

哺乳卵研誌  
J. Mamm. Ova Res.

# 哺乳動物卵子研究会誌

Journal of Mammalian Ova Research

哺乳動物卵子研究会

Japanese Society of  
Mammalian Ova Research

Vol. 5 No. 2

October 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

**コンセラル®注射液**

牛の卵胞のう腫、排卵障害、  
卵巢静止の治療、排卵促進に

(要指示)

製造発売元

武田薬品工業株式会社

提携

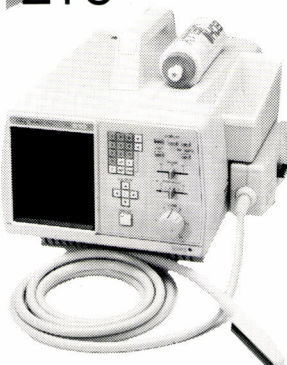
帝国臓器製薬株式会社

## 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

卵巢の状態・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

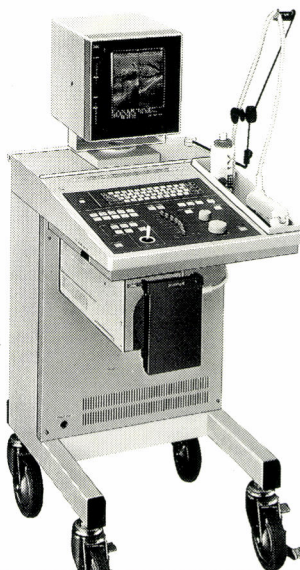


直腸用プローブ

- 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)

- 持ち歩ける超音波診断器
- 2画像表示機能

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2号

昭和63年10月

## 目次

原 著

- マウスの受精、胚発生および胚盤胞ハッチングに及ぼす  
インドメサシンの影響 岡崎正幸、新村末雄、石田一夫 ..... 70
- ゴールデン・ハムスター体外成熟卵の雄性前核形成能に  
及ぼす成熟培地へのアミノ酸とホルモンの添加効果について 堀内俊孝、長池文康 ..... 78
- 体外受精由来マウス胚の発生に及ぼす金属-EDTA  
キレートの影響 鈴木宏志、福田芳詔、豊田 裕 ..... 84
- 凍結・融解したラット卵巢の卵巢嚢内への移植  
利部 聡、牧田登之、萬場光一、石田哲也 ..... 89
- 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 聡、中村のゆみ、高橋寿太郎、安田泰久 ..... 98
- マウス着床期胚におけるフィブロネクチン(FN)の意義と  
体外培養が胚のFN出現に及ぼす影響について  
竹内一浩、森 明人、鶴木康資、永田行博 ..... 105
- 精子透明帯相互作用に関わる Salt-stored egg の  
透明帯機能について 吉松宣弘、柳田 薫、星 和彦、佐藤 章 ..... 113
- マウス着床前初期胚の産生するプロゲステロンのヘキソキナーゼ  
活性に及ぼす影響  
綾部琢哉、堤 治、矢野 哲、藤原敏博  
三橋直樹、水野正彦 ..... 119



ダブルトレーサ法によるラット卵子の  $^3\text{H}$ -ロイシンと  
 $^{14}\text{C}$ -グルタミン酸の取込みについて

辻井弘忠 ..... 125

## 短 報

卵丘細胞層との共培養による牛体外成熟・体外受精卵の  
体外発生と受胎例について

堀内俊孝、高田直和、沼辺 孝、大久保範幸、石川勇志 ..... 134



# Journal of Mammalian Ova Research

Vol. 5 No. 2

October 1988

## Contents

### Originals

Effect of indomethacin on fertilization, early development  
and hatching of mouse eggs.

OKAZAKI, M., S. NIIMURA & K. ISHIDA ..... 70

Effect of amino acids and hormones on the ability of male  
pronucleus formation of in vitro matured oocytes.

HORIUCHI, T. & F. NAGAIKE ..... 78

Effect of metal-EDTA chelates on the preimplantation  
development of mouse embryos fertilized in vitro.

SUZUKI, H., Y. FUKUDA & Y. TOYODA ..... 84

Transplantation of rat ovary into ovarian bursa after  
freezing and thawing.

KAGABU, S., T. MAKITA, K. MAMBA & T. ISHIDA ..... 89

Scanning electron microscopic study of interspecific  
chimaeric blastocysts.

SOETA, S., N. NAKAMURA, J. TAKAHASHI & Y. YASUDA ..... 98

The significance of fibronectin (FN) in  
peri-implantation mouse embryos and the effect of  
culturing on appearance of FN.

TAKEUCHI, K., A. MORI, Y. UNOKI & Y. NAGATA ..... 105

Zonae pellucidae of salt-stored eggs: Their functions  
in sperm-zona interactions.

YOSHIMATSU, N., K. YANAGIDA, K. HOSHI & A. SATO ..... 113



Possible autocrine function of progesterone on hexokinase  
activity of mouse preimplantation embryo.

AYABE, T., O.TSUTSUMI, T.YANO, T.FUJIWARA,  
N.MITSUHASHI & M.MIZUNO ..... 119

Uptake of  $^3\text{H}$ -leucine and  $^{14}\text{C}$ -glutamic acid in rat eggs of  
preimplantation stage by the double labelling method.

TSUJII, H. .... 125

### Brief note

Development of bovine follicular oocytes matured and  
fertilized in vitro by Co-culture with cumulus cells and  
subsequent pregnancies by non-surgical transfer.

HORIUCHI, T., N.TAKADA, T.NUMABE, N.OOHISA & Y.ISHIKAWA ..... 134





マウスの受精、胚発生および胚盤胞ハッチングに  
及ぼすインドメサシンの影響

Effect of Indomethacin on Fertilization, Early Development  
and Hatching of Mouse Eggs

岡崎正幸・新村末雄・石田一夫

Masayuki OKAZAKI, 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,  
Ikarashi 2, Niigata 950-21, Japan

The effect of indomethacin (IM), an inhibitor of prostaglandin (PG) synthesis, on fertilization, early development and hatching of blastocysts was examined using ICR mouse eggs.

(1) When eggs obtained from the oviducts of superovulated females 15 hours after hCG injection were denuded with hyaluronidase and cultured for 2 hours in a modified Krebs-Ringer bicarbonate solution containing 100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M or 200  $\mu$ M of IM before being inseminated *iv vitro*, 55.9%, 50.0%, 47.1%, 50.0% and 47.5% of the eggs were fertilized respectively, showing no significant differences from that obtained in an IM-free (control) medium (55.8%). Fertilization rate was significantly lowered only in the highest (400  $\mu$ M) concentration of IM.

(2) When 2-cell embryos were cultured for 48 hours in the presence of 100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M or 100  $\mu$ M of IM, 79.6%, 81.0%, 81.1% and 85.7% of the embryos respectively were developed into blastocysts, but the percentages showed significant decrease in higher concentrations (200  $\mu$ M) of IM and no blastocysts were observed in a medium containing 400  $\mu$ M of IM.

(3) The percentages of hatched blastocysts were significantly decreased when blastocysts obtained 96 hours after hCG were cultured with graded concentrations of IM higher than 1  $\mu$ M, resulting in only 6.7% of hatched blastocysts in a medium containing 400  $\mu$ M of IM.

These results suggest that PG synthesis plays an important role in early development, especially in the hatching of blastocyst.



## 緒 言

1975年にDickmann and Spilman<sup>1)</sup>は、ウサギ胚盤胞にプロスタグランジン (PG) E-A とPGF が含まれていることをラジオイムノアッセイ(RIA) によってはじめて確かめた。その後、各種のPGがウサギ<sup>2-4)</sup>、ウシ<sup>5)</sup>、ヒツジ<sup>6,7)</sup>およびブタ<sup>8)</sup>の胚盤胞でRIA によって検出されている。また、これらの動物の胚盤胞は、*in vitro*でPGを合成・分泌しているとともに<sup>4,6,7,9-12)</sup>、アラキドン酸からPGを合成する能力をもっていることが知られている<sup>4,10,13-18)</sup>。

マウスについては、Niimura and Ishida<sup>19,20)</sup>が未受精期から胚盤胞期までの卵でPGE<sub>2</sub>を免疫組織化学的に検出するとともに、アラキドン酸を基質に用いてPG合成酵素を組織化学的に証明し、マウス卵に存在するPGE<sub>2</sub>は卵自身が合成したものであると結論づけた。

胚のPG合成は、胚盤胞のハッチングや着床と関係のあることがマウスを用いて調べられているが<sup>21-25)</sup>、PG合成と胚発生との関係については調べられていない。また、卵のPG合成と受精との関係については、林ら<sup>26)</sup>が詳細に調べている。すなわち、PG合成の阻害剤であるインドメサシン(IM)を含む培養液中でマウス卵の体外受精を試みたところ、420 $\mu$ M と560 $\mu$ M の濃度のIMを含む培養液では受精率は有意に低下すると報告している。しかし、このような培養液中での体外受精では、IMの影響は卵ばかりでなく精子にも及んでいる。

本研究では、(1) 各種濃度のIMを添加した培養液でマウス卵を前培養したのち、体外受精を行って受精率を調べ、(2) IMを添加した培養液で2細胞胚を培養して、胚盤胞への発生率を調べ、(3) 同種液で胚盤胞を培養してハッチング率を調べて、卵のPG合成と受精との関係、胚のPG合成と発生ならびにハッチングとの関係を明らかにした。

## 材料および方法

供試動物として、ICR 系の成熟マウスを使用した。飼育は24℃のコイトロン(EA-8HW)内で行い、点灯は午前4時から午後6時までの14時間とした。これらの雌にPMSG(セロトロピン、帝国臓器)とhCG(ゴナトロピン、帝国臓器)をそれぞれ5 IUずつ、48時間間隔で腹腔内に注射して過排卵処置を施した後、未受精卵採取の場合を除き、直ちに雄と同居させた。

未受精卵はhCG 注射後15時間に豊田らが使用した培養液(TYH 液)<sup>27)</sup>を入れた時計皿中で卵管膨大部から採取した。2細胞胚はhCG 注射後48時間に卵管を、胚盤胞は96時間に子宮をWhittingham の培養液<sup>28)</sup>でそれぞれ灌流して採取した。胚盤胞は十分にエキスパンドしたもののみを実験に用いた。

培養液に添加するIM (Sigma, U.S.A.)は、エタノールで溶解して50mMの濃度の溶液を作成した後、TYH 液またはWhittingham の培養液で希釈して100nM、1 $\mu$ M、10 $\mu$ M、100 $\mu$ M、200 $\mu$ M および400 $\mu$ M の濃度に調整した。なお、培養液中のエタノール濃度はいずれも0.8 %とした。なお、IMを含まずエタノールを0.8 %含む培養液を対照として使用した。

採取した未受精卵は、ヒアルロニダーゼ(Sigma)で卵丘細胞を除去した後、各種濃度のIMを含むTYH液に移し、37℃で、炭酸ガス5%、空気95%の気相下で2時間前培養した。これらの卵は、前培養後、TYH液で3回洗浄して体外受精に用いた。体外受精は豊田らの方法<sup>27,29)</sup>に準じて行った。すなわち、精子懸濁液は同系統の成熟雄の精巢上体尾部をTYH液中で細切して作成した。この精子懸濁液は37℃で、炭酸ガス5%、空気95%の気相下で2時間処理した。授精は培養した精子を含むTYH液に前培養した卵を移し、同じ条件下で、5時間培養して行った。なお、授精に用いたTYH液中の精子濃度は、 $1.0 \sim 5.0 \times 10^5/\text{ml}$ であった。授精させた卵は10%ホルマリン緩衝液(pH7.4)で固定した後、アセトラクモイド染色を施した。処理した卵は、あらかじめワセリン・パラフィンのスポットをカバーガラスの四隅に位置するように置いたスライドガラスの中央に移し、カバーガラスをかぶせ、静かに押して卵を押し、顕微鏡下で観察した。受精卵には単精子受精卵のほか少数の多精子受精卵も含まれており、未受精卵には単為発生卵と退行卵も含めた。

採取した2細胞胚と胚盤胞は、前述の濃度のIMを含むWhittinghamの培養液に移し、37℃で、炭酸ガス5%、空気95%の気相下でそれぞれ48時間と24時間培養した。

受精率、発生率およびハッチング率の統計処理は $\chi^2$ 検定によって行った。

## 結 果

### 1. 受精に及ぼすIMの影響

各種濃度のIMを含むTYH液で2時間前培養した卵の体外受精の成績は表1に示す通りである。

IMを含まない培養液で前培養した卵では、55.8%が受精しており、そのうち1個は多精子受精卵であった。一方、IMを100nM、1 $\mu$ M、10 $\mu$ M、100 $\mu$ M および200 $\mu$ M 添加した培養液で前培養した卵の受精率はそれぞれ55.9%、50.0%、47.1%、50.0%および47.5%で、対照との間には有意差は認められなかった。多精子受精卵は0ないし6個認められた。しかし、IMを400 $\mu$ M 添加した培養液で前培養した卵の受精率は27.3%で、対照に比べて有意に低かった。なお、多精子受精卵は2個認められた。

### 2. 2細胞胚の発生に及ぼすIMの影響

各種濃度のIMを含む培養液で2細胞胚を培養して得られた胚発生の成績は表2に示す通りである。

IMを含まない培養液では、86.7%の胚が胚盤胞へ発生した。一方、IMを100nM、1 $\mu$ M、10 $\mu$ Mおよび100 $\mu$ M 添加した培養液では、それぞれ79.6%、81.0%、81.1%および85.7%の発生率で、対照との間に有意差は認められなかった。しかし、IMを200 $\mu$ M 添加した培養液では、胚盤胞への発生率は11.4%で有意に低下し、IMを400 $\mu$ M 添加した培養液では、胚盤胞へ発生した胚は認められなかった。なお、IMを200 $\mu$ M および400 $\mu$ M 添加した培養液では、退行胚が観察され、その割合はIMの濃度が高い培養液で顕著であった。

### 3. 胚盤胞のハッチングに及ぼすIMの影響

各種濃度のIMを含む培養液で胚盤胞を培養して得られたハッチングの成績は表3に示す通りであ

Table 1. The effect of indomethacin on the *in vitro* fertilization of mouse eggs

Concentrations of indomethacin in media	No. of eggs observed	No. of fertilized eggs	No. of unfertilized eggs	Rates of fertilization(%)
None(Control)	43	24 (1)	19	55.8
100 nM	34	19 (0)	15	55.9
1 $\mu$ M	40	20 (6)	20	50.0
10 $\mu$ M	34	16 (2)	18	47.1
100 $\mu$ M	50	25 (4)	25	50.0
200 $\mu$ M	40	19 (1)	21	47.5
400 $\mu$ M	66	18 (2)	48	27.3*

The numbers in parentheses show the polyspermic egg.

Marked value is significantly different from that of the control(\*— $P<0.01$ ).

Table 2. The effect of indomethacin on the development of 2-cell mouse embryos

Concentrations of indomethacin in media	No. of 2-cell embryos cultured	No. (%) of embryos at different stages					No. (%) of atretic embryos
		2-cell	4-cell	8-cell	Morula	Blastocyst	
None(Control)	83	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	11(13.3)	72(86.7)	0(0.0)
100 nM	49	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	10(20.4)	39(79.6)	0(0.0)
1 $\mu$ M	42	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	8(19.0)	34(81.0)	0(0.0)
10 $\mu$ M	53	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	10(18.9)	43(81.1)	0(0.0)
100 $\mu$ M	42	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	6(14.3)	36(85.7)	0(0.0)
200 $\mu$ M	35	4(11.4)	0(0.0)	8(22.9)	17(48.6)	4(11.4)*	2(5.7)
400 $\mu$ M	35	22(62.9)	1(2.9)	2(5.7)	5(14.3)	0(0.0)*	5(14.3)

Marked values are significantly different from that of the control (\* — $P<0.001$ ).

Table 3. The effect of indomethacin on the hatching of mouse blastocysts

Concentrations of indomethacin in media	No. of blastocysts cultured	No. (%) of blastocysts	
		hatched	not hatched
None(Control)	56	38 (67.9)	18 (32.1)
100 nM	32	16 (50.0)	16 (50.0)
1 $\mu$ M	32	14 (43.8)*	18 (56.2)
10 $\mu$ M	30	11 (36.7)**	19 (63.3)
100 $\mu$ M	29	6 (20.7)***	23 (79.3)
200 $\mu$ M	29	4 (13.8)***	25 (86.2)
400 $\mu$ M	30	2 (6.7)***	28 (93.3)

Marked values are significantly different from that of the control(\* — $P<0.05$ , \*\* — $P<0.01$ , \*\*\* — $P<0.001$ ).

る。

IMを含まない培養液では、67.9%の胚盤胞がハッチングを起こした。一方、IMを100nM 添加した培養液では、ハッチングした胚盤胞の割合は50.0%に低下したが、対照との間に有意差は認められなかった。しかし、IMの濃度が1 $\mu$ M より高くなるにしたがって、ハッチングした胚盤胞の割合は徐々に有意に低下し、IMを400 $\mu$ M 添加した培養液では、6.7 %の胚盤胞しかハッチングを起こさなかった。

なお、ハッチングしない胚盤胞の中には萎縮して小型化したものが多数観察された。



## 考 察

マウス卵のPG合成と受精との関係を調べるために、林ら<sup>26)</sup>は体外受精用の培養液に280 $\mu$ M ないし560 $\mu$ M のIMを添加して体外受精を行ったところ、IMを420 $\mu$ M および560 $\mu$ M 添加した培養液では受精率が低下するが、PGF<sub>2</sub> $\alpha$ を培養液に添加することによって受精率の改善がみられることを観察している。彼らはこれらの濃度のIMを添加した培養液での受精率の低下は、IMの濃度が高いためPG合成ばかりでなく、他の物質代謝も阻害されたためであろうと推察している。また、IMを添加した培養液中で授精させているため、培養液中のIMが精子の運動と先体反応に影響を及ぼし、受精率の低下をもたらしたことも考えられると述べている。実際に、IMで前処置したマウス精子を用いて体外受精を行うと、受精が阻害されることが報告されている<sup>30)</sup>。

本実験において、精子に及ぼすIMの影響を除くために、IMを添加した培養液で卵のみを前培養したのち体外受精を行った。その結果、100nM ないし200 $\mu$ M のIMを添加した培養液で前培養した卵の受精率はIMを含まない培養液で前培養した卵の受精率と比べ、有意差は認められなかった。Niimura and Ishida<sup>19)</sup>は、IMを100 $\mu$ M 添加した培養液でマウス2細胞胚を培養して得られた胚盤胞について、PGE<sub>2</sub>の免疫組織化学的検出を試みており、PGE<sub>2</sub>の局在を示す蛍光の強さは有意に低下し、蛍光のみられない胚も出現すると述べている。また、ウサギの胚盤胞では140 $\mu$ M のIMを添加した培養液で1ないし2時間培養するとPGの分泌量は有意に低下することが明らかにされている<sup>4)</sup>。これらのことから、本実験の100 $\mu$ M および200 $\mu$ M のIMを添加した培養液で前培養した卵においてもPG合成が阻害されていることが推察されるが、受精率には影響がみられなかった。したがって、卵でPGが合成されなくても受精には影響がないことが示唆された。しかしながら、IMを400 $\mu$ M 添加した培養液で前培養した卵の受精率は有意に低かった。IMはcyclooxygenaseを阻害してPGGの合成を抑制することが知られているが、そのほか、PG dehydrogenase、cAMP dependent protein kinase、phosphodiesterase、Dopa decarboxylaseなどの活性も阻害するといわれている<sup>31)</sup>。このことから、IMを400 $\mu$ M 添加した培養液で前培養した卵の受精率の低下は、高濃度のIMがPG合成とともに他の物質代謝にも影響を及ぼしたためと推察される。

次に、本実験において、IMを培養液に添加して2細胞胚を培養し、胚盤胞への発生を観察したところ、IMの濃度が100nM から100 $\mu$ M の範囲では、胚盤胞への発生率はIMを含まない培養液で培養したものと変わらなかった。既述のように、IMを100 $\mu$ M 添加した培養液で培養するとマウス胚のPG合成は抑制されるといわれており、本実験の100 $\mu$ M のIMを添加した培養液で培養して得られた胚盤胞においても、PG合成は阻害されているものと推察されるが、この濃度では胚盤胞への発生は影響を受けなかった。このことから、胚でPGが合成されなくても発生には影響がないことが示唆された。しかし、IMの濃度が200 $\mu$ M 以上になると胚盤胞への発生率は著しく低下し、400 $\mu$ M のIMを添加した培養液では胚盤



胞へ発生した胚はみられなかった。高濃度のIM処理による発生率の低下は、受精率低下の場合と同じ理由によるものと思われる。

マウス胚盤胞のハッチングはPGE<sub>2</sub>の拮抗剤である18,18,20-trimethyl PGE<sub>2</sub> やPGF<sub>2</sub>αの拮抗剤であるN-dimethylamide PGF<sub>2</sub>αによって抑制されることから、PGE<sub>2</sub>とPGF<sub>2</sub>αはマウス胚盤胞のハッチングに役割を果たしていると考えられている<sup>24)</sup>。一方、マウス胚盤胞のPG合成とハッチングとの関係については、Biggers *et al.*<sup>22)</sup>、Hurst and MacFarlane<sup>23)</sup> および千田<sup>25)</sup> がIMを用いて観察している。すなわち、Biggers *et al.*<sup>22)</sup> は1μM から1mM のIMを添加した培養液で、Hurst and MacFarlane<sup>23)</sup> は5μM から50μMのIMを添加した培養液で胚盤胞を培養すると、IMのハッチングに対するinhibitory doses (ID) 50は、それぞれ9.08μMおよび6.15μMであったと報告している。また、千田<sup>25)</sup> は1μMから100μM のIMを添加した培養液で胚盤胞を培養し、ハッチングした胚盤胞の割合を有意に低下させるIMの濃度は100μM であったと述べている。

本実験において、100nM から400μM のIMを添加した培養液で胚盤胞を培養したところ、IMの濃度が1μM より高くなるにしたがって、ハッチングした胚盤胞の割合は徐々に有意に低下した。この結果はBiggers *et al.*の結果<sup>22)</sup> によく類似していた。以上の結果から、本実験においても、胚盤胞のPG合成とハッチングとの間には密接な関係のあることが示唆された。

## 文 献

- 1) Dickmann, Z. and Spilman, C.H. (1975). Prostaglandins in rabbit blastocysts. *Science*, 190, 997-998.
- 2) Dey, S.K., Chien, S.M., Cox, C.L. and Crist, R.D. (1980). Prostaglandin synthesis in the rabbit blastocyst. *Prostaglandins*, 19, 449-453.
- 3) Pakrasi, P.L. and Dey, S.K. (1982). Blastocyst is the source of prostaglandins in the implantation site in the rabbit. *Prostaglandins*, 24, 73-77.
- 4) Harper, M.J.K., Norris, C.J. and Rajkumar, K. (1983). Prostaglandin release by zygotes and endometria of pregnant rabbits. *Biol. Reprod.*, 28, 350-362.
- 5) Shemesh, M., Milaguir, F., Ayalon, N. and Hansel, W. (1979). Steroidogenesis and prostaglandin synthesis by cultured bovine blastocysts. *J. Reprod. Fert.*, 56, 181-185.
- 6) Lacroix, M.C. and Kann, G. (1982). Comparative studies of prostaglandins F<sub>2</sub>α and E<sub>2</sub> in late cyclic and early pregnant sheep: *In vitro* synthesis by endometrium and conceptus effects of *in vivo* indomethacin treatment on establishment of pregnancy. *Prostaglandins*, 23, 507-526.
- 7) Hyland, J.H., Manns, J.G. and Humphrey, W.D. (1982). Prostaglandin production by ovine embryos and endometrium *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 65, 299-304.

- 8) Davis, D.L., Pakrasi, P.L. and Dey, S.K. (1983). Prostaglandins in swine blastocysts. Biol.Reprod., 28, 1114-1118.
- 9) Pakrasi, P.L. and Dey, S.K. (1983). Catechol estrogens stimulate synthesis of prostaglandins in the preimplantation rabbit blastocyst and endometrium. Biol.Reprod., 29, 347-354.
- 10) Lewis, G.S. (1986). Effects of superovulation, arachidonic acid or endometrium on release of prostaglandins and synthesis of proteins by bovine trophoblast. Prostaglandins, 32, 275-290.
- 11) Watson, J. and Patek, C.E. (1979). Steroid and prostaglandin secretion by the corpus luteum, endometrium and embryos of cyclic and pregnant pigs. J.Endocr., 82, 425-428.
- 12) Stone, B.A., Seamark, R.F., Kelly, R.W. and Deam, S. (1986). Production of steroids and release of prostaglandins by spherical pig blastocysts *in vitro*. Aust.J.biol.Sci., 39, 283-293.
- 13) Racowsky, C. and Biggers, J.D. (1983). Are blastocyst prostaglandins produced endogenously? Biol.Reprod., 29, 379-388.
- 14) Lewis, G.S., Thatcher, W.W., Bazer, F.W. and Curl, J.S. (1982). Metabolism of arachidonic acid *in vitro* by bovine blastocysts and endometrium. Biol.Reprod., 27, 431-439.
- 15) Lewis, G.S. and Waterman, R.A. (1983). Effects of endometrium on metabolism of arachidonic acid by bovine blastocysts *in vitro*. Prostaglandins, 25, 881-889.
- 16) Marcus, G.J. (1981). Prostaglandin formation by the sheep embryo and endometrium as an indication of maternal recognition of pregnancy. Biol.Reprod., 25, 56-64.
- 17) Lewis, G.S. and Waterman, R.A. (1985). Metabolism of arachidonic acid *in vitro* by ovine conceptuses recovered during early pregnancy. Prostaglandins, 30, 263-283.
- 18) Lewis, G.S. and Waterman, R.A. (1983). Metabolism of arachidonic acid *in vitro* by porcine blastocysts and endometrium. Prostaglandins, 25, 871-880.
- 19) Niimura, S. and Ishida, K. (1987). Immunohistochemical demonstration of prostaglandin E-2 in preimplantation mouse embryos. J.Reprod.Fert., 80, 505-508.
- 20) Niimura, S. and Ishida, K. (1988). Histochemical detection of prostaglandin synthetase in preimplantation mouse embryos. Jpn.J.Zootech.Sci., 59, 819-821.
- 21) Kennedy, T.G. (1983). Embryonic signals and the initiation of blastocyst implantation. Aust.J.biol.Sci., 36, 531-543.
- 22) Biggers, J.D., Leonov, B.V., Baskar, J.F. and Fried, J. (1978). Inhibition of hatching of mouse blastocysts *in vitro* by prostaglandin antagonists. Biol.Reprod., 19, 519-533.

- 23) Hurst, P.R. and MacFarlane, D.W. (1981). Further effects of nonsteroidal anti-inflammatory compounds on blastocyst hatching *in vitro* and implantation rates in the mouse. Biol.Reprod., 25, 777-784.
- 24) Baskar, J.F., Torchiana, D.F., Biggers, J.D., Corey, E.J., Andersen, N.H. and Subramanian, N. (1981). Inhibition of hatching of mouse blastocysts *in vitro* by various prostaglandin antagonists. J.Reprod.Fert., 63, 359-363.
- 25) 千田 智 (1985). Indomethacin及びProstaglandin  $E_2$ , Prostaglandin  $F_2\alpha$ がマウス胚のHatchingに与える影響、日産婦誌、37, 2067-2072.
- 26) 林 清士、野田洋一、松本 央、森 崇英 (1987). 受精の過程におけるプロスタグランジン作用の解析、日不妊会誌、32, 453-461.
- 27) 豊田 裕、横山峯介、星冬四郎 (1971). マウス卵子の体外受精に関する研究. I. 精巢上体精子による受精成績、家畜繁殖誌、16, 147-151.
- 28) Whittingham, D.G. (1971). Culture of mouse ova. J.Reprod.Fert., Suppl., 14, 7-21.
- 29) 豊田 裕、横山峯介、星冬四郎 (1971). マウス卵子の体外受精に関する研究. II. 精子侵入時期に及ぼす精子体外培養の効果、家畜繁殖誌、16, 152-157.
- 30) Nuzzo, N.A., Joyce, C. and Zaneveld, L. (1983). Role of prostaglandins in the acrosome reaction and fertilization. Biol.Reprod., 28, Suppl., 38.
- 31) 清水孝雄、早石 修 (1980). 最近の進歩、"プロスタグランディンとその周辺" 現代医療編集委員会編、現代医療社、東京、P.1-11.

ゴールデン・ハムスター体外成熟卵の雄性前核形成能に及ぼす  
成熟培地へのアミノ酸とホルモンの添加効果について

Effect of amino acids and hormones on the ability of male pronucleus  
formation of in vitro matured oocytes

\*堀内俊孝・長池文康

Toshitaka HORIUCHI and Fumiyasu NAGAIKE

\*宮城県畜産試験場酪農肉牛部

Miyagi-ken Exp. Station of Anim. Sci.

現所属・広島農業短期大学

Present, Hiroshima Agricultural College

長池産婦人科病院

Nagaike Obs. Gyn., Hospital

The ability of male pronucleus formation of hamster follicular oocytes matured in vitro was examined by using in vitro fertilization technique of zona-free oocytes.

When hamster oocytes, matured in vitro in a modified Tyrode's solution (mTALP) without amino acids and hormones, were fertilized in vitro, any oocytes could not get the ability to support the development of male pronucleus.

By incorporating 12 amino acids (alanine, arginine, cystidine, glutamine, histidine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, proline and valine) and hormones (LH, FSH, PRL and estradiol-17 $\beta$ ) in the maturation medium, higher percent (65%) of 75 oocytes gained the ability to support the development of male pronucleus.

緒 言

哺乳動物の卵胞卵は、卵胞から遊離させ培養すると体外で成熟する。このことは最初ウサギにおいて Pincus & Enzmann (1935) によって報告された。その後、ゴールデン・ハムスター (Gwatkin & Haidori, 1974 a, b) を含む多くの哺乳動物で明らかにされた。

しかし、体外で成熟させた卵胞卵は体内成熟した卵胞卵と比べてその受精率が低く (マウス: Cross & Brinster, 1970; ウサギ: Thibault & Gerard, 1973; ラット: Shalgi et al, 1979)、ゴールデン・ハム



スター (Leibfried & Bavister, 1983) では侵入精子頭部が前核を形成しないことが報告されている。

本研究は、ゴールデン・ハムスター体外成熟卵の雄性前核形成能を判定するため透明帯除去体外受精法を用い、体外成熟培地へのアミノ酸とホルモンの添加が体外成熟卵の雄性前核形成能に及ぼす効果について検討した。

## 材料および方法

### 培養液

卵巣や体外での卵の操作のため M2 (Quinn et al., 1982) を用いた。この培養液は空気下で PH 7.2-7.4 を示した。卵胞卵の体外成熟のため修正タイロッド液 (Leibfried & Bavister, 1983) を用いた。この培養液 (mTALP) の組成は 101.8mM NaCl、2.68mM KCl、1.80mM CaCl<sub>2</sub>、0.49mM MgCl<sub>2</sub>、0.36mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、35.70mM NaHCO<sub>3</sub>、4.50mM グルコース、1.0mM ピルビン酸ナトリウム、9.0mM 乳酸ナトリウムである。この培養液は 5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub> 及び 90%N<sub>2</sub> の気相下で PH 7.2-7.4 を示した。

ハムスター精子の受精能獲得と体外受精のためには mTALP の NaCl を 124mM に上げ NaHCO<sub>3</sub> を 11.90mM に下げ 0.5mM ハイポタウリン、0.05mM エピネフリンを添加した培養液 (mTALP4) を用いた。この培養液は空気下で PH 7.3-7.5 であった。

M2 および mTALP には 4mg/ml の濃度で、mTALP4 には 15mg/ml の濃度でウシ血清アルブミン (Calbiochem, Fraction V) を加えた。

### アミノ酸とホルモン

体外成熟用培養液 mTALP には 4 アミノ酸または 12 アミノ酸を加えた。4 アミノ酸はグルタミン、イソロイシン、メチオニン、フェニールアラニンで、12 アミノ酸は前者の 4 アミノ酸にアラニン、アルギニン、シスチン、ヒスチジン、ロイシン、プロリン、セリン、バリンを加えたものである。これらは Sigma または ICN Nutritional 社製の L 型アミノ酸で、その組成は Haidori & Gwatkin (1973) がゴールデン・ハムスター卵胞卵の体外成熟に用いたものと同様であった。

ホルモンは LH 10µg/ml、FSH 10µg/ml、プロラクチン (PRL) 20ng/ml、エストラジオール 17β (E<sub>2</sub>) 1 µg/ml の濃度で加えた。LH、FSH、PRL は USDA で純化されたものを用いた。E<sub>2</sub> は Sigma 社製で 100% エタノール中 400 µg/ml の濃度で -40℃ に保存した。

### 未成熟卵胞卵の採取と体外培養

発情周期の第 1 日目 (排卵当日の午前 9~10 時) PMSG 30iu を成熟雌ハムスター (生後 2 ヶ月) の腹腔内に注射した。PMSG の注射後 59~62 時間 (発情周期の第 3 日目の夕方 20~22 時) に卵巣を切り出し、M2 にいれ解剖針で卵胞卵を遊離させた。卵丘細胞群に囲まれた卵胞卵のみをミネラルオイル (Squib & Sons) 下 mTALP (300µl) に 10~50 個入れ、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub> 及び 90%N<sub>2</sub> の気相下 37℃ で 15~17 時間培養し体外成熟させた。

### 受精能獲得のためのハムスター精子のインキュベーション

受精能獲得のための精子インキュベーションは、Yanagimachi (1982) の方法に若干の修正を加えた。すなわち、成熟雄ハムスターの精巣上体尾部を予め温めた mTALP4 に切り出し切開した。約 5 分間 37℃ のインキュベーターに静置し得られた精子懸濁液 (約 3ml) は 700g で 3 分間遠心し、上清を除去した。次いで、先の曲がったパスツールピペットで約 3ml の mTALP4 を、精子を混合しないように、上層にゆっくり加えた。この遠心管は 38℃ の温湯の入ったビーカー中におき、37℃ のインキュベーターに静置した。5~15 分後 上清中の精子は 85% 以上が運動していた。上清の精子懸濁液 50µl をミネラルオイル下の mTALP4 (300µl) に加え (約  $1.2 \times 10^7$  精子濃度)、約 4 時間インキュベーションし受精能獲得した。

### 体外成熟卵の体外受精

成熟させた卵細胞はM2中でピペッティングによって卵丘細胞群を除去した。実体顕微鏡下で極体の有無を観察し、極体の存在する卵細胞を体外成熟卵と判定した。体外成熟卵は0.1%トリプシン(牛臍臓由来180TAME units/mg, ICN Nutritional社)で透明帯を除去しM2で3回洗浄後、ミネラルオイル下300  $\mu$ l mTALP4に入れた。次に、受精能獲得したハムスター精子懸濁液5  $\mu$ lを加え約 $5 \times 10^4$ 精子/mlの濃度で媒精し5時間培養した。

### 受精の判定

卵細胞質内で少なくとも膨化を始めたり膨化した精子頭部または雄性前核が認められたとき体外成熟卵は受精したと判定した。本研究では、その過程を任意に4段階に分類した(図1); (I)膨化直後の精子頭部(A)、(II)完全に膨化した精子頭部(B)、(III)仁の形成が始まった膨化精子頭部(C)、(IV)明瞭な仁の認められた雄性前核(D、E)。

## 結 果

成熟培地へのアミノ酸とホルモンの添加効果の結果は表1に示した。体外成熟率はアミノ酸とホルモンの添加にかかわらず差はなく74-88%であった。体外成熟卵の精子侵入率は68-81%、多精子侵入率は41-60%(精子数2-5)であった。

アミノ酸とホルモンの無添加区では、精子侵入卵30個のうち17%で初期膨化精子頭部、83%で完全な膨化精子頭部が観察されたが、雄性前核の形成した卵は一つもなかった。

4アミノ酸(グルタミン、イソロイシン、メチオニン、フェニールアラニン)の存在下で、ホルモン(LH、FSH、PRL、E<sub>2</sub>)の無添加および添加区で、初期膨化精子頭部と完全な膨化精子頭部の認められた卵は、精子侵入卵49個のうち各10%、88%と精子侵入卵57個のうち各2%、63%であった。仁形成開始膨化精子頭部と雄性前核形成の認められた卵はホルモン無添加および添加区で各0%、2%と各16%、19%で成熟培地へのホルモンの添加によって雄性前核形成率は有意に増加した。

表1 ハムスター体外成熟卵の雄性前核形成能に及ぼす成熟培地へのアミノ酸とホルモンの添加効果

成熟培地への添加*		媒精** 卵数	精子侵入 卵数 (%)	雄 性 前 核 の 発 達 段 階 (%)			
アミノ酸	ホルモン			I	II	III	IV
—	—	43	30 (70)	17	83	0	0
4	—	71	49 (69)	10	88	0 <sup>a,c</sup>	2 <sup>a,c</sup>
	+	70	57 (81)	2	63	16 <sup>b</sup>	19 <sup>a,d</sup>
12	—	52	37 (71)	0	48	14 <sup>d</sup>	38 <sup>b</sup>
	+	75	51 (68)	0	23	12	65 <sup>b</sup>

\* 成熟培地へ添加されたアミノ酸とホルモンの種類は材料と方法を参照

a, b;  $P < 0.01$

\*\* 体外成熟率: 74~84%、透明帯除去体外受精法を用いた

c, d;  $P < 0.05$

\*\*\* 雄性前核の発達段階: I~IVは材料と方法および図1を参照

一方、12アミノ酸（上記 4アミノ酸とアラニン、アルギニン、シスチン、ヒスチジン、ロイシン、プロリン、セリン、バリン）の存在下で、ホルモンの無添加および添加区での初期膨化精子頭部および完全な膨化精子頭部の認められた卵は 精子侵入卵37個のうち 各0%、48%と 精子侵入卵51個のうち 各0%、23%であった。仁形成開始膨化精子頭部と雄性前核形成の認められた卵はホルモン無添加および添加区で 各14%、38%、各12%、65%でホルモン添加による有意差は認められなかったが増加する傾向にあった。ホルモンの存在下では、4アミノ酸と12アミノ酸の添加区で雄性前核を形成した卵の割合が19%と65%で、成熟培地への添加アミノ酸数の増加は雄性前核形成卵率を増加させた。

また、これら雄性前核の形成した体外成熟卵は雌性前核の形成が確認された。

## 考 察

ゴールドデン・ハムスター卵胞卵が体外で成熟することは、Haidori & Gwatkin(1973)、Gwatkin & Haidori(1974a,b)、Mandelbaum et al(1977)、Leibfriend & Bavister(1983)によって報告された。本研究では Leibfriend & Bavister(1983)の用いた修正タイロード液を基礎培地とし極体放出した卵胞卵を成熟したと判定した結果74-88%の成熟率で、アミノ酸およびホルモンの有無によって成熟率に差はなかった。

ハムスター体外成熟卵の受精能は体外受精によって検討され、Mandelbaum et al(1977)はハムスター精子が透明帯を侵入できないと報告し、Leibfriend & Bavister(1983)は卵細胞質に侵入しても精子頭部は膨化しなかったと報告した。本研究では、透明帯除去体外受精を行うことで体外成熟卵の卵細胞質が精子頭部を膨化させる能力を得ていること、成熟培地へのアミノ酸の添加によって雄性前核形成が観察されホルモンの存在下ではその効果が増大することを明らかにした。そして、哺乳動物卵胞卵の成熟過程において、アミノ酸の吸収が増大し蛋白質合成が活発になること(Cross & Brinster, 1974; Moor & Smith, 1979)から、成熟培地へのアミノ酸の添加が体外成熟卵に不十分であった雄性前核形成因子の合成のため有効に働いたのかもしれない。

また、性腺刺激ホルモンは体外成熟の過程で卵丘細胞から卵胞卵へのアミノ酸の吸収を刺激すること(Cross & Brinster, 1974)や卵丘細胞群の蛋白質合成を制御すること(Shultz & Wassermann, 1977; Warnes et al, 1977; Landwehelt et al, 1979)が報告されており、本研究でホルモン(LH, FSH, PRL, E2)の添加によって雄性前核形成率がさらに増加したのは、アミノ酸の吸収を刺激し雄性前核形成因子の合成を活発にさせたことが考えられる。体外成熟卵の受精能に及ぼすホルモンの効果に関しては、Shalgi et al(1979)がラットにおいて成熟培地へのLHの添加が有効であると報告し、Ball et al(1983)がウシにおいて成熟培地へのFSH添加が体外成熟卵の受精率を高めると報告した。

最近、マウスで体外成熟培地に血清を添加することで体外成熟卵が排卵卵と同じ割合で胚盤胞に発生すると報告した(Schroeder & Eppig, 1984)が、ハムスターにおいては今のところ血清によって体外成熟卵の受精能を改善したとの報告はない。今後、さらに詳細に検討することが必要と思われる。

## 謝 辞

本研究は、ハワイ大学生殖生物学教室で行ったものである。研究に際して、御指導いただいた柳町隆造教授に感謝いたします。

文 献

- Ball GD, Leibfried ML, Lenz RW, Ax RL, Bavister BD, First NL(1983): Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. Biol Reprod 28:717-725.
- Cross PC, Brinster RL(1970): In vitro development of mouse oocytes. Biol Reprod 3:298-307.
- Cross PC, Brinster RL(1974): Leucine uptake and incorporation at three stages of mouse oocytes maturation. Exp Cell Res 86:43-46.
- Gwarkin RBL, Haidori AA(1974a): Requirements for the maturation of hamster oocytes in vitro. Exp Cell Res 76:1-7.
- Gwarkin RBL, Haidori AA(1974b): Oxygen requirements for the maturation of hamster oocytes. J Reprod Fert 37: 127-129.
- Haidori AA, Gwarkin RBL(1973): Requirement for the maturation of oocytes from preovulatory follicles. J Reprod Fert 35: 173-176.
- Landefeld TD, Campbell KL, Midgley AR(1979): Rapid in the synthesis of specific ovarian granulosa cell proteins induced by hCG. Pro Natl Acad Sci, USA 76:5153-5157.
- Leibfried ML, Bavister BD(1983): Fertilizability of in vitro matured oocytes from golden hamster. J Exp Zool 226:481-485.
- Mandelbaum J, Plachot M, Thibault C(1977): Role of the follicle in zona pellucida maturation of hamster oocytes. Ann Biol Anim Biochim Biophys 17:389-391.
- Moor RM, Smith MW(1979): Amino acid transport in mammalian oocytes. Exp Cell Res 119:333-341.
- Pincus G, Enzmann EV(1935): The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. I. The activation of ovarian eggs. J Exp Med 62:665-675.
- Quinn P, Barros C, Whittingham DG(1982): Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. J Reprod Fert 66:161-168.
- Schroeder AC, Eppig JJ(1984): The development capacity of mouse oocytes that matured spontaneously in vitro is normal. Develop Biol 102:493-497.
- Schultz RM, Wassermann PM(1977): Specific changes in the pattern of protein synthesis during meiotic maturation of mammalian oocytes in vitro. Pro Natl Acad Sci, USA 74:38-541.
- Shalgi R, Dekel N, Kraicer PF(1979): The effect of LH on the fertilizability and developmental capacity of rat oocytes matured in vitro. J Reprod Fert 55:429-435.
- Thibault C, Gerard M(1973): Cytoplasmic and nuclear maturation of rabbit oocytes in vitro. Annls Biol anim Biochim Biophys. 13:suppl.145-156.
- Warnes GM, Moor RM, Johnson MH,(1977): Changes in protein synthesis during maturation of sheep oocytes in vivo and in vitro. J Reprod Fert 49:331-335.
- Yanagimachi R(1982): In vitro sperm capacitation and fertilization of golden hamster eggs in a chemically defined medium. In Hafe ESE, Semm K(eds): "In vitro Fertilization and Embryo Transfer." Lancaster:MTP Press, pp 65-76.



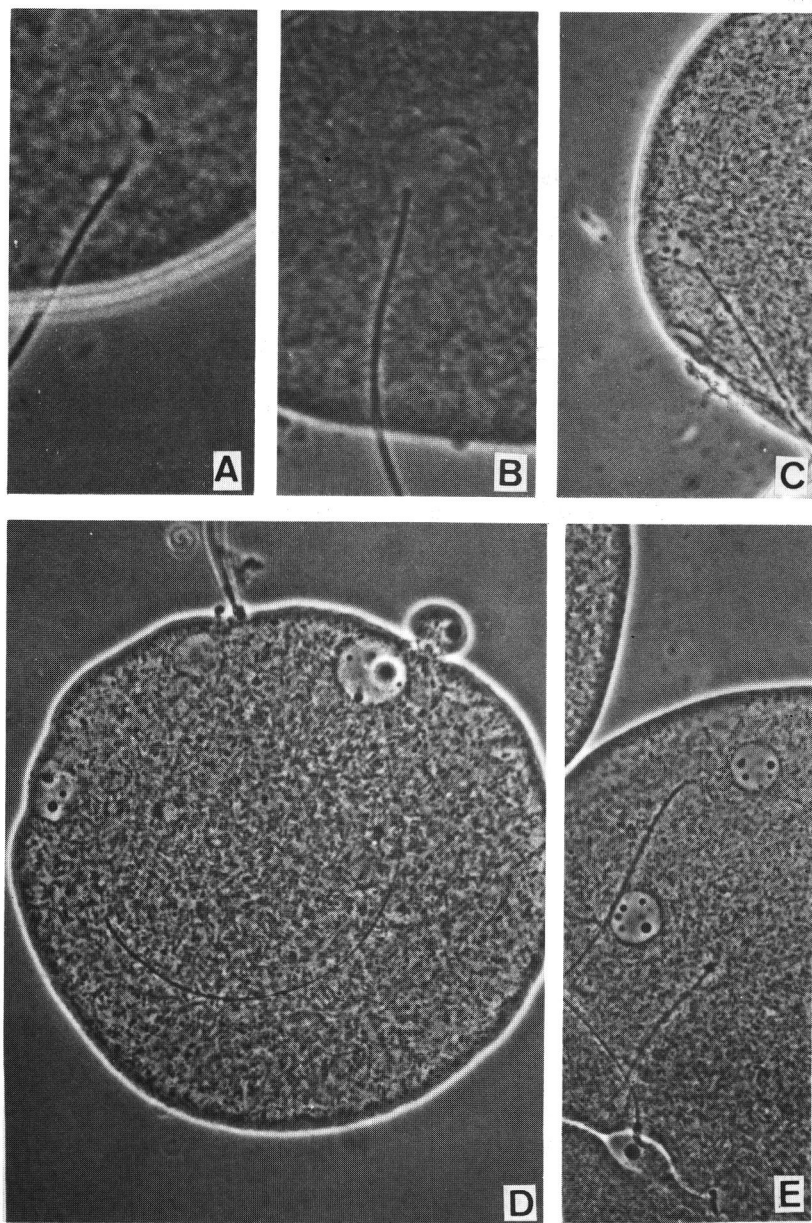


図1 体外成熟卵に侵入した精子頭部の変化；A:膨化直後の精子頭部(I)，  
B:完全に膨化した精子頭部(II)，C:仁の形成が始まった膨化精子頭部(III)，  
D,E:雄性前核(IV)

体外受精由来マウス胚の発生に及ぼす金属-EDTAキレートの影響

Effect of Metal-EDTA chelates on the preimplantation development  
of mouse embryos fertilized in vitro

鈴木宏志※、福田芳詔、豊田裕 §

Hiroshi SUZUKI※ Yoshinori FUKUDA and Yutaka TOYODA §

北里大学獣医畜産学部 家畜育種繁殖学教室

現所属：中外製薬開発研究所※

東京大学医科学研究所 §

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

Present adress: Drug Development Laboratories, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.※

The Insitute of Medical Science, The University of Tokyo §

Summary

In order to test the effect of Metal-EDTA chelate on the preimplantation development of mouse embryos fertilized in vitro, ICR mouse zygotes were cultured with  $10 \mu\text{M}$  Mg-, Ca-, Mn-, Co-, Ni-, Cu-, Zn-, La- or Fe-EDTA in Whitten's medium up to 120hr after insemination. Development to the 4-cell stage of embryos was improved by addition of Mg-, Ca-, La-, or Fe-EDTA in the medium, while Co-, Ni- or Zn-EDTA showed no effect as control medium. At 120hr after imsemination, developmental rates to the blastocyst of the embryos in culture with Mg-(41.7%), Ca-(45.8%) or La-EDTA(68.3%) were not significantly different compared with EDTA control(67.9%). In the presence of Fe-EDTA, ICR embryos overcame the 2-cell block(86.7%) yet most embryos could not developed to the blastocyst stage(10.0%). These results indicated that Ca-, Mg- or La-EDTA was effective to support the preimplantation development in ICR zygotes, and EDTA was effective not only on the second cleavage but also the blastocyst formation.

序論

体外受精由来マウス胚の培養において、卵子提供雌の系統によって2細胞期で発生の停止が起こる

(2-cell Block)こと〔1,2〕、および培地へのEDTAの添加により4細胞期への発生が改善され、胚盤胞への発生が可能になることが知られている〔3,4〕。また、EDTA添加培地で発生した胚盤胞の移植による正常産仔への発生も確認されているが〔5,6〕、'2-cell Block'の原因ははまだ明らかにされていない。また、EDTAの作用機序については、EDTAが培養液中の $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 以外の重金属を除去することにより、2細胞期以降の発生を改善するとも考えられているが、その証拠は得られていない。本実験では、種々の金属-EDTAキレートが、体外受精マウス胚の発生を改善するか否かについて検討した。

### 材料および方法

実験にはすべてJcl:ICR 成熟マウスを用いた。卵子は、PMSGおよびhCG 各5i.u. を48時間間隔で腹腔内注射して、過排卵処理を施した成熟雌マウスの卵管膨大部から、hCG 注射後15-16 時間に採取した。精子については、成熟雄マウスの精巢上体尾部より採取し、2時間のブレインキュベート後、卵子を含む0.4ml のWhitten's 培地〔7〕に添加することにより体外受精を行った。精子および卵子の培養条件は、37°C、5%CO<sub>2</sub>、95% 空気とした。次いで、授精後5-6 時間に、第2極体の放出および雌雄の両前核が認められた卵子を、10  $\mu$ M の濃度のEDTA(2Na) または各種金属-EDTAキレート(Mg-, Ca-, Mn-, Co-, Ni-, Cu-, Zn-, La-およびFe-EDTA)を含むWhitten's 培地に移し換え、授精後120 時間まで培養した。また、100  $\mu$ M の濃度のEDTAおよびLa-EDTA の効果についても比較検討した。

### 結果および考察

各種金属-EDTAキレート存在下におけるICR マウス体外受精卵の培養成績は、Table 1 に示す通りであった。授精後24時間における2細胞期への発生は、各金属-EDTAキレート区では88.3% ~100%で、EDTA区および対照区のそれぞれ98.8% および92.3% との間に有意差は認められなかった( $P>0.05$ )。授精後48時間に4細胞期に発生した胚の割合は、La-, Mg-, Ca- およびFe-EDTA 区では、それぞれ96.7%, 77.1%, 83.3% および86.7% とEDTA区(97.6%) に対して有意差のない値( $P>0.05$ ) であった。一方、Mn-, Co-, Ni-, Cu- およびZn-EDTA 区では、それぞれ42.2%, 10.0%, 22.5%, 46.2%および0%で、EDTA区に比較して明らかに低く、特にCo- およびNi-EDTA 区では対照区(15.0%) と差のない値( $P>0.05$ ) であり、Zn-EDTA 区では有意に低い値であった。授精後120 時間における胚盤胞への発生率は、Mg-(41.7%), Ca-(45.8%) およびLa-EDTA(68.3%)区で高く、EDTA区(67.9%) と比較して差のない値であった( $P>0.05$ )。また、Zn-EDTA 区では4細胞期以降およびCo-EDTA 区では胚盤胞への発生が全く観察され

なかった。10  $\mu$ M の濃度の金属-EDTAキレートの中で最も高率な胚盤胞への発生を示したLa-EDTA は、100  $\mu$ M の濃度においても良好な成績であり (Table 2)、EDTAと同等にICR 胚の4細胞期以降への発生を促した。

Table 1 Effect of various metal-EDTA chelates on the development of ICR mouse embryos fertilized in vitro

Metal-EDTA chelate (10 $\mu$ M)	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to :		
		2-cell (24hr) <sup>1)</sup>	4-cell (48hr) <sup>1)</sup>	Blastocyst (120hr) <sup>1)</sup>
Mg-EDTA	48	47(97.9) <sup>a</sup>	37(77.1) <sup>b</sup>	20(41.7) <sup>b</sup>
Ca-EDTA	48	48(100) <sup>a</sup>	40(83.3) <sup>b</sup>	22(45.8) <sup>b</sup>
La-EDTA	60	59(98.3) <sup>a</sup>	58(96.7) <sup>b</sup>	41(68.3) <sup>b</sup>
Mn-EDTA	45	44(97.8) <sup>a</sup>	19(42.2)	3( 6.7) <sup>a</sup>
Fe-EDTA	60	60(100) <sup>a</sup>	52(86.7) <sup>b</sup>	6(10.0) <sup>a</sup>
Co-EDTA	60	53(88.3) <sup>a</sup>	6(10.0) <sup>a</sup>	0( 0 ) <sup>a</sup>
Ni-EDTA	40	36(90.0) <sup>a</sup>	9(22.5) <sup>a</sup>	3( 7.5) <sup>a</sup>
Cu-EDTA	52	50(96.2) <sup>a</sup>	24(46.2)	12(23.1)
Zn-EDTA	69	62(90.0) <sup>a</sup>	0( 0 )	0( 0 ) <sup>a</sup>
EDTA(2Na)	84	83(98.8) <sup>a</sup>	82(97.6) <sup>b</sup>	57(67.9) <sup>b</sup>
Control	247	228(92.3) <sup>a</sup>	37(15.0) <sup>a</sup>	8( 3.2) <sup>a</sup>

1) Hours after insemination.

Values with the different superscripts are significantly different in the same column at  $p < 0.05$ .

Table 2 Effect of EDTA and La-EDTA on the preimplantation development of ICR mouse embryos fertilized in vitro

	No. of embryos cultured	Developmental stage (%)				
		2-cell (24hr) <sup>1)</sup>	4-cell (48hr) <sup>1)</sup>	Morula (72hr) <sup>1)</sup>	Blastocyst (96hr) <sup>1)</sup>	Blastocyst (120hr) <sup>1)</sup>
EDTA(2Na) <sup>2)</sup>	60	58(96.7)	54(90.0)	43(71.7)	45(75.0)	51(85.0)
La-EDTA <sup>2)</sup>	60	59(98.3)	58(96.7)	47(78.3)	50(83.3)	56(93.3)
Control	97	92(94.8)	18(18.6)	1( 1.0)	0( 0 )	1( 1.0)

1) Hours after insemination.

2) 100  $\mu$ M

以上の成績より、ICR マウス体外受精卵の4細胞期以降への発生がEDTA(2Na)のみならず、他の金属EDTAキレートでも改善されることが知られた。また、発生が改善されなかった金属キレートの場合でも、その効果にはそれぞれ特徴があることが知られた。特にFe-EDTA の'2-cell block'克服の顕著な効果(86.7%)にもかかわらず、胚盤胞への発生率が低率(10.0%)であったことは、桑実胚から胚盤胞への発生が第2卵割とは異なった機序により進行することを示唆しており、EDTAの作用は第2卵割を促すのみならず、胚盤胞への発生あるいは胚盤胞形成に対しても、何らかの作用を有するものと考えられる。

本研究の概要は、日本畜産学会創立60周年記念第76回大会で発表した。

#### 要約

ICR マウス体外受精由来胚の発生に及ぼす種々の金属-EDTA キレートの効果を検討した。授精後6時間に、前核期の体外受精卵を $10\mu\text{M}$ の濃度のMg-,Ca-,Mn-,Co-,Ni-,Cu-,Zn-,La-あるいはFe-EDTAを含むWhitten's 培地に移し換え、授精後120時間まで培養した。授精後24時間における2細胞期への発生は、各区とも高率(88.3~100%)であった。授精後48時間に4細胞期へ発生した胚の割合は、Mg-(77.1%),Ca-(83.3%),La-(96.7%)およびFe-EDTA 区(86.7%)でEDTA(2Na) 区(97.6%)と比較して有意差のない値であったが、Co-,Ni- およびZn-EDTA 区では、EDTA無添加の対照区と同等あるいはそれ以下の成績であった。授精後120時間における胚盤胞への発生率は、Mg-(41.7%),Ca-(45.8%)およびLa-EDTA 区(68.3%)で、EDTA区(67.9%)と有意差のない値であったが、他の区では対照区と同様な低値を示し、特にCo- およびZn-EDTA 区では胚盤胞への発生は全く見られなかった。また、Fe-EDTA 区では2-cell blockの克服を示したものの、胚盤胞への発生は低率(10.0%)であった。

#### 文献

- [1] Biggers, J.D. (1971) New observations on the nutrition of the mammalian oocyte and the preimplantation embryo. In: The Biology of the Blastocyst. ed, Blandau, R.J. The University of Chicago Press, Chicago, 319-327.
- [2] Whitten, W.K. and Biggers, J.D. (1968) Complete development in vitro of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. J. Reprod.

Fert. 17,399-401.

- [ 3] Abramczuk, J., Solter, D. and Koprowski, H. (1977) The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. Dev. Biol. 61, 378-383.
- [ 4] 星雅樹、豊田裕 (1985) 体外受精に由来するマウス胚の発生におよぼすEDTAの効果、日畜会報 56, 931-937.
- [ 5] 木村資亜利、小島博子、横山峯介、勝木元也 (1985) マウス受精卵の体外培養法の検討、哺乳卵研誌 2, 43-44.
- [ 6] Suzuki, H. and Toyoda, Y. (1986) Normal young from in vitro fertilized mouse embryos developed in a medium supplemented with EDTA and transferred to pseudopregnat recipients. J. Mamm. Ova Res. 3, 78-85.
- [ 7] Whitten, W. K. (1971) Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro. Advan. Biosci. 6, 129-141.





凍結・融解したラット卵巢の卵巢嚢内への移植

利部 聰・牧田 登之・萬場 光一・石田 哲也

山口大学農学部獣医学科

Transplantation of rat ovary into ovarian bursa  
after freezing and thawing

KAGABU Satoshi, MAKITA Takashi, MAMBA Kouichi and ISHIDA Tetsuya

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

S u m m a r y

A study has been made of the viability of rat ovarian tissue after exposure  
-196℃. The ovaries were plunged into LN<sub>2</sub> directly after soaking in the  
vitrification solution(Rall & Fahy, 1985). After thawing and transplantation,  
such tissue formed functional grafts in the ovarian bursa of the ovariecto-  
mised donors, and ovulated.

生殖期間中の総排卵数は、卵巣に存在する卵細胞のわずか0.01%であり、99.9%が閉鎖卵胞となる (Hirshfield & Midgley, 1978)。卵細胞の効率的採取を目的として、過排卵誘起処理を繰り返し行ってもわずかに増加するだけで、排卵数は卵巣のもつ能力のごく一部を引き出しているにすぎない。近年の発生工学の進歩はめざましく、実験材料である卵子の不足が深刻な問題となりつつある。卵巣の凍結保存-培養-排卵系または凍結保存-移植系を確立すれば、卵巣から多数の卵子を効率よく得られるようになり、卵子不足の解決する可能性がでてくる。卵巣の凍結保存に関連した研究は、1960年代まで多く行われたが、当時はまだ発生工学の今日のような発展はなく、その後この種の研究は少なくなった。

一方、卵子の凍結保存法は改良が積み重ねられ、凍結保護剤を浸透させたあと直接液体窒素に投入する超急速無段階凍結法がRallとFahy(1985)によって確立された。この凍結法を応用してラットの卵巣を凍結し、移植後組織が生着したとの報告がなされた (利部ら、1987)。

RallとFahyの方法は、従来のようにプログラムフリーザーを必要とせず、液体窒素保管器があれば屠場で採取された卵巣もその場で凍結保存することも可能であるので、今後この方法は利用価値が高まると予想される。本研究は、RallとFahyの方法を卵巣の凍結保存法として適応させるために種々な条件下で卵巣を凍結し融解後卵巣嚢内に移植し生着状態・排卵の有無を調べたものである。

## 材料および方法

### 供試卵巢

ウイスター・今道系ラット（九動から導入）の交配後22日目の胎児卵巢45個を用いた。麻醉下で卵巢を取出し、だだちに室温に暖めたリン酸緩衝培養液（以下PB1、Quinnら、1982）中で、卵管・卵巢囊・脂肪塊を除去した後ふたたびPB1で洗浄し供試した。

### ガラス化凍結液

RallとFahy(1985)の方法に準じて調整した。0.4%w/vウシ血清アルブミンを含んだPB1に、凍結保護剤として20.0%w/vDMSO、15.5%w/vアセトアミド、10.0%w/vプロピレングリコール、6.0%w/vポエチレングリコール（分子量7800-9000）を添加してガラス化凍結液（以下VS1と略す）とした。

### 脱水・凍結法

#### 実験1

胎児卵巢をセラムチューブ（住友ベークライト、1.8ml）内で脱水した。VS1 12.5%を含む室温PB1（12.5%VS1）に15分間、室温25%VS1に15分間、さらに氷冷した50%VS1、100%VS1にそれぞれ静置して脱水処理とした。凍結は、0.5ml精液用ストローに移しかえ、直接液体窒素に投入して行った。凍結融解後の卵巢組織内にできる氷晶を観察するため、常法による透過型電子顕微鏡（TEM）での観察を行った。

#### 実験2

凍結保護剤の浸透時間を各V S 1濃度とも30分間とした。その他の方法は、実験1と同様である。

### 実験3

凍結保護剤の浸透を良くするために卵巣をセラムチューブに入れた状態にしてスターラーで3回/秒、15分間攪拌した。温度設定およびその他の方法は、実験1と同様である。

### 実験4

Whittingham ら(1979)のマウス胚の凍結方法によった。すなわち0℃で3<sub>M</sub>DMSOを添加し-6℃で植氷後-30℃まで0.3~1℃/分で冷却したのち液体窒素で凍結した。

### 融解・凍結保護剤の除去

実験1-2では、液体窒素中で6-7日間保存した卵巣を、氷水中で激しく振とうして融解した。融解後ただちに氷冷した50%V S 1、25%V S 1にそれぞれ10分間静置後室温P B 1で2回洗浄して凍結保護剤処理とした。実験3では、スターラーで攪拌して除去処理を行った。温度設定は、実験1-2と同様である。また、実験4においては、融解後P B 1で2回洗浄して移植した。

### 移植

宿主として同系統のウイスター・今道ラットを用い、野口・野口(1982)の方法によって移植した。最初に、卵巣囊の切開部分をできるだけ小さくして、卵巣囊の内部で卵巣門を切断して宿主の卵巣を完全に除去した。次に凍結・融解卵巣を止血剤および支持体としてスポンゼル(山之内製薬)にのせ移植した。卵巣囊切開部は縫合せずにそのまま

の状態で腹腔内に戻した。なお、卵巣の移植は片側だけに行った。

### 移植した卵巣の生着

移植後約6週間目の発情後期に生着を判定した。卵巣は卵巣嚢とともに常法によりパラフィン連続切片にして、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 Tsafiriri(1980)の基準にしたがった。すなわち、顆粒膜細胞に核濃縮、卵胞腔中に細胞屑が観察されるものは閉鎖卵胞と判定した。

### 結 果

Table1. Viability of frozen ovarian tissue after transplantation in rats

	Ovaries with non-atretic follicles	Ovaries transplanted	Follicles $\geq 50 \mu m$	Living ovary	Rats ovulated
Exp. 1	13	15	22	5	6
Exp. 2	10	15	19	4	2
Exp. 3	14	15	37	6	3

Table 1 および Fig.1 ~ 4 にその概要を示した。生着卵胞は、卵巣の周辺部に多数観察された。

## 考 察

ParkesとSmith(1953)は、ラット卵巢を $-79^{\circ}\text{C}$ で凍結後移植して 卵母細胞の再形成を観察して卵巢の凍結保存のさきがけとなった。その後 Deansley(1954, 1957)、Greenら(1956)、Parrott(1958)、Parrott とParkes(1960)が 実験動物の卵巢の凍結保存を報告している。最近になってDaniel(1987)がウシ卵巢を凍結し融解後培養して元どおりに回復させた。これらの報告はすべて冷却過程を数段階に分け、それぞれに冷却速度を設定したものであって、操作は簡単であるとはいえない。卵子の凍結保存の分野では凍結法の簡略化が検討されている。ガラス化法により組織を脱水し、そのまま 直接 $\text{LN}_2$ へ投入する超急速無段階凍結法が Rall と Fahy(1985)によって開発され操作が大幅に簡略化された。この無段階凍結法を卵巢の凍結に応用し、皮下移植後生着した組織が観察されている (利部ら、1987)。

これをうけて、本実験では凍結卵巢を卵巢嚢へ移植し生着を試みた。その結果、凍結・融解卵巢は卵巢嚢内で生着し、排卵が観察された個体も認められた。また同時に Whittingham(1979) のマウス胚に用いた3段階凍結法をラット卵巢に応用してみたが、この方法によっても生着、しこれら2方法間では卵巢の生着にあきらかな差異がなく、本法は卵巢を短時間に凍結できる方法であることが示唆された。しかし、問題点がないわけではない。6週齢ラットに存在する卵胞は  $250\mu\text{m}$ 以上のものでも卵巢当たり28個に達する (利部、1983)が、移植後生着した卵胞はこれに比べて少ないことが指摘できる。また、生着卵胞の多くは、卵巢の周辺部に認められたが、中心部の卵胞はほぼ壊死していた。この原因としては凍結・融解時の卵巢内部の氷晶による障害が考えられたの



で、融解後の卵巣をTEMで観察してみたところ、15分静置区では卵巣の中心部に近づくほど氷晶形成によると思われる空胞が多く見られ、凍結保護剤の浸透が不足しているように考えられた。そこで、保護剤を卵巣中心部まで浸透させる目的で、①静置時間の延長、②スターラーによる攪拌を試みた。その結果双方とも生着に好影響を及ぼさなかった。今後卵巣を細切するなどして凍結保護剤の浸透性を高める方法を検討しなければならない。また、この点に関しては移植卵巣の中心部へ栄養がゆきわたらないことも原因として考えられる。さらに他の原因も考えられるが、本実験の成績から断定はできない。

以上のことより、卵巣の凍結保存に超急速無段階凍結法は、有効な手段であることがあきらかとなり、屠場等の現場で短時間にしかもプログラムフリーザーのような特別な設備がなくても卵巣を凍結保存でき、融解後卵巣嚢内で再び機能を回復できる可能性が示唆された。

- Braw, R. H. and Tsafiri, A. (1980). J. Reprod. Fert., 56, 267.
- Daniel, J. C. Jr. and Juneja, S. C. (1987). Theriogenology, 27, 220.
- Deanesly, R. (1954). J. Endocrin., 11, 197.
- Deanesly, R. (1957). Proc. roy. Soc., B, 147, 412.
- Green, S. H., Smith, A. U. and Zuckerman, S. (1956). J. Endocrin., 13, 330.
- Hirshfield, A. N. and Midgley, A. R. Jr. (1978). Biol. Reprod., 19, 597.
- 利部 聰 (1983). 日不妊誌, 28, 505.
- 利部 聰・牧田 登之・萬場 光一 (1987). 昭和62年秋季繁殖学会.
- 野口 基子・野口 武彦 (1982). 実験生殖生理学の展開, 鈴木 善祐編, ソフトサイエンス社.
- Parkes, A. S. and Smith, A. U. (1953). Proc. roy. Soc. B, 104, 455.
- Parrott, D. M. V. (1958). Study on Fertility, 9, 137.
- Parrott, D. M. V. and Parkes, A. S. (1956) Brit. vet. J., 112, 550.
- Rall, W. F. and Fahy, G. M. (1985) Nature, 313, 573.
- 菅原 七郎 (1986). 図説 哺乳動物の発生工学実験法, 菅原 七郎編, 学出版センター.
- Whittingham, D. G. (1971). Nature, 233, 125.
- Whittingham, D. G., Wood, M., Farrant, J., Lee, H. and Halsey, J. A. (1979). J. Reprod. Fert., 56, 12.

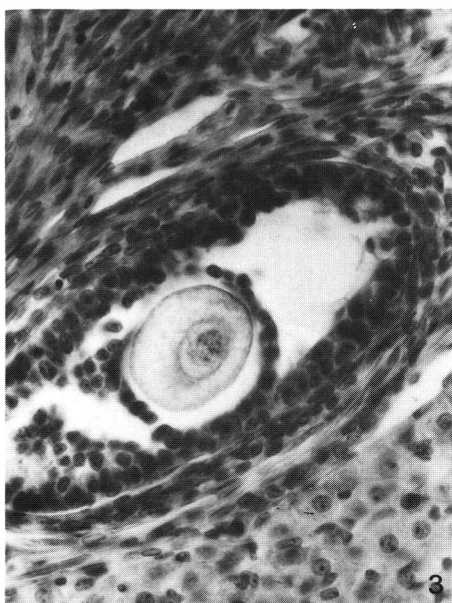
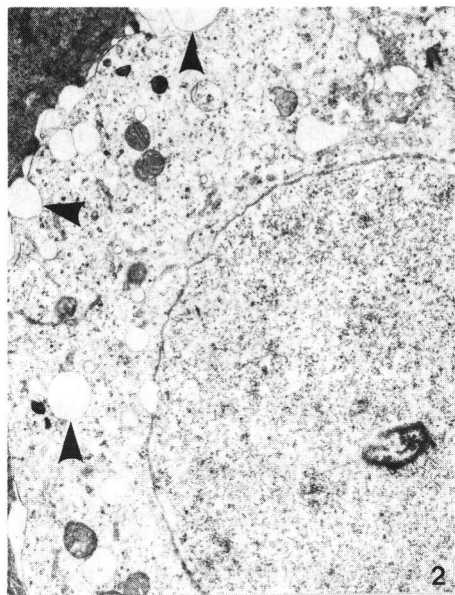
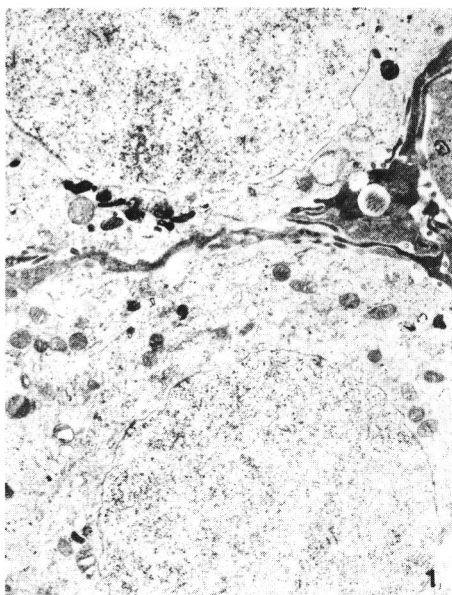


Fig. 1 In the segment of intact rat ovary, there appeared to be no additional damage.

Fig. 2 In the specimens which had been freezed and thawed, varying amount of vacuoles (allow) were seen.

Fig. 3 Six week after homoioplastic-transplantation into ovarian bursa, follicles appeared non-atretic.

Fig. 4 An example of the ovulated ovum(allow) in transplanted ovary.



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 聡、中村のゆみ、高橋寿太郎、安田泰久

Satoshi SOETA, Noyumi NAKAMURA, Jutarō 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

Summary

Interspecific chimaeric blastocysts (mouse↔rat, mouse ↔hamster, rat ↔hamster) were produced in the present experiment. Feulgen staining of nuclei and scanning electron microscopic observations of the chimaeric embryos were undertaken to analyse the origin of trophoblast cells, cell distribution and the interaction between cells derived from different species.

In Feulgen nuclear reaction, the cells derived from mouse, rat and hamster were distinguished by observation of its nuclear size, and the shade of stained nuclei in chimaeric embryos. The cells derived from mouse had large nuclei which were homogeneously stained. The cells derived from rat had various size of nuclei which were smaller than those derived from mouse and were unevenly stained. The cells derived from hamster had small nuclei which were homogeneously stained.

Observation with SEM showed the difference among the cells derived from each species embryos in density of microvilli on the surface of trophoblast cells. Trophoblast cells of which surface was covered with few microvilli were derived from mouse embryo. Dense microvilli were found on the surface of the cells derived from rat embryo. The cells derived from hamster were covered with many microvilli which were thicker and shorter than those of mouse or rat.

In chimaeric blastocysts, trophoblast cells derived from each embryos distributed in groups at random regardless of their polarity.

## 緒言

当研究室では、発生初期段階における、遺伝的に由来を異にする細胞集団の相互認識を解析する目的で、異種間キメラ胚の作成を試みてきた(1)。この結果、光学顕微鏡下における経時的な観察により集合胚盤胞への高い発生率が確認された。しかしキメラ初期胚の細胞構成を解析するためには、各々の細胞集団に特異的な標識が必要である。現在ではGPI (glucose phosphate isomerase) 等の酵素群を用いての生化学的な定性的解析が広く行われているが、細胞間の立体構成の把握は不可能である(2)。このためには種特異的な形態上の標識が必要となる。Tachi&Tachi は、マウス、ラット間集合胚の超薄切片を観察し、特異的な細胞内微細構造を指標として、各細胞の由来と、その分布状態を判定している(3)。本研究では、より簡易な方法である、フォイルゲン反応、走査型電子顕微鏡(以下SEM)を用いて、胚の核の染色性、栄養膜細胞の表面構造を観察し、同一培養系におけるマウス、ラット、ハムスター胚の形態学的な差異を確認した。そしてこれらを指標に、各動物間集合胚の細胞群の識別、立体的な配置、および細胞間相互作用の解析を試みた。

## 実験材料及び実験方法

実験には当研究室においてクローズド・コロニーで継代繁殖している、Wistar系ラット、ICR/Jcl系マウス、ゴールデンハムスターの成熟雌を使用した。

管理交配を行い交配確認日を0日目とし、マウス、ハムスターは2日目、ラットは3日目の16:00~19:00 に放血屠殺後、摘出子宮を灌流することによって8~16細胞期胚を得た。採取した胚は0.3%プロナゼ溶液に移すことによって透明帯を除去後、37℃、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。

また透明帯除去胚を集合接着することにより、マウス、ラット、ハムスター間集合胚を作成した。胚の接着は0.3%植物性凝集素溶液を用いて行い、接着後、単独胚と同様の条件下で培養した。

単独胚、集合胚は、6、12、24、48時間培養後、光顕下で観察し、それぞれフォイルゲン反応、走査型電子顕微鏡の試料に供した。

フォイルゲン反応はホールマウント法によって、SEMはグルタルアルデヒド固定後、常法に従って標本を作成した。

## 結果

### 1. フォイルゲン反応

対照として、マウス、ラット、ハムスターの培養12時間後の胚を染色した。3者を比較してみると、マウス胚は核が大きく均一に染色されているのに対し、ラット胚では核の大きさに差があるものの、

一般にマウスに比べて小さく、染色性も均一ではなかった。またハムスター胚の核は、マウス、ラットよりも小さく、大きさ、染色性は均一であった。

これらの核の大きさ、染色性を指標に培養12時間後の集合胚の細胞分布を識別することができた。すなわち、マウス⇄ラット間集合胚では、均一に染色された大きな核を持つマウス由来細胞と、核が小さく染色性が不均一なラット由来細胞の細胞分布が観察される。同様にマウス⇄ハムスター、ラット⇄ハムスター間集合胚においても、小さく均一に染色された核を持つハムスター由来細胞群の分布状態を見ることができる。各動物由来細胞は群をなし集塊状に分布していた (Fig. 1)。

培養48時間後では、同様に、マウス⇄ラット間集合胚において、栄養膜細胞での細胞識別は可能であったが、内部細胞塊の両者の核の同定は困難であった。マウス⇄ハムスター、ラット⇄ハムスター間集合胚は、例数が不十分であり、標本作成に至らなかった。

## 2. SEMによる観察

培養12時間後において、マウス胚では、割球表面は丘状に盛上がって皺壁状を呈しており、微絨毛はほとんど認められなかった。ラット胚では表面に微絨毛が密生し、割球もマウス胚に比べ平盤状に近い。ハムスター胚にみられた微絨毛は太く短いのが特徴的であり、ラット胚と同様に密生していた。同じ傾向は、24、36時間後の各胚にも見うけられた。細胞表面の微絨毛の密度は、マウスとラット、マウスとハムスター間で有意差があり (Table. 3)、微絨毛の密度と形態を指標とした集合胚の細胞分布の解析が可能であった。マウス⇄ラット間集合胚では、微絨毛の密生した細胞群と、微絨毛のほとんどみられない細胞群が混在しているのが観察され、マウス、ラット由来細胞が識別された (Fig. 2)。また、マウス⇄ハムスター間集合胚でもハムスターに特徴的な太く短い微絨毛を持つ細胞群が識別された (Fig. 3)。

Fig. 4 は統合発生した集合胚のうちの5例であり、表面の細胞分布をSEMにより観察し、まとめた模式図である。由来の異なる細胞は、それぞれ規則性を持たずに群をなして分布し、モザイク状を呈することはなかった。

## 考察

各動物由来識別の標識となった細胞表面微絨毛は栄養膜細胞の分化がおこる以前から存在し、発生の段階で密度と形状に変化がみられるが、胚盤胞では栄養膜細胞の外側全体に存在する。この微絨毛は、栄養膜細胞表面に増加する糖物質とともに着床を助ける (5)。

Fig. 4 に示されているように、培養12時間後のマウス⇄ハムスター集合胚では、すでに胚の統合がおこなわれていた。同時期のマウス⇄ラット間集合胚と比較すると非常に早い時期に統合されたことがわかる。マウス、ラットの培養12時間後の胚は、通常、桑実胚あるいは初期胚盤胞であるため、桑



実胚を経ないで胚盤胞になるハムスター胚の影響を受け統合が早まった可能性がうかがわれる(6)。培養36時間後の同集合胚では、ハムスター由来細胞の占める領域が狭かったが、これは、同培養系でのハムスター胚の発生率が低いこと(Table. 1, 2)、およびハムスター胚の発生様式の違いに原因があると考えられる。マウス⇄ラット間集合胚においては、マウス由来細胞の優位に分布している例が多く、本培養系でのマウス胚の発生分化速度は、他の2者よりも速いのではないと思われる。どの例においても各動物由来細胞は群を成して分布し、ランダムなモザイク状を呈しているものはなかった。細胞間相互作用は正常に働き、各由来細胞が混在した正常な胚盤胞を形成しており、このため、胚の統合が行われた時期には、分化の発生調整能が失われておらず、また、自己および非自己の識別能がなかったのではないかとかんがえられる。

以上のことより、フォイルゲン反応による核染色、SEMを用いての栄養膜細胞表面微絨毛の観察は、異種間集合胚の確認、細胞構成の解析に有効であることが示唆された。

本研究は昭和60年度文部省科学研究費補助金、一般研究(C)『異種間動物のキメラ胚作成による類縁性の解析』(課題番号60560271)の一部である。

Table 1. Development of mouse and rat 8-16-cell stage embryos and hamster 8-cell stage embryos in vitro.

Species	No. of embryos	Developmental stages (Cultured Time)		Degeneration (%)
		Morula (%) (12hr.)	Blastocyst (%) (24hr.)	
Mouse	57	4 (7.0)	51 (89.5)	2 (3.5)
Rat	23	1 (4.3)	21 (91.3)	1 (4.3)
Hamster	12	—	5 (41.2)	7 (58.3)

Table 2. Development of intraspecific and interspecific aggregated embryos in vivo.

Types of aggregated embryos	No. of aggregated embryos	Developmental stages (Cultured time)		Disintegrated (%)
		Morula (%) (12hr.)	Blastocyst (%) (24hr.)	
Intraspecific				
M ⇄ M	37	1 (2.7)	31 (83.8)	5 (13.5)
R ⇄ R	23	3 (13.0)	16 (69.6)	4 (17.4)
H ⇄ H	52	17 (32.7)	0	35 (67.3)
Interspecific				
M ⇄ R	51	1 (2.0)	39 (76.5)	11 (21.5)
M ⇄ H	31	2 (6.5)	2 (6.5)	27 (87.0)
R ⇄ H	34	5 (14.7)	—	29 (85.3)

M ; mouse R ; rat H ; hamster

Table 3. The number of microvilli on the surface of embryos. (microvilli/25  $\mu$  m<sup>2</sup>)

species	Cultured time			
	6 hr.	12hr.	24hr.	36hr.
Mouse	42.44 $\pm$ 10.24	19.00 $\pm$ 1.00	30.00 $\pm$ 2.00	27.37 $\pm$ 5.42
Rat		69.16 $\pm$ 10.88**		122.00 $\pm$ 2.00**
Hamster		48.25 $\pm$ 12.41*		61.00 $\pm$ 18.67*

\*  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with mouse

Fig.1 Aggregated embryos after 12 hours in culture. Adhered to slide glass by whole mount method; fixed in 10% formalin solution; stained with Feulgen reaction.  $\times 400$

Aggregated embryo (mouse  $\leftrightarrow$  rat) shows various size of mixed nuclei derived from mouse (large arrow) and rat (small arrow).

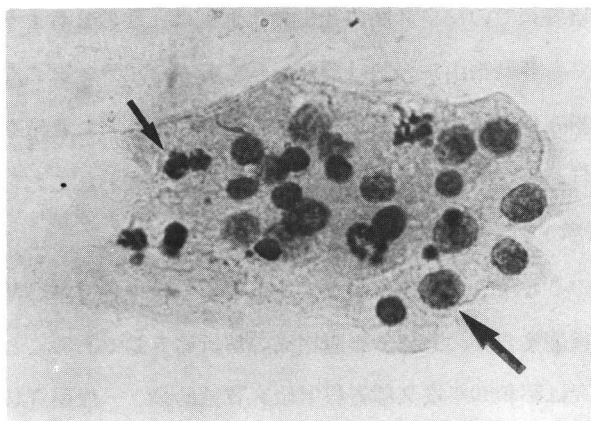


Fig.2 Scanning electron micrograph of aggregated embryo (mouse  $\leftrightarrow$  rat) after 36 hours in culture. Completely integrated expanded blastocyst. Surface of embryo is covered with two types of cells. A group of cells of which surface is densely covered with microvilli (upper half portion of embryo) is derived from rat embryo. The other group of cells of which surface (lower half portion of embryo) is covered with few microvilli are derived from mouse embryo.

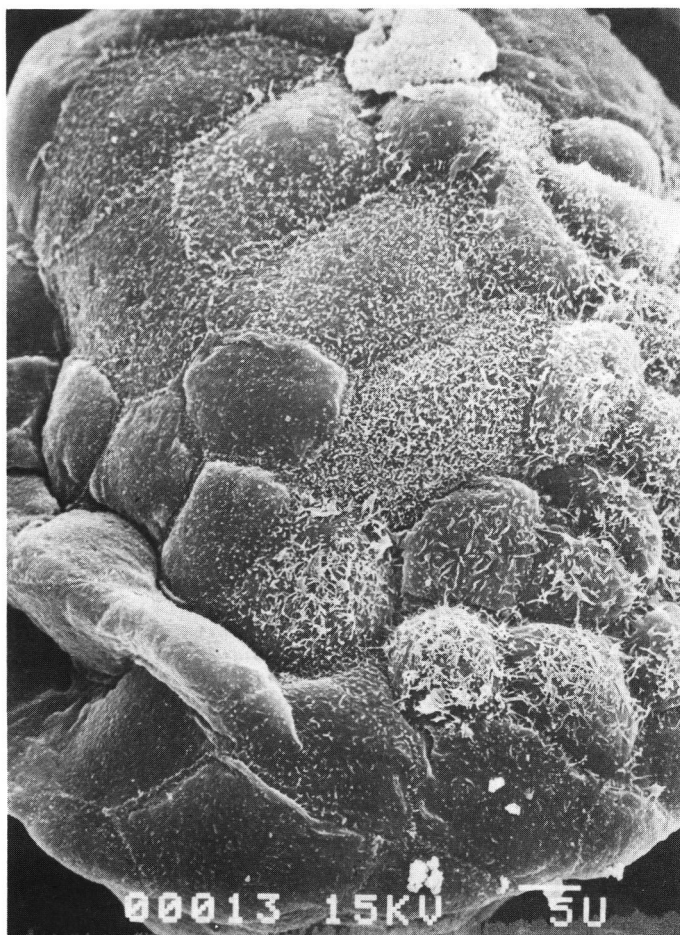
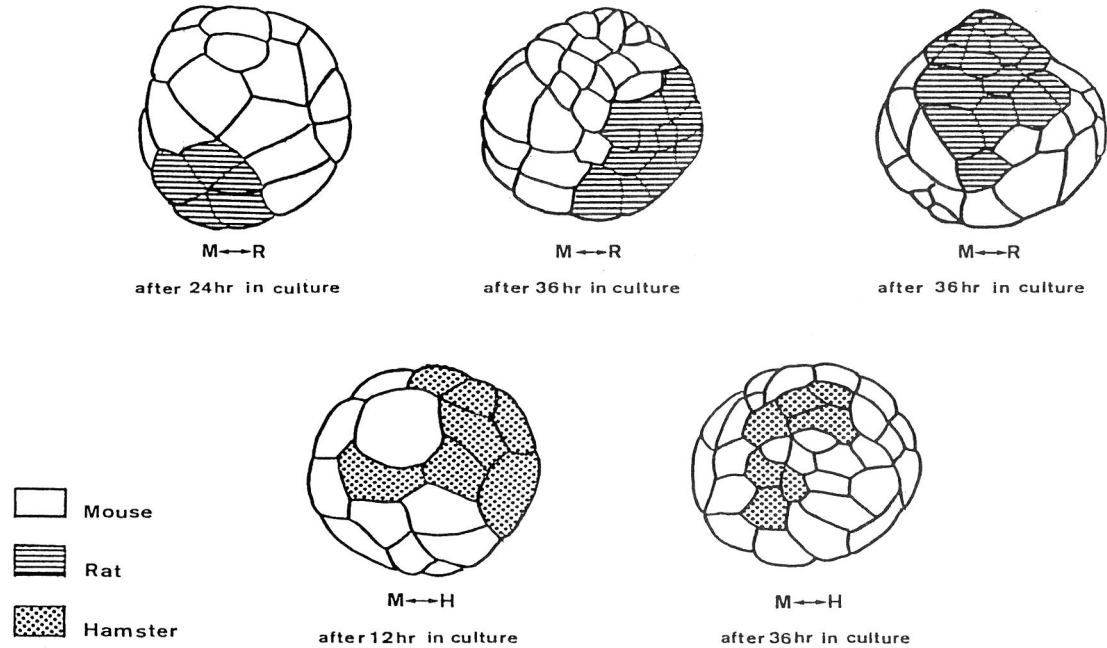


Fig. 3 Scanning electron micrograph of aggregated embryo (mouse  $\leftrightarrow$  hamster) after 12 hours in culture. Complete integrated embryo shows two types of cells. The cells of which surface is covered with microvilli are derived from hamster embryo. The cells of which surface is covered with few microvilli are derived from mouse embryo.



Fig. 4 Distribution of the cells derived from each species in chimaeric embryos



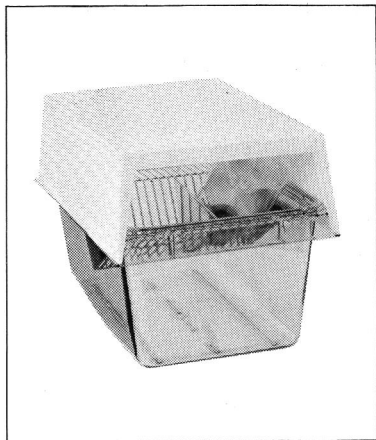
文献

- (1) 高橋文明 (1986). 岩手大学大学院修士論文 哺乳類受精卵の体外培養に関する研究: 異属及び異科間 (マウス、ラット、ハムスター) のキメラ胚の作成
- (2) Peterson, A. C., Frair, P. M. and Wong, G. G. (1978). Technique for detection and relative quantitative analysis of glucose phosphate isomerase isozymes from nanogram tissue samples. *Biochem. Genet.*, 16, 681~690.
- (3) Tachi, S. and Tachi, C. (1980). Electron microscopic study of chimaeric blastocysts experimentally produced by aggregating blastomeres of rat and mouse embryos. *Develop. Biol.*, 80, 18~27.
- (4) Mintz, B. (1962). Formation of genotypically mosaic embryos. *Amer. Zool.*, 80, 18 ~27.
- (5) Mintz, B. (1962). Experimental study of the developing mammalian egg: removal of the zona pellucida., *Science*, 138, 594~595.
- (6) Bavister, B. D., Leibfrid, M. L. and Leiberman, G. (1983). Development of preimplantation embryos of Golden hamster in a defined culture medium. *Biol. Reprod.*, 28, 235~247.

**NEW!**

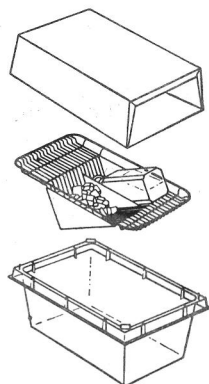
# M-7 (Isocage & Isocap)

## マウス用 **アイソレーションケージ**



### 特長

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



OKAZAKI

**岡崎産業株式会社**

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



また一歩、母乳に近づきました  
ラクトフェリンは、赤ちゃんを  
病気から守る感染防御物質  
です。  
森永 B F - L ドライミルクは  
赤ちゃんのおなかに大切な  
ビフィズス菌を増やすラクチュ  
ロース、赤ちゃんの脳や神経  
の発育に大切なタウリンも配  
合しました。



母乳に多い  
感染防御因子  
**ラクトフェリン新配合**

新製法で、さらに  
溶けやすくなりました



母乳に多いラクトフェリン新配合で赤ちゃんすこやか

**森永 B F - L ドライミルク**



森永乳業

マウス着床期胚におけるフィブロネクチン(FN)の意義と  
体外培養が胚のFN出現に及ぼす影響について

The significance of fibronectin(FN) in peri-implantation mouse  
embryos and the effect of culturing on appearance of FN

竹内 一浩 森 明人 鶴木 康資 永田 行博

KAZUHIRO TAKEUCHI AKITO MORI  
YASUSHI UNOKI AND YUKIHIRO NAGATA

鹿児島大学医学部産婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Kagoshima University

Abstract

The localization of fibronectin in mouse embryos in vivo was first found in the inner cell mass of early blastocyst and was later found also massively in the trophectoderm of late blastocyst. In contrast, fibronectin could not be found even in the late blastocyst stage in cultured embryos.

When the blastocysts developed in vivo or in vitro were further cultured for three days in Dulbecco's Modified Eagle Medium(D'MEM) containing 10% fetal calf serum, the in vitro-implantation(trophoblastic outgrowth in vitro) rates were 90%, 37% respectively; the latter showed a significantly low rate. If in vivo blastocysts were cultured in D'MEM without fetal calf serum, the in vitro-implantation rate was as low as 29%. However, if fibronectin at the concentration of 5, 10, 20, or 40  $\mu$ g/ml was added, instead of fetal calf serum, to the D'MEM, the in vitro-implantation rates were improved to 76, 84, 82 and 79%, respectively.

Key Words : fibronectin, blastocyst, in vitro-implantation

緒 言

フィブロネクチン(FN)は、1948年にMorrisonらによって血液中の糖タンパク質として最初に発見された。FNは細胞接着、走化性、食作用、細胞移動、組織の修復などの多岐にわたる作用があり、あらゆる方面から多くの研究者に注目されている。

胚発生に関するFNの役割は、細胞外マトリックスの一つとして胚内に存在し、細胞活動に対して積極的な生理機能を有し、胚発生に重要な役割を演じていることが示唆されている。<sup>1)</sup>

しかしながら、FNと胚発生に関する報告は少なく、受精卵におけるFNの出現時期について少数の報告<sup>2)~5)</sup>がなされているのみである。ことに着床現象との関係について述べた報告はほとんど見られない。

今回、我々は体外受精・胚移植という立場からその基礎的研究として、着床前期胚におけるFNの局在を観察し、体内胚と体外培養胚における相違点を比較検討した。また、着床におけるin vitro実験モデル<sup>6), 7)</sup>を用いて種々検討し、若干の知見を得たので報告する。

## 材料と方法

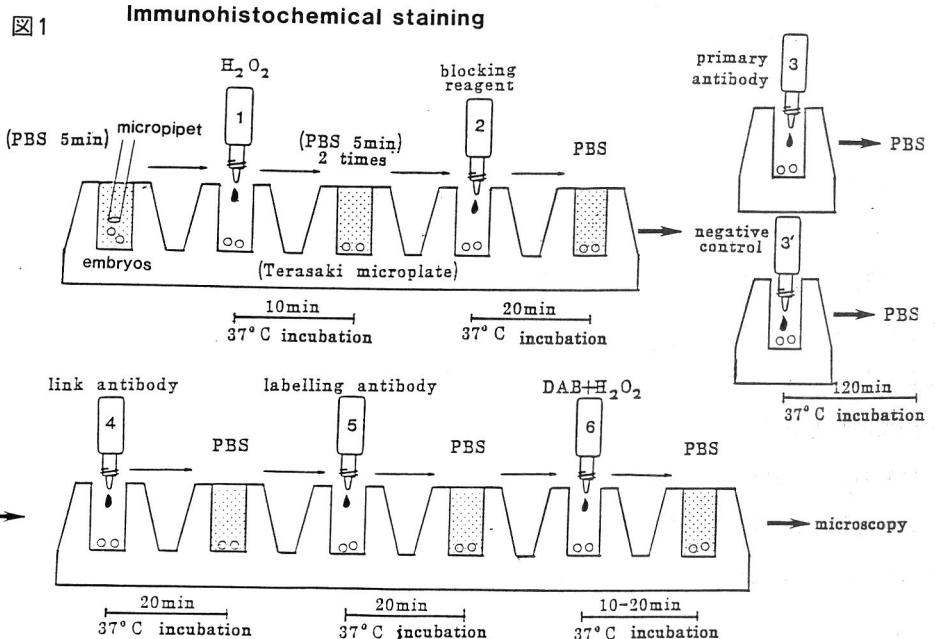
### 1. 胚の採取

成熟ICRマウスにPMS 5単位を腹腔内投与し、さらに48時間後にhCG 5単位を投与し過排卵誘起した。hCG投与後成熟雄マウスと交配させ、翌朝プラグの確認できたものを実験に使用し、これをday 1とした。day 2で、卵管を加温PBSにて灌流し、2細胞期胚を採取した。さらにday 3~day 5までそれぞれ卵管及び子宮を灌流し、4細胞期胚、桑実胚、初期胚盤胞及び後期胚盤胞、さらに円筒胚まで採取し、この群を体内群とした。これに対して体外培養群は、2細胞期を採取し、これを10%仔牛血清を含むmodified Whitten's medium<sup>8)</sup>にて後期胚盤胞まで追加培養した群を体外培養群とした。

採取した体内及び体外培養群のそれぞれの各期胚は、胚保護目的でpolyvinylpyrrolidone(K-30)を添加したacid-Tyrod's solutionにて透明帯を融解除去し、PBSにて洗浄した後、直ちに10%中性ホルマリンによる固定を行った。

### 2. FNの免疫組織化学的観察

胚は固定後まずPBSにて洗浄し、以後の操作は全てTerasaki-microplate上で実体顕微鏡下で行った。酵素抗体法による染色はBiogenix Laboratories(USA)のAB(アビジン・ビオチン)キット(単クローン





抗体)を用い、操作手順は図1に示した。各ステップごとにmicropipetを取り替え、PBSでの洗浄は5分間を3回繰り返し、次のような手順で染色を行った。①まずH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を1滴添加後、湿潤箱中で10分間反応させ、内因性ペルオキシターゼ活性を阻止した。②PBSで洗浄後、続いてblocking-reagentとして第二抗体と同種の正常血清を添加し、20分間反応させた。③マウスと交叉性が確認されているmouse-anti-human fibronectin(antigen: human amniotic fluid's fibronectin)<sup>9)</sup>を第一抗体として加え、この時negative controlとして第一抗体と同種の正常血清を加えた群を設けた。これらは120分間incubateした。④ビオチン結合抗免疫グロブリン(rabbit-anti-mouse IgG)を第二抗体として加えた。⑤ペルオキシターゼ標識アビジンを添加したのち、⑥DAB反応にて発色させた。その後染色した胚はPBSにて洗浄し、さらに封入固定した後FNの局在を観察した。

### 3. in vitro-implantation<sup>6), 7)</sup>の観察

胚盤胞以降のin vitroでの発育を評価するために、trophoblastのin vitro outgrowthによって判定するin vitro-implantationを観察した。なお、in vitro-implantationの評価は胚盤胞を5%CO<sub>2</sub> in air, 37℃の条件下で培養し、位相差顕微鏡にて24時間ごとの観察を行い、培養後72時間目に行った。trophoblastのoutgrowthの度合は①no outgrowth ②marginal outgrowth ③slightly outgrowth ④moderate outgrowth ⑤extensive outgrowthに分け、③以上をin vitro-implantation(+)と判定した。また、inner cell massの発育度も評価の参考にした。

実験は、まずin vivo blastocyst及びin vitro cultured blastocystをそれぞれ10%仔牛血清を含むD'MEM液で培養し、in vitro-implantation率を比較した。また、このとき培養液中のFN濃度をELISA法により測定した。次にin vivo-blastocystを用いて、①血清を含まないD'MEM液のみ、②D'MEM液+FN(mouse plasma fibronectin)(D'MEM液1 mlあたり5, 10, 20あるいは40 µgの濃度で添加)のそれぞれの培地で培養し、それぞれのin vitro-implantation率を比較検討した。

## 成 績

### 1. FNの出現時期と局在

体内胚及び体外培養胚におけるFNの出現時期と局在を図2に示した。

体内胚では、2細胞期および4細胞期でFNの局在は認められず、桑実胚でもFNの局在は全く見られなかった(N=25)。しかしFNは初期胚盤胞になって、内部細胞塊に初めて出現した。それは、ほとんどの例(38/40)で顆粒状に染色された。また、4例では栄養外胚葉も薄く染色された。後期胚盤胞になると全例(N=40)において内部細胞塊及び栄養外胚葉が染色され、特に内部細胞塊は強く染まった(写真1~3)。

体外培養では体内胚と同様桑実胚期まではFNの局在は認められなかった。

しかし体内胚とは異なり、この群では初期胚盤胞(N=37)になっても局在は見られず、さらに後期胚盤胞(N=41)になっても局在は全く見られなかった(写真4)。

図2      Comparison of expression of fibronectin(FN) between  
in vivo embryos and in vitro cultured embryos









<u>embryonic stages</u>		<u>FN expression</u>	
		(in vivo)	(in vitro)
 Two-cell		( - )	
 Four-cell		( - )	( - )
 Eight-cell		( - )	( - )
 Morula		( - )	( - )
Early blastocyst			
 Inner cell mass		( + )	( - )
 Trophoctoderm		( ± )	( - )
Late blastocyst			
 Inner cell mass		( ++ )	( - )
 Trophoctoderm		( + )	( - )

写真1～4

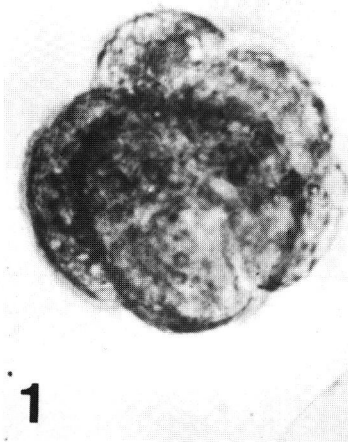


Fig.1 : early morula(in vivo group) no staining  
for fibronectin(FN).

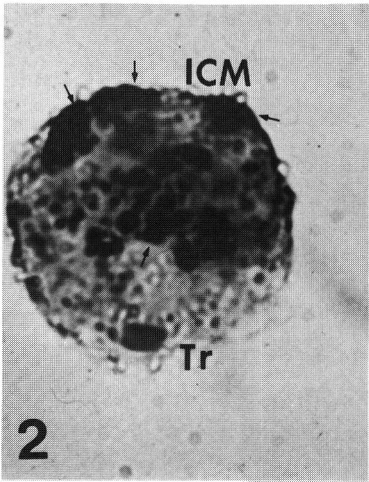


Fig.2 : early blastocyst(in vivo group) granular  
type of stained fibronectin(FN) is seen  
in the inner cell mass. (arrow)  
ICM : inner cell mass  
Tr : Trophoctoderm

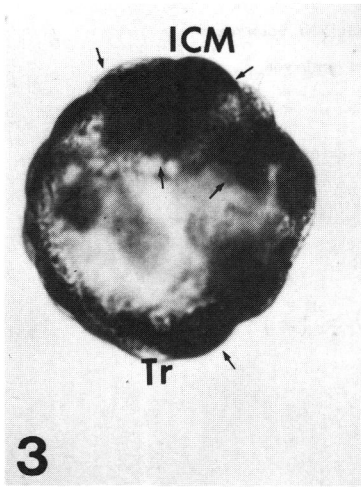


Fig.3 : late blastocyst(in vivo group) strongly stained fibronectin is seen in the inner cell mass and trophectoderm. (arrow)

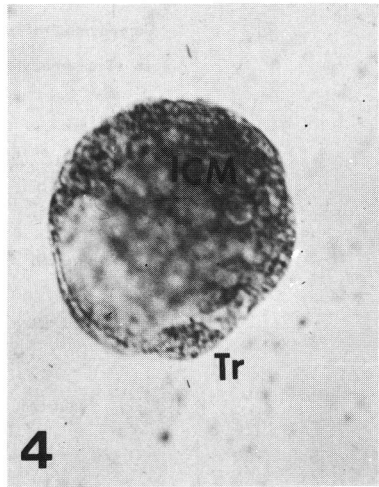


Fig.4 : late blastocyst(in vitro cultured group) : no localization of fibronectin

2. in vitro-implantation rate

in vivo-blastocyst 群と in vitro-cultured blastocyst 群の 10% 仔牛血清を含む D'MEM 液中での in vitro-implantation rate を表 1 に

表 1 Comparison of in vitro-implantation between the in vivo blastocyst group and in vitro cultured blastocyst group

group	in vitro-implantation rate
in vivo blastocyst	90% ( 54/60 ) *
in vitro cultured blastocyst	37% ( 23/62 ) *

\* P < 0.001

なお、10% 仔牛血清を含む

表 2 Effect of fibronectin ( FN ) on in vitro-implantation of the in vivo blastocyst

D'MEM 液の平均 FN 濃度は  $15.2 \pm 3.1 \mu\text{g/ml}$  であった。

medium	in vitro-implantation rate
D'MEM only	29% ( 20/70 ) <sup>ab,c,d</sup>
D'MEM + fibronectin *	
5 $\mu\text{g/ml}$	76% ( 57/75 ) <sup>a</sup>
10 $\mu\text{g/ml}$	84% ( 76/90 ) <sup>b</sup>
20 $\mu\text{g/ml}$	82% ( 67/82 ) <sup>c</sup>
40 $\mu\text{g/ml}$	79% ( 67/85 ) <sup>d</sup>

\* concentration of FN in medium

ab,c,d P < 0.001

in vivo-blastocyst 群において仔牛血清を含まない D'MEM 液のみで培養した in vitro-implantation rate は 29% に低下した。しかし血清の代わりに FN を加えたところ、5  $\mu\text{g}$  添加群で 76%、10  $\mu\text{g}$  添加群で 84%、

20 $\mu$ g添加群で82%, 40 $\mu$ g添加群で79%のin vitro-implantation率が得られた(表2)。

## 考 察

フィブロネクチンが胚発生のどの時期に出現するかは、Wartiovaara<sup>2)</sup>らやZetter<sup>4)</sup>らがすでに述べているが、マウス胚においては受精以後桑実胚まではFNは検出されないとし、胚盤胞になって内部細胞塊の細胞間に初めて検出されるとした。さらにまた、内部細胞塊から内胚葉層と外胚葉層に分化してくるとこれらにもFNが検出されるようになると述べている。<sup>2)</sup> 我々の実験においても、上記の結果と同様に初期胚盤胞以前にはFNの局在は出現しなかった。FNは初期胚盤胞の内部細胞塊において初めて出現し、さらに後期胚盤胞以降では内部細胞塊及び栄養外胚葉にも強く出現した。これらの結果からみて、FNが初期胚盤胞になって初めて出現することは、ほぼまちがいないと言えよう。

ところでFNが着床期胚でどのような役割をしているかはまだ十分研究されていない。FNは細胞接着を促進することから、われわれは妊卵の着床現象にもFNが関与しているのではないかと考えた。そのモデルとした体外培養胚において、FNが通常出現する時期を越えて後期胚盤胞に至っても出現しなかったことは重要なことだと考えられる。

また体外培養にて得られた胚盤胞のin vitro-implantation率が体内の胚盤胞のそれに比べて低値であったことも重要であろう。

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・胚移植の低い妊娠率が問題になっているが、この体外培養胚でのFNの局在の喪失は、FNが着床にどの程度関与しているかを別にしても、体外培養では着床に必要な要素が十分に得られていない可能性があるのではないかということを示している。

次にin vitroにおける着床モデルとして、われわれはin vitro-implantationを用いたが、これがどこまでin vivo現象を反映するかと言う疑問はあるが、いくつかの報告結果<sup>6), 7), 10), 11)</sup>を考え合わせると、現時点では有効なモデルと言える。

この方法では、血清を含む培地で培養するとin vitro-implantationが高率に起こるが、Randallら<sup>14)</sup>や小沢<sup>15), 17)</sup>らは中でも血清中のFNがin vitro-implantationに深く関与すると述べている。

事実、我々の実験でも10%仔牛血清を含む培地での体内胚のin vitro-implantation率は高く、また10%仔牛血清を含む培地のFN濃度は $15.2 \pm 3.1 \mu\text{g/ml}$ であった。しかし、血清を含まないD'MEM液で培養した体内胚のin vitro-implantation率は低かった。この培地にFNを添加することでin vitro-implantation率が改善されたこともin vitro-implantationにFNが必要なことを示している。

in vitro-implantationが起こるためには培養液中にFNが必要であることを我々はこの実験で確認した。そこでin vitro-implantation率の低い体外培養胚の培養液にFNを添加して検討したが、in vitro-implantation率は改善できなかった。このことは10%仔牛血清を含むD'MEM液での培養で体外培養胚が体内胚と比較してin vitro-implantation率が著明に低値であったことと同様に重要な知見であると考えられる。すなわち胚の着床には胚自体がFNを保有することも重要な因子であると考えられる。つまり着床現象には胚の内外共にFNが

必要である可能性が強く、体外培養胚の場合、外的に与えられたFNは胚内に取り込まれないのではないかと推察された。

現時点の我々の免疫組織化学法では胚内で検出されるFNが果してどの細胞に由来して作られるのか明らかにできないし、またこのような報告も見ない。このため体外培養胚でFNがなぜ消失しているのか明らかにできない。今後さらにこれらの点について追求していくことが必要であると考えられる。

#### 参考文献

- 1) 吉永一也, 藤本十四秋: 発生におけるフィブロネクチンの役割・最新医学, 39(10)1996-2000, 1984
- 2) Joma Wartiovaara, Ilmo Leivo, and Antti Vaheri: Expression of the cell surface-associated glycoprotein, fibronectin, in the early mouse embryo. *Develop. Biol.* 69, 247-257, 1979
- 3) Ilmo Leivo, Antti Vaheri, Rupert Timpl and Jorma Wartiovaara: Appearance and distribution of collagens and Laminin in the early mouse embryos. *Develop. Biol.* 76, 100-114, 1980
- 4) Bruce R. Zetter and Gail R. Martin: Expression of a high molecular weight cell surface glycoprotein (LETS protein) by preimplantation mouse embryos and teratocarcinoma stem cells. *Cell* 5, 2324-2328, 1978
- 5) Jorma Wartiovaara and Antti Vaheri: Fibronectin and early mammalian embryogenesis. In "Development in Mammals" M. H. Johnson, ed. North-Holland, New York. vol. 4, 233-266, 1980
- 6) Akiko I. Spindle and Roger A. Pedersen: Hatching, attachment, and outgrowth of mouse blastocysts in vitro: Fixed nitrogen requirements. *J. Exp. Zool.*, 186, 305-318, 1972
- 7) Spindle, A. I., and Pederson, R. A.: Hatching, attaching, and outgrowth of mouse blastocysts in vitro: Fixed nitrogen requirements. *J. Exp. Zool.* 186, 305-318. 1973
- 8) Whitten, W. K.: Nutritional requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro. *Adv. in Biosci.*, 6. 129, 1971
- 9) P. Kuusela, E. Ruoslahti, E. Engvall and A. Vaheri: Immunological interspecies cross-reactions of fibroblast surface antigen (fibronectin). *Immunochemistry*, 13, 639-642, 1976
- 10) Enders, A. C., Chavez, D. J., and Shlafke, S. Comparison of implantation in utero and in vitro. "Cellular and Molecular Aspects of Implantation", pp. 365-382, Plenum, New York. 1981
- 11) Sherman, M. I., and Atienza-Samols, S. B.: In vitro studies on the surface adhesiveness of mouse blastocysts. In "Human Fertilization" pp.179-183. PGS, Boston. 1978

- 12) 松田道生, 中三川千鶴子: フィブロネクチンおよびその関連物質と組織修復。立山シンポジウム I, 凝固・線溶, 血小板研究, - 基礎と臨床 -, P175-182 1982
- 13) 林 正男: フィブロネクチンの物質的実体と取扱法・最新医学, 39(10), 1988-1991, 1984
- 14) D. Randall Armant, Howard A. Kaplan, and William J. Lennarz: Fibronectin and lamin promote in vitro attachment and outgrowth of mouse blastocysts. Dev. Biol. 116, 519-523, 1986
- 15) Masayuki Ozawa, Masahiro Sato, Hisako Muramatsu, Hiroshi Hanada and Takashi Muramatsu: A membrane glycoprotein in teratocarcinoma cell adhesion to substratum. Exp. cell research, 158, 127-143, 1985
- 16) Jean Richa, Caroline H. Damsky, Clayton A. Buck, Barbara B. Knowles, and Davor Solter: Cell surface glycoprotein mediate compaction, trophoblast attachment, and endoderm formation during early mouse development. Dev. Biol. 108, 513-521, 1985
- 17) 小沢政之: 着床期胚割球表層の糖タンパク質について。細胞 19(2), 7-12, 1987
- 18) Fujimoto T., Yoshinaga K. and Kono I.: Distribution of "fibronectin" on the migratory pathway of primordial germ cells in mice. Anat. Rec., in press, 1984
- 19) ANGIE RIZZINO and MICHAEL I. SHERMAN: Development and differentiation of mouse blastocysts in serum-free medium. Exp. cell research, 121, 221-233, 1979
- 20) 関口清俊: フィブロネクチン(その細胞接着因子としての分子的基础)・細胞工学, 4, (6), 1985

## 精子透明帯相互作用に関わる

### Salt-stored egg の透明帯機能について

Zonae pellucidae of salt-stored eggs :

Their functions in sperm-zona interactions

吉松宣弘, 柳田 薫, 星 和彦, 佐藤 章

Nobuhiro Yoshimatsu, Kaoru Yanagida,  
Kazuhiko Hoshi, Akira Sato

福島県立医科大学産科婦人科学講座

Department of Obstetrics and Gynecology, Fukushima Medical College, Fukushima. Japan

#### Abstract

When mammalian eggs are placed in a highly concentrated solution of neutral salt, the egg cytoplasm shrinks to become a small spherule, whereas the non living zona pellucida remains morphologically unchanged. In this study we examined the function of zona pellucida of salt-stored eggs in about sperm-zona interactions.

- (1) Zona penetration by spermatozoa began about same time when salt-stored and living eggs were inseminated with 2hr preincubated (capacitated) spermatozoa in the same dish. Also the time course changes in the ratio of penetration (or fertilization) was almost same.
- (2) When 2hr preincubated (capacitated) hamster spermatozoa were mixed with salt-stored and living eggs, almost same number of spermatozoa attached to each type of zona. The number of spermatozoa tightly bound to the two types zona was also about the same.
- (3) Acrosome reaction inducing ability of the zona was well maintained after storage of eggs in salt solution.

The major biological and biochemical properties of the zona were retained in the salt solution, therefore salt-stored eggs can be used to study sperm-zona interactions as the substitute of living eggs.

#### 緒 言

Salt-stored egg は, 1979年 Yanagimachi<sup>(1)</sup>らにより考案された研究用哺乳動物卵子の一保存法である。Salt



-stored egg は、多くの研究施設で利用されているが、その大部分は単に精子の透明帯貫通能力の研究に利用されているに過ぎない。本法では、保存と同時に卵実質は死滅してしまうので、卵子としての機能は透明帯のみに集約される事になるが、Salt-stored egg の透明帯が、生存卵の透明帯と同様の機能を有しているとすれば、sperm-zona interaction の研究材料として、その応用範囲は広がるはずである。本論では、ハムスターの卵子、精子を用いて、精子の透明帯への貫通(Penetration)、透明帯の精子先体反応誘起能力(Zona induced acrosome reaction)、透明帯の精子結合能力(Sperm binding ability)の3点につき、Salt-stored egg と生存卵について比較検討を行ったので、ここに報告する。

## 研究方法

### (1) 培養液：

修正 Tyrode 液の m-TALP-4 (Ex 1, 2) 及び m-TALP-7 (Ex 3) を用いた。それぞれの組成は、Table I, II に示した。pH は、それぞれ、7.3-7.4 に調整して使用した。

### (2) ハムスター卵子及び精子の回収：

2～3ヶ月齢の成熟雌ゴールデンハムスターの発情周期の第1日目に PMSG 30 iu, 第3日目に hCG 25 iu を筋注し、第4日目に開腹して未受精卵を回収後、0.1% ヒアルロニダーゼで処理して、cumulus-free egg を回収した。

又、5～7ヶ月齢の成熟雄ゴールデンハムスターの精巢上体尾部より swim-up 法で運動性良好の精子を回収した。精子濃度は  $5 \times 10^5$  cell/ml となる様に調整し、m-TALP-4 及び m-TALP-7 にて2時間前培養した。(37°C, pure air)

### (3) Salt-stored egg の作製及び保存：

Cumulus-free egg を、2.0M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 40mM Hepes, 0.5%Dextran, pH7.0 の高濃度塩溶液内に移し、表面をミネラルオイルで被って、4°C で1週間保存した。使用に先立ち、0.9% NaCl, 20mM Hepes, 0.3% BSA pH7.3 の洗浄溶液で1時間洗浄した。

### (4) Ex 1 受精及び透明帯貫通の評価：

2時間前培養した sperm-suspension に、生存卵及び Salt-stored egg (以下 SE) を媒精した。媒精後、30分, 1, 2, 3時間後に卵子又は SE を取り出し、位相差顕微鏡下で、受精又は透明帯貫通の有無を観察した。尚 SE では、Perivitelline space 内の精子数もあわせて検討した。

### (5) Ex 2 透明帯精子結合能力の評価：

Ex 1 と同様に媒精を行った。媒精5分後に卵子及び SE を大口径のピペットを用いて静かに取りだし、m-TALP-4 の入った時計皿で余分な精子を洗い流した後、卵子及び SE とこれに付着している精子のみを、あらかじめ用意した m-TALP-4 に移した。媒精30分後に卵子及び SE を取り出し、半数の卵子及び SE は、スライドガラスに移して、それぞれの透明帯に付着している精子数をカウントした。残りの卵子及び SE は、パーコール (400 $\mu$ l lithium fluoride/heparin coated tube, 1.8% percoll 250 $\mu$ l, 2.8% 50 $\mu$ l, 45% 50 $\mu$ l) 重

積層にて $90 \times g$ で120秒間遠心し、2.8%と45%パーコール境界層より卵子及びSEを取り出し、遠心後もそれぞれの透明帯に強く結合している精子数をカウントした。

(6) Ex 3 精子先体反応誘起能力の評価：

m-TALP-7で2時間前培養した sperm-suspension に、生存卵及びSEを媒精させる。媒精5分後、約50~100個の精子がそれぞれの透明帯に付着した時、大口径のピペットを用いて、静かに卵子及びSEを取り出し、m-TALP-7の入った時計皿に移す。この洗浄を2度繰り返した後、あらかじめ用意したm-TALP-7に移す。媒精後10, 30, 60分後に卵子及びSEを取り出して、位相差顕微鏡下で、透明帯上の精子頭部(先体)の状態を観察した。この際、生存し運動している精子のみを観察し、動きのない精子は観察対象から除外した。

## 結 果

(1) Ex 1 受精及び透明帯貫通の評価：

Fig I は生存卵及びSEの透明帯を精子が貫通する経時的割合と、SEのperivitelline space内精子数の経時的増加をプロットしたものである。生存卵とSEとの間には極端な精子貫通開始時間の差は認められず、又、精子の透明帯貫通が認められた卵子の割合もほぼ同率である。又、SEでは、時間経過と共に perivitelline space内の精子数が増加していくのが認められた。

(2) Ex 2 透明帯精子結合能力の評価：

Table IIIに生存卵及びSEの透明帯への付着(遠心前)と結合(遠心後)精子数を示した。両者の間には、精子結合能力に関して全く差を認めなかった。

(3) Ex 3 精子先体反応誘起能力の評価：

Table IVにm-TALP-7内での精子先体反応(Spontaneous acrosome reaction)の割合を示した。培養開始後2時間で、先体反応を完了した精子の割合は0%であり、更に1時間培養しても2%前後とm-TALP-7内での先体反応を起こす精子の割合は極めて低率である。

Table Vは、2時間m-TALP-7内で前培養した精子と生存卵及びSEを媒精し、先体反応を起こしている透明帯上の精子の割合を示したものである。生存卵では、媒精後10分で約10%、30分で25%、60分で45%前後の精子が透明帯上で先体反応を完了しており、この傾向は、SEでも同様であり、両卵子の先体反応誘起能力には有意な差は認めなかった。

## 考 察

受精とりわけ精子卵子相互作用の研究に於いては、一度に多数の卵子を使用しなくてはならない場合があり、ハムスターやマウスなどの小動物では数多くの卵子を回収する事も可能であるが、牛やヒトなどでは不可能であり、その為、少数の卵子を保存集積して研究に使用しなくてはならない。保存された卵子を、特に精子卵子相互作用の研究に用いる際に最も大切な事は生存卵子の有する全ての機能が長期間に亘って保持されている事

**Table. I**

Composition of m-TALP-4 (mM)

NaCl	124.80
KCl	2.68
CaCl <sub>2</sub> (anhyd)	1.80
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.49
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.36
NaHCO <sub>3</sub>	11.90
D-Glucose	4.50
Na-pyruvate	1.00
Na-lactate	9.00
Hypotaurine	0.50
Epinephrine	0.05
BSA	15mg/ml
Gentamicin sulfate	50μg/ml
Osmolality	310mOsmol

Gas phase : pure air

※ Use for handling hamstar spermatozoa and egg.

**Table. II**

Composition of m-TALP-7 (mM)

NaCl	124.80
KCl	2.68
CaCl <sub>2</sub> (anhyd)	1.80
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.49
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.36
NaHCO <sub>3</sub>	11.90
D-Glucose	0.50
Na-pyruvate	0.25
Na-lactate	12.50
Taurine	0.50
BSA	12mg/ml
Gentamicin sulfate	50μg/ml
Osmolality	313mOsmol
Gas phase : pure air	

※ Use for assessment of "zona induced acrosome reaction"

**Table III**

Comparison of sperm attachment and binding to zonae pellucidae of salt-stored and living (control) hamster eggs

Egg	No. (mean±s.d) of spermatozoa on each zona	
	Before rinsing with Percoll	After rinsing with Percoll
Living (control)	53 ± 5	19 ± 8
Salt-stored	55 ± 4	20 ± 7

(1). Stored in 2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 40mM Hepes + 0.5% dextran, pH7.0, for one week.

(2). Each value is based on examination of 16—25 zonae in four separate experiments.

Table IV.

Survival and spontaneous acrosome reaction of hamster spermatozoa in standard m-TALP-7 medium

(Values are Mean  $\pm$  SD)

Incubation period (hrs)	Motility (%)	% of acrosome* reacted spermatozoa
1	96.0 $\pm$ 1.7	0
2	88.3 $\pm$ 2.9	0
3	81.7 $\pm$ 2.9	2.2 $\pm$ 1.9

3 experiments.

\* : % of acrosome reacted (motile) spermatozoa among entire population.

Table V.

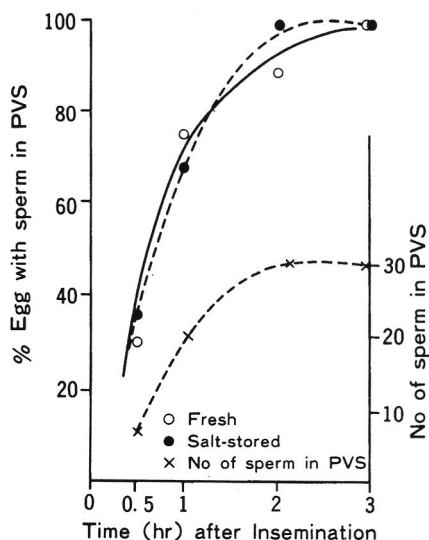
The ability to induce acrosome reaction of hamster spermatozoa.

	Time (post insemination)			No of eggs exam.	No of exp
	10	30	60		
Living	11.2 $\pm$ 4.3	27.4 $\pm$ 3.2	44.1 $\pm$ 8.1	75	4
Salt-stored	9.6 $\pm$ 3.6 p>0.5	23.7 $\pm$ 7.9 p>0.5	42.2 $\pm$ 12.3 p>0.5	60	4

(1). Salt stored eggs were stored in 2M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 40mM Hepes + 0.5% dextran pH7.0 for 1 week.

(2). Student t-test was carried out between the value of living and salt stored eggs.

Fig I.



Sperm penetration through the zonae pellucidae of fresh (living) and salt-stored hamster eggs. The latter had been stored in 2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 40mM Hepes + 0.5% dextran, pH7.0 for 1 week. Each point represents the result of 3 experiments using 17-20 eggs. Ordinate, the percentage of eggs with spermatozoa in the perivitelline space (salt-stored eggs) or in the previtelline space and/or the vitellus (fresh eggs).

である。緒言の項でも述べた様に、Salt-stored egg は1979年に Yanagimachi<sup>(1)</sup>らにより考案された卵子保存法の一方法であり、透明帯の生理的機能を損わずに保存できる為、精子卵子相互作用の研究には充分使用できる材料であると認識されている。しかし、Yanagimachiらのいう生理的機能とは、透明帯の種特異性、トリプシンなどの薬剤に対する反応、抗透明帯抗体に対する反応などを生存卵と比較検討したものであり、本来透明帯の持つべき精子卵子相互作用に関する機能、すなわち、精子結合能力、精子先体反応誘起能力等に関しては言及されていない。その為か、その後の Salt-stored egg の利用法も単に精子の透明帯貫通能力を中心に、Capacitation、先体反応の間接的な判定の為の利用法にしか過ぎなかった。<sup>(2)(3)(4)</sup>本研究に於いては、Salt-stored egg の透明帯は、精子貫通能力、精子結合能力、精子先体反応誘起能力に於いて、生存卵と比較して全く劣る事なく、これらの能力を保持している事が確認された。この事は、Salt-stored egg が、特に Sperm-zona interaction の研究に於いて、生存卵の代用として充分に利用できる事の証明となった。尚、Salt-stored egg では、特に精子結合能力に於いて、卵実質を介する反応（受精に伴う透明帯反応等）に関しては、生存卵とそのデータ上に差が認められる事も付記しておく。<sup>(5)</sup>

## 文 献

- (1) Yanagimachi, R., Lopata, A., Odem, C.B., Bronson, R.A., Mahi, C.A. and Nicolson, G.L. (1976) .  
Retention of biologic characteristics of zona pellucida in highly concentrated salt solution :  
The use of salt-stored eggs for assessing the fertilizing capacity of spermatozoa.  
Fert Steril., 31, 562-574
- (2) Overstreet, J.W., Yanagimachi, R., Katz, D.F., Hayashi, K. and Hanson, F.W. (1980)  
Penetration of human spermatozoa into the human zona pellucida and zona-free hamster egg : A  
study of fertile donors and infertile patients.  
Fert Steril., 33, 534-542.
- (3) Boatman, D.E., Andrews, J.C., and Bavister, B.D. (1988)  
A quantitative assay for capacitation : Evaluation of multiple sperm penetration through the zona  
pellucida of salt-stored hamster egg.  
Gamete Res., 19, 19-29.
- (4) Fayer-Hosken, R.A. and Brackett, B.G. (1987)  
Use of salt-stored zonae pellucidae for assessing rabbit sperm capacitation for in vitro fertilization  
Gamete Res., 17, 191-201.
- (5) 吉松宣弘 (1988)  
Salt-stored egg の透明帯機能保存に関する研究。  
福島医誌, 投稿中。

マウス着床前初期胚の産生するプロゲステロンの  
ヘキソキナーゼ活性に及ぼす影響

Possible autocrine function of progesterone on  
hexokinase activity of mouse  
preimplantation embryo

綾部琢哉、堤 治、矢野 哲、藤原敏博、三橋直樹、水野正彦

Takuya AYABE, Osamu TSUTSUMI, Tetsu YANO, Toshihiro FUJIWARA,

Naoki MITSUHASHI and Masahiko MIZUNO

東京大学医学部産科婦人科学教室

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

ABSTRACT

A possible function of progesterone ( $P_4$ ) produced by mouse embryo was investigated during preimplantation period. Four cell embryos were obtained from PMS-hCG treated ICR mice 56h after hCG administration and cultured in modified BWB. Hexokinase (HK) activity of the embryos increased 4 fold after 36hr culture period, i. e. from  $2.68 \pm 0.11$  to  $10.5 \pm 0.61$  pmol NADPH/embryo/h (mean  $\pm$  SEM). Addition of  $P_4$  did not significantly increase HK activity. When  $P_4$  production of the embryo was inhibited by trilostane (TRL), a specific inhibitor of  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, the elevation of HK activity was suppressed dose-dependently (TRL  $200 \mu M$ ,  $4.02 \pm 0.18$ ), and recovered by  $P_4$  supplement ( $P_4$   $0.5 \mu g/ml$ ,  $7.54 \pm 0.46$ ). The inhibition was dominant when TRL was added in the first 24h. Actinomycin-D (ACTD) and cycloheximide, which inhibited mRNA transcription and protein translation respectively, both inhibited the elevation of HK activity dose-dependently, and the inhibition by ACTD was also dominant when added in the first half. These results suggest that  $P_4$  play a role in the induction of HK enzyme protein at the transcriptional level perhaps through autocrine fashion.

## 緒 言

マウス初期胚の培養液中に外因性に progesterone ( $P_4$ ) を添加し初期胚の形態学的変化に対する影響をみた報告では、 $P_4$   $4 \mu g/ml$  までは何ら影響なく<sup>1)</sup>、 $8 \mu g/ml$  以上では毒性が現われるとされていた<sup>2)</sup>。本研究では、初期胚内部におこる糖代謝能の変化、特にその律速酵素である hexokinase 活性の変化<sup>3)</sup>を定量的な指標として、ステロイドホルモンの影響を生化学的に検討した。更に、初期胚自身の産生するステロイドホルモンの意義について検討を加えた。

## 材 料

### 1. 初期胚の採取、培養

8ないし9週齢のICR系雌マウスにPMS5単位、hCG5単位を腹腔内投与して過排卵処理を行い同系の雄マウスと交配した。初期胚は卵管ないし子宮を培養液で灌流し採取した。培養はmodified BWBを用い、5%  $CO_2$ , 95% air,  $37^\circ C$ の条件下に行った。

### 2. 酵素活性の測定

それぞれの条件下で培養した初期胚を回収後、凍結乾燥し、酵素的サイクリング法により<sup>3)</sup>、初期胚のもつ hexokinase 活性を初期胚1個ごとに測定した。

## 方 法

### 1. 実験—1

hCG投与後56時間で4細胞期胚を採取し、36時間培養した。培養液中に $P_4$   $0.5 \mu g/ml$ あるいは $5 \mu g/ml$ を添加して、hexokinase活性に及ぼす影響を検討した。

### 2. 実験—2

実験1と同じ条件で培養した。Progesterone産生酵素 $3\beta$ -hydroxy steroid dehydrogenase ( $3\beta$ -HSD)の特異的阻害剤である trilostane (TRL, 持田製薬)を培養液中に添加、 $20 \mu M$ ,  $100 \mu M$ ,  $200 \mu M$ の各濃度について hexokinase 活性に及ぼす影響を検討した。TRL  $200 \mu M$ 添加群には $P_4$   $0.5 \mu g/ml$ あるいはhydrocortisone (F)  $0.5 \mu g/ml$ を加え hexokinase 活性回復の効果を検討した。

### 3. 実験—3

hCG投与後68時間で8細胞期胚を採取し、24時間培養した。DNAからRNAへの転写を阻害する actinomycin-D  $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-1} \mu g/ml$ , あるいはRNAから蛋白合成への翻訳を阻害する cycloheximide  $0.1$ ,  $0.2$ ,  $0.5$ ,  $1.0 \mu g/ml$ をそれぞれ培養液に添加して hexokinase 活性に及ぼす影響を検討した。更に、actinomycin-D  $1 \times 10^{-1} \mu g/ml$ あるいは cycloheximide  $1.0 \mu g/ml$ を培養の前半12時間にのみ添加した群と、後半12時間にのみ添加した群とについて、それぞれ検討した。

### 4. 実験—4

実験1と同じ条件で培養した。TRL  $200 \mu M$ を添加する時間を、最初の12時間、24時間、最後の12時間、24

時間に区切り、それぞれ hexokinase 活性に及ぼす影響を検討した。

## 成 績

### 1. 実験—1

表1に示す通り、hexokinase活性は、培養前 $2.68 \pm 0.11$  pmol/embryo/hが、培養36時間後には $10.5 \pm 0.61$  pmol/embryo/hまで上昇した。

培養液中に $P_4$   $0.5 \mu g/ml$ を添加しても、hexokinase活性は、対象群に比べて軽度上昇したが有意ではなかった。 $P_4$ 濃度を $5 \mu g/ml$ にしても、培養36時間後の活性値は $14.1 \pm 1.88$  pmol/embryo/h ( $n=8$ )と、やはり有意の上昇は認められなかった。

### 2. 実験—2

表2に示す通り、TRLはhexokinase活性の上昇を用量反応性に有意に抑制し、 $200 \mu M$ 添加群では $4.02 \pm 0.18$  pmol/embryo/hであった。TRL  $200 \mu M$ に更に $P_4$   $0.5 \mu g/ml$ を添加すると、活性は $7.54 \pm 0.46$  pmol/embryo/hまで有意に回復した。この回復はFの添加でもみられたが、 $P_4$ による回復に比べると有意に低値であった。なお培養36時間後の初期胚は桑実胚期にあり、形態学的変化は指標とならなかった。

### 3. 実験—3

培養前のhexokinase活性 $3.39 \pm 0.23$  pmol/embryo/hが、24時間培養後には $13.0 \pm 0.85$  pmol/embryo/hまで上昇した。Actinomycin-Dあ

表1 マウス初期胚のhexokinase活性に及ぼす培養液中progesteroneの影響

培養時間(h)	hexokinase活性(pmol/embryo/h)	
	control	progesterone $0.5 \mu g/ml$
0	$2.68 \pm 0.11$ (10)	
24	$3.11 \pm 0.81$ (8)	$3.78 \pm 0.26$ (8)
30	$7.06 \pm 0.91$ (14)	$8.31 \pm 0.81$ (8)
36	$10.5 \pm 0.61$ (75)	$13.6 \pm 1.21$ (8)
42	$20.9 \pm 2.35$ (26)	$20.4 \pm 1.66$ (8)

成績はmean  $\pm$  SEM; nは( )内に示した。

表2 マウス初期胚のhexokinase活性に及ぼす培養液中trilostaneの影響

処 置	hexokinase活性(pmol/embryo/h)
培養前	$2.68 \pm 0.11$ (10)
培養後 control	$10.5 \pm 0.61^{*1}$ (75)
TRL $20 \mu M$	$7.82 \pm 1.87$ (8)
100 $\mu M$	$7.17 \pm 1.69$ (7)
200 $\mu M$	$4.02 \pm 0.18^{*2}$ (72)
TRL $200 \mu M + P_4$ $0.5 \mu g/ml$	$7.54 \pm 0.46^{*3}$ (58)
TRL $200 \mu M + F$ $0.5 \mu g/ml$	$5.56 \pm 0.42^{*4}$ (38)

成績はmean  $\pm$  SEM, nは( )内に示した。

有意差  $P < 0.01$ が次の各群間に認められた。

\*1 vs \*2, \*2 vs \*3, \*2 vs \*4, \*3 vs \*4

(TRL; trilostane,  $P_4$ ; progesterone, F; hydrocortisone)



表3 マウス初期胚のhexokinase活性に及ぼす  
培養液中actinomycin-D, cycloheximideの影響

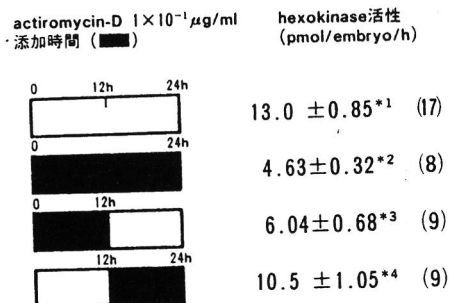
処 置	hexokinase活性 (pmol/embryo/h)
培養前	3.39±0.23 (6)
培養後 control	13.0 ±0.85 (17)
actinomycin-D $1 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$	12.6 ±0.58 (8)
$1 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$	6.43±0.90* (10)
$1 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$	4.66±0.20* (9)
$1 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$	4.63±0.32* (9)
cycloheximide 0.1 $\mu\text{g/ml}$	6.41±0.55* (10)
0.2 $\mu\text{g/ml}$	5.34±0.39* (10)
0.5 $\mu\text{g/ml}$	4.56±0.26* (10)
1.0 $\mu\text{g/ml}$	4.22±0.35* (10)

成績はmean±SEM, nは( )内に示した。

\*はcontrolと比較して $P < 0.01$

図1 マウス初期胚のhexokinase活性に及ぼす  
培養液中actinomycin-Dの添加時間による影響

また図1に示すように、actinomycin-Dを培養前半にのみ添加した群ではhexokinase活性は対象群に比べて有意に抑制されたが、後半にのみ添加した群では抑制をうけず、対象群との間に有意差はみられなかった。Cycloheximideについては図2に示す通り、培養前半のみ、あるいは後半のみに添加した群は、両者とも対象群に比べ有意に抑制され、両者間には差がみられなかった。両者とも抑制の程度は24時間全添加群より有意に軽度であった。



成績はmean±SEM, nは( )内に示した。

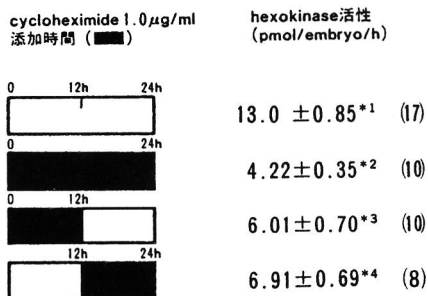
有意差  $P < 0.01$ が以下の各群間に認められた

\*1 vs \*2, \*1 vs \*3, \*2 vs \*4, \*3 vs \*4

\*1 vs \*4 } not significant

\*2 vs \*3 }

図2 マウス初期胚のhexokinase活性に及ぼす  
培養液中cycloheximideの添加時間による影響



成績はmean±SEM, nは( )内に示した。

有意差  $P < 0.01$ が以下の各群間に認められた

\*1 vs \*2, \*1 vs \*3, \*1 vs \*4, \*2 vs \*4

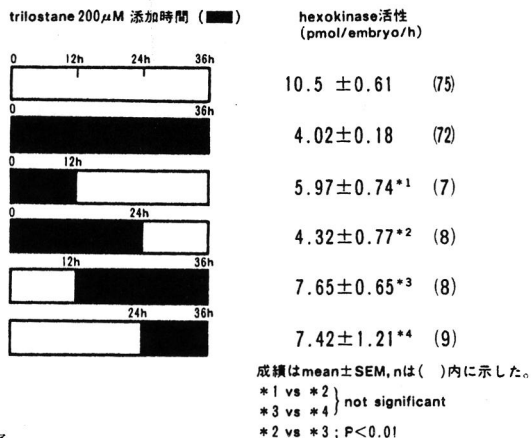
\*2 vs \*3;  $P < 0.05$

\*3 vs \*4; not significant

#### 4. 実験—4

図3に示す通り、TRLを最初の12時間、24時間だけ添加した群は、培養によるhexokinase活性の上昇が有意に抑制された。これに対し後半の24時間、12時間だけ添加した群では抑制の程度が弱く、前半24時間添加群 $4.32 \pm 0.77$  pmol/embryo/h と後半24時間添加群 $7.65 \pm 0.65$  との間には有意差が認められた。

図3 マウス初期胚のhexokinase活性に及ぼす培養液中trilostaneの添加時間による影響



#### 考 察

従来、初期胚の分化発育の指標として、形態学的変化が用いられてきたが、本研究では初期胚のhexokinase活性<sup>3)</sup>という生化学的指標を用いて定量的解析を行った。Hexokinaseはブドウ糖をリン酸化して解糖系に取り込む酵素であり、その活性は2～4細胞期では低値であるが、卵割が進むにつれて急速に上昇する。このことは初期胚の培養実験により得られた栄養要求性の事実をよく説明する。即ち初期胚は8細胞期以降で初めてブドウ糖依存性になるが、hexokinase活性の変化はこのブドウ糖利用能の変化に対応していると考えられ、生物学的にも意義のある指標と考えることができよう。この指標をもって、培養液中に添加した外因性 $P_4$ の影響を検討したが、実験1の結果が示すように(表1)  $P_4$ はhexokinase活性を有意には上昇させなかった。

しかしながら、初期胚自身にステロイド産生能があることが組織化学的手法により示され<sup>4)</sup>、我々もサイクリング法を用いて初期胚の $3\beta$ -HSD活性を生化学的に測定している<sup>5)</sup>。この初期胚自身が産生する $P_4$ が作用しているとすれば、外因性の $P_4$ は必ずしも必要なものではないと考えることができる。

そこで、実験2ではTRLを添加して初期胚自身による $P_4$ 産生を抑制してみた。TRLは、1970年、スターリング・ウィンスロップ研究所のNeumannらによって合成された化合物で、 $3\beta$ -HSDを特異的、競合的、可的に阻害する薬剤であり、ステロイド代謝路の他の部位は阻害しないという<sup>6)</sup>。このTRLの添加によりhexokinase活性の上昇が抑制され、 $P_4$ の同時投与で回復した(表2)。この回復はFでも認められたが $P_4$ によるものより低値であり、 $P_4$ に特異的と考えられた。従って、初期胚の産生する内因性の $P_4$ がhexokinase活性に何らかの形で関与していることが示唆されたといえよう。

次にこのhexokinase活性上昇の機序について検討した。実験3で示されたように(表3)、初期胚による蛋白合成を抑制すると、hexokinase活性の上昇も抑制される。従って活性の上昇は、単なる機能の亢進だけでなく、hexokinase酵素蛋白そのものの合成促進による可能性が考えられる。Actinomycin-Dでも抑制を受けることから、マウス初期胚は自分自身のDNAからhexokinase酵素蛋白へと翻訳していることが示唆された。Actinomycin-Dの抑制効果発現時期が培養の前半に限られていることから(図1)、この時期にhexokinase酵素蛋白mRNAの転写が集中的に行われていると考えられる。これに対しcycloheximideによる抑制効果は

時期によらず一定しており(図2)、mRNAからの蛋白の翻訳は、mRNAの転写と同時に開始し、どの時期でも同じ速さで行われていると考えられる。

次に、実験4で、内因性の $P_4$ がhexokinase 酵素蛋白誘導のどのレベルで作用しているかについて検討した。Hexokinase 活性上昇の、TRLによる抑制効果は、培養前半に強く認められており、actinomycin-Dの効果と時間的に類似している。このことから、一般のステロイドホルモンの作用機序と同様初期胚においても $P_4$ はDNAからmRNAへの転写レベルで作用しているのではないかと考えられよう。その $P_4$ が、初期胚自身により産生されている可能性が本研究で示唆されたわけである。

マウス初期胚は実際には $P_4$ を産生できないともいわれていたが<sup>7)</sup>、我々はpregnenoloneを基質とした培養転換実験により、in situで $P_4$ を産生し得ることも確認している<sup>8)</sup>。今後は更に詳しい作用機序について検討をすすめるつもりである。

また、マウス初期胚がestradiol-17 $\beta$ を産生しうるか否かは確認されていないが、in vitroで抗estrogen剤<sup>9)</sup>やaromatase活性阻害剤<sup>10)</sup>の投与により胞胚形成が抑制され、estradiol-17 $\beta$ の投与により回復したとする報告もみられ、今後の展開が期待される。

#### 文 献

- 1) Roblero, L. and Izquierdo, L. : Effect of progesterone on to cleavage rate of mouse embryo in vitro, J. Reprod. Fertil., 46 : 475, 1976
- 2) Kirkpatrick, J. R. : Differential sensitivity of preimplantation mouse embryos in vitro to oestradiol and progesterone, J. Reprod. Fertil., 27 : 283, 1971
- 3) 堤 治他 : サイクリング法による哺乳動物卵子代謝動態解析, 哺乳類卵研誌, 1 : 45, 1984
- 4) Dey, S. K. and Dickmann, Z. :  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity in Rat Embryo on Days 1 Through 7 of Pregnancy, Endocr., 95 : 321, 1974
- 5) Tsutsumi, O. et al : Quantative analysis of steroidogenesis in the single oocyte and preimplantation embryo, In vitro Feitilization, Embryo Transfer and Early Pregnancy : p 65, MTP Press, 1984
- 6) Potts, G. O. et al : Trilostane, an orally active inhibitor of steroid biosynthesis, Steroids, 32 : 257, 1978
- 7) Sherman, M. I. and Atienza, S. B. : Production and Metabolism of Progesterone and Androstenedione by Cultured Mouse Blastocysts, Biol. Reprod., 16 : 190, 1977
- 8) 綾部琢哉 他 : Pregnenoloneを基質としたマウス初期胚のステロイド転換実験, 受精着床, 印刷中
- 9) Sengupta, J. et al : Evidence that "embryonic estrogen" is a factor which controls the development of the mouse preimplantation embryo, Steroids, 29 : 363, 1977
- 10) Sengupta, J. et al : Effect of an oestrogen synthesis inhibitor, 1,4,6-androstatriene-3, 17-dione, on mouse embryo development in vitro, J. Reprod. Fertil., 66 : 63, 1982

ダブルトレーサー法によるラット卵子の  $^3\text{H}$ -ロイシン

と  $^{14}\text{C}$ -グルタミン酸の取込みについて

Uptake of  $^3\text{H}$ -Leucine and  $^{14}\text{C}$ -Glutamic Acid in Rat Eggs of  
Preimplantation Stage by the Double Labelling Method

辻 井 弘 忠

H i r o t a d a T S U J I I

信州大学農学部家畜育種繁殖学教室

Laboratory of Animal Breeding and Reproduction,  
Faculty of Agriculture, Shinshu University

We have previously reported the uptake of  $^{14}\text{C}$ -leucine and  $^{14}\text{C}$ -glutamic acid in rat eggs of the preimplantation stage. In this experiment, the simultaneous uptake of  $^3\text{H}$ -leucine and  $^{14}\text{C}$ -glutamic acid in rat eggs by the double labelling method was studied to compare the single uptake of  $^3\text{H}$ -leucine and the previously reported single uptake of  $^{14}\text{C}$ -glutamic acid in rat eggs.

(1) Both the single uptake of  $^3\text{H}$ -leucine and simultaneous uptake of  $^3\text{H}$ -leucine +  $^{14}\text{C}$ -glutamic acid in rat eggs were found to increase until 60 minutes after culture. When glucose, lactate and pyruvate were added, the uptake of these amino acids was augmented.

(2) The uptake of  $^3\text{H}$ -leucine and  $^{14}\text{C}$ -glutamic acid in rat eggs by the double labelling method tended to be reduced, compared to the single uptake of either  $^3\text{H}$ -leucine or  $^{14}\text{C}$ -glutamic acid.

(3) Using the uptake of  $^3\text{H}$ -leucine in rat eggs as an index basis of 1, the uptake of  $^{14}\text{C}$ -glutamic acid in the same eggs showed the same pattern whether singly or doubly labelled. The similarity between the ratios of leucine and glutamic acid to total free amino acids in the uterine fluid and the ratios of uptake of these amino acids in the present experiment suggested the possible relationship between the contents of free amino acids in the uterine fluid and the uptake of amino acids.

## 結 言

著者らは<sup>1-5)</sup>、哺乳動物卵子の発生過程における物質代謝および蛋白質の生成を解析する目的で、ラット卵子を用いアミノ酸の取込みを検討してきた。その結果、子宮液中の遊離アミノ酸含量<sup>6)</sup>と卵子のアミノ酸の取込み量との間になんらかの関係が存在することが示唆された<sup>5)</sup>。

そこで、ダブルトレーサー法を用いて、2つのアミノ酸の取込みを調べ、卵子のアミノ酸代謝と子宮液中の遊離アミノ酸との関係を検討する目的で行った。

## 材 料 お よ び 方 法

Wistar系ラットの1細胞期(未受精卵)、2細胞期および初期胚盤胞の卵子を用いた。採卵および培養には滅菌Ca-free Krebs Ringer Phosphate Buffer (pH 7.4) (K.R.P緩衝液)を用いた。形態的に正常な卵子50個を0.1mlのK.R.P緩衝液中に集め、直ちに37.5℃下で前培養5分間行なったのち、エネルギー無添加区においては0.1mlのK.R.P緩衝液を、添加区においては0.1mlのグルコース(終末濃度 $10^{-2}$ M)、乳酸ナトリウム( $5 \times 10^{-2}$ M)、ピルビン酸ナトリウム( $5 \times 10^{-4}$ M)のいずれかと0.5  $\mu$ ci/ml  $^3$ H-(T)-L-Leucine (Spec. act. 0.15mci/ml)、0.5  $\mu$ ci/ml  $^{14}$ C-(U)-L-Glutamic acid (Spec. act. 0.11mci/ml)を同時添加した。なお、単一 $^3$ H-Leucineの取込みは上記と同様に行い $^3$ H-Leucine単一投与した。培養時間は、各々0、15、30、45、60分で、培養後、冷TCAを加え、終末濃度5%にして反応を停止させ、ミリポアフィルター(SCMP 8 $\mu$ )上で5%TCAを用いて数回洗浄、乾燥後、液体シンチレーション・スペクトロメーター(Aloka LSC-601)で測定した。各取込み値は、各々の培養時間の取込み値より0時間値を差引いた値をdpm/eggで示した。

単一 $^{14}$ C-グルタミン酸のデータは既報を参考にした<sup>5)</sup>。

## 結 果

### 1) 単一 $^3$ H-ロイシンの取込みについて

1細胞期、2細胞期および初期胚盤胞におけるエネルギー源無添加、グルコース、乳酸、ピルビン酸を添加

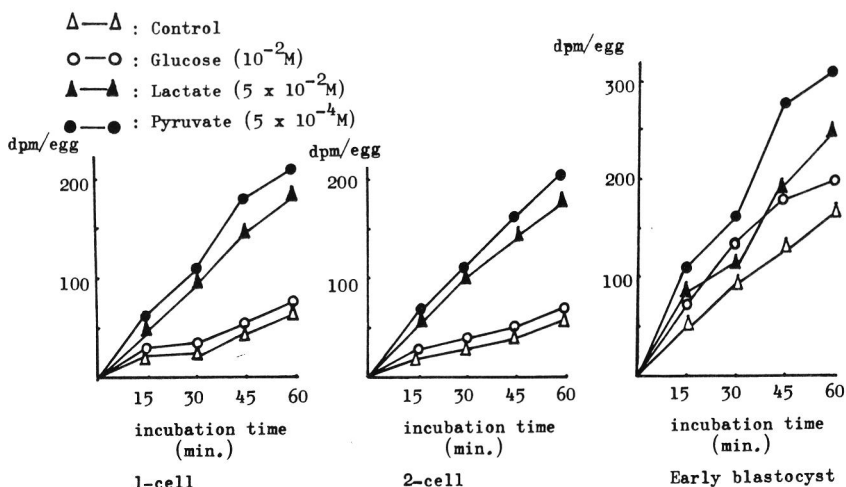


Fig.1. Effect of glucose, lactate or pyruvate addition on incorporation of  $^3$ H-leucine of each stage of egg in each time of incubation.

した場合の  $^3\text{H}$ -ロイシンの取込みを図1に示した。1細胞期、2細胞期および初期胚盤胞とも培養60分までは取込みが直線的に増加することが認められた。また、1細胞期および2細胞期ではピルビン酸および乳酸添加時、初期胚盤胞ではピルビン酸、乳酸およびグルコース添加時に  $^3\text{H}$ -ロイシンの取込みが増加することが認められた ( $P < 0.05$ )。

## 2) ダブルトレーサー法による取込み

i) エネルギー源無添加時の取込みについて：結果を表1に示した。1細胞期、2細胞期および初期胚盤胞とも培養60分まで  $^3\text{H}$ -ロイシンおよび $^{14}\text{C}$ -グルタミン酸の取込みが増加した。 $^3\text{H}$ -ロイシンおよび $^{14}\text{C}$ -グルタミン酸の取込みは、1細胞期と2細胞期の間には有意差がみられなかった ( $P > 0.05$ ) が、1細胞期および2細胞期と初期胚盤胞の間には有意差がみられた ( $P < 0.05$ )。

ii) グルコース添加時の取込みについて：結果を表2に示した。1細胞期、2細胞期および初期胚盤胞とも培養60分までは、 $^3\text{H}$ -ロイシンと $^{14}\text{C}$ -グルタミン酸の取込みが増加することが認められた。 $^3\text{H}$ -ロイシンと $^{14}\text{C}$ -グルタミン酸の取込みは、1細胞期と2細胞期の間には有意差がみられなかった ( $P > 0.05$ ) が、1細胞期および2細胞期と初期胚盤胞の間には有意差がみられた ( $P < 0.05$ )。 $^3\text{H}$ -ロイシン +  $^{14}\text{C}$ -グルタミン酸の取込みをエネルギー源無添加時の取込みと比較すると1細胞期、2細胞期および初期胚盤胞のいずれも取込みが増加した ( $P < 0.05$ )。

iii) 乳酸添加時の取込みについて：結果を表3に示した。1細胞期、2細胞期および初期胚盤胞とも培養60分までは、 $^3\text{H}$ -ロイシンおよび $^{14}\text{C}$ -グルタミン酸の取込みが増加することが認められた。乳酸添加時の $^3\text{H}$ -ロイシンと $^{14}\text{C}$ -グルタミン酸の取込み値は、エネルギー源無添加時およびグルコース添加時の取込みと比べ、各卵子とも有意に取込みが増加した ( $P < 0.05$ )。

iv) ピルビン酸添加時の取込みについて：結果を表4に示した。ピルビン酸添加時の $^3\text{H}$ -ロイシンおよび $^{14}\text{C}$ -グルタミン酸の取込み値は、エネルギー源無添加時およびグルコース添加時の取込みと比べて高い取

Table 1. Incorporation of  $^3\text{H}$ -leucine and  $^{14}\text{C}$ -glutamic acid in rat egg.  
(dpm/egg) (Mean  $\pm$  S.E.)

Stage of egg	Incubation time (min.)			
	15	30	45	60
1-cell (unfertilized)	43.3 $\pm$ 3.7 (13.8 $\pm$ 5.2)	59.1 $\pm$ 4.2 (15.3 $\pm$ 2.9)	82.6 $\pm$ 4.8 (18.4 $\pm$ 3.2)	106.1 $\pm$ 7.2 (21.2 $\pm$ 4.4)
2-cell	37.1 $\pm$ 5.9 (6.9 $\pm$ 2.1)	62.8 $\pm$ 3.2 (11.7 $\pm$ 3.5)	86.8 $\pm$ 6.9 (17.4 $\pm$ 5.4)	102.7 $\pm$ 7.2 (19.9 $\pm$ 5.8)
Early blastocyst	83.8 $\pm$ 9.5 (47.3 $\pm$ 6.7)	139.7 $\pm$ 7.9 (68.4 $\pm$ 7.9)	173.4 $\pm$ 8.3 (88.3 $\pm$ 8.2)	210.1 $\pm$ 10.0 (124.9 $\pm$ 9.7)

Number in parentheses represent incorporation of  $^3\text{H}$ -leucine.

Table 2. Effect of glucose addition on incorporation of  $^3\text{H}$ -leucine and  $^{14}\text{C}$ -glutamic acid.  
(dpm/egg) (Mean $\pm$ S.E.)

Stage of egg	Incubation time (min.)			
	15	30	45	60
1-cell (unfertilized)	79.0 $\pm$ 6.5 (15.3 $\pm$ 2.3)	97.7 $\pm$ 8.2 (18.1 $\pm$ 1.3)	114.4 $\pm$ 9.6 (22.5 $\pm$ 4.1)	167.5 $\pm$ 7.5 (24.7 $\pm$ 5.9)
2-cell	80.3 $\pm$ 7.3 (14.7 $\pm$ 4.0)	98.8 $\pm$ 4.7 (17.3 $\pm$ 5.2)	153.4 $\pm$ 6.1 (23.9 $\pm$ 3.8)	175.8 $\pm$ 9.2 (25.4 $\pm$ 6.4)
Early blastocyst	81.3 $\pm$ 5.8 (57.3 $\pm$ 6.3)	152.5 $\pm$ 8.5 (74.3 $\pm$ 7.7)	172.4 $\pm$ 5.5 (85.7 $\pm$ 8.3)	220.9 $\pm$ 8.7 (142.1 $\pm$ 9.0)

Number in parentheses represent incorporation of  $^3\text{H}$ -leucine.

Table 3. Effect of lactate addition on incorporation of  $^3\text{H}$ -leucine and  $^{14}\text{C}$ -glutamic acid.  
(dpm/egg) (Mean $\pm$ S.E.)

Stage of egg	Incubation time (min.)			
	15	30	45	60
1-cell (unfertilized)	134.5 $\pm$ 5.6 (20.1 $\pm$ 2.1)	171.1 $\pm$ 7.5 (27.3 $\pm$ 4.3)	197.6 $\pm$ 8.9 (32.2 $\pm$ 5.6)	202.6 $\pm$ 9.9 (45.8 $\pm$ 7.6)
2-cell	87.7 $\pm$ 5.4 (22.9 $\pm$ 4.2)	145.6 $\pm$ 7.6 (30.8 $\pm$ 6.9)	159.0 $\pm$ 9.4 (48.8 $\pm$ 7.5)	206.8 $\pm$ 7.4 (57.9 $\pm$ 8.4)
Early blastocyst	129.4 $\pm$ 7.6 (86.7 $\pm$ 6.8)	248.4 $\pm$ 7.1 (108.3 $\pm$ 9.8)	396.6 $\pm$ 8.3 (166.7 $\pm$ 8.6)	496.8 $\pm$ 8.4 (183.3 $\pm$ 7.1)

Number in parentheses represent incorporation of  $^3\text{H}$ -leucine.

込み値を示した。しかし、ビルビン酸添加時の  $^3\text{H}$ -ロイシンの取込みは、乳酸添加時と比べて1細胞期の15、30、45分値、2細胞期の15分値において有意差がなかった ( $P>0.05$ )。また、ビルビン酸添加時と比べて1細胞期の30、45分値は有意差がなかった ( $P>0.05$ )。それ以外のビルビン酸添加時の  $^3\text{H}$ -ロイシン+  $^{14}\text{C}$ -グルタミン酸の取込みは、乳酸時の取込みより高かった ( $P<0.05$ )。

Table 4. Effect of pyruvate addition on incorporation of  $^3\text{H}$ -leucine and  $^{14}\text{C}$ -glutamic acid.  
(dpm/egg) (Mean  $\pm$  S.E.)

Stage of egg	Incubation time (min.)			
	15	30	45	60
1-cell (unfertilized)	103.1 $\pm$ 7.2 (27.1 $\pm$ 4.8)	177.3 $\pm$ 5.2 (37.3 $\pm$ 3.7)	195.1 $\pm$ 8.7 (45.5 $\pm$ 5.9)	232.1 $\pm$ 7.1 (66.2 $\pm$ 4.9)
2-cell	144.1 $\pm$ 4.8 (37.3 $\pm$ 6.3)	167.9 $\pm$ 7.2 (55.0 $\pm$ 4.0)	190.4 $\pm$ 6.4 (73.4 $\pm$ 7.3)	220.7 $\pm$ 8.0 (87.2 $\pm$ 5.3)
Early blastocyst	182.1 $\pm$ 9.6 (94.4 $\pm$ 6.7)	356.4 $\pm$ 11.2 (133.4 $\pm$ 9.7)	437.1 $\pm$ 9.9 (200.4 $\pm$ 8.7)	525.7 $\pm$ 12.0 (260.6 $\pm$ 11.0)

 Number in parentheses represent incorporation of  $^3\text{H}$ -leucine.

## 考 察

マウス卵子を用いたアミノ酸の取込みおよび蛋白質合成に関する研究は、Mintz<sup>7)</sup>、Weitlauf and Greenwald<sup>8)</sup>、Monesi and Salfi<sup>9)</sup>、Brinster<sup>10)</sup>などが報告している。しかし、ラット卵子を用いた報告は少なく、また、ダブルトレーサー法を用いての取込みを測定した報告はない。

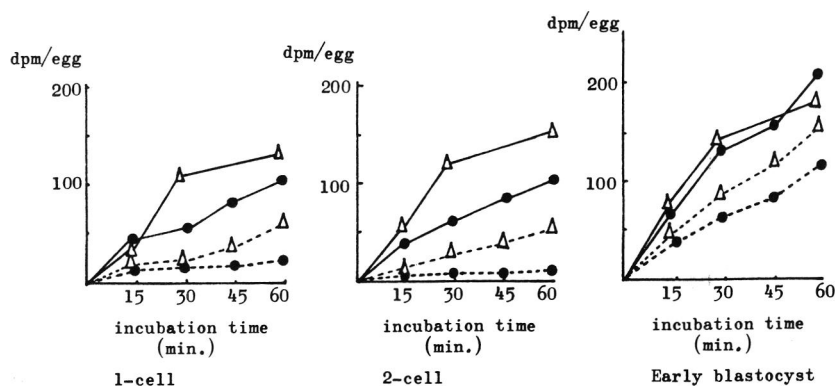


Fig.2. Incorporation of  $^3\text{H}$ -leucine (●-----●) and  $^{14}\text{C}$ -glutamic acid (●——●) in rat egg.  
 $\triangle$ ----- $\triangle$ : incorporation of  $^3\text{H}$ -leucine alone.  
 $\triangle$ —— $\triangle$ : incorporation of  $^{14}\text{C}$ -glutamic acid alone.



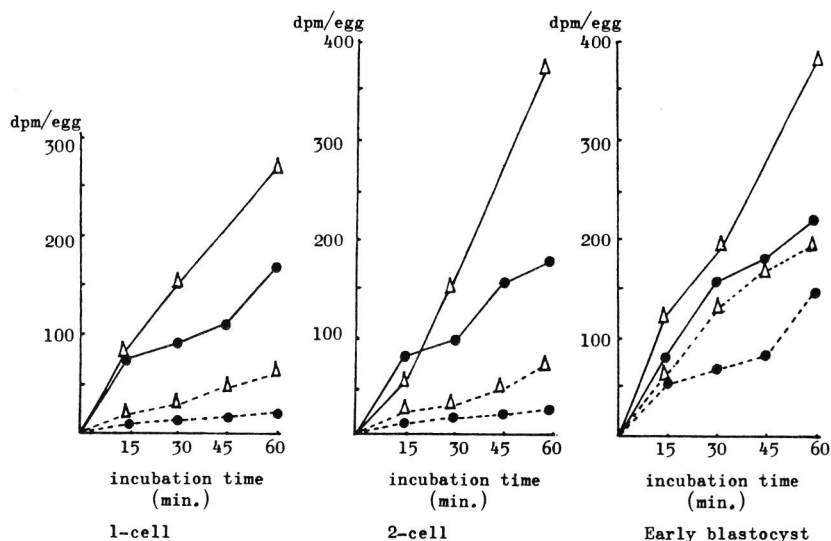


Fig.3. Effect of glucose addition on incorporation of  $^3\text{H}$ -leucine (●-----●) and  $^{14}\text{C}$ -glutamic acid (●——●) of each stage of egg in each time of incubation.

△-----△: incorporation of  $^3\text{H}$ -leucine alone. △——△: incorporation of  $^{14}\text{C}$ -glutamic acid alone.

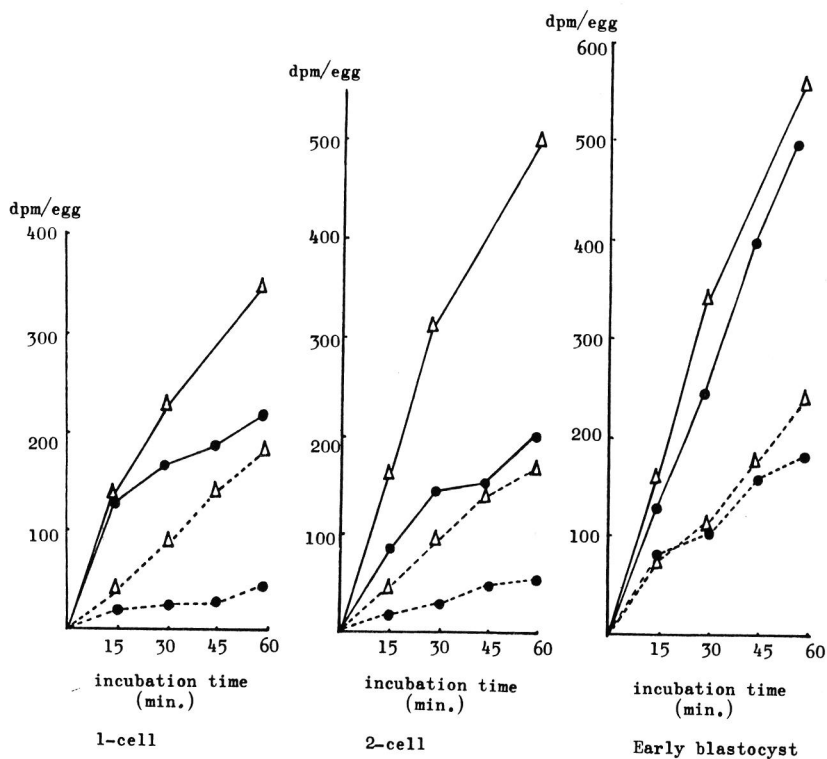


Fig.4. Effect of lactate addition on incorporation of  $^3\text{H}$ -leucine (●-----●) and  $^{14}\text{C}$ -glutamic acid (●——●) of each stage of egg in each time of incubation.

△-----△: incorporation of  $^3\text{H}$ -leucine alone.

△——△: incorporation of  $^{14}\text{C}$ -glutamic acid alone.

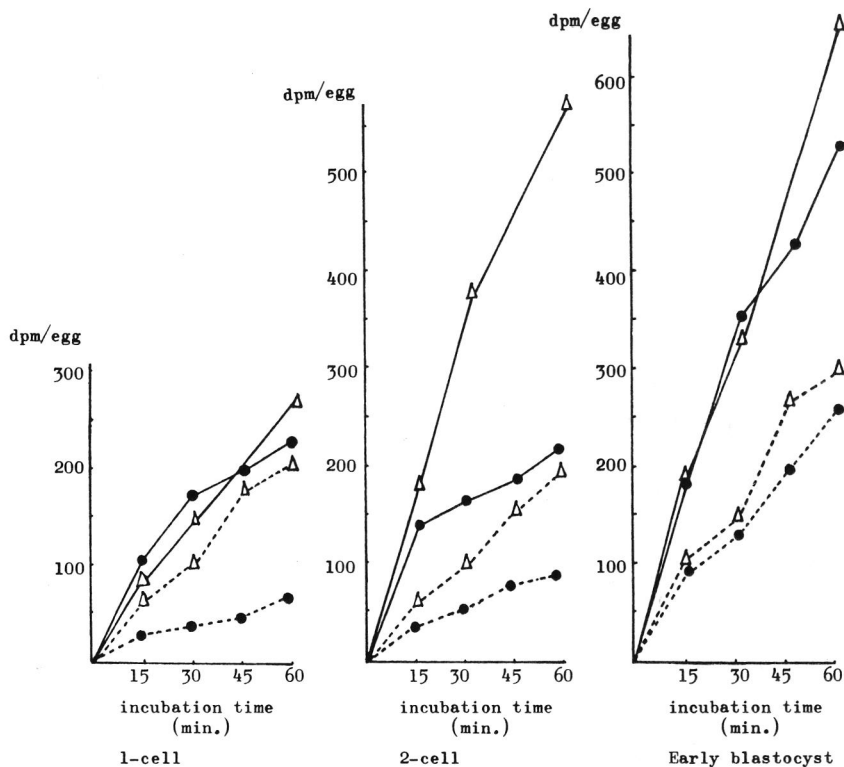


Fig.5.  $^{14}\text{C}$ -glutamic acid (●—●) of each stage of egg in each time of incubation.

△—△: incorporation of  $^3\text{H}$ -leucine alone.

△—△: incorporation of  $^{14}\text{C}$ -glutamic acid alone.

エネルギー源無添加時およびグルコース、乳酸またはビルビン酸添加時の  $^3\text{H}$ -ロイシン+ $^{14}\text{C}$ -グルタミン酸の取込みは、1細胞期、2細胞期および初期胚盤胞のいずれも培養60分まで増加すること、また、グルコース、乳酸およびビルビン酸添加によって取込みが増加することが認められた。これらは単一  $^3\text{H}$ -ロイシンおよび  $^{14}\text{C}$ -グルタミン酸の取込みの結果と一致した。また、いずれの場合も  $^{14}\text{C}$ -グルタミン酸の取込みが高かった。

シングルならびにダブルトレースにおける  $^3\text{H}$ -ロイシンと  $^{14}\text{C}$ -グルタミン酸の取込みを、エネルギー源無添加、グルコース、乳酸、ビルビン酸添加時に分けて図2～5に示した。ダブルトレーサーによる  $^3\text{H}$ -ロイシン+ $^{14}\text{C}$ -グルタミン酸の取込みは、いずれも単一  $^3\text{H}$ -ロイシンおよび単一  $^{14}\text{C}$ -グルタミン酸の取込みより低くなる傾向がみられた。

シングルならびにダブルトレースにおける  $^3\text{H}$ -ロイシンの取込みを1とした場合の  $^{14}\text{C}$ -グルタミン酸の取込み値を図6に示した。シングルならびにダブルトレースの場合とも  $^{14}\text{C}$ -グルタミン酸の取込みの方が、 $^3\text{H}$ -ロイシンの取込みより約1.5～7.3倍高く、双方とも同じ傾向にみられた。すなわち、単一アミノ酸の場合あるいは複数のアミノ酸の場合、多少増減はみられるが、ほとんど同じ取込みパターンであることが示唆された。

子宮分泌液中の遊離アミノ酸のロイシンとグルタミン酸の比は、発情前期で約8.4、偽妊娠5日で約7.7といずれもグルタミン酸の方が多く<sup>6)</sup>、卵子のアミノ酸の取込みと子宮分泌液中の遊離アミノ酸含量の間になんらかの関係が存在することが示唆された。

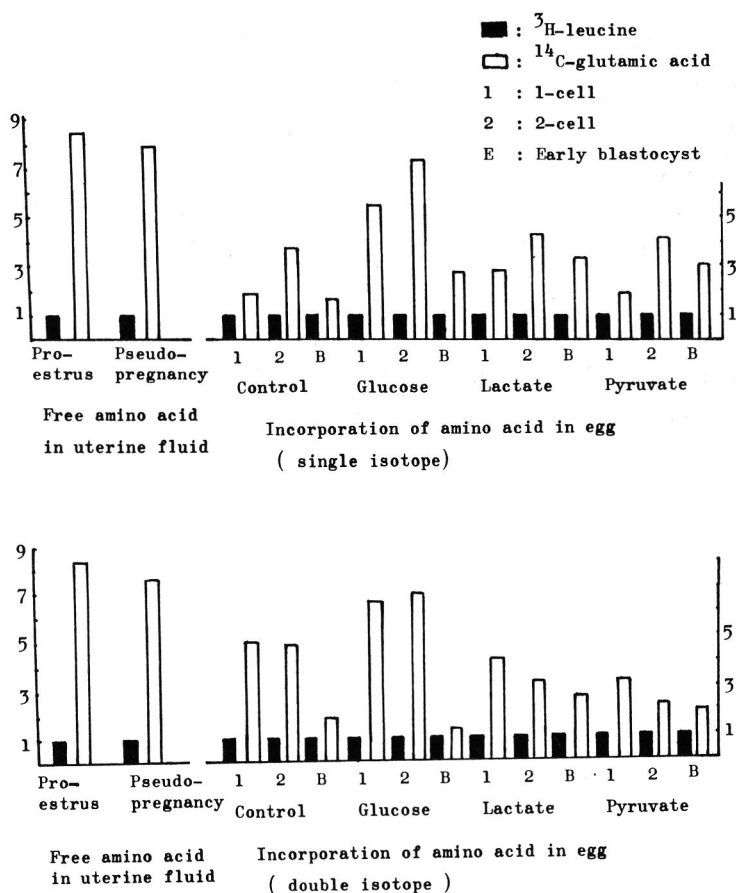


Fig.6. Relationship between content ratio of leucine to glutamic acid in uterine fluid and incorporation ratio of  $^3\text{H}$ -leucine to  $^{14}\text{C}$ -glutamic acid in egg.

## 要 約

単一  $^3\text{H}$ -ロイシンおよびダブルトレーサーによる  $^3\text{H}$ -ロイシン+ $^{14}\text{C}$ -グルタミン酸のラット卵子への取込みは、培養60分まで取込みが増加すること、また、グルコース、乳酸およびビルビン酸添加によって取込みが増した。

ダブルトレースの  $^3\text{H}$ -ロイシンおよび $^{14}\text{C}$ -グルタミン酸のラット卵子への取込みは、単一  $^3\text{H}$ -ロイシンおよび単一 $^{14}\text{C}$ -グルタミン酸の取込みと比べて、取込みが低くなる傾向がみられた。

子宮分泌液中の遊離アミノ酸のロイシンとグルタミン酸の比と、卵子へのロイシンとグルタミン酸の取込み比が類似していることから、卵子のアミノ酸の取込みと子宮分泌液中の遊離アミノ酸含量との間になんらかの関係が存在することが示唆された。

## 主 要 文 献

- 1) 辻井弘忠、菅原七郎、竹内三郎 (1969): 家畜繁殖誌、15. 32-34。
- 2) Tsujii, H., Sugawara, S. and Takeuchi, S. (1970): Tohoku J. Agr. Res., 21. 13-19.
- 3) Tsujii, H., Sugawara, S. and Takeuchi, S. (1971): Tohoku J. Agr. Res., 22. 31-35.
- 4) 辻井弘忠、菅原七郎、竹内三郎 (1972): 日本畜産学会報、43. 91-96。
- 5) Tsujii, H., Sugawara, S. and Takeuchi, S. (1972): Jap. J. Zotech. Sci., 43. 660-665。
- 6) 辻井弘忠、菅原七郎、竹内三郎 (1971): 家畜繁殖誌、16. 140-146。
- 7) Mintz, B. (1964): J. Exp. Zool. 157, 85。
- 8) Weitlauf, H.M. and Greenwald, G.S. (1967): Anat. Rec. 159, 249.
- 9) Monesi, V. and Salfi, V. (1967): Exp. Cell Res. 46, 632。
- 10) Brinster, R.L. (1971): J. Reprod. Fert. 27, 329。

健保適用

# 下垂体性性腺刺激ホルモン パーゴナル<sup>®</sup>注75・150

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



## 【効能・効果】

間脳性（視床下部性）無月経，下垂体性無月経の排卵誘発

## 【用法・用量】

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

## 【包装】

パーゴナル注 75：10管  
パーゴナル注150：10管



帝國臓器製薬株式会社  
東京都港区赤坂二丁目5番1号

## 【使用上の注意】

### 1. 一般的注意

1) 本療法の対象は不妊症患者のうちの，間脳又は下垂体前葉の機能・器質的障害に由来する性腺刺激ホルモン低分泌無月経患者であるので次の点に注意すること。

ア．エストロゲン・プロゲステロンテストで初めて反応する第2度無月経又は抗エストロゲン療法（クエン酸クロミフェン，シクロフェニル等）が奏効しない第1度無月経の患者に投与すること。

イ．患者の状態（例えばエストロゲン・性腺刺激ホルモン・プレグナジオール分泌，頸管粘液，基礎体温等）を詳細に検査し，子宮性無月経の患者には投与しないこと。

ウ．原発性卵巣不全による尿中性腺刺激ホルモン分泌の高い患者，副腎・甲状腺機能の異常による無月経患者，頭蓋内に病変（下垂体腫瘍等）を有する患者，及び無排卵症以外の不妊患者には投与しないこと。

2) 本療法の卵巣過剰刺激による副作用を避けるため，投与前及び治療期間中は毎日内診を行い，特に次の点に留意し，異常が認められた場合には，直ちに投与を中止すること。

ア．患者の自覚症状（特に下腹部痛）の有無

イ．卵巣腫大の有無

ウ．基礎体温の異常上昇の有無（毎日測定させること）。

エ．頸管粘液量とその性状

3) 卵巣過剰刺激の結果としての多胎妊娠の可能性があるため，その旨をあらかじめ患者に説明すること。

4) 妊娠初期の不注意な投与を避けるため，投与前少なくとも1ヵ月間は基礎体温を記録させること。

5) 産婦人科・内分泌専門医師の管理のもとに投与すること。

### 2. 次の場合には投与しないこと

1) 卵巣腫瘍及び多量の胞性卵巣症候群を原因としない卵巣の腫大を有する患者

2) 妊婦

3. 次の患者には投与しないことを原則とするが，やむを得ず投与する場合には，慎重に投与すること。

1) 児を望まない第2度無月経患者

2) 多量の胞性卵巣を有する患者

### 4. 副作用

1) 卵巣過剰刺激 卵巣腫大，下腹部痛，下腹部緊迫感，腹水・胸水を伴ういわゆる，Meigs様症候群等があらわれた場合には，直ちに投与を中止するなど，適切な処置を行うこと。

2) その他 ときに悪心，頻尿，しびれ感，頭痛，浮腫があらわれることがある。また尿量が増加することがある。

### 5. 相互作用

胎盤性性腺刺激ホルモンとの併用により，卵巣の過剰刺激による卵巣腫大，腹水・胸水を伴ういわゆるMeigs様症候群があらわれることがある。

卵丘細胞層との共培養による牛体外成熟・体外受精卵の体外発生と受胎例について

Development of Bovine Follicular Oocytes Matured and Fertilized *In Vitro*  
by Co-culture with Cumulus Cells and subsequent Pregnancies by Non-surgical  
Transfer

\*堀内俊孝・高田直和・沼辺孝・大久範幸・石川勇志

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

宮城県畜産試験場・酪農肉牛部, \*現所属・広島農業短期大学

Miyagi-ken Exp. Station of Anim. Sci., Hiroshima Agricultural College

体外受精した牛体外成熟卵は体外では8~16細胞期までしか発生し得なかったため<sup>1)</sup> ウサギ<sup>2)</sup>やヒツジ<sup>3, 4)</sup>卵管内で体内培養することによって胚盤胞期への発生が検討された。そして、この方法によって牛体外成熟卵は正常に胚盤胞期まで発生し受精卵に移植することで産仔が得られた。

最近、牛体外成熟・体外受精卵を卵丘細胞層<sup>5)</sup>、栄養芽層小胞(trophoblastic vesicle)<sup>6)</sup>や卵管上皮細胞層<sup>7)</sup>と共培養することにより体外での発生を改善し得ることが報告された。

本研究は、卵丘細胞層との共培養による牛体外成熟・体外受精卵の体外培養法を追試し、その結果受胎例が得られたので報告する。

#### 材料および方法

宮城県仙北食肉市場において屠殺されたホルスタイン種と黒毛和種の卵巢を屠殺後3時間以内に実験室に持ち帰り、注射針(21G5/8)をつけた注射筒で小卵胞(1~8mm)を吸引した。卵丘細胞層が密に付着し細胞質が均一な暗黒色を呈する卵胞卵のみを選択し、10%非働化仔牛血清(GIBCO Cat 200-6170, Lot 24K6174)加TCM199(GIBCO, 380-2340)で20~24時間培養し体外成熟させた。

精子は宮城県畜試繁殖種雄牛の凍結精液を用いた。各精液は融解後、10mMカフェイン加B0液<sup>8)</sup>で2回洗浄(約 $2.0 \times 10^7$ /ml)し、 $0.1 \sim 0.4 \mu\text{M}$ のA23187で60秒間処理し媒精した。媒精後4~5時間で10%非働化仔牛血清加TCM199に移し培養を続けた。

媒精後72時間で卵子は卵丘細胞層からピペettingによって遊離させた。その時点で、卵丘細胞はシャーレ底面に付着し単層に増殖しており、卵子はさらに72時間卵丘細胞層と共培養した。媒精後6日目で32細胞期から初期桑実期に発生した胚は20%非働化仔牛血清加Ham's F10に移し換え培養した。

#### 結果および考察

牛体外成熟・体外受精卵を卵丘細胞層と共培養した結果は表1に示した。牛体外成熟・体外受精卵83個のうち媒精後7日目で8~32細胞期に発生した胚は17個、桑実期と胚盤胞期に発生した胚は20個(24%)であった。

初期桑実胚各3個を2頭のホルスタイン種経産牛に移植したところ1頭が受胎した。超音波診断によって単仔であることが確認されたが、65-90日の間に流産した。1.8Mプロパンディオールで凍結保存<sup>9)</sup>した5個の牛胚は25℃の温水中で融解し、0.3Mシヨ糖液/PBSで耐凍剤を除去後、20%仔牛血清加Ham's F10で17時間培養して生存性を確認した。その結果、2個(40%)が拡張胚盤胞に発生し、ホルスタイン種末経産牛に移植したところ受胎した。

Table 1. Development of bovine oocytes fertilized in vitro and co-cultured with cumulus cells

No. of oocytes fertilized	Stage of egg/embryo development 8-32 cell morulae/blastocyst(%)	
83	17	20(24)

ことで胚盤胞胚へ約11%が発生したと発表した。しかし藤谷ら(1988)<sup>11)</sup>は媒精8時間以降卵丘細胞層には体外発生を積極的に促進する作用がないことを明らかにした。このことは、体外成熟・体外受精卵の体外発生にとって卵丘細胞層は初期に短期間存在することが有効であるかもしれないことを示唆する。今後さらに詳細に検討する必要がある。

体外成熟培養での卵丘細胞層の膨潤と媒精後の卵丘細胞層のシャーレ底面への付着・増殖は血清のロットによって影響を受けた。本研究で用いた仔牛血清は膨潤・付着・増殖のすぐれているもので、牛胎児血清でもロットによって有効なものがあった。血清の由来だけでなくロット間の変動も大きいと思われる。また、Sanbuissho & Threlfall(1985)<sup>13)</sup> Lu et al(1987)<sup>4)</sup>は体外成熟培地への発情期牛血清添加の有効性を報告し、藤谷ら(1987)は体外成熟・体外受精卵の体外培養系における胚盤胞期胚への発生率が牛胎児血清よりも仔牛血清で良かった<sup>13)</sup>と発表した。体外成熟と体外発生過程での血清の有効性については今後の課題である。

体外成熟・体外受精由来の桑実胚と胚盤胞期胚を凍結融解し移植することで受胎例が得られたが、発情後7日目に採卵した体内受精・体内発生胚の凍結融解後の生存率に比べ非常に低かった。そして、体外発生した胚盤胞期胚は体内発生したものよりも細胞質が暗黒色で活力が低く思われた。しかし、培養の持続によって透明帯から脱出した。そのため、これら胚の凍結保存についてはさらに良好な凍結方法を検討するか体外培養系の改善によって活力の高い胚を发育させることが必要と思われる。

#### 参考文献

- 1) Eyestone WH, First NL, Theriogenology 25, 152 Abstr 1986; 2) 花田章, 家畜繁殖誌 31, 56-61, 1985;
- 3) Eyestone WH, Leibfried-Rutledge ML, Northey DL, Gilligan BG, First NL, Theriogenology 27, 1-7 1987; 4) Lu KH, Gorden I, Gallagher M, vet Rec 121, 259-260, 1987; 5) 梶原豊・後藤和文他, 家畜繁殖雑誌 33, 173-180, 1987; 6) Heyman Y, Menezo Y, Chesene Y, Camous S, Garnier V, Theriogenology 27, 59-68, 1987; 7) Eyestone WH, Vignieri J, First NL, Theriogenology 27, 228 Abstr, 1987; 8) Brackett BG, Oliphant G, Biol Reprod 12, 260-274, 1975; 9) 堀内俊孝・沼辺孝他, 第80回日畜学会講演要旨 V-48, 1988; 10) 福田芳詔・市川優樹他, 第79回日畜学会講演要旨 I-35, 1987; 11) 藤谷泰裕・高橋政義他, 第80回日畜学会講演要旨 V-42, 1988; 12) 藤谷泰裕・塩谷康生他, 第72回家畜繁殖学会講演要旨 p 17, 1987; 13) Sanbuissho A, Threlfall WR, Theriogenology 23, 226 Abstr, 1985.

# 哺乳動物卵子研究会会則

## 名 称

第 1 条 本会は、哺乳動物卵子研究会と称する。

## 事 務 局

第 2 条 本会の事務局は、東京都内または近隣県内に置く。

## 目 的

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

## 事 業

第 4 条 本会は、前条の目的を達成するために、次の事業を行う。

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

## 会 員

第 5 条 本会は、次の会員をもって組織する。

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

## 入 会

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

## 退 会

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

第 8 条 会員は、次の事項に該当する時は会員の資格を失う。

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

## 役 員

第 9 条 本会に次の役員を置く。

会 長 1 名

副 会 長 1 名



理	事	若干名
監	事	2 名
幹	事	2 名

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

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

第 11 条 役員の選出は、次によって行う。

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

第 12 条 役員の任期は 2 年とし、再任を妨げない。

## 総 会

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

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

第 14 条 総会は次の事項を審議し、決定する。

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

## 会 計

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

2. 本会の経費は会費、寄付金およびその他の収入をもってこれにあてる。

## 附 則

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

## 哺乳動物卵子研究会誌投稿規定

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

### 雑誌の場合

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

### 単行本の場合

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

〒252

神奈川県藤沢市亀井野 1866

日本大学農獣医学部獣医生理学教室内

TEL 0466-81-6241 内線 332

哺乳動物卵子研究会編集委員会

# 哺乳動物卵子研究会役員

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

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

## 編 集 後 記

本年は、夏から秋にかけて気象庁開設以来と云う、いくつかの記録を残した異常気象でありましたが、会員の皆様には益々御健勝にて御活躍のことと存じます。

本号には、原著論文9編と短報1編を掲載することができ、内容も豊富で読み応えがあるものと思います。また、投稿論文の方も巻を重ねるごとに増えており、頼しい限りであります。

明年の春には、本会が発足して以来30年目を迎えることとなります。現在、30年を記念する大会を豊田委員長のもとで企画しておりますのでご期待いただきたく存じます。

なお、6巻1号の投稿論文を募集中でありますので多数ご投稿下さいますようお願いいたします。

(遠 藤 克)

## 編 集 委 員

委員長：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 2 号

V o l . 5

N o . 2

昭和63年9月25日 印刷

昭和63年10月1日 発行

( 会 員 頒 布 )

発行者 哺乳動物卵子研究会  
代表 佐久間 勇 次

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

印刷所 誠和印刷株式会社  
住 所 藤沢市城南5丁目2番8号  
電 話 0466-34-9110(代表)

# 繁殖障害に!!



(家畜共済診療点数採用)

要指示医薬品

動物用  
医薬品

## アントリン

前葉性卵胞刺激  
ホルモン剤



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

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

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



**デンカ製薬株式会社**

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

日本薬局方 注射用胎盤性性腺刺激ホルモン

動物  
専用

## ブペローゲン®

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

日本薬局方 注射用血清性性腺刺激ホルモン

動物  
専用

## ピーメックス®

1,000単位

販 売 元



**三 共 株 式 会 社**

東京都中央区銀座2-7-12

製 造 元



**三共ゾキ株式会社**

東京都中央区日本橋本町4-1-14

