが摘出できなかった。第3の症例は、10個の卵が採取された。うち9個が成熟卵であった。精液所見は $59 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度であり、運動率は81%であった。3個の前核を認めた卵の採卵時の成熟度は成熟卵であった。マイクロマニピュレーションにて前核は摘出できたが、細胞質の流出が多く細胞は崩壊した。

考察：体外受精一胚移植では、非生理的状況において配偶子の接合が行なわれるため、時々多数の前核を1卵細胞中に認めることがある。この際余分な前核を摘出することによって正常な発育が再び保つことができるならば、この方法は体外受精一胚移植にとって有益な方法となり得る。しかし、我々はなるべく3個以上の前核にならないよう体外受精一胚移植を行っているので、その症例数が少なく結論はでないが、今回の実験より前核を完全に摘出するのに約15分の時間を要し、またその際の細胞質の流出を多く、卵に重大な障害を残す可能性は十分あると考えられた。また1個の受精卵のみが、比較的細胞質の流出がなく卵の原形が保たれたが、分割しなかった。これはもともと卵自体に分割能力が欠損していたか、前核を摘出する操作という侵襲のために分割能力が失なわれたか、前核摘出の際の細胞質流出が原因か、また操作中の温度変化、pHの変化が影響しているのか、種々の原因が考えられるが、これは今後症例数を増加させ検討していくなければならない。今回の実験では、卵が分割するところまでは至らなかったが、卵分割が行われたらその卵の染色体の分析まで行わなければならない。

マイクロマニピュレーションによる配偶子操作は、我々にとってはまだ習熟を必要とするものではあるが、いずれにせよ、配偶子の侵襲という点ではかなり重大な侵襲であると考えられ、今後症例数を増加させこの操作の適応を検討しなければならない。

文献

1. Rawlins, R.G., Binor, Z., Radwanska, E. Microsurgical enucleation of polyspermic human embryos, 43rd annual meeting of the american fertility society, Sep. 28-30, 1987 Reno, Nevada

裸化マウス卵子の受精能に及ぼす DMSOの影響

Effect of DMSO on fertilizability of cumulus free mouse oocytes

河野 恵子・東 貞宏・豊田 裕

Keiko Kohno, Sadahiro Azuma and Yutaka Toyoda

東京大学医科学研究所 獣医学研究部

Department of Animal Pathology, Institute of Medical Science
University of Tokyo

目的:マウスの未受精卵の凍結保存はWittingham(1977)による成功以来研究が進められ、凍結保存卵由来の体外受精卵の移植による新生仔も既に得られている。しかし、凍結保存卵の発生率は通常の体外受精より得られるものより低く、改善の余地が残される。とくに耐凍剤として用いられているDMSOについては、従来の方法では0°Cでの添加(Wittingham 1977; Glenister, et.al. 1987)あるいは牛胎仔血清を含む培地を用いた室温添加(Michaelis et.al. 1985; 平泉ら, 1986)が用いられ、初期胚について一般に行われている血清を含まない培地での室温添加では十分な検討は行われていない。そこで本研究では凍結の前段階として、DMSOの添加によって卵子の受精能がどのように影響をうけるかについて体外受精法を用いて検討した。

方法:ICR成熟マウスにPMSG及びhCG各5iuを48時間間隔で注射し、hCG注射後14時間に卵管膨大部より卵丘細胞層に包まれた卵子をヒアルロニダーゼ150u/mlを含むTYH培地内に採取し裸化した。裸化卵をHEPESで緩衝したmodified PBS(以後HBS)で洗浄後、各々の実験条件でDMSO溶液に平衡した。

- (1)平衡温度の比較: 卵子を1.5M DMSOを含むHBSに室温(25-30°C)又は4°Cで10分間平衡し、0.5M シュクロースを含むHBSを用いてone step dilutionを行った。
- (2)平衡時間の比較: 卵子を1.5M DMSO溶液に室温で各々1,5,10分間平衡し、その後0.5M シュクロース溶液を用いてone step dilutionを行った。
- (3)DMSO除去法の比較: 卵子を1.5M DMSO溶液に1分間平衡した後0.5M シュクロース溶液を用いたone step dilution、または段階的に低濃度に移すstep wise法によりDMSOの除去を行った。
- (4)平衡濃度の比較: 卵子を各々1.0, 0.5, 0.25M DMSO溶液に室温で2分平衡し、step wise法によりDMSOの除去を行った。

(5)透明帯除去卵による体外受精: 卵子を1.5M DMSO溶液に室温で10分間平衡し0.5M シュクロース溶液を用いたone step dilutionを行った。その後酸性タイロード液で透明帯を除去した。

全ての実験区はその後TYHに移し、1.5-2.0時間前培養した精巣上体精子を用いて体外受精を行った(福田ら, 1972)。精子添加6時間後に倒立顕微鏡下で雌雄前核および第2極体の放出が認められたものを受精卵と判定した。また一部の卵子については培養を続け翌日2細胞期への発生を観察した。

結果:DMSOとの平衡温度の比較では、4°C平衡が41.1%(44/107)に対し室温平衡では、8.5%(6/71)と著しく低く(実験1)、室温でDMSOに平衡させたときは平衡時間が10,5、および1分間のいずれの区でも全く受精卵が観察されなかった(実験2)。また、DMSOの除去法ではシュクロースを用いたone step dilutionでも段階的にDMSOの濃度を減らして行くstep wise法でも共に各々0%,3.6%(0/18,1/28)と著しく低い値であった。DMSOの濃度については1M DMSO溶液平衡0%(0/29)に対し0.5M,0.25M DMSO溶液を用いたものが51.6%,64.9%(16/31,24/37)と明らかに高く、対照区の値(69.3%)と有意差のない値であった。一方、透明帯除去卵子についてはDMSO平衡(1.5M DMSO,10分間室温)、未処置にかかわらず全て受精した。

考察:1M以上の濃度のDMSO溶液への平衡は室温では短時間でも卵子に対し受精能をほとんど消失させることが示された。このDMSOの毒性の作用部位としてはすべての透明帯除去卵子で精子の侵入および前核形成が観察されたことから、透明帯の精子受容性の変化によるものと考えられる。

Table 1 In vitro fertilization of cumulus free mouse oocytes after treatment with DMSO under various conditions.

| Oocytes | Conc. of DMSO(M) | Treatment time(min) | Treatment temp.(°C) | Removal of DMSO | Fertilized/examined(%) |
|--------------------------|------------------|---------------------|---------------------|-----------------|------------------------|
| (1) Cumulus free oocytes | 0 (control) | - | - | - | 69.3(95/137) |
| | 1.5 | 10 | room temp. | one step | 8.5(6/71) |
| | 1.5 | 10 | 4 | one step | 41.1(44/107) |
| | 1.5 | 1 | room temp. | one step | 0(0/24) |
| | 1.5 | 5 | room temp. | one step | 0(0/20) |
| | 1.5 | 10 | room temp. | one step | 0(0/20) |
| | 1.5 | 2 | room temp. | one step | 0(0/18) |
| | 1.5 | 2 | room temp. | step wise | 3.6(1/28) |
| | 1.0 | 2 | room temp. | step wise | 0(0/29) |
| | 0.5 | 2 | room temp. | step wise | 51.6(16/31) |
| | 0.25 | 2 | room temp. | step wise | 64.9(24/37) |
| (2) Zona free oocytes* | 0 (control) | - | - | - | 100(39/39) |
| | 1.5 | 10 | room temp | one step | 100(41/41) |

*Zona pellucida of cumulus free oocytes was removed with acidic Tyrode solution after treatment with DMSO

主要文献

1. Glenister, P.H., Maureen J. Wood, Carol Kirby and D.G. Wittingham (1987): Gamet. Res. 16, 205-216
2. Michaelis, U., M. Rubin and J. Hahn (1985): Dtsch. tierarztl. Wschr. 92, 16-18
3. 福田 芳詔・岡田 修・豊田 裕(1972): 家畜繁殖誌 18, 73-77
4. 平泉 真吾・東 貞宏・内藤 邦彦・福田 芳詔・豊田 裕(1987): 本誌 4, 49-50
5. Wittingham, D.G. (1977): J. Reprod. Fert. 49, 89-94

顆粒膜細胞あるいは胎児腎細胞と共に培養した 豚卵子の体外受精

In Vitro Fertilization of Pig Oocytes Cocultured
with Granulosa Cells and Fetal Kidney Cells

吉田光敏・石崎芳彦・番場公雄・小島義夫

Mitsutoshi YOSHIDA, Yoshihiko ISHIZAKI, Kimio BAMBÀ, Yoshio KOJIMA

静岡大学農学部家畜繁殖学教室

Laboratory of Reproductive Physiology, Faculty of Agriculture, Shizuoka University

目的：豚では体内成熟卵胞卵子の体外受精により産子が得られているが、¹⁾体外成熟卵子のそれでは異常受精の頻度が高く、発生能も低い。一方、家兎および羊では卵子を体細胞である顆粒膜細胞と共に培養した後、受精すると、受精や発生状況の改善が見られると報告されている。しかし、豚卵子の体外成熟における体細胞との共培養が受精や発生に及ぼす影響については明らかでない。本研究では、豚顆粒膜細胞あるいは豚胎児腎細胞と共に培養した豚卵子を体外受精し、それらの体細胞との共培養が卵子の成熟、受精および発生状況に及ぼす影響を調べた。

方法：豚卵子および豚顆粒膜細胞(pGC)は屠場採取の卵巣卵胞(直径:2~5 mm)より吸引採取した。豚胎児腎細胞(pFKC)は胎齢約100日の雌胎児の腎皮質をトリシン消化後、6~7日間培養して調整した。そして、pFKCは2~3回継代後、実験前日にマイマイシンC処理して分裂能を失わせて継代し、実験当日、培地を成熟培地に交換した。豚精子は射精精子を使用し、前培養(4h)後、実験に用いた。卵子は20~30個を一群として成熟培地2mlを含む細胞無添加区、pGC添加区(3~4X10cells⁵/ml)およびpFKC添加区(4~5X10cells⁵/ml)へそれぞれ導入し、36h培養した。卵子は卵丘細胞層の状態を観察した後、受精培地へ移し、体外受精(5X10⁵/mlの精子濃度)した。そして、卵は媒精後6hで発生培地へ移し、12hで一部の卵を固定・染色して成熟・受精状況を調べた。残りの卵はさらに培養し、媒精後42~44hで固定・染色して発生状況を調べた。体外受精の方法は既報に準じ、成熟培地には10%FCS加lmlTCM199(PMSG, hCG, E₂添加)を、発生培地には10%FCS加lmlTCM199を使用した。なお、推計学的分析は²⁾t検定を行った。

結果：媒精直前の卵丘細胞層の状態は細胞無添加区と比べてpGC添加区およびpFKC添加区で膨潤化の割合が有意に(70%vs60%, 56%:p<0.05)減少し、逆に単層を形成した割合が有意に(26%vs36%, 37%:p<0.05)増加した。

表1. 体細胞添加が豚卵子の成熟・受精状況に及ぼす影響 (実数)

| 体細胞 | 成熟率% | 受精率% | 多精子受精率% ^{a)} | 多卵核受精率% ^{a)} | 雄性前核形成率% ^{a)} |
|---------|--------------|--------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| — | 65.0 (26/40) | 82.5 (33/40) | 78.8 (26/33) | 12.1 (4/33) | 33.3 (11/33) |
| p G C | 60.0 (24/40) | 75.0 (30/40) | 80.0 (24/30) | 10.0 (3/30) | 3.3 (1/30)** |
| p F K C | 75.0 (24/32) | 71.9 (23/32) | 65.2 (15/23) | 13.0 (3/23) | 39.1 (9/23) |

a)受精卵に対する割合、** p<0.01

媒精後12h における卵子の成熟・受精状況を表1に示した。成熟率はpFKC添加区で高かったが、差はなかった。受精率は細胞添加区で低かったが、差はなかった。多精子受精率はpFKC添加区で低かったが、差はなかった。また、2個以上の雌性前核の見られる多卵核受精卵の割合もそれぞれの区で差はなかった。しかし、雄性前核形成率はpGC 添加区で他の区に比べて有意に(p<0.01)低かった。媒精後

42~44h における体外受精卵の発生状況を表2に示した。何れの区においても55% 以上の卵に分割が見られ、卵分割率に差はなかった。一方、第1・2極体が観察され、各割球に1個の核を有する均等2~4細胞期卵数から求めた正常卵分割率は、pFCK添加区で高かったが、差はなかった。

考察：生体内では卵子は多数の体細胞に取り囲まれた環境で成熟する。また、一般に培養細胞の増殖能はFeeder細胞層の存在により増強されることが知られている。本研究においては、豚卵子の体外成熟培養のFeeder層として用いたpGC およびpFKCは同じ体細胞である卵丘細胞層の形態変化に顕著な影響を及ぼしたが、卵子の成熟、受精および発生状況に顕著な影響を及ぼさず、卵子と体細胞の共培養の有効性は示されなかった。²⁾しかし、Motlik & Fulka(1981)²⁾は家兎卵子の受精および発生状況に、また、Staigmiller & Moor(1984)³⁾は羊卵子の発生状況に同種CCとの共培養が影響を及ぼし、その有効性を報告している。この違いは卵子やCCを採取した個体へのセル前処理の有・無や受精方法が異なっていたことによると考えられた。また、pGC 添加区で雄性前核形成率が低かったのは、Motlik & Fulka(1981)²⁾が報告したように、添加したCCが卵子の核成熟期間を遅延させたことにより生じたものと推察された。一方、低率であったが、形態的には正常な体外受精卵が得られたことから、今後、卵管移植後の発生能についても共培養の効果と共に検討する必要があると思われた。

主要文献：1)Yoshida, M. (1987) : Jpn. J. Vet. Sci. , 49, 711-718.

2)Motlik, J. and Fulka, J. (1981) : J. Reprod. Fertil. , 63, 425-429.

3)Staigmiller, R. B. and Moor, R. M. (1984) : Gamete Res. , 9, 221-229.

ヒト体外受精における精子運動能の分析

Sperm movement characteristics in human IVF

淡路英雄・井上正人・小林善宗・本田育子・佐々木史・出口しのぶ・松井素子

Hideo AWAGI, Masato INOUE, Yoshimune KOBAYASHI, Ikuko HONDA,
Humi SASAKI, Shinobu DEGUCHI, Motoko MATSUI

東海大学医学部産婦人科学教室

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

目的：受精の初期過程における精子側の条件は①Capacitation acrosome reactionなどの精子の生化学的变化と②透明帯貫通に必要な精子運動能とがあり①についてはCa ionophore A₂₃₁₈₇を用いたZona free hamster egg sperm penetration test (ZSPT)によりほぼ正確に判定出来るようになったが②については何もわからっていない。

精子運動能については以前より検者の主観によりGradeして判定する方法 Eye and stop watch methodの様に客観性に乏しい方法やTime lapse photography やVideomicrographyなどを用いて長時間を費やして計測する方法などしかなかった。

最近アメリカで開発された精液自動分析装置Automated semen analyzerは短時間に大量の検体を客観的、定量的に検査出来る機器である。

今回我々は本機器を用いてヒト体外受精（体外受精胚移植IVF-ET、体外受精卵卵管内移植IVF-ETR）に用いた精子浮遊液中の精子運動能について検討し、その結果を体外受精前に行ったZSPTと共に検討しヒト体外受精における精子運動能について分析したので報告する。

方法：対象は昭和62年5月より9月までに東海大学附属病院産婦人科において体外受精（IVF-ET、IVF-ETR）による治療を受けた不妊患者の精子浮遊液96検体である。

卵採取は過排卵処理（Clomid, clomid-HMG, HMG）の後卵胞径20mm大を目安に入院HCG投与後36時間で主に超音波ガイド下に経腔、経膀胱的に採卵した。

精子浮遊液の作成は通常のSwim up法により（BWW液内で1～2時間Swim upし遠沈後HTF液にて0.2～0.4mlに調整した。）作成した。

体外受精に用いたあと残りの精子の浮遊液を精液自動分析装置により測定した。

今回使用した精液自動分析装置はCRYO Resources社製 "Cell Soft" である。本機器はIBM PC Computer、オリンパス社製位相差顕微鏡、松下電気製 Video Camera 日立製作所製 Video monitor、OKIDATA社製 Dot matrix printer より構成されている。



$$\text{Velocity} = \frac{a+b+c+d+e+f+g+h+i}{\text{time}}$$

$$\text{Linearity} = \frac{|V|}{|a+b+c+d+e+f+g+h+i|} \times 10$$

計測は位置差顕微鏡により得られた像をComputer処理しデジタル化した後精子の運動を精子頭部の0.75秒間の基跡として、その像についてComputer分析を行った。主な分析項目は一般的精子性状(濃度、運動率……)のほかに精子運動能として、平均Linearityと平均Velocityについて分析した。Linearityは図の如くデジタル化された頭部が描く0.75秒間の曲線の各成分に対するベクトルの長さにより決定した。つまり10に近い値がより直進性の高い動きをする精子である。Velocityについては各曲線成分を合計した距離を時間で除いた値で示した。

結果：体外受精により96例中83例(86.5%)が受精した。精子運動能と体外受精の結果との比較では平均Velocityについて差が明らかだった。平均Velocityと体外受精前に行ったZSPT結果とを合わせて検討するとZSPT正常群(受精率70%以上)78例(平均受精率93.7±9.1%)では68例が体外受精により受精したが、その平均Velocityは60.0±10.5 (Mean ± S. D.) microns/secであり非受精10例の平均Velocity 50.1±6.5 microns/secに比べて有意に低下を示した。(P<0.01)一方ZPST異常群(受精率70%以下)18例(平均受精率43.8±11.7%)では15例が体外受精により受精したがその平均Velocityは56.5±17.2 microns/secであり、非受精3例の49.5±4.8 microns/secと比べ低下傾向はみとめられたものの症例数が少ないので有意な差はなかった。しかし18例中、受精はしたものの体外受精率30%以下の比較的低受精率群である5例と30%以上の13例とに分けて検討したところでは授精率30%以上群13例の平均Velocityは61.1±7.6 microns/secであり30%以下の群5例のそれは40.0±22.6 microns/secとなり有為な差を認めた(P<0.02)

考察：ヒト体外受精における精子側の要因として我々は以前ZSPTにおける受精率と体外受精結果に相関性の認められることを報告したが、今回は精子運動能と体外受精の結果との相関を検討した。結果はVelocity (Sperm swimming speed)と体外受精の結果には相関が認められ、精子運動能時にVelocityは体外受精を行なうにあたりZSPTと共にinvitroにおける精子受精能力の重要な因子であると考えられた。又ZSPTとVelocityを組み合せ両面から検討することにより更に正確な受精能力検査法が開発されるものと期待される。

主要文献：

1. Awaji, H., Inoue, M., Kobayashi, Y., Honda, I. and Fujii, A. : Comparison of the zona free hamster egg sperm penetration test and hamster invitro fertilization Arch Gynecol. (Suppl), 237:15, 1985.
2. 井上正人, 他: 精子の受精能力検査—透明帯除去 ハムスター卵子貫通試験. ベリネイタルケア 4:247, 1985
3. 淡路英雄・津田朋男・松山毅彦・古橋進一・小林善宗・本田育子・井上正人・藤井明和, 体外受精におけるSwimup 精子の運動能—Computer assisted semen analyzerによる分析 第5回日本受精着床学界学術集会抄録集

体外受精卵卵管内移植の成績

Results of in vitro fertilization-embryo
tubal replacement (IVF-ETR)

小林善宗・本田育子・井上正人・淡路英雄・松山毅彦・津田朋男・藤井明和

Yoshimune KOBAYASHI, Ikuo HONDA, Masato INOUE, Hideo AWAGI,
Takehiko MATUYAMA, Tomoo TSUDA, Akikazu FUJII

東海大学医学部産婦人科学教室

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

目的：体外受精胚移植（IVF-ET）は、高度の卵管性不妊に加えて、男性不妊や原因不明不妊などにも広く適応されている。しかしその成績は、Seppala¹⁾の集計による世界全体の妊娠率で、対周期11.1%と決して満足のいくものではない。このため、卵管の疎通性のある難治性不妊に対して、より生理的な配偶子卵管内移植（GIFT）²⁾³⁾が、新たな治療法として登場してきた。しかしGIFTにも限界があり、卵管内受精障害などに対しては多くを期待できない。我々は、GIFT不成功例に対する新たな治療法として、体外受精卵卵管内移植（IVF-ETR）⁴⁾を開発した。今回、IVF-ETRの成績と有効性を分析し、さらにGIFTの成績と比較し、不妊原因としての卵管内受精障害について考案した。

方法：対象は当科不妊外来受診中の長期不妊患者93例で、S61～S62.9の期間に109回のIVF-ETRを行った。原発性不妊61例、続発性不妊32例であった。GIFT不成功例は42例で、51例はsecond look以後をかねた各種難治性不妊であった。全例Zona free hamster egg sperm penetration test (ZSPT)を行い、ZSPT平均90.4% (41.5～100%) の精子受精能力から、IVF可能であることをあらかじめ確認した。

方法は、⁴⁾採卵から受精まではIVF-ETと同じで、媒精後約18時間すなわち、前核期の段階で受精卵をGIFTの要領で卵管膨大部に移植した。

結果：93例の難治性不妊患者に、計109回のIVF-ETRを施行し、34例に臨床的妊娠が成立した。対患者妊娠率は36.6%、不妊、続発性不妊の妊娠率はそれぞれ、34.4% (21/61)、40.6% (13/32) で両者間に差はなかった。GIFT不成功例、非GIFT施行例の妊娠率はそれぞれ、35.7% (15/42)、37.3% (19/51) で両者間に差はなかった。主な不妊原因別の対周期妊娠率を表1に示した。卵管内精子輸送障害 (38.5%) 原因不明不妊 (38.5%) が最も高率で、ついで子宮内膜症 (31.7%)、術後卵管性不妊 (26.2%)

であった。

IVF-ETRの成績をGIFTの成績(表2)と比較し、不妊原因別に分析した。術後卵管性不妊(卵子pick up障害)では、IVF-ETRとGIFTの間には大きな差はなかった。子宮内膜症では、初期のstage I (R-AFS分類)で著明な差が認められ、IVF-ETRの対周期妊娠率41.7% (10/24) は、GIFTの12.0% (3/25) に比べて明らかに高率であった。卵管内精子輸送障害では、抗精子抗体陽性例でIVF-ETR 6例の対周期妊娠率62.5% (5/8) は、GIFTの14.3% (2/14) に比べて明らかに高率であった。逆に陰性例では、IVF-ETRの0% (0/5) に対して、GIFTの66.7% (4/6) の方が高率であった。原因不明不妊では、IVF-ETRの38.5%の対周期妊娠率に対して、GIFTでは0%であった。

考察: IVF-ETRは、GIFT不成功例とくに免疫性不妊に対する新しい治療法として我々が開発したものである。IVF-ETRは受精までをin vitroで行い、受精卵を早期に卵管に戻すため、その後のプロセスは自然の場合と変わらない。IVF-ETRにおける受精卵の培養の問題も胚移植に伴う問題もIVF-ETRにはない。IVF-ETRはIVF-ETに比べてはるかに生理的であり、またGIFTに比べて受精を確認できることが利点である。不妊原因別によるGIFTとの比較から、IVF-ETRは精子不動化抗体陽性例のごとき卵管内精子輸送障害に対して非常に有効であった。一方、精子不動化抗体陰性例でしかも卵管内精子輸送障害に対しては、GIFTが十分有効であった。子宮内膜症合併不妊、とくに初期の場合は卵子pick up障害というよりは、むしろ卵管内受精障害がその不妊原因ではないかと考えられた。原因不明不妊では、その一部は卵管内受精障害と考えられたが、多くはむしろ着床に問題があることが示唆された。

今後、難治性不妊治療の成績向上のためには、不妊原因別に治療法を選択することが重要であろう。IVF-ETの成功率がまだ低い現在、IVF-ETRはGIFTと同様に、卵管疎通性のある難治性不妊の治療に試みるべき方法と思われる。

主要文献:

- 1) Seppala M: The world collaborative report on in vitro fertilization-embryo replacement; current state of the in January 1984. Ann NY Acad Sci 442:558, 1985.
- 2) Asch, R. H., Balmaceda, J. P., Ellsworth, L. R., and Wong, P. C: Pregnancy after transperitoneal laparoscopic gamete intrafallopian transfer. Lancet 2:1034, 1984.
- 3) 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.
- 4) 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: 体外受精卵卵管内移植の試み, 哺乳卵研誌 4:67, 1987.

表1. IVF-ETRの成績

S61 ~ S62.9

| 主な不妊因子 | 症例数 | 回数 | 妊娠 |
|--------------|-------|---------|------------|
| 術後卵管性不妊 | 37 | 42 | 11 (26.2%) |
| 子宮内膜症 | 35 | 41 | 13 (31.7%) |
| 卵管内精子輸送障害* | 11 | 18 | 5 (38.5%) |
| 原因不明不妊 | 10 | 13 | 5 (38.5%) |
| 計 | 93 | 109 | 34 (31.2%) |
| 平均年齢 | 34.9歳 | (25~42) | |
| 平均不妊期間 | 8.6年 | (2~17) | |
| 平均AIH | 13.0 | (0~59) | |
| 採取成熟卵子 (平均) | 2.3 | | |
| 移植正常受精卵 (平均) | 2.2 | | |

* 精子不動化抗体陽性 6例を含む

表2. GIFTの成績

S60 ~ S62.9

| 主な不妊因子 | 症例数 | 回数 | 妊娠 |
|-------------|-------|---------|------------|
| 術後卵管性不妊 | 84 | 106 | 25 (23.6%) |
| 子宮内膜症 | 43 | 46 | 9 (19.6%) |
| 卵管内精子輸送障害* | 18 | 20 | 6 (30.0%) |
| 男性不妊** | 24 | 39 | 4 (10.3%) |
| 原因不明不妊 | 8 | 10 | 0 (0%) |
| 計 | 177 | 221 | 44 (19.9%) |
| 平均年齢 | 33.7歳 | (25~44) | |
| 平均不妊期間 | 8.5年 | (2~19) | |
| 平均AIH | 13.2 | (0~59) | |
| 採取成熟卵子 (平均) | 2.1 | | |

* 精子不動化抗体陽性12例を含む

** 精子不動化抗体陽性4例を含む

牛胚の染色体分析による性判別法の検討

Sexing of Bovine Embryos by Chromosomal Analysis

堀内俊孝・大久範幸・沼辺孝・高田直和・石川勇志

Toshitaka HORIUCHI, Noriyuki OHISA, Takashi NUMABE,
Naokazu TAKADA, Yushi ISHIKAWA

宮城県畜産試験場・酪農肉牛部
Miyagi-ken Exp. Station of Anim. Sci.

目的：畜産分野において、特に乳牛では雌の価値が高いので、希望する性の仔牛を生産する技術の確立によって得られる利益は非常に大きい。これは、牛受精卵の移植技術の発展と共に、牛胚を性判別することで可能である。今のところ、性判別の正確度が高く、実用性があると思われる方法は染色体分析によるものである。しかし、初期牛胚（桑実期～胚盤胞期）の染色体分析による性判別法について技術的検討を詳細に行った報告は少なく、また性判別率も低く、その確立が望まれている。

今回は牛二分割胚を用いて、牛胚の染色体分析法のための分裂阻止剤について検討を加えたので報告する。

方法：PMSG または FSH で過剰排卵誘起した黒毛和種雌牛から発情後第7日目に非外科的に牛胚を採取した。桑実期～胚盤胞期の牛胚をバイオ・メス 715（フェザー社製）によって二分割した。二分割胚は 20% 非効化仔牛血清（以下 CS と略）加 Ham's F10 で 2 時間培養後、染色体分析に用いた。分裂阻止剤は Colcemid 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ または Podophyllotoxin と Vinblastin（以下 Pod. & Vinb. と略）各 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ あるいは各 0.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とし、20% CS 加 Ham's F10 に加え 2 時間培養で用いた。低張処理は 3% 血清加 0.9% クエン酸ナトリウムで 20～30 分間行った。染色体標本作製は、美甘ら¹⁾の漸進固定・空気乾燥法に従い実施し、25 倍希釈ギムザ液で染色し検鏡した。

結果：分裂阻止剤として Colcemid または Pod. & Vinb. を用いた染色体分析の結果は表 1 に示した。Colcemid 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の場合、分析胚数 8 個、総核数 48.6 \pm 27.3、中期核板の認められた胚数 7 個 88%、中期核板数 2.1 \pm 1.2、性判別できた胚数 1 個であった。一方、Pod. & Vinb. 各 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と各 0.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を用いた場合、分析胚数 14 個と 19 個、総核数 48.2 \pm 25.6 と 37.1 \pm 15.3、中期核板の認められた胚数 12 個 86% と 15 個 79%、中期核板数 2.6 \pm 1.9 と 2.3 \pm 1.5、性判別できた胚数 8 個 67% と 5 個 56% であった。このことから、牛胚の染色体分析のための分裂阻止剤としては、Pod. & Vinb. 各 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で性判別率が高く、有効であることが明らかになった。図 1 は Colcemid 添加区の染色体像で染色体が収縮している。図 2 は Pod. & Vinb. 各 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加区の染色体像で染色体の収縮性は弱い。図 1 と 2 の矢印は、X 染色体を示した。

考察：牛胚の染色体分析のため用いられている分裂阻止剤は、Colchicine、Colcemidが一般的である。本研究では、Colcemid によって牛胚の染色体は著しく収縮した。Moustafa(1978)²⁾は Colcemid 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、Picard ら(1985)³⁾は Colcemid 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、牛島ら(1986)⁴⁾は Colcemid 0.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を用いているが、いずれの染色体像も収縮している。今回用いた Pod. & Vinb. は Colcemid と比べて染色体の収縮性が低く、性判別の正確度と性判別率の向上のために有効であることが示唆された。今後さらに、染色体分析で性判別した牛二分割胚の移植による生産性の検討が必要である。



Fig.1. Chromosome by using Colcemid

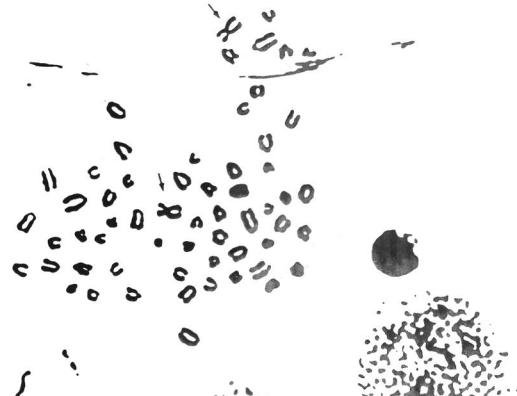


Fig.2. Chromosome by using Pod. & Vinb.

Table 1. Sexing of bisected bovine embryos by chromosomal analysis

| Mitotic inhibitor | Conc. of inhibitor | No. of half emb. | Total no. of nuclei | No. (%) of emb. with meta. | No. of meta. | No. of emb. sexed |
|-------------------|--------------------|------------------|---------------------|----------------------------|--------------|-------------------|
| colcemid | 0.02 | 8 | 48.6 ± 27.3 | 7(88) | 2.1 ± 1.2 | 1(14) |
| Pod. & Vinb. | 0.02 | 14 | 65.3 ± 27.8 | 12(86) | 2.6 ± 1.9 | 8(67) |
| | 0.04 | 19 | 44.5 ± 25.8 | 15(79) | 2.3 ± 1.3 | 5(56) |

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) Moustafa, von Laila A., Hahn, J., Roselius, R. (1978) Versuche zur Geschlechtsbestimmung an Tag 6 und 7 alten Rinderembryonen, Berl. Munch. Tieraztl. Wschr. 91, 236-238.
- 3) Picard, L., King, W.A., Betteridge, K.J. (1985) Production of sexed calves from frozen-thawed embryos. Vet. Res. 117, 603-608.
- 4) 牛島仁他(1986)牛一卵性二分離胚を用いた胚の性別予知, 千葉畜セ研報 10, 13-18

ブタ・ヒト透明帯共通抗原 (23Kd) に対するマウス 抗血清のヒト *in vitro* 受精系に及ぼす影響

Influence of antiserum raised to the common antigen (23Kd) in porcine and human zona pellucidae
on in vitro fertilization system in humans

長谷川昭子、香山浩二、磯島晋三

Akiko Hasegawa, Koji Koyama, 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】昨年本研究会でブタ・ヒト透明帯(ZP)共通抗原に対するモノクローナル抗体(Mab-3A4)の対応抗原について報告した。その中で、ブタZPは二次元電気泳動(等電点・SDS)で4つの糖蛋白質群に分離されるが、Mab-3A4が認識する抗原は平均分子量23Kdに位置する11個の等電点の多様な分子群であることを示した。この多様性は糖鎖の結合の割合が異なることに由来し、23Kd分子群のポリペプチド部分は共通であろうと考えられた。この23Kd分子群は他の3つの分子群から分子量の差によって分離することができるので、今回23Kd分子群を精製しマウスに免疫して抗血清を得、その反応性を検討した。

【方法】可溶化ブタZPを一次元SDS-PAGEで分離し23Kd(20~30Kd)に相当する位置のゲルを切り出しelectoelutionにより蛋白質を抽出した。これを抗原としBALB/cマウス♂一匹あたり10μg/回、フロイント完全アジュバントと共に2回、更に追加免疫3回行ない抗血清を作製した。この抗血清は①各種動物卵を用いた間接蛍光抗体法②可溶化ブタZPのWestern blot③ヒト精子のヒトZPへの結合に及ぼす影響について分析した。

【結果】抗23Kd抗血清はブタ卵を用いた間接蛍光抗体法で1:10,000の力値を示した。またMab-3A4がブタとヒトのZPとしか反応しないのに対し、抗23Kd抗体はハムスター・ネコZPとも反応し23Kd分子上にはヒトとの共通エピトープの他にも複数のエピトープが存在するものと思われた。又可溶化ブタZPの二次元電気泳動のWestern blotでは23Kd分子群と92Kd分子群に反応した。これは昨年発表した「23Kd分子群はS-Sの還元により92Kdから解離する」という結果と一致するものであった。ヒト卵を用いた精子結合阻止実験では表に示すように卵を抗23Kd抗血清で処理後完全に洗浄した場合、対照と比較してやや結合精子数は少ないものの、進入数は高率で抗ブタZP抗体と比較してその阻害作用は弱かった。一方抗血清10%存在下に媒精すると結合精子数においても進入精子数においても強い阻害が観察された。

【考察】ブタZPはヒトZPと抗原性を共有するため、ブタZPを用いてヒト避妊ワクチンへの応用が研究されている¹⁾。しかし、ZP上の精子の種を認識するレセプターは種により特異的構造と考えられるので、ブタZPを利用する以上多数の抗体の結合による立体障害というメカニズムによらねばならないだろう²⁾。今回の結果から抗

23Kd抗体では弱い阻害作用しか起こらなかつたが実験条件によっては強い阻害作用も起こり得るので、避妊ワクチンとして充分かどうか検討の余地はあると考えられる。又可溶化ブタZP全体³⁾あるいはその最も主要な蛋白質群⁴⁾を用いた研究では卵巢そのものに対する障害が報告されている。従ってエピトープ数が増えれば障害が起こる可能性も高くなるので避妊効果に充分な最少のエピトープを含む抗原を選ぶことが重要であろう。

表 ヒト精子の透明帯への結合に及ぼす抗23Kd抗血清の影響

| 処理 | 供試卵数 | 透明帯結合 | 透明帯進入 |
|------------|------|-----------|----------|
| | | 精子数／卵 | 精子数／卵 |
| 対照* | 3 | 39.0±8.2 | 4.3 ±2.5 |
| 抗23Kd抗血清* | 3 | 18.3±4.0 | 3.3 ±1.5 |
| 抗ブタZP抗血清* | 2 | 3.5±2.1 | 0.0 ±0.0 |
| <hr/> | | | |
| 対照** | 3 | 66.3±30.5 | 6.0 ±1.6 |
| 抗23Kd抗血清** | 3 | 8.7±2.1 | 0.3 ±0.6 |
| 抗ブタZP抗血清** | 2 | 0.5±0.7 | 0.0 ±0.0 |

* 原血清で1時間卵を処理後、充分洗浄して媒精した。

**原血清で1時間卵を処理後、10% 抗血清を含む条件で媒精した。

【参考文献】

- 1) Sacco, A.G. Zona Pellucida : Current Status as a Candidate Antigen for Contraceptive Vaccine Development. AJRIM 1987;15:122-130
- 2) Koyama K., Hasegawa, A., Tsuji, Y. and Isojima, S. Production and characterization of monoclonal antibodies to cross-reactive antigens of human and porcine zonal pellucidae. J. Reprod. Immunol. 1985;7:187-198
- 3) Skinner, S.M., Mills, T., Kirchick, H.J. and Dunbar, B.S. Immunization with Zona Pellucida Proteins Results in Abnormal Ovarian Follicular Differentiation and Inhibition of Gonadotropin-Induced Steroid Secretion. 1984;115:2148-2432
- 4) Sacco, A.G., Subramanian, M.G., Yurewicz, E.C., DeMayo F.J. and Dukelow W.R. Heteroimmunization squirrel monkey with a purified porcine zona antigen (PPZA) : immunoresponse and biologic activity of antiserum. 1983;39:350-358

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 信

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 悅

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” 大沢伸昭、江藤一洋、館 鄭、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生生理学教室内

TEL 0466-81-6241 内線 332

哺乳動物卵子研究会編集委員会

日本薬局方 注射用胎盤性性腺刺激ホルモン

動物專用

ブベローゲン®

1,500单位
3,000单位
5,000单位
10,000单位

日本薬局方 注射用血清性性腺刺激ホルモン

動物專用

エ-マッカス®

1,000单位

販売元

三共株式会社
東京都中央区銀座 2-7-12

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

編 集 後 記

会誌5巻1号をお届けします。本号では、原著論文3編と第29回研究会の講演要旨を掲載いたしました。

今年は、立春の翌日に早々と春一番が吹き、異常気象とも思える暖冬かと思いましたが、2月には寒い日が続き平均気温は平年を下回る状況でした。春の到来も遅く桜の開花も3月中には見ることが出来ず、例年通りの開花ということで、自然現象はそんなに大きく変わるものでないことを感じております。

本研究会誌にも、春の到来が間近のようであり、投稿論文も増えており、哺乳動物卵子の専門誌として、今後とも内容の充実に努力いたしますので会員の皆様のご支援をお願いいたします。

(遠藤 克)

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5巻 第1号

Vol. 5

No. 1

昭和63年3月25日印刷

(会員頒布)

昭和63年4月1日発行

発行者 哺乳動物卵子研究会
代表 佐久間 勇 次

発行所 哺乳動物卵子研究会
〒252 藤沢市亀井野1866
日本大学農学部医学部生理学教室
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)

健保適用

下垂体性性腺刺激ホルモン

パーゴナル[®]注75・150

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



【効能・効果】

間脳性（視床下部性）無月経、下垂体性無月経の排卵誘発

【用法・用量】

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

【包 装】

パーゴナル注 75：10管
パーゴナル注150：10管



商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・ブレグナンジオール分泌、頸管粘液、基礎体温等）を詳細に検査し、子宮性無月経の患者には投与しないこと。
 - ウ. 原発性卵巣不全による尿中性腺刺激ホルモン分泌の高い患者、副腎・甲状腺機能の異常による無月経患者、頭蓋内に病変（下垂体腫瘍等）を有する患者、及び無排卵症以外の不妊患者には投与しないこと。
 - 2) 本療法の卵巣過剰刺激による副作用を避けるため、投与前及び治療期間中は毎日内診を行い、特に次の点に留意し、異常が認められた場合には、直ちに投与を中止すること。
 - ア. 患者の自覚症状（特に下腹部痛）の有無
 - イ. 卵巣腫大の有無
 - ウ. 基礎体温の異常上昇の有無（毎日測定させること）。
 - エ. 頸管粘液量とその性状
 - 3) 卵巣過剰刺激の結果としての多胎妊娠の可能性があるので、その旨をあらかじめ患者に説明すること。
 - 4) 妊娠初期の不注意な投与を避けるため、投与前少なくとも1ヵ月間は基礎体温を記録させること。
 - 5) 産婦人科・内分泌専門医師の管理のもとに投与すること。
2. 次の場合には投与しないこと
- 1) 卵巣腫瘍及び多くのう胞性卵巣症候群を原因とする卵巣の腫大を有する患者
 - 2) 妊婦
 3. 次の患者には投与しないことを原則とするが、やむを得ず投与する場合には、慎重に投与すること。
 - 1) 児を望まない第2度無月経患者
 - 2) 多のう胞性卵巣を有する患者
4. 副作用
- 1) 卵巣過剰刺激 卵巣腫大、下腹部痛、下腹部緊迫感、腹水・胸水を伴ういわゆる、Meigs様症候群等があらわれた場合には、直ちに投与を中止するなど、適切な処置を行うこと。
 - 2) その他 ときに恶心、頻尿、しびれ感、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。

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。



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 総括課 ☎ 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

テンカ製薬株式会社

神奈川県川崎市川崎区中浜3丁目19番11号 〒210



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。
森永B.F.-L.ドライミルクは
ビフィズス菌を増やすラクトフェ
リン、赤ちゃんの脳や神經
の発育に大切なタウリンも配
合しました。



母乳に多い
ラクトフェリン新配合
感染防御因子

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 B.F.-L.ドライミルク



森永乳業

新製品 細胞融合・遺伝子導入

実験に……教育に…… 低価格

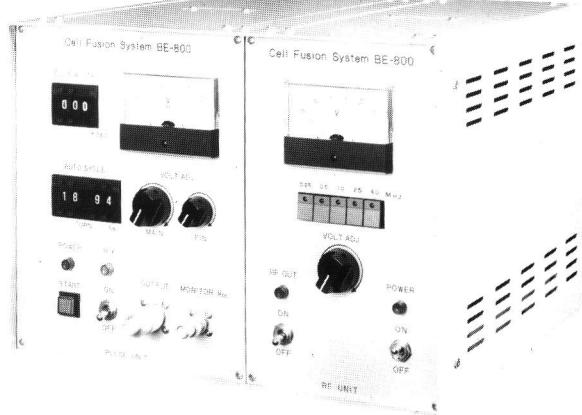
電子細胞融合装置

国産化で画期的な低価格を実現！

用途に合わせ 6 機種60万円～150万円を選択できる

標準本体価格 82万円

Model: BE-800～BE-2400/100



〈仕様〉

標準機種(特注機種)

パルス出力電圧：10～800V (～2400V)
パルス幅：10～990sec.
パルス印加回数：1～99回(自動)
パルス印加間隔：10～990msec.
高周波出力電圧：0～50Vp-p(AC100Vp-p)
周 波 数：250KHz～2MHz(12MHz)
入 力：AC100V, 50/60Hz
サ イ ズ：350W×350D×250H
重 量/容 量：15kg/200W

〈特長〉

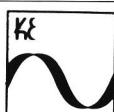
1. パルス回数/間隔の設定により連続的なパルスの自動印加が可。
2. 標準出力800Vから最高2400Vまで出力アップが可。(オプション)
3. 高周波とパルスの合成波電圧の印加により、様々な実験が可能。
4. 各種入出力を完備。パソコン、オシロ等外部機器との接続も可。
5. プログラムによる自動操作、データ記録も可能。(オプション)
6. チャンバーの特注製作や顕微鏡モニタリングシステムにも対応。
7. 遠隔操作出来るためクリンベンチ内で観察実験が容易に出来る。

〈オプション〉

1. デジタルディスプレイ
2. C. インターフェイス
3. 高圧発生ユニット
4. 特別融合チャンバー
5. オートCPUユニット
6. 同CPU用プリンター
7. モニターシステム
8. デレイタイマー

※全国でのデモ申し込み受付中。お問い合わせは下記へ。

※その他の特別仕様にも応じます。



輸入総代理店

関西電子株式会社

本 社：大阪市北区兎我野町4-12 TEL.06-312-1471 FAX.06-312-6232
東京営業所：東京都渋谷区千駄ヶ谷5-8-2 TEL.03-356-1401 FAX.03-356-1405

