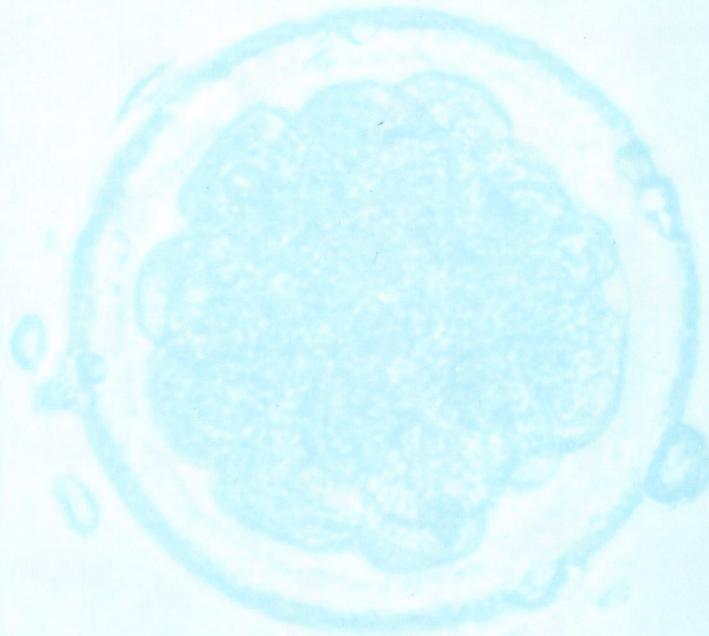


哺乳動物卵子研究会誌

Journal of Mammalian Ova Research



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

Vol. 6 No. 1
April 1989



◆牛の繁殖障害の
分野に新しい可能性！



タケダのすぐれた合成技術が生んだ

LH放出ホルモン製剤

動物用医薬品

コンセラール®注射液

牛の卵胞のう腫、排卵障害、
卵巣静止の治療、排卵促進に

(要指示)

製造発売元

武田薬品工業株式会社

提携

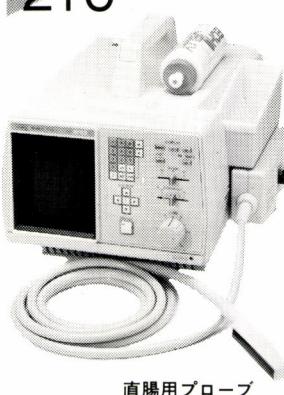
帝国臓器製薬株式会社

FHK スーパーアイ SSD-210・610・630

動物用電子走査超音波診断装置

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

210



- 持ち歩ける超音波診断器
- 2画像表示機能

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

直腸用プローブ

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ax(03)812-3663

哺乳動物卵子研究会誌

第6巻 第1号

平成元年4月

目次

原 著

マウス4細胞期胚から分離した割球の発生能

中村克彦、石島芳郎 1

嫌気的条件下におけるラット卵子のアミノ酸の取り込みについて

辻井弘忠 6

第30回哺乳動物卵子研究会講演要旨集

特別講演

卵子研究30年の歩み 佐久間勇次 11

シンポジウム

「卵子の凍結保存に関する最近の進歩」

家畜胚の凍結保存 小栗紀彦 15

マウス初期胚の凍結保存；とくに系統差について

横山峯介 19

超急速凍結法を用いた体外受精由来マウス初期胚の凍結保存について

中瀧直己 23

教室におけるヒト胚凍結保存の導入の背景

辰巳賢一、野田洋一、福田愛作、馬岡 陽、松本 央、岸 淳二 江見信之、神崎秀陽、森 崇英 27

卵子凍結保存の染色体への影響 佐藤文彦、斎藤英和、広井正彦 31

一般講演

一頭の屠場牛卵巣より採取した卵胞卵子の胚盤胞への発生能について

高木優二、菅原七郎、正木淳二、江 金益、鐘 声、范 必勤 35

二重蛍光染色法による牛胚盤胞期胚の栄養膜細胞と内部細胞塊の分染色

岩崎説雄、吉田 豊、渡辺誠喜、中原達夫 37

未受精ハムスター卵の皮層顆粒の放出と滑面小胞体

岡田詔子、川村 良、永江 肇、岩城 章、猪俣賢一郎 39

ハムスター卵透明帯に関する糖質組織化学的検討

木村順平、高沢良徳、月瀬 東、岡野真臣、後藤 勤、佐藤嘉兵	4 1
マウス卵の受精前後におけるタンパク合成	
藤原敏博、堤 治、綾部琢哉、矢野 哲、三橋直樹、水野正彦	4 3
プロゲステロンのマウス初期胚蛋白合成、RNA合成活性化における役割	
綾部琢哉、堤 治、矢野 哲、藤原敏博、三橋直樹、水野正彦	4 5
スーパー・オキシドジスムターゼの初期胚姉妹染色分体交換に及ぼす影響	
斎藤英和、佐藤文彦、斎藤隆和、広井正彦	4 7
マウス卵子の受精と初期発生におけるG負荷の影響	
伊藤雅夫、丸瑠璃子、亀山祐一、石島芳郎	4 9
Lysophosphatidyl Choline 処理ハムスター精子の受精能について	
佐藤嘉兵、後藤 勤、高野 聰	5 1
ブタ、ヒト透明帯共通抗原23Kdに対するモノクローナル抗体の作製と その受精障害について	
長谷川昭子、香山浩二、磯島晋三	5 3
マウス初期胚に及ぼす添加血清の影響	
山元慎一、竹内一浩、福元清吾、堂地 勤、森 明人、永田行博	5 5
透明帯異常による受精障害	
淡路英雄、小林善宗、本田育子、津田朋男	
松山毅彦、松井素子、井上正人、藤井明和	5 7
マウス卵子の体外受精における卵丘細胞層の役割の再評価	
板垣佳明、東 貞宏、R.B.ABDULLAH、豊田 裕	5 9
外来ベースの体外受精の成績	
小林善宗、本田育子、津田朋男、松山毅彦	
淡路英雄、松井素子、井上正人、藤井明和	6 1
体外および体内受精由来マウス胚の着床率の比較	
森 匠、清水 弘、北嶋朋子、一戸喜兵衛	6 3
Superoxide Dismutase によるマウス2-Cellプロック解除の 機構について	
松本 央、野田洋一、馬岡 陽、辰巳賢一	
岸 淳二、森 崇英	6 5
低酸素濃度培養系におけるマウス2-Cellプロック解除について	
馬岡 陽、野田洋一、松本 央、岸 淳二	
辰巳賢一、森 崇英	6 7

マウス2細胞期胚割球の発生能におよぼす透明帯、団卵腔および割球の
形状の影響

河野友宏、小川美代子、中原達夫 69

マウスにおける非同調集合キメラ胚の発生能

乾 嘉孝、高橋寿太郎、安田泰久 71

悪性テラトカルシノーマ細胞凝集キメラマウス胚の発生

平野裕子、後藤 勤、佐藤嘉兵 73

ラットおよびマウスの凍結卵巣の培養

利部 聰、萬場光一、牧田登之 75

耐凍剤として1-2-Propanediolを用いたマウス胚盤胞胚の凍結保存

条件の検討

吉村 格、本好茂一、大久範幸、沼辺 孝

高田直和、石川勇志、堀内俊孝 77

ゴールデンハムスター未受精卵の凍結融解後の生存性について

加納 宏、関口総一郎、関本邦敏、下郡洋一郎 79

細胞数を半数にしたマウス胚の凍結解凍後の生存性

石森久雄、佐伯和弘、宇高健二 81

マウス胚の凍結保存による系統維持に関する検討：胚の回収率および

Vitrification法による凍結・融解後の発生率の系統差について

森口佳之、鈴木宏志、富樫 守、安達二朗 83

Journal of Mammalian Ova Research

Vol. 6 No. 1

April 1989

Contents

Originals

Developmental potential of blastomeres isolated from 4 cell mouse embryos.	NAKA MURA, K. & Y. ISHIJIMA	1
Incorporation of amino acids in rat eggs under an anaerobic condition.	TSUJII, H.	6

Proceeding of the 30th Annual Meeting of Japan Society for Mammalian Ova Research

Special report

Advances on ova research in the last 30 years.	SAKUMA, Y.	11
--	------------------	----

Symposium

Cryopreservation of embryos in the farm animals.	OGURI, N.	15
Freeze preservation of mouse embryos; with reference to strain differences.	YOKOYAMA, M.	19
Survival of mouse embryos derived from <i>in vitro</i> fertilization after ultrarapid freezing and thawing.	NAKAGATA, N.	23
The background of human embryo cryopreservation program in Kyoto university.	TATSUMI, K., Y. NODA, A. FUKUDA, Y. UMAOKA, H. MATSUMOTO, J. KISHI, N. EMI, H. KANZAKI & T. MORI	27
The effects of cryopreservation on embryo.	SATO, F., H. SAITO & M. HIROI	31

General reports

The development to the blastocyst stage of oocytes matured and fertilized <u>in vitro</u> from one abattoir cow.	TAKAGI, Y., S. SUGAWARA, J. MASAKI, J. JINYU, Z. SHENG & B. FAN	35
--	---	----

Differential nuclear staining of trophectoderm and inner cell mass of bovine blastocyst by double fluorochrome dye technique.

IWASAKI, S., Y. YOSHIDA,
S. WATANABE & T. NAKAHARA 37

Premature cortical granule release and sER of hamster oocyte.

OKADA, A., M. KAWAMURA, T. NAGAE,
A. IWAKI & K. INOMATA 39

Cytochemistry of glycoconjugates in the zona pellucida associated with hamster oocyte maturation.

KIMURA, J., Y. TAKAZAWA, A. TSUKISE,
M. OKANO, T. GOTO & K. SATO 41

Protein synthesis of pre- and post- fertilization mouse oocytes.

FUJIWARA, T., O. TSUTSUMI, T. AYABE.
T. YANO, N. MITSUHASHI & M. MIZUNO 43

Possible role of progesterone on the activation of protein and RNA synthesis of preimplantation mouse embryo.

AYABE, T., O. TSUTSUMI, T. YANO,
T. FUJIWARA, N. MITSUHASHI & M. MIZUNO 45

Effect of superoxide dismutase on sister chromatid exchange in early stage embryo.

SAITO, H., F. SATO, T. SAITO & M. HIROI 47

Effect of acceleration on fertilization and early development of mouse ova *in vitro*.

ITO, M., R. MARU, Y. KAMEYAMA & Y. ISHIJIMA 49

Fertilization ability of hamster spermatozoa treated with 1-
lysophosphatidyl choline.

SATO, K., T. GOTO & S. TAKANO 51

Production of monoclonal antibodies to the zona pellucida antigen (23Kd)
common to human and their inhibitory effects on in vitro fertilization in humans.

HASEGAWA, A., K. KOYAM & S. ISOJIMA 53

Effects of serum on the development of early mouse embryos.

YAMAMOTO, S., K. TAKEUCHI, S. FUKUMOTO,
T. DOUCHI, A. MORI & Y. NAGATA 55

Fertilization failure associated with zona pellucida abnormality in human IVF program.

AWAJI, H., Y. KOBAYASHI, I. HONDA,
T. TSUDA, M. MATSUI, M. INOUE & A. FUJII 57

Evaluation of the role of cumulus cells in fertilization of mouse eggs *in vitro*.

ITAGAKI, Y., S. AZUMA,
R. B. ABDULLAH & Y. TOYODA 59

Results of IVF-ET on outpatient bases.

KOBAYASHI, Y., I.HONDA, T.TSUDA,
T.MATSUYAMA, H.AWAJI. M.MATSUI,
M. INOUE & A.FUJII 6 1

A comparison between implantation rate of mouse embryos derived from in vitro and in vivo fertilization.

MORI, T., H.SHIMIZU,
T.KITAJIMA & K.ICHINOE 6 3

Mechanisms of the effect of superoxide dismutase on 2-cell block releasing in mouse embryo in vitro.

MATSUMOTO, H., Y.UNODA, Y.UMAOKA
K.TATSUMI, J.KISHI & T.MORI 6 5

Release of 2-cell block phenomenon in mouse embryos cultured under low oxygen tension.

UMAOKA, Y., Y.NODA, H.MATSUMOTO, J.KISHI,
K.TATSUMI & T.MORI 6 7

The effects of zona pellucida, perivitelline space and cell size on the development of single blastmeres of 2-cell mouse embryos.

KONO, T., M.OGAWA & T.NAKAHARA 6 9

Chimerization of asynchronously aggregated mouse embryos.

INUI, Y., J.TAKAHASHI & Y.YASUDA 7 1

Development of mouse chimeric embryos produced from malignant teratocarcinoma cells.

HIRANO, Y., T.GOTO & K.SATO 7 3

The culture of freezed ovary in rats and mouse.

KAGABU.S., K.MAMBA & T.MAKITA 7 5

Freezing strage of mouse blastocysts by using 1-2 Propanediol as cryoprotectant.

YOSIMURA, I., S.MOTOYOSHI, N.OHHISA,
T.NUMABE, N.TAKADA,
Y.ISHIKAWA & T.HORIUCHI 7 7

The effect of cryopreservation on the viability of unfertilized hamster oocytes.

KANO, H., S.SEKIGUCHI,
K.SEKIMOTO & Y.SHIMOGORI 7 9

Development of mouse half-embryos after freezing and thawing.

ISHIMORI, H., K.SAEKI & K.UTAKA 8 1

Strain differences in the recovery rate of embryos and the development after freezing and thawing by vitrification method in mice

MORIGUCHI, Y., H.SUZUKI,
M.TOGASHI & J.ADACHI 8 3

マウス 4 級胞期胚から分離した
割球の発生能

Developmental Potential of Blastomeres Isolated from 4 cell Mouse Embryos

中村克彦・石島芳郎

Katsuhiko NAKAMURA and Yoshiro ISHIJIMA

東京農業大学畜産学科家畜繁殖学研究室

Laboratory of Animal Reproduction, Department of Zootechnical Science,
Tokyo University of Agriculture

This paper describes the developmental potential of blastomeres isolated 4-cell embryos in mice.

Four-cell embryos were collected from superovulated CF#1 females which were mated with C57BL/6 males. Zona pellucidae were removed in Hanks solution containing 0.2 % pronase. After removal of zona pellucida, 4-cell embryos were separated into individual blastomeres by pipetting in Ca^{++} and Mg^{++} free Hanks solution containing 0.02% EDTA. Separated blastomeres (one-quarter embryos) were cultured in drops of M16 medium covered with paraffin oil at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 , 95% air for 72 hours.

Four one-quarter embryos developed to blastocysts were transferred into right uterine horn of CF#1 recipients on Day 4 or 5 pseudopregnancy, and 4 normal blastocysts of CF#1 strain cultured from 4-cell stage were transferred into left uterine horn of the same recipient.

The results were as follow: 1) The proportion of one-quarter embryos developed into blastocysts were 79/124 (63.7%). 2) By transfer of one-quarter embryos developed to blastocysts, the proportion of implantation sites and live fetuses were 6/24 (25.0%) and 0/24 (0%). On the other hand the proportion of implantation sites and live fetuses were 19/24 (79.2%) and 14/24 (58.3%).

緒言

実験動物において、胚分離による一卵性多子が容易に作出できれば、近交系作出のような手間をかけた遺伝的制御をしなくとも均質な個体が得られるので、研究への利用価値は高いと考えられる。

これまで、胚分離による一卵性多子の作出は、主としてマウスで研究されており、2細胞期胚の分離割球による一卵性双子に関しては、すでにTsunoda and McLaren(1983)によって4組の双胎子が得られたのを始め、富樫ら(1987)が7組の双子、また中村、石島(1988)が3組の双子を作出するのに成功している。一方、4細胞期胚を4分離した一卵性4つ子に関しては、Fiser and Macpherson 1976, 角田、杉江(1983), 富樫ら(1988)が培養により胚盤胞に発育した1/4胚の移植を試みているがまだ生存胎子すら得られておらず、この方法での4つ子作出は困難視されている。しかし、マウス4細胞期胚から分離した割球(1/4胚)の発生能の検討は、培養を含めてもそう多くはなく(Fiser and Macpherson 1976, Rossant 1976, 角田、杉江1983, O'Brien et al. 1984, Tojo et al. 1985, 富樫ら 1988), まだ検討の余地が残されている。

著者らは、分離胚によるマウスの一卵性多子作出の検討の一環として、すでに2細胞期胚から分離した1/2胚での成績は報告してきたが(中村、石島 1986, 1988, 中村ら 1987), その後4細胞期胚から分離した1/4胚についても培養、移植を試みたので報告する。

材料および方法

4細胞期胚は、CF ♀ 1系雌マウスに過排卵処理後C57BL/6系雄マウスを交配して所定の時期に採取した。採取した4細胞期胚は、0.2%のプロナーゼ(アクチナーゼE, 科研製薬)を含むHanks液中に入れて5分程度培養することによって透明帯の除去を行った。透明帯除去胚をHanks液で洗浄後、EDTA(第一化学)0.2%を含むカルシウム、マグネシウム欠Hanks液に移し、数回ピッティングすることにより割球の分離を行った。分離割球の培養は、シリコンコーティングされた小プラスチックシャーレ(直径35mm, 深さ10mm, Lux社製)を用い、シャーレごとにM16液0.1mlを滴下し流動パラフィンを覆った小滴を4個作り、4分離した割球を1個ずつ小滴に入れて行った。培養条件は、炭酸ガス5%, 空気95%, 湿度100%, 温度37°Cとした。培養は72時間行い、胚盤胞に達したものを見出しつつ発育胚とみなした。

移植には、分離した4個の割球がすべて胚盤胞に発達したものを見選び、偽妊娠4または5日のレシピエント(CF ♀ 1系雌マウス)の右子宮角に4個とも移植した。レシピエント

トの左子宮角には、対照胚として CF #1 系マウスの4細胞期から培養した胚盤胞を4個移植した。レシピエントは、妊娠18日に当たる日にと殺開腹し、着床状況（着床数、生存胎子）を観察した。

結果

マウス4細胞期胚から分離した割球 (1/4 胚) の培養ならびに移植成績は、それぞれ、Table 1 および 2 に示したとおりである。

4細胞期胚31個から分離した 124個の1/4 胚を72時間培養したところ、Table 1 に示すように、79個(63.7 %) が胚盤胞に発達した。このうち4割球ともが組で発育したものが 10/31 組 (40割球, 32.3%) 含まれていた。

4個の割球がともに発育した6組 (24個) の1/4胚を、1組 (4個) ずつ6例のレシピエントの右子宮角に移植した結果、Table 2 に示すように、全体で6/24胚 (25.0%) が着床したが、生存胎子は全く得られなかった。一方、左子宮角に移植された正常胚は、19/24胚 (79.2%) が着床し、14/24胚 (58.3%) が生存胎子であった。

Table 1 Development of blastomeres isolated from 4-cell mouse embryos

No. of cultured 1/4 embryos	No. of developed to blastocyst (%)
124	79 (63.7)

Table 2 Transfer of blastocysts following culture in blastomeres isolated from 4-cell mouse embryos

No. of recipients	No. of prgnant (%)	No. of embryos transferred	No. of implantation sites (%)		No. of living fetuses (%)	
			Normal	1/4	Normal	1/4
6	5 (83.3)	24	24	19 (79.2)	6 (25.0)	14 (58.3) 0 (0)

考察

CF #1 系雌に C57BL/6 系雄を交配して得た 4 細胞期胚から分離した 1/4 胚の胚盤胞への発生率は 63.7% であり、すでに、同条件で培養した同系の 2 細胞期胚から分離した 1/2 胚の発生率 74.2% には及ばなかった (中村, 石島 1988)。このことは、1/4 胚の発生能

が1/2胚よりいくぶん劣ることを示していた。しかし、これまで報告されている1/4胚の体外培養による胚盤胞への発生率、34.9% (Fiser and Macpherson 1976), 65% (O'Brien et al. 1984), 42.5% (Tojo et al. 1985) および61.8% (富樫ら 1988) に比べると、本実験の成績も遜色ないものであった。一方、角田、杉江(1983)は1/4胚を3日間マウス卵管内で培養し、96%と体外培養に比べて高い発生率を得ている。

本実験で、分離された4割球とも組で胚盤胞へ発生した率をみると、32.3%と低率で、すでに報告した1/2胚の対の発生率61.5%には遠く及ばなかった。このことは、4分離した割球を揃えて発育させることが困難なことを示唆している。

今回、4個の割球がともに発育した1/4胚を6組(24胚)選んで片側の子宮角への移植を試みた結果、全体で25.0%の胚が着床していたが、全く生存胎子は得られなかった。それに対し、同じレシピエントの反対側子宮角に移植した正常胚は79.2%が着床し、移植胚に対して58.3% (生存胎子/着床数73.7%) の生存胎子が得られた。このことから、1/4胚はきわめて生存胎子を得ることが困難なことが示された。同様な傾向は、すでに1/4胚を移植したFiser and Macpherson(1976), 角田、杉江(1983), 富樫ら(1988)によっても報告されており、本実験はそれを裏付けた結果となった。

このように、1/4胚から生存胎子が得られない原因としては、胚盤胞形成時の細胞数の少なさが指摘されている (Rosant 1976, O'Brien et al. 1984)。これに関連して、Tsunoda et al. (1987) および小野寺、角田(1988)は、マウス8細胞期胚の4分離胚(2/8胚)ならびに8分離胚(1/8胚)でも単為発生卵と集合して細胞数を補うと、分離胚由来の産子が得られることを証明している。このことから、4細胞期胚から分離した割球による一卵性4つ子の作出も、単為発生卵との集合法を検討する価値があるように思われる。

要約

マウス (C F ♀ 1雌 × C 57 B L/6雄) の4細胞期胚を分離し、それらの単一割球(1/4胚)の発生能を培養と移植により検討した。

- 1) 4細胞期胚の分離割球を72時間培養した結果、63.7% (79/124) が胚盤胞へ発達した。
- 2) この胚盤胞のうち4割球ともに発育した6組(24個)の1/4胚を6例のレシピエントの右子宮角に移植してみたが、全く生存胎子は得られなかった。それに対して、左子宮角に移植された正常胚は58.3% (14/24) が生存胎子に発育していた。

このことから、4細胞期胚から分離された割球は、培養では発生能を有していても、胎子に発生する可能性が少ないことが示唆された。

文献

- 1) Fiser, P. S. and Macpherson, J.W. (1976) Development of embryonic structures from isolated mouse blastomeres. *Can. J. Anim. Sci.*, 56, 33-36.
- 2) 中村克彦, 石島芳郎(1986)マウス2細胞期卵から分離した割球の体外発育. 哺乳卵研誌, 3, 97-102.
- 3) 中村克彦, 石島芳郎(1988)2細胞期胚の分離によるマウス一卵性双子の作出. 哺乳卵研誌, 5, 8-13.
- 4) 中村克彦, 亀山祐一, 石島芳郎(1987)マウス2細胞期卵から分離した割球の培養後の移植成績. 哺乳卵研誌, 4, 33-34.
- 5) O'Brine, M.J., Critser, E.S. and First, N.L. (1984) Developmental potential of isolated blastomeres from early murine embryos. *Theriogenology*, 22, 601-607.
- 6) 小野寺政一, 角田幸生(1988)単為発生卵と集合したマウス8および16分離胚の生存性に及ぼすPHAならびに培養気相条件の影響. 家畜繁殖誌, 34, 1-7.
- 7) Rossant, J. (1976) Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs. *J. Embryol. exp. Morph.*, 36, 283-290.
- 8) 富樫 守, 鈴木宏志, 宮井達也, 岡本道生(1987)マウスの2細胞期胚分離による一卵性双生仔の作出. 家畜繁殖誌, 33, 51-57.
- 9) 富樫 守, 鈴木宏志, 宮井達也, 本秀夕景, 岡本道生(1988)体外培養されたマウス分離胚の細胞数と移植成績. 第35回日本実験動物学会講演要旨, 83.
- 10) Tojo, H., Ogita, Z. and Momose, Y. (1985) Comparison of the in vitro development of mouse single blastomeres with and without the zona pellucida. *Experientia*, 41, 108-109.
- 11) Tsunoda, Y. and McLaren, A. (1983) Effect of various procedures on the viability of mouse embryos containing half the normal number of blastomeres. *J. Reprod. Fert.*, 69, 315-322.
- 12) 角田幸生, 杉江 吉(1983)マウス4分離胚の生存性について. 畜試年報, 22, 45.
- 13) Tsunoda, Y., Yasui, T., Okubo, Y., Nakamura, K. and Sugie, T. (1987) Development of one or two blastomeres from eight-cell mouse embryos to term in the presence of parthenogenetic eggs. *Theriogenology*, 28, 615-623.

嫌気的条件下におけるラット卵子の
アミノ酸の取込みについて

Incorporation of Amino Acids in Rat Eggs under an
Anaerobic Condition

辻井 弘忠

Hirotada TSUJII

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, University of Shinshu, Kamiina, Nagano, 399-45

Summary

Our previous finding of the incorporation of ^{14}C -leucine and ^{14}C -glutamic acid in rat eggs has suggested that the incorporation of amino acids in rat eggs is mediated by oxidation of the intermediary metabolite as an energy source. In this study, the incorporation of ^{14}C -leucine and ^{14}C -glutamic acid under an anaerobic condition was examined using eggs of the 1-cell (unfertilized), 2-cell and early blastocyst stages. The incorporation of these amino acids under an anaerobic condition was lower either in the absence of a substrate or in the presence of lactate, compared to the previously reported result under an aerobic condition. These results suggested that the incorporation of amino acids in rat eggs is mediated by oxidation of the intermediary metabolite as an energy source.

緒 論

著者らは¹⁻⁶⁾、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り込みを *in vitro* で検討してきた。その結果、エネルギー源添加することによって、アミノ酸の取り込みが増加することを見出した。これらのことから、ラット卵子のアミノ酸の取り込みには、添加された中間代謝物の酸化が介在していることが示唆された。

一方、卵子には炭酸ガスを固定する能力をもっていること⁷⁻¹¹⁾、また、脱水素系からの酸化系が存在することから¹²⁾、卵子のアミノ酸の取り込みに添加された中間代謝物の脱水素系による酸化が介在しているかどうかを、嫌気条件下の取り込みで検索した。

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 (pH7.4) (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°C 下で前培養 5 分間行った後、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 の乳酸ナトリウム ($5 \times 10^{-2} M$) を添加し、さらに 0.5 μ ci/ml ¹⁴C-Leucine (spec. act. 0.4mci/mM) または 0.5 μ ci/ml ¹⁴C-Glutamic acid (spec. act. 0.1mci/mM) を添加して嫌気的条件下で培養した。なお、初期分割卵子は 100% 炭酸ガス下でも発生することから 100% 炭酸ガス下で行った。培養は 0、30、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 (SCWP 8 μ) 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。各取り込み値は、各々の培養時間の取り込み値より 0 時間値を差引いた値を cpm/egg で示した。好気的条件下の ¹⁴C-ロイシン¹⁻³⁾ および ¹⁴C-グルタミン酸⁴⁾ のデータは既報を参考にした。

結 果

1) 嫌気的条件下における ¹⁴C-ロイシンの取り込みについて: エネルギー源無添加時の取り込みを表1に、乳酸添加時の取り込みを表2に示した。嫌気的条件下のエネルギー源無添加時および乳酸添加時の1細胞、2細胞、

Table 1. Incorporation of ¹⁴C-leucine under anaerobic in rat eggs.(cpm/egg) (Mean \pm S.E.)

Incubation time (min.) Stage of egg	30		60	
1-cell(unfertilized)	4.6 \pm 2.2 (35.7)		11.2 \pm 3.0 (64.9)	
2-cell	5.1 \pm 2.4 (58.8)		14.5 \pm 4.1 (83.4)	
Early blastocyst	6.6 \pm 3.0 (7.9)		12.3 \pm 3.4 (24.3)	

Number in parentheses represent incorporation of leucine under aerobic.

Table 2. Effect of lactate addition on incorporation of ^{14}C -leucine under anaerobic in rat eggs.
(cpm/egg) (Mean \pm S.E.)

Incubation time (min.) Stage of egg	30	60
1-cell (unfertilized)	8.7 \pm 2.1 (80.0)	21.5 \pm 4.2 (88.6)
2-cell	11.3 \pm 3.4 (89.9)	24.2 \pm 3.8 (105.7)
Early blastocyst	22.4 \pm 3.6 (129.5)	38.7 \pm 4.0 (169.5)

Number in parentheses represent incorporation of leucine under aerobic.

初期胚盤胞の取り込みは、好気的条件下での各々の取り込みより低かった ($P < 0.05$)。また、嫌気的条件下における無添加時の各分割卵子間の取り込みには有意差がみられなかったが、乳酸添加によって各分割取り込みが増加し、特に初期胚盤胞で有意に増加するのがみられた ($P < 0.05$)。

2) 嫌気的条件下における ^{14}C -グルタミン酸の取り込みについて： エネルギー源無添加時の取り込みを表3に、乳酸添加時の取り込みを表4に示した。嫌気的条件下のエネルギー源無添加時および乳酸添加時の1細胞、2細胞

Table 3. Incorporation of ^{14}C -glutamic acid under anaerobic in rat eggs.
(cpm/egg) (Mean \pm S.E.)

Incubation time (min.) Stage of egg	30	60
1-cell (unfertilized)	48.1 \pm 4.6 (100.4)	52.9 \pm 5.3 (123.1)
2-cell	47.2 \pm 4.1 (119.5)	85.6 \pm 4.8 (143.2)
Early blastocyst	104.9 \pm 6.7 (144.7)	110.7 \pm 6.0 (181.3)

Number in parentheses represent incorporation of glutamic acid under aerobic.

Table 4. Effect of lactate addition on incorporation of ^{14}C -glutamic acid under anaerobic in rat eggs.
(cpm/egg) (Mean \pm S.E.)

Incubation time (min.) Stage of egg	30	60
1-cell (unfertilized)	98.3 \pm 5.0 (210.3)	123.6 \pm 6.5 (298.8)
2-cell	105.4 \pm 4.7 (283.7)	132.3 \pm 4.3 (430.4)
Early blastocyst	157.1 \pm 7.7 (307.5)	276.3 \pm 7.2 (507.8)

Number in parentheses represent incorporation of glutamic acid under aerobic.

胞、初期胚盤胞の取り込みは、ロイシンの取り込みと同様、好気的条件下での各々の取り込みより低かった。また、嫌気的条件下における無添加時および乳酸添加時の取り込みは、1細胞および2細胞の取り込みはほぼ同じであったが、初期胚盤胞は1細胞および2細胞より有意に取り込みが高かった ($P < 0.05$)。乳酸添加によって各分割卵子の取り込みが増加した ($P < 0.05$)。

培養後の卵子の生存活性についてニグロシン染色で検査した結果、嫌気的条件したでも培養2時間以内は正常であった。

考 索

初期分割卵子は、着床までの間卵管および子宮分泌液に栄養源を依存している。卵管および子宮分泌液のかなりの部分を占めるものに重炭酸塩がある¹²⁻¹⁶⁾。この重炭酸塩はin vitroでの卵子の培養においても重要な物質である¹⁷⁾。これらのことについて注目してBiggersら¹⁸⁾はマウス受精卵の分割中に炭酸ガスを固定する能力を有すること、さらにマウス8細胞の卵子を用い、ラベルした重炭酸塩から卵子へ取り込まれた放射物のほとんどが酸可溶性の物質で、その大部分が蛋白質に一部が脂肪に取り込まれたと報告している¹⁹⁾。また、同じく核酸への炭酸ガスの固定を検索した結果、S-RNAに有意に取り込まれること²⁰⁾などから、マウスの受精卵子はどの時期においても炭酸ガスを固定する能力を有し、蛋白質および核酸等の巨大分子の合成に関与していること²¹⁾を明らかにした。同様なことがラット卵子においてもみられている²²⁾。

一方、初期の卵管内卵子は、ヘキソーズ・モノフォスフェート側路で解糖されることが判っている²³⁾。本実験の嫌気的条件下のアミノ酸の取り込みの結果、基質無添加時ならびに乳酸添加時のいずれにおいても、好気的条件下でのロイシンおよびグルタミン酸の取り込みより低い値を示した。これらのこととは、アミノ酸の取り込みには、エネルギー源としての中間代謝物の脱水素系によるエネルギー供給量が、好気的条件下の中間代謝物によるエネルギー源の供給より少ないために嫌気的条件下でのアミノ酸の取り込みが減少したものと思考された。また、嫌気的条件下でのアミノ酸の取り込みは、初期分割卵子と初期胚²⁴⁾の卵子において差異があることが推察された。

要 約

嫌気的条件下で、¹⁴C-ロイシンおよび¹⁴C-グルタミン酸の取り込みをラット1細胞(未受精卵)、2細胞および初期胚²⁴⁾をもちいて調べた。その結果、嫌気的条件下の¹⁴C-ロイシンおよび¹⁴C-グルタミン酸の取り込みは、基質無添加時ならびに乳酸添加時のいずれにおいても、既報の好気的条件下のそれとの取り込みより低かった。これらのことから、卵子のアミノ酸の取り込みには、エネルギー源としての中間代謝物の酸化が介在しているものと推測された。

文 献

- 1) 辻井弘忠、菅原七郎、竹内三郎(1969)：家畜繁殖誌, 15, 32.
- 2) Tsujii, H., Sugawara, S. and Takeuchi, S. (1970) : Tohoku J. Agr. Res., 21, 13.
- 3) Tsujii, H., Sugawara, S. and Takeuchi, S. (1971) : Tohoku J. Agr. Res., 22, 31.
- 4) 辻井弘忠、菅原七郎、竹内三郎(1972)：日本畜産学会報, 43, 91.
- 5) Tsujii, H., Sugawara, S. and Takeuchi, S. (1972) : Jap. J. Zootech. Sci., 43, 660.
- 6) Biggers, J.D., Whittingham, D.G. and Donahue, R. (1967) : Proc. Nat. Acad. Sci. 58, 560.
- 7) Wales, R.G., Quinn, P. and Murdoch, R.N. (1969) : J. Reprod. Fert. 20, 541.

- 8) Murdoch, R.N. and Wales, R.G. (1971) : J. Reprod. Fert. 24, 287.
- 9) Graves, C.N. and Biggers, J.D. (1970) : Science, 169, 1506.
- 10) 菅原七郎, 辻井弘忠, 竹内三郎 (1972) : 家畜繁殖誌, 19, 99.
- 11) 菅原七郎 (1962) : 日本畜産学会報, 33, 1.
- 12) 菅原七郎, 竹内三郎 (1962) : 家畜繁殖誌, 10, 77.
- 13) Vishwakarma, P. (1962) : Fertil. Steril. 13, 481.
- 14) Hammer, C.E. & Williams, W.L. (1965) : Fertil. Steril. 16, 170.
- 15) David.A., Brackett, B.G., Garcia, C.R. and Mastroianni, L. (1969) : J. Reprod. Fert. 19, 285.
- 16) Restall, B.J. and Wales, R.G. (1966) : Aust. J. Biol. Sci. 19, 687.
- 17) Biggers, J.D., Whitten, W.K. and Whittingham D.G. (1970) : Methods of Mammalian Embryology, ed. Daniel, J.C. Jr. p.86, Freeman, San Francisco, Ltd.

第 30 回
哺 乳 動 物 卵 子 研 究 会

講 演 要 旨 集

会 期 平成元年 5 月 28 日
会 場 日 本 青 年 館

卵子研究30年の歩み

Advances on Ova Research
in the last 30 years

佐久間勇次

Yuzi SAKUMA

日本大学農獸医学部獸医生理学教室

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

本研究会は、昭和35年(1960)に発足した哺乳動物卵子談話会が25年の歳月を経て昭和59年(1984)に哺乳動物卵子研究会となり、著者が初代会長を引き受けて5年になる。談話会は、発足当初から年一回の会合を、研究会になってからは年一回の総会と研究発表会、年二回の会誌を刊行している。卵子研究者の集いとして発足した談話会が、30年の長い歳月を経て本年は第30回の大会を迎えることになった。

発足した昭和35年当時を振り返ってみると、昭和30年代は、もはや戦後は終ったといわれ高度経済成長が始まった時代である。自然科学領域においてもようやく独自の研究が始まった時代である。生命科学の対象として精子、卵子の研究がある。精子の研究は、家畜の人工授精を目的に戦前から多くの研究が行われ昭和30年前後には凍結精液が普及し、次いでヒト精液の凍結保存も行われるようになった。一方、卵子の研究は、ウサギの卵子について生物学的生殖現象として実験が行われていた。戦後、家畜に多発した繁殖障害、ヒトの不妊症などの解明のため、排卵、受精、着床、避妊などに関する卵子の研究が始まり、やがて優秀なメス家畜を増殖する方法として、腹は借りものと言われる家畜の胚移植を目的にした卵子の研究が行われるようになった。著者らが始めて胚移植の実験に取り組んだのは、昭和20年代後半であり東北大学農学部助手の時代である。研究の動機は、恩師橋本重郎教授、佐々木清綱教授の御示唆によるものであった。実験は、ウサギを使い幼稚な試行錯誤を繰り返しようやく成功した。その後、昭和30年代に入ると農林省畜産試験場の大槻、杉江らにより山羊、綿羊、昭和39年に牛の胚移植第一号が誕生した。麻醉の進歩と抗生物質の普及により、昭和50年代の後半頃からウシの胚移植が画期的な改良増殖方法として実用化されるようになった。また、ヒトの体外受精児は昭和58年(1983)に東北大学鈴木雅洲教授のもとで第一号が誕生した。

このように卵子の研究は、家畜もヒトも胚移植を共通テーマとして農学、医学、生物学の研究者により談話会を中心に研究が進められた。

本研究会における30年間の演題の推移を示すと、図1のごとくである。

発足当時の昭和35年からの10年間は、各回毎の演題数が10題以内であったが、昭和45年以降は、生殖生理学に関する研究に関心が高まり、昭和45年からの10年間は、毎回10~15題程度の演題が集まつた。昭和55年以降は、さらにこの分野の研究が急激な発展を示した

ことから演題数も増加し、昭和55年からの5年間は、毎回平均20題程度の演題が集まり、また、60年からの5年間は、平均25題程度の演題が発表されるようになった。とくに、演題数の増加は、研究会に移行する前の第24回談話会からであり、この演題数の増加が、研究会へ発展的に移行する一因になった。

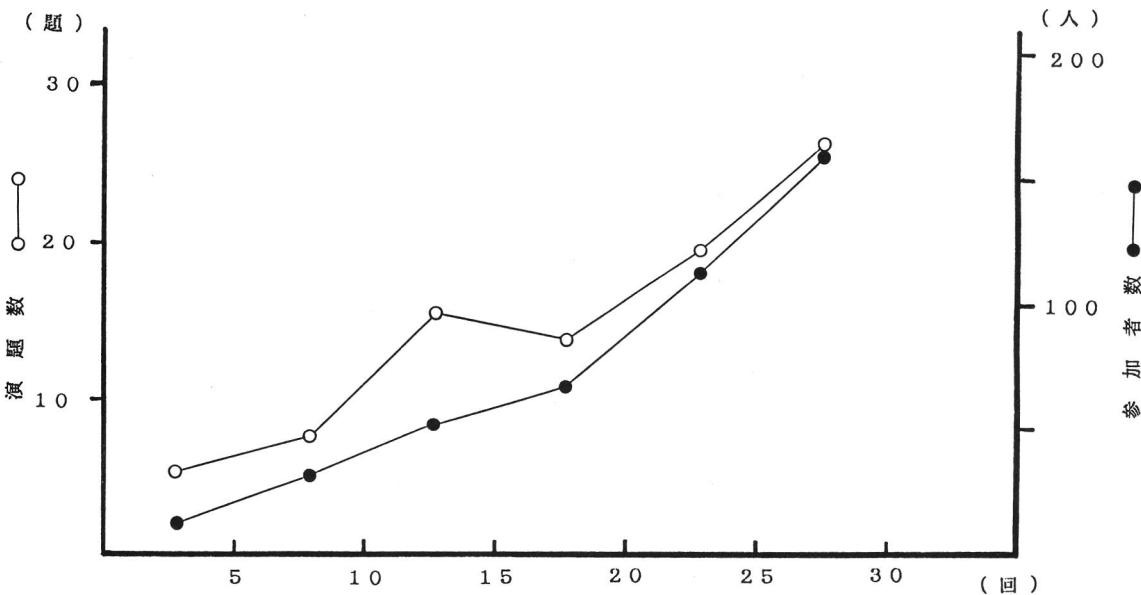


図1 本研究会における演題数および参加者数の推移

研究会に参加する参加者数の推移をみると、図1に示すとおりである。

発足当時の5年間は、毎回平均20人程度の集まりであり、その後の5年間は、30人程度で推移した。昭和45年から昭和55年の10年間は、各回の平均参加者が50～70名程度で推移

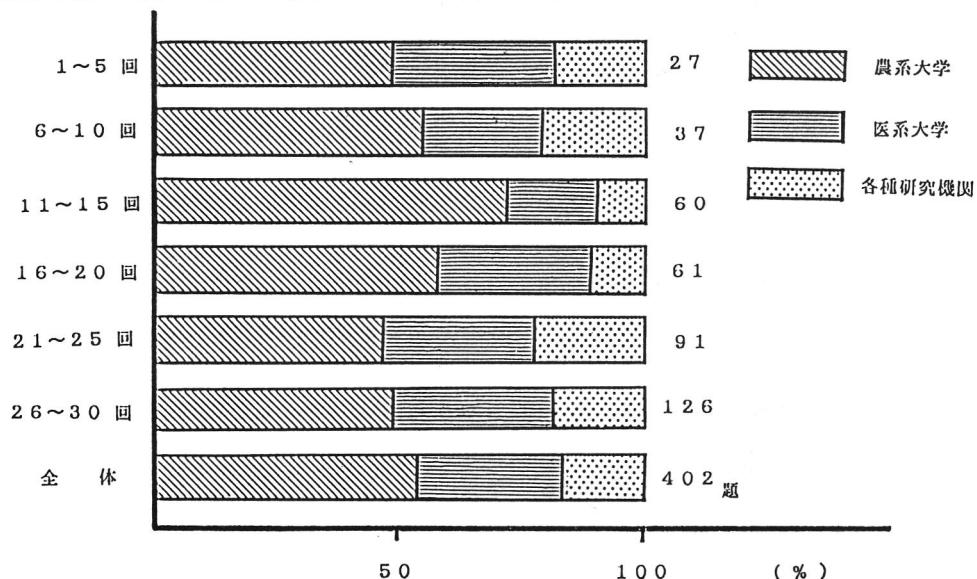


図2 研究機関別の演題出題状況

し、昭和55年以降は参加者が急激に増加し、昭和55年からの5年間の平均参加者は、約2倍の130名程度に増加した。また、昭和60年以降はさらに増加し、平均参加者数は160~170名程度となり、今回の第30回を迎えるにいたっている。

演題の出題を機関別に比較すると、図2に示すごとくである。

第1~30回までの一般演題402題を機関別に分けると、農学系大学から214題(53.2%)、医学系大学から117題(29.1%)、畜産試験場などの各種研究機関から71題(17.7%)となっている。各回毎の分布は図2に示すごとくであり、とくに第20回以降において医学系大学からの出題が多くなっている。

談話会発足以来の話題・一般演題を表1に示した。第1回から30回まで5年毎の内容の変遷を示したものであるが、胚移植・体外受精、凍結保存の基礎的研究および臨床応用など内外の生殖生理学、生殖医学の動向を表わしている。さらに近年においては、マニピュレーションを用いた生殖細胞工学・胚分離と性判別といったバイオテクノロジーに関する先駆的な研究も行われている。

表1 発表演題の動向

第1~5回	胚移植(29.6%), 代謝(14.8%), 形態(14.8%), 組織化学(14.8%)
第6~10回	過排卵誘起(27.0%), 形態(16.2%), 胚移植・着床(16.2%), 卵子の下降(8.1%)
第11~15回	排卵・受精(23.3%), 凍結保存(18.3%), 形態(15.0%), 生殖機能(13.0%)
第16~20回	体外受精(13.1%), 凍結保存(13.1%), 代謝(13.1%), 形態(11.5%)
第21~25回	凍結保存(13.2%), 体外受精(12.1%), 生殖免疫(9.9%), 胚移植(9.9%), 受精能獲得(8.8%)
第26~30回	体外受精(15.1%), 凍結保存(11.9%), マニピュレーション・胚分離(11.1%), 形態(7.9%), 胚発生(7.9%), キメラ(5.6%), 性判別(5.6%)

哺乳動物卵子談話会・研究会において特別企画としてとりあげたテーマを示すと表2のごとくである。

最初にとりあげたテーマは、15年前に採卵のテクニックの要領とゆうテーマで11種類の動物の採卵について詳細に報告してもらったのが最初である。その後、第20回の際は、特別講演2題とシンポジウム2題を企画し、第20回大会の記念とした。その後は、要望のあるたびに特別講演をお願いした。なお、そのテーマと演者は表に示すとおりである。

哺乳動物卵子研究会誌に掲載した論文を、内容別に検討すると表3に示すごとくである。第1巻1号から第5巻2号に掲載した51編の論文を内容別に比較した結果、最も多かったのは体外受精に関するもので21.6%であり、ついで精子の機能に関するものが15.7%, キメラ・胚の分離・器官培養および着床に関するものがそれぞれ9.8%, 卵の代謝(7.8%), その他(25.5%)であった。

このように本研究会は、30余年に亘って生命科学のバイオニアとして大きな役割を果してきた。その結果現在では、家畜の胚移植はすべての家畜に応用され、また、ヒトにおいてもIVF・ET、GIFT、マイクロファーティライゼイションなどの手法が開発され

表2 哺乳動物卵子談話会・研究会における特別企画内容

特別講演

IVF-ERの展望：鈴木雅洲（第28回）

排卵過程に働く凝固線溶系と胎盤蛋白質：相馬広明（第27回）

X精子とY精子について：毛利秀雄（第26回）

卵子のマニピュレーション：加藤淑裕（第23回）

最近における卵子研究の動向：柳町隆造（第22回）

マイクロサージェリーについて：井上正人（第20回）

卵子の電顕技術について：藤原達司（第20回）

シンポ、集中話題

体外受精（第24回）、牛の受精卵移植（第23回）

卵子の体外受精、卵子の凍結保存（第20回）

採卵テクニックの要領（第15回）

表3 哺乳動物卵子研究会誌の内容別比較

体外受精（21.6%），精子の機能（15.7%），着床（9.8%）

キメラ・胚分離（9.8%），器官培養（9.8%），卵の代謝（7.8%）

その他（25.5%）

た。さらにまた、家畜およびヒトも胚の凍結保存が可能となった。

本研究会との関連学会である畜産学会、家畜繁殖学会、不妊学会、受精着床学会などにおいても卵子研究の演題、論文が急増し多彩なテーマのシンポジウムが企画されるようになった。まさに卵子研究は花ざかりの時代といえよう。

家畜の胚移植、とくにウシの胚移植は牛肉、牛乳の生産性を飛躍的に増大させる産業技術になり、国土狭少のわが国畜産振興に大きな期待がかけられている。しかし、貿易自由化による安価な牛肉、乳製品の輸入は、わが国の畜産に強烈なゆさぶりをかけることになった。世界の人口は急増し50億人を越え、やがて21世紀には人口増に伴う深刻な環境汚染と食糧問題が起こり食糧の輸入が困難な時代がやってくる。これから卵子研究は生き残りをかけたわが国の畜産振興に役立ち協力できる研究開発が必要になる。農学栄えて農業亡びるという古くからの警句がある。将来の日本農業、畜産に対する私達への警句として心しておくべき言葉であろう。

終りに、本研究会30年の発展の歴史に貢献された諸先生、とくに故人になられた山根甚信、林基之先生を始め、談話会の大黒柱として発足当時から十数年に亘り御指導下された加藤浩先生をはじめ、大槻清彦、木下佐、杉江信の諸先生に心から感謝いたします。

家畜胚の凍結保存

Cryopreservation of embryos in the farm animals

小栗紀彦

Norihiko OGURI

農林水産省畜産試験場繁殖部

Department of Animal Reproduction,
National Institute of Animal Industry

1972年に哺乳動物胚における凍結保存の最初の本格的成功例がマウスで報告されて以来、15動物種で胚の凍結保存が成功している(Leibo, 1989)。主要家畜では、牛(Wilmut & Rowson, 1973), 緩羊(Willadsenら, 1974), 山羊(Bilton & Moore, 1976), 馬(Yamamotoら, 1982)で凍結保存が成功しているが、豚胚の凍結保存の成功例はまだ報告されていない。

1. 胚の凍結・融解手順

家畜胚の凍結保存において汎用されている主要な手順は次の通りである。1.胚の用意, 2.耐凍剤の添加・平衡, 3.凍結保存容器への充填, 4.植氷温度までの冷却, 5.植氷, 6.緩速冷却, 7.液体窒素への浸漬, 8.液体窒素中での保存, 9.融解, 10.耐凍剤の希釈・除去, 11.処理胚の生存性の評価。

2. 凍結・融解胚の生存性に影響する主な要因

1) 供試胚：家畜では雌の生殖道を灌流して採取した胚、体外受精による胚、細胞操作した胚が凍結保存に用いられている。胚の発育ステージおよび質は凍結・融解後の生存性に大きく影響することが知られており、多くの動物種で、発育ステージの進んだ胚で耐凍性が高く、形態的評価の低い胚では凍結・融解後の生存率が著しく低い。なお、成功例が報告されている動物種においても、すべての発育ステージで凍結・融解胚の生存性が証明されているわけではない。

2) 耐凍剤の添加・平衡：細胞膜透過性の物質(グリセロール, DMSO, グリコール, メタノール), 非透過性の物質(ショ糖, PVP)が家畜胚の凍結保存で成功裡に用いられており、単独で用いて有効な耐凍剤はすべて細胞膜透過性を有する。耐凍剤の添加は2~6段階で行われているが、最近では、直接最終濃度の凍結媒液に胚を移しても生存性は損なわれないとされている。牛胚の凍結保存では、37°Cから室温の間の温度で、30分以下の平衡時間を設けるのが普通である。

3) 凍結保存容器：フタ付きガラス試験管、ガラスアンプル、ポリプロピレン製セラムチューブ、牛精液保存用プラスチックストロー等が家畜胚の凍結保存容器として用いられている。緩速冷却・急速融解法による牛胚の凍結保存では、ガラスアンプル(0.5x5cm)を用いた場合よりも0.25mlプラスチックストローを用いた場合の方が、移植後の受胎率が高い(Massipら, 1979)。

4) 植氷(水晶形成の誘起)：胚を含んでいる凍結媒液が過度の過冷却状態で凍結すると、細胞内凍結を起こす恐れがある。これを避けるために、凍結媒液の融点よりわずかに低い温度で、人為的に植氷することが、胚の凍結保存における一般的な手順となっている。哺乳動物胚の凍結保存における植氷は-4~-9°C間の温度で行われるのが普通であり、6°C以上の潜熱発生は胚の生存性に大きく影響する。

以下に述べる植氷方法が哺乳動物胚の凍結保存において成功裡に採用されている。a.微小な水晶あるいは媒液の結晶を凍結媒液中に投入する、b.バストールビペットの先端部に予め水晶を作っておき、これを凍結媒液に接触させる、c.冷却したバストールビペットまたは皮下針を植氷温度の凍結媒液に浸漬する、d.植氷温度に保持されている凍結保存容器の外側に、液体窒素などで冷却したピンセット、止血鉗子、ガラス棒、金属製スパチュラ、あるいはドライアイスの小片を接触させ、凍結媒液を部分的に急冷して水晶核を形成する、e.凍結保存容器(ガラスアンプル)の外側をピンセットで鋭く叩く、f.ヨウ化銀(AgI)を凍結媒液に添加しておく等の方法である。市販の各種オートマチックフリーザーでは、自動植氷装置が種々工夫されている。

5) 冷却・加温： a) 緩速冷却・緩速融解法(緩速冷却法:slow cooling method)：植氷後、緩速(0.3~

0.8°C/min)によよそ-80°Cまで冷却してから液体窒素に浸漬する。この方法は初期の仕事で多用され、家畜では牛、馬、綿羊、山羊で成功例が得られている。生存胚を得るためには、緩速に加温する必要がある。冷却・加温に時間が掛かるので、現在、ほとんど採用されていない。
b)緩速冷却・急速融解法(急速冷却法:rapid cooling method): 1970年代前半には急速融解は致死的であると考えられていたが、緩速冷却後-30°C代で直接液体窒素に浸漬し場合、急速融解によってのみ生存胚が得られることが明らかにされた(Willadsen, 1977)。緩速冷却・緩速融解法と同様に牛、馬、綿羊、山羊で成功例が報告されている。植氷後、緩速(0.3~0.8°C/min)に-30~-35°Cまで冷却した後、液体窒素に浸漬する。浸漬する前に、10分間0.1°C/minで冷却するか、保持する場合もある。融解には200°C/min以上の速度が必要であり、通常、20~38°Cの温水中に凍結容器を浸漬して行われる。この方法は実用的見地から普及している。
c)2段階冷却法(two-step cooling method):植氷温度および-20°C・-40°C間のある温度に設定した冷却槽にそれぞれ適当な時間保持した後、液体窒素に浸漬する方法であり、家畜では牛で成功例が報告されている(Bouyssou & Chupin, 1982)。この他、細胞膜透過性の耐凍剤と細胞膜非透過性の耐凍剤とを室温で胚に作用させ、予備脱水した後、植氷操作を施すことなく、-30°Cに保持された低温槽に移し、一定時間保持した後、液体窒素に浸漬する方法もあり、牛胚(1.5Mグリセロール+1.0Mショ糖)でも成功している(Bui-Xuan-Nguyenら, 1984)。

6)耐凍剤の除去:融解後、胚を含んだ凍結媒液に、耐凍剤を含まない媒液を少量づつ添加するか、あるいは融解した胚を、段階的に耐凍剤濃度を低くした媒液に、順次移すかした後、最終的には耐凍剤を含まない等張の媒液に移して耐凍剤を除去する。細胞膜を透過しないショ糖の溶液中に融解後の胚を5~10分間おいた後、PBSへ1段階で移して耐凍剤を除去する方法も開発されている(Leibo, 1983)。この方法で、凍結容器としてプラスチックストローを用い、胚を含んだ少量の凍結媒液と多量のショ糖溶液とを気泡で分離して、充填しておけば、融解後、ストローを振って両液を混合できる。混合後、ストロー内で、胚に含まれている耐凍剤の希釈が進行し、5~10分後に凍結保存容器として用いたそのストローのまま移植することができる(Leibo, 1984)。

7)処理胚の生存性の評価:凍結・融解胚の生存性の評価は形態観察、体外培養、胚移植によって行われるのが一般的である。

3. Vitrification(ガラス化)法

ガラス化とは熔解している液体が適当に急冷された場合、一種の過冷却状態を保って、結晶せずに固相に変わることである。ガラス化し得る物質の例は多く、ガラス、釉薬、エナメル、イオウ、セレン、ミョウバン、各種アルコール、グルコース、各種の有機高分子化合物などが挙げられる。ガラス化法による胚の超低温保存の成功例はマウス(Rall & Fahy, 1985)、牛(Massipら, 1987)、ラット(Konoら, 1988)で報告されており、数種の耐凍剤(DMSO+アセトアマイド+プロピレングリコール+ポリエチレングリコール；グリセロール+プロピレングリコール；ポリエチレングリコール+プロピレングリコール；ポリエチレングリコール+グリセロール)を高濃度に含んだ媒液が用いられている。ガラス化法の手順はきわめて簡便である。すなわち、供試胚を媒液に移して、耐凍剤を平衡させた後、プラスチックストローに封入し、これを直接液体窒素に浸漬するだけである。加温はストローを温湯に直接浸漬して行う。この方法では氷晶による傷害は避けられるが、高濃度の耐凍剤の毒性と浸透圧衝撃による害の防止が今後の課題である。

4. 牛胚の凍結保存

1)胚の用意:性周期の9~14日目にPMSGの1回投与あるいはFSHの連続投与の開始とPGF_{2α}の併用によって過排卵を誘起する。頸管経由法による非外科的移植で好成績を得るために、許容開始後7~8日目の胚(後期桑実胚~拡張胚盤胞)を採取するのが一般的である。幸い、これらの発育ステージの牛胚の耐凍性は高い。牛では自然の胚の他、2分離した胚(Lehn-Jensen & Willadsen, 1983; Niemannら, 1986; Suzuki & Shimohira, 1986)および体外受精による胚も、凍結保存されている。体外受精による胚の移植後の生存率は59%(111/189)であり(家畜改良事業, 1988)、自然の胚の成績と変わらないが、凍結保存した体外受精胚の生存率25%(11/44)(高橋、私信)は自然の胚のそれと比較して低い。最近では、ガラス化法で-196°C保存された牛の2分離胚の生存性も報告されている(Bielanski & Hara, 1988)。

2)凍結方法: Wilmut & Rowson(1973)による最初の報告以来, 初期の成功例は緩速冷却・緩速融解法によったが, 現在では緩速冷却・急速融解法が汎用されており, 段階的凍結法ならびにガラス化法でも成功例が報告されている。

演者らの研究室で開発した固定化ヨウ化銀による植氷法(Kojimaら, 1988)を採用した牛胚の凍結保存の概要を以下に紹介する。 a)固定化ヨウ化銀の作製: ヨウ化銀を2%の濃度になるように, 2%アルギン酸ナトリウムのコロイド溶液に加え, 超音波破碎機で細粒化した後, マグネットクリッパーを用いて攪拌する。このヨウ化銀・アルギン酸ナトリウム混合液を5cc注射器に吸引し, 尖端を切断した23ゲージ注射針の先端から100mM塩化カルシウム水溶液中に滴下してヨウ化銀を固定化する。ヨウ化銀・アルギン酸ナトリウム混合液は塩化カルシウム水溶液中に滴下すると球状になる。固定化ヨウ化銀を塩化カルシウム液から取り出し蒸留水で2~3回洗浄した後, 121°Cで20分間湿熱滅菌し, 使用時まで4°Cの滅菌蒸留水中で保存する。 b)凍結方法: 胚を10%(v/v)グリセロール・PBI(含10%FCS)溶液中へ移し, 室温で30分間平衡させる。この間に, 0.25ml容量のプラスチックストロー内へ, 胚1個を含む0.2mlの凍結媒液とともに固定化ヨウ化銀1個を納めた後, ストロー両端を加熱閉封する。室温から-7°Cまで1°C/minで冷却した後, 5分間冷却槽内の温度を-7°Cに保つ。-7°Cから-36°Cまで0.3°C/minで冷却した後, ストローを液体窒素中に浸漬し, 融解まで保存する。冷却過程での外部からの植氷操作は行わない。37°Cの温水中にストローを浸漬して融解した後, 胚を含んだ凍結媒液をディッシュに移す。次いで回収胚を含んだ凍結媒液0.02mlと0.5Mショ糖・PBI溶液0.15mlを0.25mlストローに気泡を隔てて再吸引し, 両液を混合した後, 線栓部を下にしてストローを鉛直に保持し, 5分間静置する。ストローから胚を回収し, 0.5Mショ糖・PBI溶液5mlの入ったディッシュに5分間移した後, PBIで2回洗浄する。 c)固定化ヨウ化銀法による成績: 固定化ヨウ化銀法による植氷で凍結した牛胚の培養による生存率は84%(16/19)であり, 通常の植氷法による凍結・融解胚での成績65%(42/65)(Pratherら, 1987)よりも高かった。

5. 馬胚の凍結保存

1982年にYamamotoらが凍結保存した馬胚から発育した最初の子馬を報告した後, 馬胚の凍結保存に関する研究の成果が相次いで報告されているが, 馬胚の凍結保存についてはまだ不明な点が多い。

1)胚の採取: 馬では過排卵誘起が困難であり, 凍結保存に用いられている胚はすべて自然排卵を利用して採取されている。馬胚は排卵後140時間前後に, 初期胚盤胞の状態で子宮に到達するので, 6日目以降にバルンカテーテルを用いて非外科的に採取する。この方法による採取率は87%と非常に高い。開腹して卵管あるいは子宮を灌流する方法も報告されているが, 一般的ではない。

2)凍結方法: 馬胚の凍結ではFCSを含むmPBSを基本媒液とし, これに10%グリセロールを添加して凍結媒液としている。冷却・加温は緩速冷却・緩速融解法および緩速冷却・急速融解法によって行われている。耐凍剤としてDMSOも用いられているが, DMSO存在下で凍結された馬胚の生存率は報告されていない。Sladeら(1985)によって報告された凍結保存胚の移植後の受胎率(39%)はかなり高いが, 新鮮胚の受胎率(78%)に比べると半分に過ぎない。馬胚の耐凍性は6日目胚で最も高く, 7日目胚がこれに次ぎ, 8日目胚では1例で生存性が示されたに過ぎない。発育の進んだ胚の生存性が低い理由は明かでない。

6. 豚胚の凍結保存

豚胚は低温感作を受け易く, +15°C以下に冷却された胚は生存性を示さないと言われていた。演者ら(1987)は-5°Cに曝した豚胚の生存性を培養で証明したが, 移植ではその生存性を証明することができなかった。その後, Nagashimaら(1988)によって, +11°Cまで冷却された豚胚よりの生存胎児が報告され, 続いて-20°C(長嶋ら, 1988), -35°C, -196°C(水野ら, 1988)まで冷却した豚胚の生存性が培養で証明された。最近, -35°Cに約1時間保持した豚胚からの産子生産(水野らによる)が新聞報道されたが, 豚胚の凍結保存における本格的成功例はまだ報告されていない。ここでは, 演者らの成績を中心に豚胚の凍結保存を紹介する。

1)豚胚の採取: 豚の子宮角は長いので, 非外科的な胚の採取は困難であると考えられており, 開腹あるいは屠殺して生殖道を灌流する方法によって胚を採取するのが一般的である。

2)凍結・融解方法: PMSGによる過排卵誘起処置を施した雌豚から, 雄性容開始後6,7日目に採取した良好胚を供試した。FCSおよび卵黄を含んだmPBSを基本媒液とし, 耐凍剤として, DMSO, グリセロール,

プロピレングリコールを用いた。室温で耐凍剤と平衡し、1°C/minで-7°Cまで冷却した後、-7°Cで10分間保持した。0.3°C/minで-36°Cまで冷却した後、液体窒素に浸漬し保存した。なお、0.25mlストローを凍結容器とし、植氷は固定化ヨウ化銀法によった。温水中で融解した胚の生存性は、ショ糖溶液で耐凍剤を希釈した後、培養ならびに移植で評価した。

3)成績:凍結・融解胚348個を培養した結果、24時間、48時間後に良好な形態を示した胚はそれぞれ38個(10.9%)、12個(3.4%)であった。116個の凍結・融解胚を8例のrecipientに移植したところ、5例は不受胎であったが、4個の新鮮胚とともに凍結融解胚を移植した3例は発情徵候を示していない。

7. 緬・山羊胚の凍結保存

緬羊胚は1974年以来、凍結・融解条件の検討に多数用いられており、凍結保存胚の移植において高い受胎率が得られているが、山羊胚の凍結保存に関する報告は少ない。緬・山羊では後期桑実胚および胚盤胞の耐凍性が高いことが知られている。

1)胚の採取:緬・山羊では、PMSGあるいはFSHとhCGとの併用による過卵を誘起処置を施し、交配した後、開腹して卵管あるいは子宮を灌流して、胚を採取する。最近では、過排卵誘起にPGF_{2α}を併用するものが普通である。緬・山羊胚は交配後3~4日目に4~8細胞期の状態で子宮に到達する。

2)凍結方法:緬・山羊胚の凍結には同種血清を含むmPBSに1.5M-DMSOあるいは10%グリセロールを添加した媒液が用いられており、冷却・加温は緩速冷却・緩速融解法および緩速冷却・急速融解法によって行われている。

1.5M-DMSO存在下20%緬羊血清を含んだPBS中で緩速に凍結した緬羊の後期桑実胚および初期胚盤胞の融解後の培養成績から、高い生存率を得るために-10°Cより高い温度で植氷を行うことが必要であることが明らかにされている(Moore & Bilton, 1979)。

主要文献

- Bielanski,A. & Hara,W.C.D.(1988)Theriogenology, 29, 223(abstr.).
Bilton,R.J. & Moore,N.W.(1976)Aust.J.Biol.Sci., 29, 125-129.
Bouyssou,B. & Chupin,D.(1982)Theriogenology, 17, 159-166.
Bui-Xuan-Nguyen,N., Heyman,Y. & Renard,J.P.(1984)Theriogenology, 22, 389-399.
Kojima,T., Soma,T. & Oguri,N.(1988)Theriogenology, 30, 1199-1207.
Kono,T., Suzuki,O. & Tsunoda,Y.(1988)Cryobiology, 25, 170-173.
Lehn-Jensen,H. & Willadsen,S.M.(1983)Theriogenology, 19, 49-54.
Leibo,S.P.(1983)Theriogenology, 19, 139(abstr.).
Leibo,S.P.(1984)Theriogenology, 21, 767-790.
Leibo,S.P.(1989)Theriogenology, 31, 85-93.
Massip,A., Van Der Zwalm,P. & Ectors,F.(1987)Theriogenology, 27, 69-79.
Massip,A., Van der Zwalm,P., Ectors,F., De Coster,R., D'leteren,G. & Hanzen,C.(1979)Theriogenology, 12, 79-84.
水野(仁)・小林(一)・林(哲)・斎藤(邦)・平野(進)(1988)第74回家畜繁殖学会, 27(講演要旨).
Moore,N.W. & Bilton,R.J.(1979)In The Freezing of Mammalian Embryos, 203-211.
Nagashima,H., Kato,Y., Yamakawa,H. & Ogawa,S.(1988)Theriogenology, 29, 280(abstr.).
長嶋(比)・加藤(行)・山川(宏)・尾尾川(昭)(1988)第74回家畜繁殖学会, 26(講演要旨).
Niemann,H., Brem,G., Sacher,B., Smidt,D. & Krausslich,H.(1986)Theriogenology, 25, 519-524.
Prather,R.S., Spire,M.F. & Schalles,R.R.(1987)Theriogenology, 28, 195-204.
Rall,W.F. & Fahy,G.M.(1985)Nature, 313, 573-575.
Suzuki,T. & Shimohira,I.(1986)Theriogenology, 26, 333-339.
Willadsen,S.M.(1977)In The Freezing of Mammalian Embryos, 175-194.
Willadsen,S.M., Polge,C., Rowson,L.E.A. & Moor,R.M.(1974)Cryobiology, 11, 560(abstr.).
Wilmut,I. & Rowson,L.E.A.(1973)Vet.Rec., 92, 686-690.
Yamamoto,Y., Oguri,N., Tsutsumi,Y. & Hachinohe,Y.(1982)J.Reprod.Fert., Suppl., 32, 399-403.

マウス初期胚の凍結保存：とくに系統差について

Freeze Preservation of Mouse Embryos : With
Reference to Strain Differences

横山峯介

Minesuke YOKOYAMA

財実験動物中央研究所生殖研究室

Animal Reproduction Laboratory, Central Institute for
Experimental Animals

(緒言) 系統保存への応用を目的としたマウス初期胚の凍結保存は、ホルモン処理によって過剰排卵を誘起したメスを交配し、8細胞期の発生ステージで胚を採取して凍結保存するのが一般的に行なわれている方法である。しかし、ホルモン(PMSG-hCG)処理によって排卵ならびに発情を誘起し、交配したさいの交尾率には系統差のあることが知られている¹⁾。また、ミュータント系の中には、繁殖能力の低いものや運動失調のために自然交配が不能で胚を得ることが困難なものも多い。

本研究では、いくつかの系統のマウスから体外受精によって受精卵を得、これを2細胞期胚で凍結保存した。さらに凍結胚を融解し、その生存性と発生能について検討した。

(材料および方法)

動物：体外受精とそれにひき続く胚の凍結保存の実験には、BALB/cA, C57BL/6N, C3H/HeN, DBA/2N, BALB/cA-hr(ヘアレス), CBA/N-nu(ヌード), C57BL/6-nu(ヌード), C57BL/6-dy(筋ジストロフィー), C57BL/6-shi(シバラ), MRL/MpJ-1pr(自己免疫)の成熟マウスを使用した。また、胚を移植するためのレシピエントメスと、帝王切開した摘出仔を里子とする里親には、Jcl:MCH(ICR)成熟マウスを用いた。

体外受精：体外受精のための卵は、メスにPMSG(5IU)とhCG(5IU)を48時間間隔で腹腔内注射し、排卵を誘起して得られたものを使用した。採卵はhCG注射後14~17時間にメスを殺処分し、卵管膨大部から行なった。精子はオスの精巣上体尾部から採取したものを、パラフィンオイル下のTYH²⁾に懸濁し、1時間インキュベート(37°C, 5%CO₂・95%Air)して受精能獲得を誘起してから媒精に供した。媒精は卵の入ったTYH液に、精子懸濁液を最終濃度が100~150精子/μlになるように添加して行なった。その後はそのままの状態で24時間培養(37°C, 5%CO₂・95%Air)し、2細胞期へと発生させた。なお、一部の卵は媒精後約6時間

に観察し、第2極体の放出が起り、雌雄前核の形成が確認されたものをMW液³⁾に移し換えて18時間培養(37°C, 5%CO₂・5%O₂・90%N₂)した。

胚の凍結保存：胚の凍結保存はWhittinghamら⁴⁾の方法に若干修正を加えた手法⁵⁾により行なった。体外受精後の培養によって2細胞期に発生した胚は、PBI液⁶⁾で3回洗浄し、凍結チューブ(1.8ml; ヌンク、No.363401)に20~40個の割合で移した。室温でDMSOの最終濃度が1Mになるように添加し、-7°Cまで冷却して植氷した。その後、-50°Cまで0.3°C/分、-50~-70°C間を0.5°C/分で、ドライアイスアルコール法により冷却した。-70°Cまで冷却した凍結チューブは、液体窒素(-196°C)に浸漬して一定期間保存した。融解は凍結チューブを液体窒素内から取り出し、室温に静置する方法で行なった。この際の-70°Cから-10°Cまでの温度上昇速度は約10°C/分であった。室温下で新鮮なPBI液を加えてDMSOを希釈・除去した後、胚をMW液内に回収し、形態的な観察を行なった。

胚移植：形態的に正常と判定された凍結融角胚は、精管結紮オスとの交配によって偽妊娠を誘起したDay1(交尾確認日)のレシピエントメスの卵管に移植した。移植胚数は、片側の卵管あたり5~8個で、合計10~16個とした。妊娠が成立したレシピエントは、自然分娩させたが、Day20の午後になっても分娩しないものについては帝王切開して仔を摘出し、里親に哺育させた。

育成と交配実験：得られた仔は発育を観察し、その一部は生後8週齢でメス1:オス1で同居させ、その繁殖成績を調べた。

(結果および考察)

媒精後、約24時間培養した近交系およびミュータント系マウス卵の2細胞期への発生成績を表1に示した。近交系ではC57BL/6Nが98.9%と最も高く、C3H/Heで83.1%，DBA/2Nで52.2%，BALB/cAが最も低く28.4%という値であった。ミュータント系では、運動失調症のモデルであるC57BL/6-shiが94.0%と最も高く、免疫不全症のCBA/N-nuが88.5%，C57BL/6-nuが82.7%であった。また、自己免疫症のMRL/MpJ-1prでは57.0%，筋ジストロフィー症で繁殖不能なC57BL/6-dyは56.1%，BALB/cA-hrでも46.2%という値であった。

体外受精によって得た2細胞期胚の凍結融解後の生存成績と移植成績を表2に示した。各系統とも凍結・融解胚の回収率は95%以上であった。形態的に正常と判定されたものは、近交系ではBALB/cA 98.2%，C3H/HeN 93.5%，C57BL/6N 92.5%およびDBA/2N 87.6%であった。また、ミュータント系のC57BL/6-shiでは97.3%，C57BL/6-dyでも72.9%と系統間には大きな差は認められなかった。

形態的に正常と判定された各系統の胚を移植した仔への発生成績は表3に示すとおりである。すなわち、C3H/HeNが58.3%，C57BL/6Nが55.4%と過半数を上わまわるものであった。BALB/cAでは43.6%，DBA/2Nでは最も低く15.3%という値であった。ミュータント系のC57BL/6-shiで47.2%，C57BL/6-dyでは30.6%の値であった。これらの仔は、自然分娩または帝王切開処置によって得られたものであるが、80%以上のものが離乳へと至った。各系統とも性比に大きな偏りは見られなかった。また、得られた個体には、凍結保存の操作によって生じたと思われる異常は全く認められなかった。さらに、交配実験による繁殖成績

表1. 各種系統マウスにおける体外受精成績*

系 統	使 用 ♀ 数	検 査 卵 数	2細胞期胚数 (%)
BALB/cA	43	429	122 (28.4)
C57BL/6N	20	352	348 (98.9)
C3H/HeN	20	242	201 (83.1)
DBA/2N	41	945	493 (52.2)
BALB/cA-hr	4	52	24 (46.2)
CBA/N-nu	22	401	355 (88.5)
C57BL/6-nu	13	173	143 (82.7)
C57BL/6-dy	75	931	522 (56.1)
C57BL/6-shi	28	604	568 (94.0)
MRL/MpJ-lpr	16	500	285 (57.0)

* 2細胞期胚で受精を判定

表2. 体外受精に由来する2細胞期胚の凍結融解後の生存成績と移植による仔への発生成績

系 統	凍結融解胚数	形態的正常胚数 (%)	移植胚数	出生仔数 (%)	離乳仔数 (♀:♂)
BALB/cA	114	112 (98.2)	94	41 (43.6)	33 (16:17)
C57BL/6N	280	259 (92.5)	195	108 (55.4)	97 (51:46)
C3H/HeN	199	186 (93.5)	144	84 (58.3)	71 (41:30)
DBA/2N	450	394 (87.6)	320	49 (15.3)	45 (18:27)
C57BL/6-dy	85	62 (72.9)	62	19 (30.6)	18 (9:9)
C57BL/6-shi	74	72 (97.3)	72	34 (47.2)	31 (18:13)

も対照群と差のないものであった。

体外受精率は系統によって大きな差が認められた。近交系のC57BL/6Nでは各実験群とも安定して高い成績が得られたが、BALB/cAでは実験群によりバラツキが大きく、平均でも28.4%と最も低い値であった。ミユータント系でも系統より差があるものの凍結保存に供する2細胞期胚を得ることができた。とくにC57BL/6dyは筋ジストロフィーを生後約2週齢で発症するため、成熟時に達しても体重は15gを越えることはまれである。このような繁殖不能な系統でも再現性のある成績で体外受精させることができ、2細胞期胚を得ることができた。また、凍結融解胚の生存性は系統を問うことなく、高い成績であった。しかし、移植による仔への発生率には、系統間に大きな差が認められ、今後さらに検討を要する課題を考える。

(主要文献)

- 1) Yokoyama,M.,Wakasugi,N. and Nomura,T. : An attempt to store inbred mouse strains. *Frozen Storage of Laboratory Animals*, (Zeilmaker,G.H.,ed), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. pp 71 - 80, 1981.
- 2) 豊田 裕, 横山峯介, 星冬四郎:マウス卵子の体外受精に関する研究. I. 精巣上体精子による受精成績. *家畜繁殖誌*, 16:147 - 151, 1971.
- 3) 勝木元也, 編:発生工学実験マニュアル・トランスジェニックマウスの作り方, 講談社サイエンティフィック. 東京, 1987.
- 4) Whittingham, D.G., Leibo,S.G., and Mazur,P. : Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. *Science*, 178: 411 - 414, 1972.
- 5) 横山峯介:実験小動物の卵子・胚の凍結保存による系統保存(胚バンク)・凍結保存—動物・植物・微生物—, (酒井 昭編), 朝倉書店, 東京 pp 97 - 102, 1987.

超急速凍結法を用いた体外受精由来マウス
初期胚の凍結保存について

Survival of mouse embryos derived from in vitro
fertilization after ultrarapid freezing and thawing.

中瀧直己

Naomi Nakagata

順天堂大学医学部共同病理研究室

Central Laboratory for Medical Sciences, Division of Pathology,
School of Medicine, Juntendo University

目的：最近、著者はRallらの開発した Fig. 1.

vitrification solution (VS1)¹⁾ を若干改良したmodified VS1を保存液とし、胚をmodified VS1に移した後、直ちに、液体窒素中に浸漬する超急速凍結を試み、融解後、高い生存率を得ることを報告した^{2, 3)}。そこで今回はこの超急速凍結法を用いて種々の発生段階、即ち、体外受精により得られたF1卵子由来の前核期受精卵、2細胞期、4細胞期、桑実期および胚盤胞期胚と各種系統における2細胞期胚の凍結保存を試み、融解後の胚の生存性について検討した。

方法：5iu PMSGと5iu HCGを48時間間隔で腹腔内投与し、過排卵処理を施したB6C3F1雌マウス(8-12週令)の卵管膨大部よりHCG注射後16-17時間に採取した卵子と受精能獲得を誘起したICR成熟雄(8-15週令)の精巣上体尾部精子を用いてHTF培地⁴⁾内で体外受精を行なった

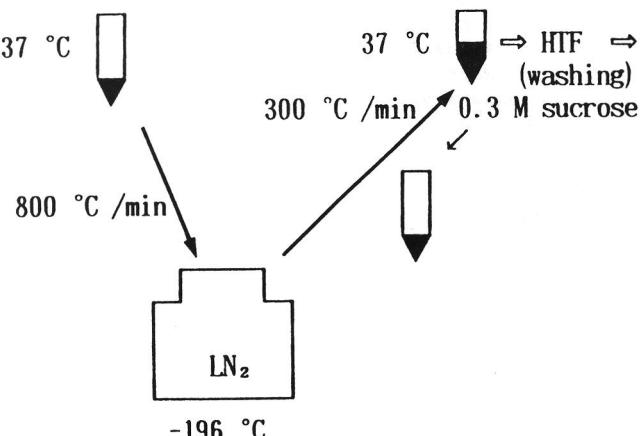


Table 1. Composition of DAP 213

Component*	Concentrations (mol)
Dimethyl sulphoxide	2
Acetamide	1
Propylene glycol	3
Total	6

* in PB1

Fig. 2 Frozen-thawed mouse embryos at recovery

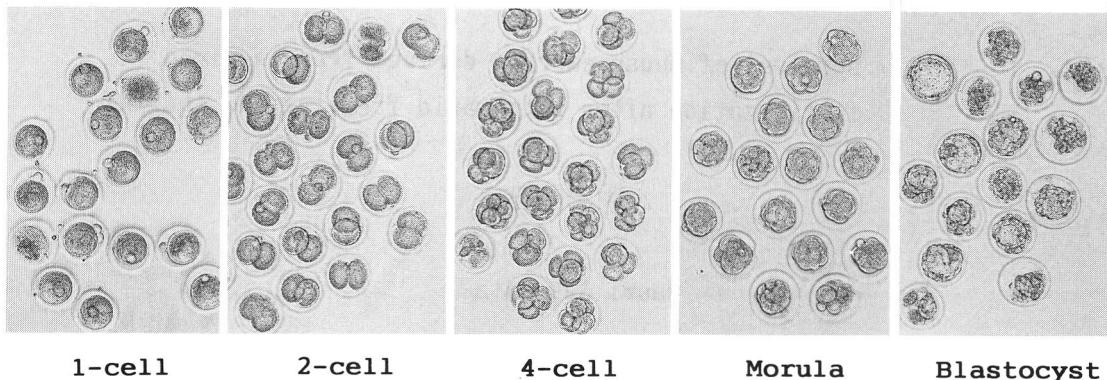


Table 2. Survival rates of frozen-thawed mouse embryos fertilized in vitro on thawing.

Stage of embryo at freezing	No. of embryos frozen	No. of embryos	
		recovered(%)	morphologically normal(%)
1-cell	100	95 (95.0)	87(91.5)
2-cell	100	96 (96.0)	91(94.8)
4-cell	100	94 (94.0)	89(94.7)
Morula	100	95 (95.0)	89(93.7)
Blastocyst	100	90 (90.0)	12(13.3)

Table 3. Preimplantation development in culture of frozen-thawed mouse embryos derived from in vitro fertilization.

Stage of embryo at freezing	No. of embryos cultured	No.(%) of embryos developed to blastocyst
1-cell	87	49(56.3)
2-cell	90	52(57.8)
4-cell	89	63(70.9)
Morula	89	74(83.1)
-----	-----	-----
Control (Unfrozen 1-cell)	80	74(92.5)

(37 °C, 5%CO₂ in air)。授精後 6, 24, 48, 72, および 96 時間の体外培養により、それぞれ前核期受精卵、2細胞期、4細胞期、桑実期および胚盤胞期へ発生したものを凍結実験に用いた。凍結・融解操作はほぼ前報に従った^{2, 3)}が、保存液および融解操作についてはさらに若干改良を加えた(Fig. 1)。即ち、保存液には DAP 213(Table 1)を用い、それぞれの胚を少量の HTF 培地とともに直接サンプリングチューブ (volume: 0.5ml, sarstedt) 内の 20-30 μl の DAP 213 に移し (1サンプリングチューブ当たり 15-25 個)、10秒以内に液体窒素中に浸漬することにより超急速的に胚の凍結を行なった。凍結後 1-14 週間に液体窒素保

Table 4. Survival rates of frozen-thawed 2-cell mouse embryos fertilized in vitro after thawing.

Strain	No. of 2-cell embryos		
	frozen	recovered(%)	morphologically normal(%)
C57BL/6J	100	95(95.0)	88(92.6)
C3H/He	100	96(96.0)	87(90.6)
DBA/2	100	96(96.0)	80(83.3)
BALB/c	100	98(98.0)	86(87.8)
ICR:JCL	100	96(96.0)	88(91.7)
B6C3F1 × ICR:JCL	100	98(98.0)	92(93.9)

Table 5. Development to live young of frozen-thawed 2-cell mouse embryos obtained by in vitro fertilization and transferred to the oviducts of recipients on day 1 of pseudopregnancy.

Strain	No. of recipients used	No. of embryos transferred	No. of animals which delivered live young	No. of live young		
				♂	♀	total(%)
C57BL/6J	6	88	6	23	30	53(60.2)
C3H/He	6	83	4	15	8	23(27.7)
DBA/2	6	80	2	3	1	4(5.0)
BALB/c	6	86	4	12	16	28(32.6)
ICR:JCL	6	84	4	10	7	17(20.2)
B6C3F1 × ICR:JCL	6	92	6	29	24	53(57.6)

管器からサンプリングチューブを取り出し、37°Cに加温した0.3mlの0.3M sucrose 溶液 (PB1⁵) に溶解) をすばやくサンプリングチューブ内へ加えることにより胚を融解と同時にDAP 213を希釈した。続いてサンプリングチューブ内の溶液をシャーレに移し、胚を回収、回収胚をHTF 培地で3回洗浄後、それら胚の形態学的観察を行なった。さらに形態的に正常と判定された前核期受精卵、2細胞期、4細胞期および桑実期胚についてはHTF 培地内でそれぞれ90、72、48、および24時間、体外培養し、胚盤胞への発生について検討した。尚、授精後6時間の前核期受精卵を凍結することなく、単に、90時間体外培養したものをcontrolとした。さらに上述の条件下で体外受精を行ない、授精24時間後に得られた各種系統の2細胞期胚 (C57BL × C57BL, C3H × C3H, DBA × DBA, BALB × BALB, ICR × ICR および B6C3F1 × ICR) についても同様の超急速凍結を行なった。また融解後におけるこれら胚の生存性の検討は、新生仔への発生、即ち、形態的に正常と判定された胚を直ちに偽妊娠第1日目 (墮胎確認日) の受容雌の卵管へ移植することにより行なった。

結果: 各ステージにおけるF1卵子由来胚の融解時の生存率 (形態的正常胚の割合) をTable 2 およびFig. 2 に示す。融解時における形態的正常胚の割合は、前核期受精卵から桑実期胚においてすべて90%以上 (91.5~94.8%) ときわめて高値であった。しかしながら、胚盤胞におけるそれはわずか13.3%と前核期受精卵から桑実期胚のそれらと比べ有意に低値を示した。また形態的に正常と判定された胚の内、体外培養により胚盤胞に発生した胚の割合は、前核期受精卵、2細胞、4細胞および桑実期胚でそれぞれ 56.3, 57.8, 70.8 および 83.1% と、桑実胚において最も高い値であった (Table 3)。

各種系統由来2細胞期胚における融解時の形態的正常胚の割合をTable 4に示すが、いずれの系統においても回収胚の80%以上(83.3~93.9%)が形態的に正常であった。各種系統において形態的に正常と判定された凍結-融解胚の移植成績をTable 5に示す。凍結-融解胚の受容雌への移植によりいずれの系統においても新生仔が得られたが、新生仔への発生率は各系統によりかなりの差異が見られ、C57BL/6Jの胚およびB6C3F1 × ICRの胚が57.6~60.2%と最も高く、逆にDBA/2の胚においてはわずか移植胚の5.0%が新生仔に発生したにとどまった。

考察：本実験から胚の超急速凍結、即ち、室温にて胚を高濃度の保存液(DAP 213)に移し、直ちに液体窒素中に浸漬することにより、マウス胚の凍結保存が可能となった。

各ステージにおける超急速凍結保存について、Massipら^{6,7)}およびScheffenら⁸⁾は牛およびマウス胚の超急速凍結を試み、胚の生存性を検討した結果、胚盤胞における融解後の生存率は桑実胚のそれに比べ、きわめて低値であったことを報告した。本実験においても胚盤胞の生存率は他のステージの胚と比較し、有意に低かったことから、今後、胚盤胞における本凍結法の十分な技術開発が必要と思われる。

各種系統由来マウス2細胞期胚の移植成績について、横山ら⁹⁾は緩慢凍結法により凍結保存したマウス胚の新生仔への発生率には、系統差があることを報告した。本実験において各種系統由来未凍結胚の移植は行なっておらず、一概に凍結に対する胚の系統差についての比較はできないが、融解時の形態的正常胚の割合がすべての系統で高値を示したにもかかわらず、新生仔への発生率にかなりのばらつきが見られたことは、一見、形態的には正常であるものの、凍結に対する感受性が系統により異なることを強く示唆しているものと思われる。

文献

- 1) Rall, W.F., and Fahy, G.M. (1985). *Nature*, 313, 573-575.
- 2) 中瀧直己(1989) 日不妊会誌, 34, 掲載予定
- 3) 中瀧直己 *Exp. Anim.* 投稿中
- 4) Quinn, P.Q., Kerin, J.F., & Warnes, G.M. (1985). *Fertil. Steril.* 44, 493-498.
- 5) Whittingham, D.G. (1974). *Genetics*, 78, 395-402.
- 6) Massip, A., Zwalmen, P., & Leroy, F. (1984). *Cryobiology*, 21, 574-577
- 7) Massip, A., Zwalmen, P., Scheffen, B., & Ectors, F. (1986). *Cryo-Letters* 7, 270-273.
- 8) Scheffen, B., Zwalmen, P., & Massip, A. (1986). *Cryo-Letters*, 7, 260-269.
- 9) 横山峯介、勝木元也、野村達次 (1988). *実験医学*, 6, 246-251.

教室におけるヒト胚凍結保存の導入の背景

The background of human embryo cryopreservation program in Kyoto University

辰巳賢一・野田洋一・福田愛作・馬岡 陽・松本 央・
岸 淳二・江見信之・神崎秀陽・森 崇英

Kenichi TATSUMI, Yoichi NODA, Aisaku FUKUDA,
Yoh UMAOKA, Hisashi MATSUMOTO, Junji KISHI,
Nobuyuki EMI, Hideharu KANZAKI, Takahide MORI

京都大学医学部婦人科学産科学教室

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

はじめに：平成元年4月より当教室のヒト体外受精・胚移植プログラムに胚凍結保存が導入されることとなつた。これは我々が体外受精・胚移植法を行う上で胚凍結保存が是非とも必要と考えるようになったからである。本稿では教室の体外受精プログラムにおける胚凍結保存の必要性、教室において行ってきた胚凍結保存の動物実験成績等について述べ、ヒト胚凍結保存プログラムの成立までの過程を示す。

胚凍結保存の必要性：体外受精・胚移植法を受ける患者の目的は妊娠することであり、我々はそれに答るために妊娠率を上げるための努力を日夜続けている。妊娠率を上げる最も有効な方法は多くの受精卵を子宮内に戻すことであり、このために患者に排卵誘発剤を投与し、多くの卵胞を発育させ、多くの卵子を回収しようとしている。教室では表1に示すように1986年2月から体外受精プログラムを開始したが、1987年末までの間に4例の妊娠例を得たに過ぎず、うち3例は流産となり、生児は1例にすぎなかつた。この間は正常分割した胚をすべて子宮内に戻していたが、この事が問題になることは無かつた。

1988年に入り、排卵誘発法をそれまでのClomiphene-HMG-hCG法¹⁾からHMG-hCG法に変えたところ妊娠率がめざましく向上し、またそれと同時に多胎妊娠が増えってきた。体外受精・胚移植法を受ける患者には双胎妊娠を希望する患者が多いが、教室の体外受精・胚移植法による双胎妊娠例は前期破水、あるいは妊娠中毒症により早産となっており、やはり産科学的立場からみれば単胎妊娠が望ましい。また患者の希望により6個の胚を移植したある患者には要胎妊娠が成立した。妊娠31週で破水し帝王切開の結果4児ともintact survivalとなつたが、このような多胎妊娠は、母児共に危険な状態となることもあり、できる限り避ける必要がある。この様に多胎妊娠を避けるという見地からみれば移植胚数はで

年度	刺激周期	採卵	胚移植	妊娠	妊娠率	
					(/排卵)	(/胚移植)
1986	56	36	24	1	3 %	4 %
1987	71	62	55	3	5 %	5 %
1988	80	69	60	18	26 %	30 %
Total	207	167	139	22	13 %	16 %

表1 京都大学における年度別体外受精成績

きる限り少なく抑える必要がある。

しかし一方前に述べたように妊娠率は移植する胚の数が多いほど高くなる。図1に教室の1988年の移植胚数と妊娠率、多胎発生率との関係を示す。妊娠例数が18例と少ないためきれいなグラフとならなかったが、それでも移植胚数が増えるに従い妊娠率も多胎発生率も上昇するのがはっきりしている。妊娠率は3個の胚移植まで上昇し、それ以上移植しても大きな向上は見られない。一方多胎妊娠は4個以上の胚移植を行った場合に非常に高い頻度で出現する。図1から見れば3個の胚を移植するのが最も合理的であり、数が増えてグラフがもう少しおだらかになることを考えれば4個の胚移植までは良いとしても5個以上の胚移植は意味が無いと考えるべきであろう。この教室のデータは、移植する胚の数は3個、多くても4個とすべきであるという、現在世界で一般的に言われていることを裏付けることとなった。

次の問題は4個または5個以上の胚が得られた場合に、いかにして3個または4個の移植する胚を選ぶかということである。ある患者では12個の卵を採卵し、体外受精の結果10個の卵が正常受精し、正常分割した。中でも5個は形態学的にみて甲乙つけがたい4-8細胞期胚であった。この内の4個を選び移植を行ったが妊娠は成立しなかった。一方形態学的に非常に良好であったが移植をしなかった胚をその後も試験管内で培養を続け、自然変性を待ったところ4日後には写真1に示すようなhatched blastocystとなった。in vitroの培養でもhatched blastocystとなったこの胚を選んで4細胞期に子宮内に移植していれば妊娠が成立した可能性も高く、5個から4個を選び出し方が悪かったために1つの生命が誕生できなかったかもしれない非常に悔やまれる症例であった。現在のところ形態学的見地から胚のqualityを確定することは難しく、実務者の勘に委ねられているのが現状である。教室における1988年の60例の胚移植症例のうち5個以上の形態学的正常胚の得られた症例は21例あり、4個以下の胚しか移植しないとすれば三分の一以上の症例で、この様な責任重大な胚の選別を行い、一部の胎児となる可能性のある胚の廃棄を行う必要が起るのである。

そこでこのような問題を解決し、廃棄されるべき運命にある胚に生存の機会を与えることで、教室の体外受精プログラムに胚凍結保存を導入することが必要となつたのである。すなわち多胎妊娠を避けるため移植せず残った正常分割胚を凍結保存し、別の周期に移植をおこなうことにより、すべての正常分割胚に胎児

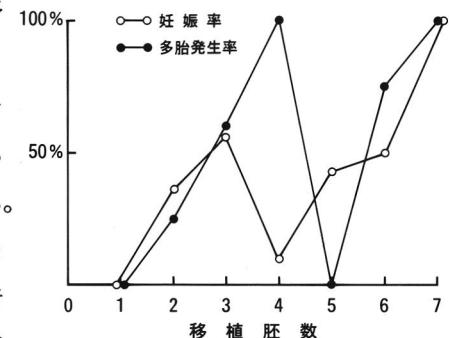


図1 移植胚数と妊娠率および多胎発生率
(京都大学, 1988年度)

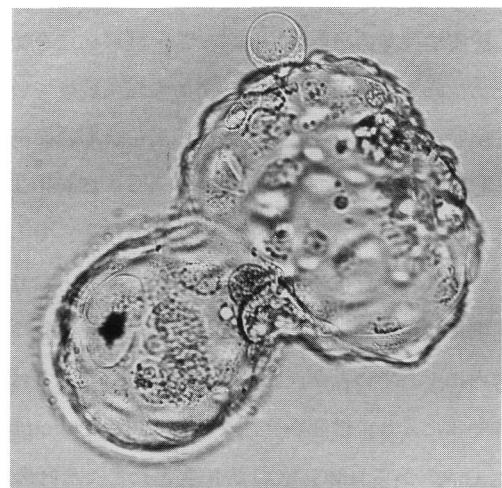


写真1 ヒト hatched blastocyst

となるチャンスが生じるのである。それに伴い当然、採卵当りの妊娠率は向上することになる。また一方、新鮮胚移植においては卵巣刺激をおこなった周期に移植を行うこととなり、子宮が内分泌学的に着床に不適当な状態となっている可能性がある。胚を凍結し、自然周期に移植することによってより着床に好ましい状態の子宮に移植することができ、この事によっても妊娠率が向上する可能性もある。Testart らは体外受精プログラムに胚凍結保存を導入することにより 11.6-19.6% の妊娠率の向上が期待できるとしている²⁾。

また胚を凍結保存し数回に分けて移植することにより、患者あたりの採卵回数を減らすことも可能となる。教室においては1986年11月より超音波ガイド下経腔採卵法を用いており、腹腔鏡採卵を行っていた頃と比べるとはるかに患者の採卵による負担は軽減している。しかし採卵に至るには卵胞刺激のため大量の排卵誘発剤を使用する必要があり、また多くの場合、採卵時に写真2に示すように卵胞のすぐ隣に外腸骨動脈が走行しており、患者は採卵の度にこの大血管の損傷の危険にさらされなければならず、採卵回数は少なくすめばそれに越したことはない。

以上が教室で胚凍結保存が必要となった背景である。

教室における胚凍結の動物実験：教室においては1985年よりマウスを用いて様々な胚凍結の実験を行ってきた。まず耐凍剤の添加による急激な浸透圧の変化による胚の傷害に注目し、耐凍剤を従来の段階的に添加する方法から連続的に添加する方法に変えたところ、凍結融解後の胚の生存率が高まった^{3), 4)}。また8細胞期に回収した胚を凍結し7日間保存した後融解し更に24時間培養したところ、図2に示すように胚盤胞にまで発育する率は耐凍剤処理のみを行ったコントロール群と比較して有意差を認めず、さらにこれらの胚盤胞をマウスの recipient の子宮内に移植し、移植後10日目に着床率、生存胎仔率を調べたところ、図3に示すように凍結融解群で89.4%、75.8%と、コントロール群の91.4%、80.0%と差を認めない高率で妊娠が成立することが確認された⁵⁾。また最近行われ始めた超高速凍結法である Vitrification 法を用いたマウス胚凍結融解実験を行ったが、従来より行われている緩慢凍結法に比較して良い成績は得られず⁶⁾。現在のところ教室のヒト胚凍結保存法に Vitrification 法を用いる予定はない。以上のように数年にわたるマウス胚凍結保存実験の蓄積により、教室においてヒト胚凍結保存法は技術的に施行可



写真2 採卵直前の卵胞

SURVIVAL OF FROZEN-THAWED MOUSE EMBRYOS

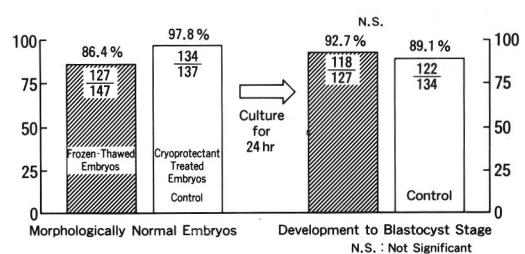


図2 マウス凍結融解胚の生存率

THE RATES OF IMPLANTATIONS AND LIVE FETUSES AFTER EMBRYO TRANSFER

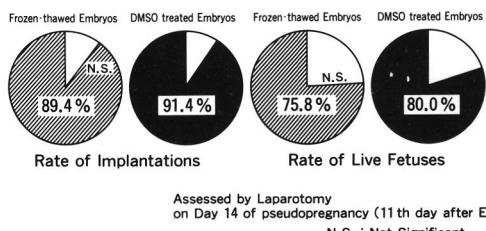


図3 マウス凍結融解胚の子宮内移植成績

能なレベルに達したと考えている。

おわりに：教室におけるヒト胚凍結保存の導入の必要性と、ヒト胚凍結保存法の基礎実験として行ってきたマウス胚凍結保存法について述べた。本稿で述べたようにヒト胚凍結保存が必要となった理由は、畜産学の分野における胚凍結保存の必要性とはまた異なったものである。我々はヒト体外受精・胚移植法の更なる充実のためにヒト胚凍結保存を適切に行っていきたいと考えている。

文献：

- 1) 辰巳賢一, 野田洋一, 矢野樹理, 神崎秀陽, 松本 央, 円山悠子, 馬岡 陽, 福田愛作, 江見信之, 高井一郎, 泰井俊造, 森 崇英：Clomiphene-HMG-hCG による体外受精・胚移植法の卵巢刺激周期における血中 LH 迅速測定法の有用性, 日本受精着床学会誌 1988; 5: 22-24
- 2) Testart, J., Lassalle, B., Belaish-Allart, J., Jorman, R., Hazout, A., Fries, N., Frydman, R. : Human embryo freezing, Ann. N.Y. Acad. Sci. 541, 1988; 532-540
- 3) 福田愛作, 野田洋一, 津久井伸一, 松本 央, 矢野樹理, 森 崇英：耐凍剤連続的添加法によるマウス胚凍結保存, 日不妊会誌 1986; 4: 491-496
- 4) Fukuda, A., Noda, Y., Matumoto, H., Mori, T. : Continuous addition of cryoprotectant for freezing of mouse embryos. In In Vitro Fertilisation, Ratnam, S.S., Teoh, E., and Ng, S., Eds., The Parthenon Publishing Group, Lancs; 153-158
- 5) 馬岡 陽, 福田愛作, 松本 央, 岸 淳二, 辰巳賢一, 矢野樹理, 野田洋一, 森 崇英：6段階耐凍剤添加および除去法による凍結融解マウス胚の子宮内移植成績, 第6回日本受精着床学会講演抄録集 1988; 37
- 6) 福田愛作, 野田洋一, 成木勝彦, 松本 央, 森 崇英：2段階凍結法(耐凍剤連続添加法による)と Vitrification 法によるマウス胚凍結保存, 日本受精着床学会誌 1987; 4: 94-98

卵子凍結保存の染色体への影響

The effects of cryopreservation on embryo.

佐藤 文彦・斎藤 英和・広井 正彦

Fumihiro SATO, Hidekazu SAITO, Masahiko HIROI

山形大学医学部産科婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology,
Yamagata University School of Medicine

ヒトの受精卵および未受精卵の凍結保存は体外受精において、妊娠率の向上と患者の負担軽減のため不可欠の技術と成りつつある。我が国においても臨床応用が開始され凍結保存による妊娠が期待されている。ここで一番問題になるのが凍結保存の安全性である。今までのところアメリカ、オーストラリア、ヨーロッパなどで凍結保存後に生まれた子供に染色体異常や奇形が増加したとの報告はない。しかし受精卵の凍結保存では凍結することにより細胞分裂中期の紡錘糸に障害を受けると言われており、これによりaneuploidyが増加する可能性が示唆されている。これまで凍結保存の染色体に及ぼす影響についての報告は少なく、充分検討されているとは言えない。

我々は1983年以来、主にマウスを用いて凍結融解・培養した受精卵の染色体分析や催奇形物質や発癌物質の検定に有用な姉妹染色分体交換 (SCE) 用いて凍結保存の染色体に及ぼす影響や安全性を検討してきた。

1) マウス8細胞期胚の凍結保存とSCE

マウスの8細胞期胚を卵管より取り出し、図1のような凍結融解法にて凍結保存を行なった後、24時間の培養後固定・染色して染色体分析およびSCEの観察を行なった。

凍結方法

室温にて凍結保護剤を数段階に添加し、ストローに入れる。

↓
1°C/minにて-7°Cまで冷却する。

↓
-7°Cで用手的に植氷する。

↓
0.33°C/minで-45°Cまで冷却して液体窒素につけて保存する。

融解方法

37°Cの水槽内で急速融解する。
凍結保護剤を段階的に稀釀して培養液で洗った後培養する。

凍結保存せずに培養した対照群と-35°Cまで0.33°C/minで冷却する緩徐凍結群と-80°Cまで0.33°C/minで冷却する急速融解群を作った。この結果融解後の正常胚および培養後に胞胚期にまで発育する受精卵の割合は急速融解群と緩徐融解群では有意差を認めず、以後受精卵の凍結法には急速凍結法を用いている。培養後の卵割球数、染色体分析およびSCEの結果は表1のように凍結・融解群で培養後の卵割球数が対照群に比して有意に減少しており融解後発育が遅れていた。しかし、染色体分析では凍結融解群で染色体異常は増加していなかった。またSCE数は対照群と凍結群で有意差無く、凍結保存の染色体への影響は認められなかった。

表1 対照群および凍結・融解群の平均卵割球数、SCE数および染色体分析

	対照群	緩徐凍結群	急速凍結群
平均卵割球数	28.5±5.53 (n=55)	25.7±4.07 (n=41)	24.8±5.91* (n=41)
平均SCE数	20.4±3.12 (n=52)	21.3±4.08 (n=54)	20.3±3.14 (n=34)
染色体分析数	31	25	20
染色体異常胚数(%)	2(6.1)	1(3.8)	1(4.8)

mean±S.D., * ; p<0.05

2) 1細胞期胚の凍結保存および染色体分析

近年、1細胞期胚（前核期）での凍結保存が生存率、妊娠率の高さや培養時間の短縮に役立つことなどより注目されている。1細胞期胚には前核期から前核が融合して第1体細胞分裂の細胞分裂中期までの時期をふくんでおり紡錘糸への影響の検討もできる。PMS-HCGにて排卵誘起を行ない、HCG投与後の21時間目から第1体細胞分裂中期の近くの30時間までの4群を設けて融解後生存胚の割合を観察後培養し、染色体分析を行なった。この結果、凍結保護剤としてpropandiolを用いた群でglycerolやdimethylsulfoxideを用いた群に比して有意に高い生存率がえられた。propandiolおよびsucroseを用いて凍結すると表2のように21時間群より27時間群では融解時の生存胚の割合は変わらなかつたが30時間群では有意に生存率が低下していた。また染色体分析の結果では表3のように生存率の低下していた30時間群においても染色体異数性の増加は認められなかつた。しかし、21時間群から30時間の各群とも2%から7%の胚にpolyploidyが認められた。また対照群においても10%の胚にpolyploidyが認められた。従つて、1細胞の各時期においても凍結保存は染色体異数性を引き起こさなかつた。

のことより1細胞期胚の凍結保存は propandiolを用いれば成績が良く、凍結時期は第1体細胞分裂中期より前であれば成績は変わらないと思われる。卵割球数が奇数の胚の凍結保存は成績が落ち、細胞分裂時期は凍結の障害を受けやすいとする報告があるが、今回の結果ではこの時期の障害は染色体異常を引き起こすような直接的な染色体への影響とは考えられず、凍結保存の紡錘糸への影響は捕えられなかった。

表2 各1細胞期に時期による凍結保存成績

	融解時正常胚(%)	培養後正常胚(%)
30 時間後	67/128(52.3)##	56/128(43.8)##
27 時間後	69/106(65.1)	56/106(52.8)
24 時間後	108/180(60.0)	95/180(52.8)
21 時間後	104/156(66.7)	95/156(60.9)

p<0.05

表3. 1細胞期胚各群の染色体分析

分析細胞数	正常細胞数	染色体異常	
		染色体異数性(%)	多倍体(%)
30時間群	37	35	0 (0) 2 (5. 4)
27時間群	43	42	0 (0) 1 (2. 4)
24,21 時間群	40	37	1 (2. 5) 3 (7. 5)

3) 未受精卵の凍結保存の染色体への影響。

これまで受精卵の凍結保存が主に行なわれてきており、未受精卵の凍結保存の試みははサイズの大きさなどの影響によるによる生存率の低さから遅れていた。しかし倫理面での問題が少ないとや、精液所見の悪い症例にとって未受精卵の凍結保存が必要になることがあり、未受精卵の凍結保存の必要性が増してきた。未受精卵の凍結保存法も進歩し、生存率が上がってきている。未受精卵の場合、融解後に受精させるため受精卵とは違った影響がある可能性がある。Glenister らはマウスの未受精卵を dimethylsulfoxide を用いて凍結し、融解後培養して染色体分析を行い polypliody や aneuploidy の有無を体外受精群と体内受精群を凍結・融解群と比較した。

マウス受精卵を0°Cあるいは-196°Cに冷却した後の染色体分析

受精	卵子数	染色体異常卵	
		多倍体 (%)	異数性 (%)
-196°C凍結群	体外受精	272	43(15.8)
対照群	体外受精	271	23(8.5)
対照群	体内受精	325	30(9.2)
0°C冷却群 (1.5M DMSD 添加)	体外受精	69	3(4.3)
0°C冷却群 (1.5M DMSO 非添加)	体外受精	68	6(6.8)
対照群	体外受精	64	4(6.3)

Glenister, P.H. et al.'87

表4のように染色体異数性は凍結保存群においても 1.5% と対照群の 3.4% に比して増加していなかった。また polyploidy は15.8% と対照群の 9.2% に比して増加していた。従って凍結保存は染色体異数性を引き起こす可能性は低いが polyploidy が増加する可能性が示唆される。polyploidyの原因には polyspermy と極体放出の障害によるものが考えられる。またこれらの胚は PMS-HCGによる排卵誘発により得られたものであり、我々が報告しているように過排卵誘起自体の影響により polyploidy が引き起こされるので凍結保存の影響についてはさらに検討が必要であると思われる。

今後凍結保存の影響・安全性についてはさらに検討が必要であると思われる。

文献

- 1) Glenister, H.P., Wood, M.J., Kirby, C. and Whittingham, D.G.; Incidence of chromosome anomalies in first-cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized in vitro. Gamete Research, 1987, 16, 205-216.
- 2) Sato, F. and Marrs, R.P. : The effect of pregnant mare serum gonadotropin on mouse embryos fertilized in vivo and in vitro., J. in vitro Fert. EmbryoTrans. 1986; 3; 353 -357.

一頭の屠場牛卵巢より採取した卵胞卵子の 胚盤胞への発生能について

The development to the blastocyst stage of oocytes matured
and fertilized *in vitro* from one abattoir cow

高木優二・菅原七郎・正木淳二・江金益*・鐘声*・范必勤*

Yuhji TAKAGI, Shichiro SUGAWARA, Junji MASAKI
Jiang JINYU*, Zhony SHENG*, Binqin FAN*

東北大學 農學部 家畜繁殖學教室
*中國 江蘇省 農業科學院 胚胎工程實驗室

Lab. of Anim. Reprod., Fac. of Agri., Tohoku University
Embryoengineering Research Unit, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, China

目的：近年、屠場由來の牛卵巢より採取した卵胞卵子を体外成熟・体外受精・体外発生させた移植胚から産子が得られるようになり実用化段階に入ったと考えられる。しかし、胚盤胞期までの発生率は、研究者や研究機関で異なるのが現状である。これは、培養液や添加される血清および生理活性物質、供試する精子やその処理条件等の差、さらに、供試する卵胞卵子の採取選択などによって左右されていると考えられる。また、一頭より得られる卵子数と胚盤胞あるいは胎児への発生率との関係についての報告は殆どなされていない。それ故、これら各諸条件と胚盤胞への発生率との関係を明確にする必要がある。そこで今回は、一例であるが、一頭より採取した卵胞卵子から胚盤胞への発生率について検討したので報告する。なお、本実験は1988年11月29日～12月15日の期間、中国江蘇省農業科学院胚胎工程実験室で行なったものである。

方法：卵巣は屠場で妊娠末期（妊娠約10ヶ月）のホルスタイン種雌牛から採取した。保温状態で実験室に持ち帰り、滅菌生理食塩水で数回洗浄後、注射筒を用いて吸引採取した。さらに、卵巣の皮質をハサミで切開し m -PBS+PVA(1mg/ml)中でメスで細切し残った卵胞卵子を採取した。回収した卵胞卵子は、 m -PBS+PVAで3回洗浄後、成熟培地に導入した。成熟培地は25mM HEPES buffer TCM-199(GIBCO社 Cat. 380-2340AG) + 5%非働化牛胎児血清 (Flow社 Cat. 29-101-54R Lot. 127) を用い、0.35mlのドロップにて21.4時間成熟培養(38.0℃, 5%CO₂, 95%air)を行なった。なお、血清はマウスを用いたロット検定で、4ロット中、発生率および割球数が最も良かったものを用いた。また、血清中 E₂、P₄、FSH、LH濃度は、それぞれ 21.7pg/ml、0.32ng/ml、57.10ng/ml、3.16ng/mlであった。精子は、3頭のホルスタイン種雄牛由來のペレット凍結精液を用い、融解後 B.O.液¹⁾ + 10mMカフェイン（欠BSA）で2回

遠心洗浄(1500rpm, 5分)後、精子濃度を $3.0 \times 10^6/\text{ml}$ に調整した。0.1 μM のイオノフォアA23187(SIGMA社 Cat. B7272)で60秒間処理し、50 μl の受精培地(B.0液+BSA20mg/ml)に50 μl 加えて媒精した。媒精後6時間で成熟培地に戻し、以後2日おきに培養液の交換を行なった。顆粒膜細胞層からの遊離は、媒精後72時間に行ない、顆粒膜細胞層と共に培養²⁻⁴⁾した。媒精後7日目より桑実期および胚盤胞期まで発生した胚は、凍結あるいは凍結せずに受卵牛に移植した。

結果：吸引法により27個、細切法により31個の卵胞卵子を回収し、供試可能な45個を実験に供した。45個中25個(55.5%)が分割し、22個(48.9%)が8細胞期以上に発生した(表1)。媒精後7日目では、桑実胚期以上に16個(35.6%)発生し、そのうち10個(22.2%)は、胚盤胞期胚であった。また、同日に16個のうち桑実胚3個および胚盤胞期胚10個を、凍結あるいは受卵牛に移植した。残りの3個の桑実胚は培養を継続し、媒精8日、9日目にそれぞれ1個ずつ胚盤胞期まで発生した。桑実胚期で凍結あるいは移植した3個の胚を除き、胚盤胞期まで発生した胚は、合計12個(26.7%)で、分割胚中の48.0%であった。また、移植した9頭のうち6頭は発情回帰していない。

Table1 Development of follicular oocytes matured, fertilized and cultured in vitro

No. of oocytes inseminated	No. of oocytes developed to:			
	$\geq 2\text{-cell}$	$\geq 8\text{-cell}$	$\geq \text{Morula}$	$\geq \text{Blastocyst}$
45	25 55.5% —	22 48.9% (68.0%) ¹⁾	16 35.6% (64.0%)	12 26.7% (48.0%)

1) % of divided embryos

考察：既述の如く、屠場牛卵巣から数多くの供試可能卵胞卵子を得るために採取法として吸引法と卵巣皮質の細切法とを併用することが有効であり、また、効率の良いことが示された。さらに、顆粒膜細胞と共に培養することにより、数多くの胚盤胞期胚を一頭から得られることが示された。同様な条件下で、黒毛和種11頭から細切法を用いることにより455個の卵胞卵子を採取し、67個(平均6.1個<15%>, 1個<2%>~15個<28%>)の胚盤胞期胚が得られ(未発表)、一方、吸引法では27頭より358個を採取し、28個(平均1.0個<8%>)の胚盤胞期胚が得られた(未発表)。これらの事実は、吸引法で採取されなかつた卵胞卵子も胚盤胞期さらには胎児まで発生し得ることを示している。

- 主要文献：1) Brackett BG., Oliphant G., Biol Reprod 12, 260, 1975
 2) Goto K., Kajihara Y., Kosaka S., Koba M., Nakanishi Y. and Ogawa K., Theriogenology 29, 251, 1988
 3) 梶原豊・後藤和文・小坂昭三・中西喜彦・小川清彦 家畜繁殖誌, 33, 173, 1987
 4) Fukuda Y., Ichikawa M., Naito K. and Toyoda Y., 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Dublin, 1988

二重蛍光染色法による牛胚盤胞期胚の栄養膜細胞と内部細胞塊の分染色

Differential nuclear staining of trophectoderm and inner cell mass of bovine blastocyst by double fluorochrome dye technique.

岩崎説雄・吉田 豊*・渡辺誠喜*・中原達夫

Setsuo IWASAKI, Yutaka YOSHIDA, Seiki WATANABE and Tatsuo NAKAHARA

東京農大総研・* 東京農大農

NODAI Research Institute and *Faculty of Agriculture,

Tokyo University of Agriculture

目的：完全体外培養系により作出された牛胚盤胞期胚の受胎率は、家兎卵管内培養による胚のそれに比べ、約15%低いといわれている¹⁾。この原因の一つには、完全体外培養系由来の胚盤胞期胚の細胞数が少ないと考えられる²⁾。一方、著者らは脱出胚盤胞期胚の内部細胞塊 (ICM) を物理的に取り出し、栄養膜細胞 (TE) と分けて標本を作製し、細胞の状態を観察したところ、TEは増殖を続けていた（分裂中期像の存在により確認した）にもかかわらず、ICMは細胞の形態が不明瞭で、すでに変性していると考えられる胚を観察した。すなわち、TEの増殖により脱出はしたものの、ICMはすでに死滅していた可能性が考えられる。もしこれに類することが胚盤胞期胚内で起こったとすれば、胚は子宮に着床はするが、その後の胚の発生は完全に停止するはずである。さらに完全体外培養系により作出された胚盤胞期胚には、約32%の頻度で何らかの染色体数異常の出現が観察されたが²⁾、これがICM由来のものか、またはTE由来のものかは未だ検討されていない。そこで著者らは、抗牛脾臓細胞免疫家兎血清を作製し、二重蛍光染色によりICMとTEの分別染色を行い、両者が明瞭に区別し得ることを確認した。さらに完全体外培養系により作出された胚盤胞期胚を用いて、TEとICMの細胞数を個別に計測することが可能であることを明らかにした。

方法：牛胚盤胞期胚は、著者ら³⁾の方法に準じ、屠場で採取した卵巣からの卵胞内卵子を体外成熟・体外受精し、体外培養により作出した。ICMとTEの分別染色は、抗牛脾臓細胞免疫家兎血清を作製したのち、Papaioannou & Ebert (1988)⁴⁾の方法に準じて、Hoechst 33258とPropidium iodide (PI) で蛍光染色した。すなわち、抗血清の作製は、牛脾臓細胞を洗浄後、細胞浮遊液を $2 \times 10^8 / \text{ml}$ の濃度に調製し、浮遊液 2 ml を週1回5週間、家兎耳静脈内に免疫し、全放血により抗血清を得た。ICMとTEの分別染色は、プロナーゼ処理により透明帯を除去した胚盤胞期胚を、10%抗血清と39°C、30分間

反応後、HoechstとPI（各10 μ g/ml）を含む補体（20%モルモット血清）と39°C、30分間反応させ、蛍光観察（UV励起、Ex 330-380、BA 420）を行った。観察後の胚をスライドグラス上で細胞を広げ、再度蛍光観察により、ICMとTEの細胞数を分別して計測し、両者の細胞数を比較した。

結果と考察：HoechstとPIによる二重蛍光染色により、抗体の作用を受けて死滅したTEは、PIによりピンクに、また抗体の作用を受けなかつたICMは、Hoechstによりライトブルーに染め分けることができた（Photo. 1）。12個の胚盤胞期胚の全細胞数は 48.2 ± 21.2 (29~102)で、ICMとTEの細胞数は、ICM： 9.7 ± 6.5 (1~21)、TE： 39.1 ± 16.3 (23~81)であった。またICMの全細胞数に対する割合は、 $18.8 \pm 8.0\%$ (3.4~31.3%)であった（Table 1）。Papaioannou & Ebert (1988)⁴⁾は、in vivo回収した豚胚盤胞期胚のTEとICMの細胞数を計測し、ICMの割合は初期胚盤胞期から拡張胚盤胞期にかけて増加するが、脱出胚盤胞期にかけて低下することを報告している。このことは、両細胞の増殖速度が発生ステージにより異なることを示しており、牛胚においても、両者の発生を区別して調べる必要性が指摘される。一方、著者ら²⁾は完全体外と培養系により作出された胚盤胞期胚の総細胞数は、4細胞期以降家兎卵管内で培養して作出した胚のそれに比べ、有意に少ないことを明らかにした。今後、本法を用いてICMとTEの割合の差異を検討し、培養系の違いが両細胞、特にICMの増殖に及ぼす影響を明らかにしたい。

主要文献：

1) 淀 芳明 (1989): 東日本受精卵移植技術 研究会報 5: 11-14.

2) Iwasaki S et al. (投稿中) .

3) Iwasaki S et al. (1988): Theriogenology 30: 1191-1198.

4) Papaioannou VE, Ebert KM (1988): Development 102: 793-803.

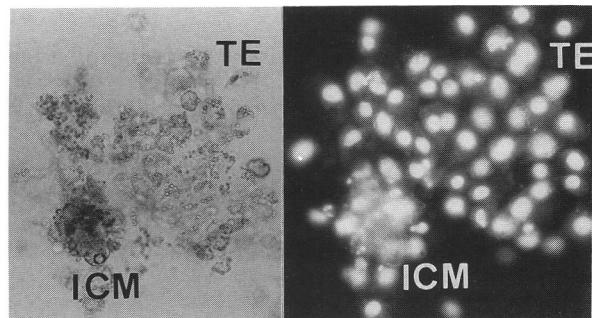


Photo. 1. Differential nuclear staining of trophectoderm and inner cell mass of bovine blastocysts. (Left: Inverted micrograph, Right: Fluorescence micrograph of nuclei dyed with Hoechst and PI, x200)

Table 1. Cell number (Mean \pm SD) of inner cell mass and trophectoderm in bovine blastocyst.

Embryo	No. of cell number	Cell No. of	
		ICM	TE
12	48.2 ± 21.2	9.7 ± 6.5	39.1 ± 16.3
		(18.8 ± 8.0)	(81.2 ± 8.0)

(): Rates to total cell number (%)

未受精ハムスター卵の表層顆粒の放出と滑面小胞体

Premature cortical granule release and sER of hamster oocyte

岡田 詔子・^X川村 良・^{*}永江 穀・^X岩城 章・猪俣賢一郎

Akiko OKADA, Makoto KAWAMURA, Takeshi NAGAE,
Akira IWAKI, Kenichirou INOMATA

東邦大学医学部第二解剖学教室・^X第二産婦人科学教室

^{*}帝京大学医学部溝口病院産婦人科学

2nd Dep. of Anat. and Obstet. and Gynecol. Sch. of Med. Toho Univ.

Dep. of Obstet. and Gynecol. Teikyo Univ. Sch. of Med. Mizonokuchi Hosp.

目的：アフリカ爪蛙、ハムスター、ウサギの卵母細胞の卵表層に多量の滑面小胞体(sER)が出現することが知られている。高坂ら³⁾はウサギ、ハムスターでは、この小胞体がLH添加により12時間で観察され24時間では消失することから成熟に関与している事を示唆している。Campanella ら¹⁾は爪蛙の卵母細胞では表層顆粒(CG)の放出時に卵表層に多量に存在してCGの周囲に一部がまきつき、他のsERに連絡して cortical networkを形成する。これは受精後の顆粒の放出を短時間に完了するようなactivation伝達機構であると報告している。一方、多くの哺乳動物卵の第二減数分裂の分裂装置上の表層ではこの領域に限定してCGが欠損し filamentousな細胞膜を有し、この部位からは精子の侵入が起りにくいことをNicosia らがマウスで観察している。演者ら²⁾はこのCGの欠損領域は第一分裂では主に極体放出時の分裂装置の移動によって両側におしゃられることにより形成され、第二分裂ではCGが放出されることにより形成されることを見出した。さらにCGの欠損領域の形成が卵周囲腔の形成時期と一致しているのでCGの放出と卵周囲腔の形成が関連深いことを示唆した。そこでハムスター卵表層のsERが未成熟卵のCGの放出時にcortical networkを形成してCGの放出に関係しているか否かをタンニン酸固定法により超薄切片で検討した。なおタンニン酸固定法では放出中の分泌顆粒は著しく電子密度が高くなり放出前の顆粒と区別できるとラット受精卵のCGの放出時や、神経伝達物質のペプチドの分泌時の観察で報告されている。

方法：成熟雌ハムスターにPMSGとHCGを各々25iu投与してHCGの投与後1-19時間後に卵胞卵或は卵管より未受精卵を回収してZamboniの固定液或はTakeuchiら⁴⁾の1%タンニン酸固定液中で約1時間室温で固定した。洗浄後1%OsO₄にて約1時間の後固定を施した。その後エタノール系列により脱水、エポン包埋後に超薄切片を作成し、ウランと鉛の二重染色後に観察した。

結果：HCG 投与後1時間卵では有窓層板が出現しその有窓層板の断端に小管状で内腔が中等度の電子密度を有するsER が連続している像がしばしば観察された。この時期のC Gは卵原形質膜から少し離れた部位に所処に存在したがsERとの接触は顯著ではなかつた。HCG 投与後4時間卵では卵表層に塊状にsER が集積していた。HCG 投与後8時間卵ではprometaphase stageで一部のsER はC Gに接触して1-4個まきつく像がよく観察された(図1)。HCG 投与後9時間卵ではanaphase stageで分裂装置にすぐ接した部位にC Gが認められ、その数は核の反対側に比し密集して存在し、C Gの放出像は観察されなかつた。HCG 投与後11-12時間卵ではsecond prometaphase stage - metaphase stage で分裂装置上ではC Gが欠損しその周辺においてC Gが破れ、その膜の内には小顆粒状の非常に高電子密度の物質を含有している放出中の顆粒が認められ→矢印、sER が放出前の顆粒に接している★星印のが観察された(図2)。放出中のC Gの膜は放出前の膜と比して高電子密度であり、その周囲の卵原形質膜と良く似た電子密度を呈していた。

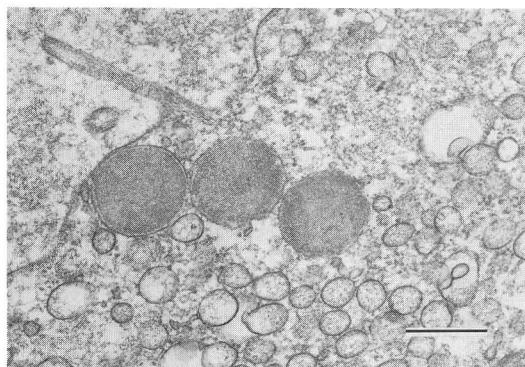


図 1 bar 0.5 μ

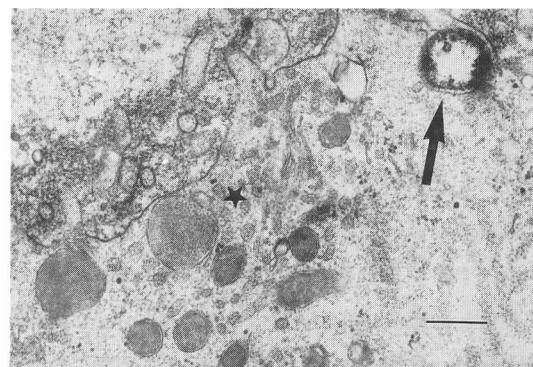


図 2 bar 0.5 μ

考察：卵母細胞の成熟に伴いC Gは上昇して原形質膜と隣接する。この時期にsER はC Gの周囲にまきついで下層の豊富なsER とcortical network を作る事からC Gの放出に関与している事が示唆される。予定極体放出領域のC Gの放出後の膜は、放出中のC Gの膜が放出前の膜と比して卵原形質膜に類似した電子密度を有していた事から卵の原形質膜の新表面となる事が推察される。さらにCampanellaらが爪蛙の未受精卵のC Gの放出は針刺激によって動物極のみにみられ植物極では観察されない。極体放出後の卵の針刺激では全周のC Gが放出されると報告している。今回のハムスター卵の分裂装置上のC Gの放出は、減数分裂核の周辺領域のみに限定されて放出される点で爪蛙の極性と類似していると思われる。

文献：

- 1) Campanella C. et al 1984; J. Exp. Zool. 229 : 283-293
- 2) Okada A. et al 1986; J Submicrosc. Cytol. 18: 233-247
- 3) 高坂哲也他 1981; 家畜繁殖誌 27: 130-133
- 4) Takeuchi I. et al 1985 ; Zoological Science 2: 415-418

ハムスター卵透明帯に関する糖質組織化学的検討

Cytochemistry of Glycoconjugates in the Zona Pellucida Associated with Hamster Oocyte Maturation

木村順平・高沢良徳・月瀬 東・岡野真臣・*後藤 勤・*佐藤嘉兵

Junpei KIMURA, Yoshinori TAKAZAWA, Azuma TSUKISE, Masaomi OKANO,
*Tsutomu Goto, *Kahei Sato

日本大学獣医解剖学教室・*動物細胞学教室

Department of Veterinary Anatomy and *Department of Applied
Biological Science, College of Agriculture and Veterinary Medicine,
Nihon University, Fujisawa, Kanagawa 252

目的：ハムスターの卵成熟に伴う卵透明帯の構成糖タンパク質末端糖鎖の変化をペルオキシダーゼ標識レクチンジアミノベンチジン法により検索した。

方法：成熟ハムスターの発情期 (estrus, Day 1) の午前中にPMSG 30 IUを投与しその54時間後にhCG 30 IUを投与した。投与後0、1、5、9、10、11、12および13時間後に左右卵巣を摘出し、左側卵巣は直ちに2%酢酸カルシウム加10% formalin (4°C) にて24時間固定後、常法に従いバラフィン切片とした。右側卵巣では卵胞を破って卵丘細胞と共に卵を回収し、0.1%ヒアルロニダーゼにより卵丘細胞を除去し上記固定液で2時間固定した。これらバラフィン切片および卵丘細胞除去卵にペルオキシダーゼ標識レクチンジアミノベンチジン法を適用した。レクチンとしてはUEA-1, WGA, SBA, PNAおよびMPAを用いた(Table 1)。

結果：結果は Table 2 に示した通りである。すなわち、hCG投与後0および1時間後では適用したすべてのレクチンに透明帯は陰性を示したが、投与5時間目以降ではWGA, SBA, PNAおよびMPAにおいて陽性反応に転じた。UEA-1染色ではすべてのサンプルで陽性反応が観察されなかった。

Table 1. Lectins used in cytochemical studies

Lectin/Agglutinin	Sugar specificity
Ulex Europeus Agglutinin (UEA-1)	α -D-Fuc
Peanut Agglutinin (PNA)	β -D-Gal
Maclura Pomifera Agglutinin (MPA)	α -D-Gal
Soybean Agglutinin (SBA)	α -D-GalNAc
Wheat Germ Agglutinin (WGA)	β -D-GlcNAc

考察：卵透明帯を構成する糖成分は卵の成熟に伴い変化する事が判明した。すなわち、ハムスター卵胞内卵透明帯を構成する糖タンパク質のD-GalNAc, D-GlcNAc あるいはD-Galといった末端糖鎖の発現はhCGがTriggerとなり引き起こされ、組織化学的に検出可能な量の糖鎖はhCG投与より5時間後

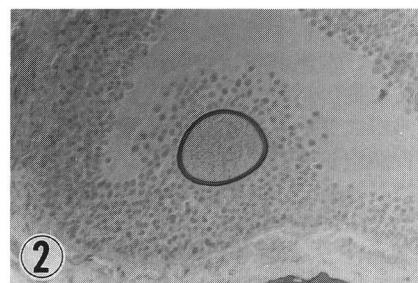
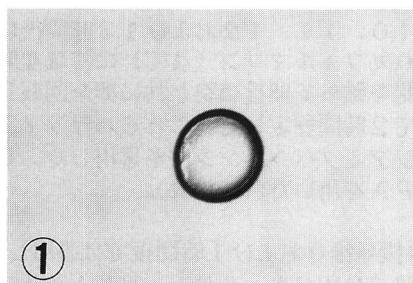
から出現するものと理解された。成熟程度の低い卵は精子との結合能が低いという事実はSuzuki & Sato (1985)により示されているが、精子リセプターとしての透明帯構成末端糖鎖の発現が精子との結合に重要であることが確認された。なお、L-Fucoseは末端糖鎖としては存在しないことが示された。

Table.2. Cytochemical reactions of glycoconjugates in the hamster zona pellucida

Time after hCG injection	UEA-1	WGA	SBA	PNA	MPA
0h	0	0	0	0	0
1h	0	0	0	0	0
5h	0	3	3	2	3
9h	0	3	2/3	1	2/3
10h	0	2/3	3	3	3
11h	0	3	3	3	3
12h	0	3	2	3	2
13h	0	3	3	3	2/3

0=Negative reaction,

1-3=The number being proportional to the intensity of reaction



Explanation to figures

- 1: Positive reaction of PNA in Zona Pellucida of cumulus free oocyte (11hrs after hCG injection).
- 2: Positive reaction of WGA in Zona Pellucida of follicular paraffin section (5hrs after hCG injection).

文献: Suzuki, Y. and K. Sato.: The ability of hamster follicular oocytes to form male pronuclei. J Mamm Ova Res 1985; 2: 21-24

マウス卵の受精前後におけるタンパク合成

Protein synthesis of pre- and post- fertilization mouse oocytes

藤原敏博・堤 治・綾部琢哉・矢野 哲・三橋直樹・水野正彦

Toshihiro FUJIWARA, Osamu TSUTSUMI, Takuya AYABE,
Tetsu YANO, Naoki MITSUHASHI, Masahiko MIZUNO

東京大学医学部産科婦人科学教室

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

目的：初期胚の発生過程において必要となる蛋白の合成は、ウニ、カエルなどの下等動物の卵では母体由来のmRNAすなわちmaternal mRNAにより行われていることが明らかになっている。哺乳動物においても、maternal mRNAの存在を示唆する報告はあるものの、それが活性化される時期やメカニズムについての知見は少ない。今回我々はマウスを用いた実験系で、過排卵を起こさせた後受精が成立するまでの一連の過程における蛋白およびRNA合成を調べ、さらにmaternal mRNAの作用発現についての基礎的検討を試みようとした。

方法：ICR系雌マウス（8～9週令）にPMS（pregnant mare serum gonadotropin）5iuを腹腔内投与し、その48時間後にhCG 5iuを腹腔内投与した後同系雄マウスと交配させ、翌朝膣栓を確認した。今回の実験にあたっては以下の4群の設定を行った。A群：PMS投与24時間後に屠殺・開腹し、採卵した卵、B群：PMS投与48時間後に採卵した卵、C群：PMS投与48時間後にhCGを投与し、交配はさせないで16時間後に採卵した卵、D群：PMS投与48時間後にhCGを投与し交配させ、16時間後に膣栓を確認し採卵した卵。なお、採卵はA群とB群では卵胞を27G針で穿刺して行い、C群とD群では卵管より採取した。

〔実験1〕各群の卵を0.03% hyaluronidase加medium (modified BWW)中で卵丘細胞を除去した後、medium 50 μ l + 3 H-labelled leucine (1.0 μ Ci/ mmol) 50 μ l 中で2時間培養し5回洗浄後、卵1個1個について液体シンチレーションカウンターにてカウントした。またB群の卵については、未発育卵胞卵でも同様の実験を行った。〔実験2〕B・C・D各群の卵を0.03% hyaluronidase加medium中で卵丘細胞を除去した後、medium 50 μ l + 3 H-labelled uridine (35 μ Ci/ mmol) 50 μ l 中で2時間培養し、5回洗浄後個々の卵についてカウントした。なお、結果は mean \pm S.D. で表示した。

結果：〔実験1〕各群の卵のleucineの取り込みを表1に示した。未発育卵胞卵ではleucineの取り込みはみられないのに対し、発育卵胞卵（PMS投与24時間後および48時間後）、未受精排卵卵、および受精卵ではいず

れも取り込みが認められた。しかし、これら4群の取り込み量には差は認められなかった。またB群の卵で、卵-卵丘細胞のまま³H-labelled leucine中で培養した後卵丘細胞を除去して、洗浄後にカウントしたところ、取り込み量は 318.2 ± 50.7 dpm ($n=16$, BG=55.1 dpm) であり、B群の卵の取り込み量に比べ有意に低値であった。

〔実験2〕各群の卵のuridineの取り込みは表2に示す通りであるが、いずれの群においてもuridineの取り込みはみられなかった。

考察：実験1において未発育卵胞卵ではleucineの有意な取り込みは認められないのに対し、発育卵胞卵では取り込みが確認された。このことから、PMSの作用により卵胞が発育すると共に卵が蛋白合成を開始している可能性が示唆された。また卵-卵丘細胞のまま培養したものは、卵単独で培養したものに比べ有意に取り込み量が少なく、アミノ酸の卵への取り込みは、卵丘細胞を介する間接的なものではなく、卵そのものが直接おこなっている可能性が示唆された。しかし、leucineの取り込みはPMS投与24時間後でも48時間後とほぼ同程度に認められており、さらにhCGの投与や受精にかかわらず、取り込み量に大きな変化は認められない。従って、meiotic arrestが解除され減数分裂が再開されたり、あるいは受精が成立しても、卵の蛋白合成量には変化がみられないことが示された。一方実験2ではいずれの群でも明らかなuridineの取り込みは認められず、従ってこの時期の卵はRNAの合成を行っていないと考えられた。以上のことから、マウスの卵には卵成熟～初期発生の段階で要する蛋白合成に必要なmRNAが予め存在している、すなわちmaternal mRNAが存在していることが示唆され、さらにこのmaternal mRNAはPMSの関与により活性化される可能性が示唆された。

文献：

- Brinster, R., L. : Uptake and incorporation of amino acids by the preimplantation mouse embryo. J. Reprod. Fert. 1971 : 27 : 329 - 338
- Gross, P., R., et al : Maternal mRNA and protein synthesis in the embryo. Acta Endocrinol [Suppl.] 1973 : 180 : 244 - 262
- Epstein, C., J. : Gene expression and macromolecular synthesis during preimplantation embryonic development. Biology of Reproduction 1975 : 12 : 82 - 105
- Harper, M., I., Monk, M., : Evidence for translation of HPRT enzyme on maternal mRNA in early mouse embryos. J. Embryol. Exp. Morphol. 1983 : 33, 2 : 389 - 396

表1 マウス卵のleucineの取り込み

mouse oocyte	N	count (dpm)	BG
未発育卵胞卵	5	48.5 ± 6.1	71.6
発育卵胞卵 (A)	13	527.2 ± 180.5	59.0
発育卵胞卵 (B)	9	586.7 ± 176.4	71.6
未受精排卵卵 (C)	26	369.7 ± 182.2	112.9
受精卵 (D)	16	569.3 ± 196.8	86.1

表2 マウス卵のuridineの取り込み

mouse oocyte	N	count (dpm)	BG
発育卵胞卵 (B)	7	49.2 ± 9.2	67.5
未受精排卵卵 (C)	23	97.5 ± 21.2	76.2
受精卵 (D)	15	82.6 ± 28.4	109.9

プロゲステロンのマウス初期胚蛋白合成, RNA合成活性化における役割

Possible role of progesterone on the activation of protein and RNA synthesis of preimplantation mouse 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,
Masahiko MIZUNO

東京大学医学部産科婦人科学教室

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

目的: マウス着床前初期胚が progesterone(P_4)を産生し¹⁾, その P_4 が初期胚自身の hexokinase 活性上昇に関与すること²⁾を既に報告した。この内因性 P_4 の初期胚自身の遺伝子発現における意義を, RNA 合成, 蛋白合成を通して検討した。

方法: 8 週齢の ICR 系雌マウスに PMS-hCG で過排卵処理を行い, 同系の雄と交配させた。Day 1 の 21 時に採取した 1 細胞期胚はそのまま³H の取込み実験に供した。Day 2 の 21 時に 2 細胞期胚を採取し mB WW 液中で培養した。培養 12 時間毎に初期胚を回収し, ³H-leucine 25 μ Ci/100 μ l mBWW (250 μ M), あるいは³H-uridine 25 μ Ci/100 μ l mBWW (5 μ M) 中にて更に 2 時間培養した後, 5 回洗浄し, 初期胚 1 個ごとに³H の取込みを測定した。次に, P_4 産生酵素 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase の特異的阻害剤 trilostane (TRL) を培養液中に添加し (20, 100, 200 μ M), 48 時間培養後の初期胚の, ³H 取込みに対する影響を検討した。TRL 200 μ M 添加群には更に P_4 (0.05, 0.5, 5 μ g/ml), hydrocortisone (F, 0.5 μ g/ml), estradiol-17 β (E, 100 n μ g/ml) を添加して回復実験を行った。

結果: 発生各段階における³H-leucine の取込み (図 1) は, 4 細胞期から増加を始め, 以後ほぼ一定の率で増加した。³H-uridine の取込み (図 2) は, 桑実胚形成期から増加を始め, 胚胎形成期に急増した。培養液に P_4 を加えただけでは³H-leucine, ³H-uridine 共に取込みは増加しなかったが (表 1, 2), TRL で初期胚の P_4 産生を抑制すると両者とも取込みは用量反応性に有意に抑制され, P_4 の同時添加で有意に回復した。F, E の添加では回復がみられず, P_4 の特異性が示された。

考察: ³H の胚発生に伴う取込み増加で, leucine が uridine より先行したのは, 発生初期には蛋白合成に母体由来の mRNA が利用され, 発生が進むと自分自身の DNA から転写され始めるためと考えられる。また, マウス初期胚の産生する P_4 が, 初期胚自身の蛋白合成に何らかの役割をはたしていること, そしてその作用が RNA 合成のレベルに及んでいることが示唆されたと考える。

図1 Uptake of ^3H -leucine by mouse preimplantation embryo

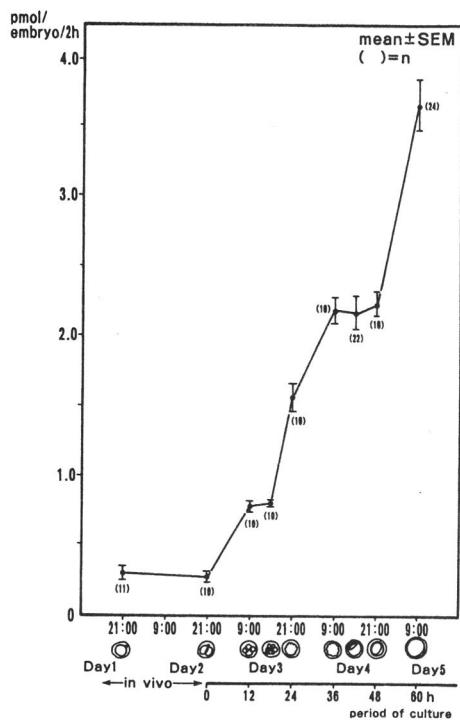


図2 Uptake of ^3H -uridine by mouse preimplantation embryo

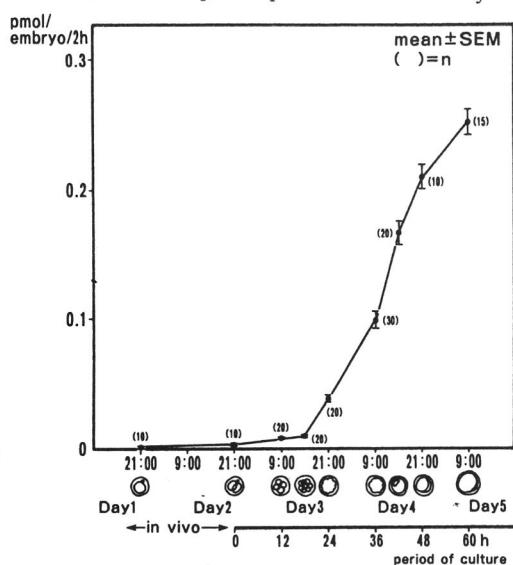


表1
Uptake of ^3H -leucine by mouse preimplantation embryo

treatment	n	dpm/embryo/2h
control	27	2288.1 ± 187.9 ^{*1}
P ₄ 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	14	2044.2 ± 272.5 ^{*2}
TRL 20 μM	13	1935.6 ± 257.0
100 μM	13	845.2 ± 138.2
200 μM	30	462.7 ± 36.1 ^{*3}
TRL 200 μM + P ₄ 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	30	1227.5 ± 167.3 ^{*4}
TRL 200 μM + P ₄ 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	16	946.2 ± 92.3 ^{*5}
TRL 200 μM + F 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	16	865.4 ± 213.8 ^{*6}
TRL 200 μM + E 100ng/ml	16	812.6 ± 162.9 ^{*7}

Values are mean ± SEM

There were significant difference between

*1 vs *3, *3 vs *4, *3 vs *5 (p < 0.01)
There were no significant difference between

*1 vs *2, *3 vs *6, *3 vs *7, *4 vs *5

(TRL:trilostane, P₄:progesterone, F:hydrocortisone, E:estradiol-17 β)

表2

Uptake of ^3H -uridine by mouse preimplantation embryo

treatment	n	dpm/embryo/2h
control	15	4901.1 ± 765.1 ^{*1}
P ₄ 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	15	4010.3 ± 698.3 ^{*2}
TRL 20 μM	15	3457.5 ± 504.6
TRL 100 μM	15	1917.3 ± 340.6
TRL 200 μM	15	473.5 ± 116.4 ^{*3}
TRL 200 μM + P ₄ 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$	15	854.5 ± 200.1 ^{*4}
TRL 200 μM + P ₄ 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	15	2000.7 ± 376.2 ^{*5}
TRL 200 μM + P ₄ 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	15	1476.9 ± 343.7 ^{*6}
TRL 200 μM + F 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	14	506.4 ± 131.0 ^{*7}
TRL 200 μM + E 100ng/ml	15	519.4 ± 150.4 ^{*8}

Values are mean ± SEM

There were significant difference between

*1 vs *3, *3 vs *5 (p < 0.01), *3 vs *6 (p < 0.05)

There were no significant difference between

*1 vs *2, *3 vs *4, *3 vs *7, *3 vs *8, *5 vs *6

(TRL:trilostane, P₄:progesterone, F:hydrocortisone, E:estradiol-17 β)

文献：1) 綾部琢哉 他：Pregnanolone を基質としたマウス初期胚のステロイド転換実験, 日本受精着床学会

雑誌, 6 : 30, 1989

2) 綾部琢哉 他：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,

哺乳卵研誌, 5 : 119, 1988

スーパーオキシドジスムターゼの

初期胚姉妹染色分体交換に及ぼす影響

Effect of superoxide dismutase on sister chromatid exchange in early stage embryo

斎藤英和, 佐藤文彦, 斎藤隆和, 広井正彦

Hidekazu SAITO, Fumihiko SATO
Takakazu SAITO, Masahiko HIROI

山形大学医学部産科婦人科学教室

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

目的：酸素は生体にとってエネルギー産生系として重要な役割をしているが, 反面活性酸素・フリーラジカルを副産物として生じ生体に炎症, 発癌, 老化, 動脈硬化等の影響を及ぼしている。一方, 生体はこれに対してスーパーオキシドディスムターゼ(¹⁾ (SOD)等の防御系を発展させてきた。

体外受精のようすに体外で配偶子や胚を培養する際には, 体内的防御系物質の保護をうけず活性酸素・フリーラジカルの脅威に直接暴露され, 配偶子や胚は多大な影響を受ける可能性がある。特に, フリーラジカル中間代謝体にはDNA塩基に共有結合するものがあり, その結果染色体異常, 姉妹染色分体交換(SCE), DNA単鎖切断およびDNA塩基損傷などを誘発することが明らかになっている。²⁾

今回, 初期胚の培養系にSODを添加し, その影響について, 細胞割球数の変化とSCEを測定することにより検討した。

方法： $B_6C_3F_1$ 雌マウスにPMSを腹腔内に投与後48時間目にhCGを投与し同系成熟雄マウスと交配させた。hCG投与より48時間目に2細胞期胚を卵管より採取し培養した。培養液は, アミノ酸, アルブミン, 血清を含まないHTF液を用い, この液にSCEを観察するためにブロモデオキシリジンを $1\mu g/ml$ の濃度で加え, SODの濃度範囲は, $100\mu g/ml$ から $10\mu g/ml$ を使用した。培養24時間後にコルセミドを加え, さらに2時間培養後脱脂したスライドグラス上にタルコフスキの方法にて胚を固定した。固定した胚はヘキスト33258色素に715分間染色後, シェーレンセン緩衝液にて封入し, 55°Cにて40分間紫外線を照射後, ギムザ染色液にて20分間染色した。染色後顕微鏡下に卵割球数, SCEについて観察した。

結果：胚固定時の胚の形態はほとんどの胚が8細胞期以上の形態を示し, 8細胞期以上胚の率は対照で93.7%, SOD添加群で87.6%, 96.6%, 95.4%, 94.5%, 94.7% (順に $100\mu g/ml$ から $10\mu g/ml$)を示し, 対照に比較し, SOD $100\mu g/ml$ の群においてやや率が低いが有意の差とはいえず, SOD添加群のどの濃度との間に有意差

を認めなかった。(表1)

表1. SOD濃度と形態的胚発育段階

SOD濃度	≥ 8 細胞期 (n)
0 (対照)	93.7% (95)
10 ng/ml	94.7% (94)
100 ng/ml	94.5% (91)
1 μg/ml	95.4% (94)
10 μg/ml	96.6% (89)
100 μg/ml	87.6% (97)

胚を固定染色後、胚の卵割球数を測定してみると対照群の卵割球数は 13.4 ± 0.3 個 (平均 \pm SEM) であるに対して SOD 添加群では、 12.5 ± 0.4 , 13.4 ± 0.3 , 13.8 ± 0.4 , 13.1 ± 0.3 , 13.0 ± 0.4 (順に $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ から $10 \mu\text{g}/\text{ml}$) であり、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、やや低値を示すが有意な差ではなく、他の濃度においても対照と差を認めなかった。(表2)

表2. SOD濃度と卵割球数

SOD濃度	卵割球数 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)
0 (対照)	13.4 ± 0.3
10 ng/ml	13.0 ± 0.4
100 ng/ml	13.1 ± 0.3
1 μg/ml	13.8 ± 0.4
10 μg/ml	13.4 ± 0.3
100 μg/ml	12.5 ± 0.4

表3. SOD濃度と姉妹染色分体交換 (SCE)

SOD濃度	SCE (/ metaphase)
0 (対照)	34.8 ± 1.8 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)
10 ng/ml	36.2 ± 3.3
100 ng/ml	33.7 ± 2.7
1 μg/ml	24.8 ± 2.6
10 μg/ml	28.2 ± 2.9
100 μg/ml	34.4 ± 3.0

考察：酸素は生体のエネルギー产生系として必要欠くべからざる物質ではあるが、最近副産物として発生する活性酸素・フリーラジカルは生体の多くの疾患の原因となっている。生体はフリーラジカルの防御系として種々な物質を発展してきたが、SODもその一つに含まれる。体外受精一胚移植系においては、配偶子・胚が生体外で培養されるために防御系に十分保護されているとは言えず、かつ配偶子・初期胚がそれら自身で防御系を十分発展させているとはいはず、フリーラジカルの影響を多大に受けている。SODを添加することによって、24時間という短かい培養時間のためか使用したSODの濃度範囲においては対照に比較し形態的な胚の発育段階や卵割球数においては差を認めなかった。発癌性物質や催奇形成物質に時に敏感な指標であるSCEより観察するとSODが $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でSCEが有意に低値を示しており、このことより染色体レベルでの安全性が改善されていると考えられた。しかし $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以外の濃度では有意なSCEの低値を認めないとより、SODの体外での至適濃度は比較的狭い範囲にあると考えられた。またこの濃度は血清中の濃度に近く、生体中との関連も示唆された。

以上よりSODは染色体レベルで胚の安全性に関与していると思われる。

- 文献：1. Nakamura, Y. et al ; Carcinogenesis 9 : 203-207, 1988
 2. 永田親義；がん発生の機構, サイエンス社
 3. Perry, P. et al ; Nature 258 : 121, 1975

マウス卵子の受精と初期発生におよぼすG負荷の影響

Effect of Acceleration on Fertilization and Early Development of Mouse Ova in vitro

伊藤雅夫・丸瑠璃子・亀山祐一*・石島芳郎*

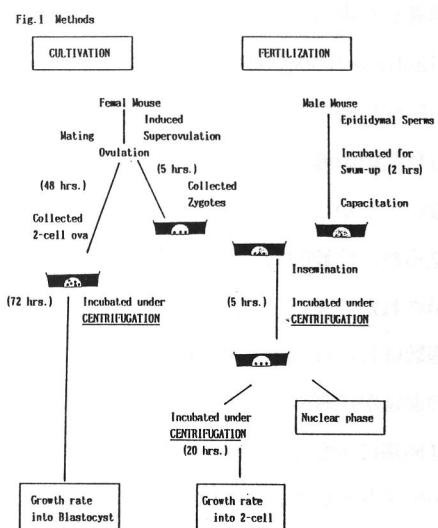
Masao Ito, Ruriko Maru, Yuuichi Kameyama*, Yoshiro Ishijima*

日本大学医学部衛生学教室・東京農業大学*

Department of Hygiene, Nihon University School of Medicine
Tokyo University of Agriculture*

目的：本研究は、哺乳動物の繁殖生理に関する重力の影響を知る目的で、受精および胚発生に及ぼすG負荷の影響を検討したものである。 哺乳動物を用いた発生学的研究においては、しばしば遠心処理が加えられるが、これらは極めて短時間の処理であり、卵子の発生能に及ぼすG負荷の影響は無いとされている。 しかし、受精や発生の全過程を通してのG負荷が胚発生におよぼす影響については、我々にとって未知の課題であり、「哺乳動物卵子は、重力による極性を持っているのか」「精子の透明帯通過や、卵分割などの現象が外力によって何のような影響を受けるのか」など興味深い問題を含んでいるものと思われる。 かかる観点から、我々は遠心力を加えながら培養できる装置を考案し、G負荷条件下においてマウス卵子の体外受精および受精卵の培養を行ない、G負荷の発生生理学的影響について検討した。

実験材料と方法： 供試動物は I C R マウス (60~70日令) である。 実験は図1に示すごとく、受精卵の培養と、体外受精の2つの系よりなっている。 何れの場合も、卵子はG T Hによって過剰排卵を誘起した雌マウスから採取した。 体外受精の場合は、排卵後5時間の未受精卵子を卵管膨大部より採取し、予め2時間の培養によってSwim-upし、受精能を獲得した精巣上体精子を用いて、媒精した。 媒精後直ちに、G負荷条件下で培養を開始した。 受精の判定は、「培養5~7時間後の核相による判定」と「培養24時間後における2-cell分割率」の2通りで行なった。 体外培養の場合は、排卵誘起と共に交配を行ない、排卵後36時間の2-cell卵子を卵管より採取し、G負荷条件



下で72時間培養した。培養後、「Blastocystへの発育率」と「胚を構成する細胞数」の観察を行なった。培養液は、体外受精ではT Y H Medium、受精卵の培養ではWhitten's Mediumを用いた。培養条件は、気相: CO_2 5%, air, 95%、温度: 37°Cである。卵子は96穴のマイクロプレートに収容し、培養器内のターンテーブルに固定し、遠心加速度を負荷しながら培養を行なった。G負荷量はターンテーブルの中心から各スポットまでの距離と回転数から算出した。

結果：1. 受精期におけるG負荷の影響。

媒精後、直ちにG負荷条件下で24時間培養した場合の受精率(2-cell分割率)を表1に示す。2-cell分割率は0.6~1.2Gおよび、1.8G以上の2つの領域で低値を示しており、G負荷による受精阻害が示唆される。2つの領域における受精阻害は、媒精後5時間における核相の観察から、その様相が異なることは明らかである。0.6~1.2G負荷における未受精卵子の多くはMetaphase IIで発生を中止しており、卵細胞質内への精子の侵入が阻害されている。一方、1.8G以上の負荷においては、卵細胞質内への精子の侵入が認められ、第2極体の放出が観察されるが前核が形成されなものや、Polyspermyなどの異常受精が高頻度に生じている。(図2)

2. 初期発生期におけるG負荷の影響。

受精後36時間の2-cell卵子をG負荷条件下で72時間培養した場合のBlastocystへの発育率と、それぞれのBlastocystの細胞数を表2と図3に示す。

2-cell卵子のBlastocystへの体外発育率におよぼすG負荷の影響は2G以下においては全く認められていない。しかし、3.6G, 4.0Gの負荷では強い影響が見られ、比較的低いG負荷で発生が阻害されることが示された。また、これらのBlastocystを構成するの細胞数は1.2G以上の負荷において有意に少なく、発育の遅延が示唆される。特に、3.6G, 4.0Gの負荷では極端に少なく、これらのBlastocystが着床することが出来たとしても、その後の胚死亡が増大することが懸念される。

Tab.1. Effect of centrifugation on in vitro fertilization

Centrifugation (g)	No. of ova treated	No. of ova fertilized*	Fertilization rate (%)	Principal nuclearphase on unfertilized ova
Untreated	60	51	85.0	
0.4	42	33	78.6	
0.6	75	25	33.3	Metaphase II
0.8	60	25	41.7	"
1.0	45	26	57.8	"
1.2	50	22	44.0	"
1.4	55	53	96.4	
1.6	64	55	86.0	
1.8	47	24	53.3	Anaphase or Telophase
2.0	70	14	20.0	

*: 2-cell growth rate.

*: Significant difference between treatment (Analysis of variance. p<0.01)

Tab.2. Effect of centrifugation on in vitro development of 2-cell ova

Centrifugation (g)	No. of ova treated	No. of developed embryos into blastocyst (%)	Cell number of embryos
Untreated	121	111 (91.0)	105.7 ± 5.3 *
0.4	25	21 (84.0)	115.2 ± 12.6
0.8	25	20 (80.0)	113.4 ± 14.1
1.2	25	23 (92.0)	90.3 ± 6.4
1.6	25	22 (88.0)	91.3 ± 5.8
2.0	25	21 (84.0)	88.2 ± 15.7
3.6	29	4 (13.8)	56.0 ± 19.7 *
4.0	52	13 (25.0)	58.2 ± 4.5 *

*: Cell number of Blastocyst in 96 hours after fertilized was 128 ± 18.5

*: Significant difference between * and the other group (p<0.01)

Fig.1 Nuclear phase of ova in vitro fertilized in 5 hours after insemination

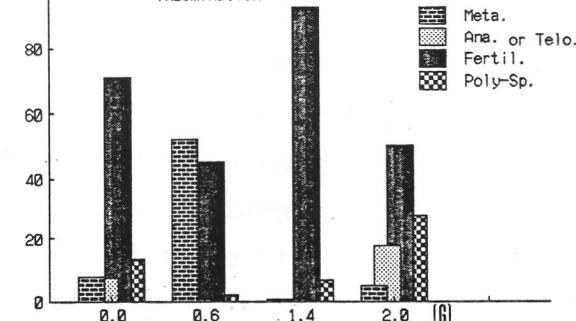
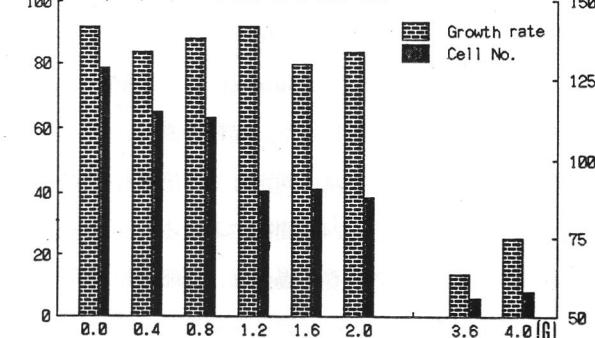


Fig.2 Effect of Centrifugation on Development of 2-cell ova



Lysophosphatidyl Choline処理ハムスター精子の受精能について
Fertilizing ability of Hamster Spermatozoa treated with Lysophosphatidyl
Choline

佐藤 嘉兵、 後藤 勤、 高野 純
Kahei SATO, Tsutomu GOTO, Satoshi TAKANO

日本大学農獣医学部応用生物科学科動物細胞学教室

Laboratory of Animal Cell Biology, Department of Applied Biological Science,
College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University
Fujisawa, Kanagawa 252

目的：Lysophospholipidsであるlysolectin(=lysophosphatidyl choline,LC)は Ca^{2+} freeの条件下でモルモット精子のcapacitationを、促進すること(Fleming and Yanagimachi, 1981)、また前培養を行ったハムスター精子を Ca^{2+} の存在下で先体反応(AR)の発現を早めること(Ohzu and Yanagimachi, 1982)が報告されている。このLCによる精子のcapacitationおよびAR発現促進効果における Ca^{2+} の役割を知る目的で、培養液中の Ca^{2+} の有無がLCのAR発現に及ぼす影響についてハムスター精子について検討し、さらにそのLC処理精子の受精能について調べた。

方法：精子の培養および体外受精にはm-TALP培養液が用いられた。成熟したゴールデンハムスターの雄を使用した。精巣上体尾部から精子を採取しm-TALP培養液中に浮遊させた。Swim up法により運動性の良好な精子を回収し実験に供した。精子をstandard m-TALP培養液と Ca^{2+} freeのm-TALP培養液で1時間の前培養を行った。培養条件は37 °C, 5%CO₂-95%air下で前培養後、LC(10, 20 μ g/ml)を添加したstandard m-TALP培養液に精子を懸濁させて10分間培養を行った。その培養の後に、精子を遠心分離法によって洗浄し、再びstandard m-TALP培養液で培養を行って精子の生存率およびAR誘発率について調べた。次に、LCによって処理された精子の受精能力を調べるためにハムスター卵子を用いて体外受精を行った。性周期のDay 1にPMSG 30 IUを腹腔内注射を行い、その52時間後にhCG 30 IUを腹腔内注射して過排卵処理を行った。hCG投与15.5時間後に卵管を取り出し、灌流法によって排卵卵子を回収した。卵丘細胞を取り除くために0.1%hyaluronidase溶液中に5分間感作した。卵丘細胞を取り除いた卵子をミネラルオイルで覆ったm-TALP培養液のドロップ内にいれ、これに精子(8~10 \times 10⁵/ml)を加えて体外受精を行った。

結果および考察： Ca^{2+} free培養液で培養したLC処理精子の運動性はcontrol精子 (LC無添加) に比べて低下がみられた。25 μ g/ml添加群は10 μ g/ml添加群に比べて、精子培養開始後の各時間の運動性を低下させる傾向にあった。一方、standard m-TALP培養液中で培養したLC処理精子も同様な結果を示した。standard m-TALP培養液中で培養した精子のAR発現率は培養開始後1時間で40% (controlでは約4.3%) で、明らかにARは促進された。

そして、3時間後にはLC処理精子のAR発現率は約69%となりcontrol(9.2%)に比べて顕著であった。Ca²⁺free m-TALP培養液で培養された精子においてもstandard m-TALP培養液での精子と同様の傾向を示したが、Ca²⁺存在下 (standard m-TALP培養液) に比べてAR発現率は低かった。LC処理精子の受精能力を調べた結果はTableに示した通りであった。Standard m-TALP培養液中でLC処理した精子はcontrol精子に比べて透明帯通過および卵子細胞質内進入時間は明らかに早められた。以上の結果から、LCのAR促進作用は前培養用培養液中にCa²⁺が存在すると効率よく発現することを示している。また、本実験の結果は、Fleming and Yanagimachi(1981), Ohzu and Yanagimachi(1982), Sato(1987)等の結果と一致した。今後、LCのcapacitationあるいはAR発現の促進に関する分子レベルでの機構解明が期待される。

Table In vitro fertilization of hamster eggs by spermatozoa treated with LC

Observation time (hr)	Dose of LC (ug/ml)	Total no. of eggs	No. (%) of eggs fertilized		
			Vitellus penetration	Swollen sperm head	Pronucleus formation
1	0	13	0	0	0
	10	14	11(78.6)	0	0
	25	14	8(57.1)	0	0
3	0	13	13(100)	0	0
	10	13	0	9(69.2)	4(30.8)
	25	13	0	9(69.2)	4(30.8)

*Spermatozoa were preincubated for 1hr in mTALP medium and treated with LC for 10min. Thereafter, they were used for insemination.

文献:

- Fleming, A.D. and Yanagimachi, R. (1981); Effects of various lipids on the acrosome reaction and fertilization of guinea pig spermatozoa with special reference to possible involvement lysophospholipids in the acrosome reaction. Gamete Res., 4: 253-273.
- Ohzu, E. and Yanagimachi, R. (1982); Acceleration of acrosome reaction in hamster spermatozoa by lysolectin. J. Exp. Zool., 224: 259-263.
- Sato, K. (1987); In vitro fertilization of rabbit eggs using spermatozoa treated with lysophosphatidyl choline. J. Mamm. Ova Res., 2: 117-118.

ブタ、ヒト透明帯共通抗原23Kdに対するモノクローナル抗体の作製とその受精障害について

Production of monoclonal antibodies to the zona pellucida antigen (23Kd) common to human and their inhibitory effects on in vitro fertilization in humans

長谷川昭子、香山浩二、磯島晋三

Akiko HASEGAWA, Koji KOYAMA and Shinzo ISOJIMA

兵庫医科大学 産婦人科学教室

Dept. of Obstetrics and Gynecology, Hyogo Medical College

【目的】ブタ透明帯（ZP）にはヒトZPと抗原性を共有する成分が存在することからブタZPを用いて避妊ワクチンの研究が行なわれている。^{1) 2)}昨年本研究会でヒトZPとの共通抗原を含む平均分子量23Kd（ZP4）の糖蛋白質に対しポリクローナル抗体を作製し、その抗体がin vitroでヒト精子のZPへの結合を阻害することを報告した。³⁾今回はモノクローナル抗体（Mab）を作製しその受精阻害作用ならびに免疫学的反応性について検討を行なった。

【方法】SDS-PAGEゲルから電気的に抽出した23Kd分画10μgをBALB/cマウスに免疫し、その脾臓細胞とP3U1を細胞融合し定法に従いハイブリドーマを作製した。抗体の検出は可溶化ブタZP（sPZP）をプレートに結合したELISA法、次いでブタおよびヒト卵を用いた間接蛍光抗体法により行なった。

【結果】作製したMabの性質を表にまとめた。いずれもsPZPと強く反応し、またトリフルオロメタンスルホン酸（TFMS）で糖を除去したDGsPZPとも強く反応した。これらのMabは23Kd糖蛋白質の蛋白質部分を認識している可能性が強い。ヒト精子のZPへの結合に及ぼす影響では、4A2, 4E12, 5H4が阻害作用を示した。しかしその作用は抗23Kdポリクローナル抗体と同様あまり強くなく、抗sPZP抗体のように媒精直後から精子のattachmentを強く阻害するものではなかった。この後、4A2と5H4について分析を進めた。sPZPは二次元電気泳動で4つの主要構成糖蛋白質群（ZP1, ZP2, ZP3, ZP4）に分離される。Western blotでは4A2は必ずしも蛋白質染色のパターンと一致しないが、ZP1, ZP2, ZP3, ZP4（23Kd）を含む広い領域と反応し、免疫原として用いたZP4（23Kd）との反応性は強くなかった。5H4はZP4に最も強く反応しZP1とも反応した。この結果から各分子群間には共通エピトープが存在することが分かった。

TFMS処理によっても糖蛋白質から糖を完全に除去することは困難で、アスパラギンに結合している糖G1cNAcは残ることが指摘されている。⁴⁾ 実際Phenol-硫酸法で測定すると、処理前の1.4%の糖が検出された。そこでTFMS処理後、更にN-glycanaseを処理し抗原活性の低下があるかどうかdot assayにより調べた。4A2、5H4いずれも反応性は処理前後において変化しなかった。またsPZPを蛋白質分解酵素で処理してその活性の変化を調べたところ、4A2の反応はtrypsin処理によって著しく低下したが、Chymotrypsin処理によっては変化しなかった。一方、5H4の反応性はtrypsinよりもchymotrypsinに感受性であった。

[考察] 5つのMabのうち3つにおいて精子結合阻害が観察されたが、その作用機序は、精子-ZP認識反応を直接障害するものではないと考えられた。即ち、多種多様な抗体を含むsPZP抗体の場合にはヒトZP上の精子認識部位に構造変化を起こし、attachmentを阻害することが可能であるが、ブタ、ヒト種間共通抗原に対するMabや特定の成分(23Kd)に対する抗体では、種属特異的と考えられるZP上の精子認識分子を阻害することは出来ないのかもしれない。これらの弱い阻害は、精子-ZP認識反応の後に続いて起こるacrosome reactionの誘起や、精子とZPとの固い結合を阻害するのではないかと考えられる。今後5H4が認識するアミノ酸配列を23Kd分子の中から検索し、避妊ワクチンの開発に役立てたいと考えている。

表 Characterization of monoclonal antibodies to ZP4 (23Kd)

Mab	class	ELISA		Immunofluorescence			Inhibition of sperm binding
		subclass	sPZP	DGsZPZ	pig	human	
2A1	IgM	+	+	+	+	+	-
2G3	IgG1	+	+	+	+	+	-
4A2	IgG1	+	+	+	+	+	+
4E12	IgG1	+	+	+	+	+	+
5H4	IgG2b	+	+	+	+	-	+

文献

1. Henderson, C.J., Braude, P. and Aitken, J.A. (1987) Polyclonal antibodies to 32-KDA deglycosylated polypeptide from porcine zona pellucidae will prevent human gamete interaction in vitro. Gamete Res. 18:251-265
2. Sacco, A.G. (1987) Zona pellucida: Current status as a candidate to antigen for contraceptive vaccine development. Am. J. Reprod. Immunol. and Microbiol. 15:122-130
3. Hasegawa, A., Koyama, K. and Isojima, S. (1988) Influence of antiserum raised to the common antigen (23Kd) in porcine and human zona pellucida on in vitro fertilization system in humans. J. Mamm. Ova. Res. 5: 68-69
4. Edge, A.S.B., Faltynek, C.R., Hof, L., Reichert, L. E. Jr. and Weber, P. (1981) Deglycosylation of glycoprotein by trifluoromethanesulfonic acid. Anal. Biochem. 118:131-137

マウス初期胚に及ぼす添加血清の影響

Effects of serum on the development of early mouse embryos

山元慎一・竹内一浩・福元清吾・堂地勉・森明人・永田行博

Shinichi YAMAMOTO, Kazuhiro TAKEUCHI, Seigo FUKUMOTO,

Tutomu DOUCHI, Akito MORI, Yukihiko NAGATA

鹿児島大学医学部産科婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine,

Kagoshima University

〔緒言〕体外受精・胚移植は現在多数の施設で行われているが、その成績は必ずしも良好ではない。妊娠率を向上させるために培養条件・培養液組成についても、数多くの報告がみられる。今回培養液内の添加血清の効果及び血清中のホルモンの影響をマウス2細胞期胚を用いて検討した。

〔材料と方法〕8~12週齢F₁(C₃H×C₅7BL)雌マウスにPMS 5単位, hCG 5単位を腹腔内投与して過排卵処理を行いICR系雄マウスと交配した。2細胞期胚は、卵管を培養液で灌流し採取した。培養液は、①HTF(Quinn et al, control)②HTF+10%NCS(Newborn calf serum, GIBCO)③HTF+10%CS(human cord serum)④HTF+10%HS(human serum, spontaneous cycle)⑤HTF+10%HS(IVF-ET patient's serum, superovulation cycle)の5種とし、①~⑤の培養液の浸透圧・pH・Na・K・Clを測定し、添加血清中のprogesterone, E₁, E₂, E₃値をRIAにて測定した。2細胞期胚は5%CO₂・5%O₂・90%N₂・37.0°C下に培養し経時に形態学的観察をおこなった。

〔結果〕1)①~⑤の培養液の浸透圧・pH・Na・K・Clは、添加血清の有無・種類にかかわらず変化を認めなかった。2)5種類の培養液にて培養した2細胞期胚の72時間及び96時間後のblastocystへの発育率を示した(Table 1)。96時間後のtotal blastocystへの発育率はcontrol(83.3%)と比較すると、NCS添加群(87.0%), 正常周期血清添加群(80.5%), 脍帯血清添加群(61.8%)で有意差はなかったが、hMG-hCGで過排卵したIVF-ET患者血清添加群では、有意に発育低下がみられた。3)96時間後のhatching率をみると、control群はhatchingが全くみられず(0.0%), NCS添加群 66.7%, HS(正常周期)添加群 58.5%, CS添加群 26.5%であった。4)それぞれの血清のホルモン値を示した(Table 2)。プロゲステロン値はNCS 0.1 ng/ml, CS400<ng/ml, HS(正常周期) 2.5 ± 4.0 ng/ml(n=8)であった。E₂値はCSが高値で(20290.0 pg/ml), HSは152.0 ± 217.4 pg/mlであり, E₁値はCSが高く(190 ± 47 pg/ml), E₃値はCSのみが検出(796560 pg/ml)

された。IVF-ET症例は2例で、採卵前、後それぞれ測定したが、プロゲステロン値が著明に上昇した。

Table 1. Development of Two-Cell Mouse Embryos in Culture Medium with Different Serum

Culture Medium	No. of 2-Cell Embryos Cultured	Blastocysts after 72hours of Culture				Blastocysts after 96hours of Culture			
		Non Hatched		Hatched		Non Hatched		Hatched	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
① HTF (control)	30	22	73.3	0	0	25	83.3	0	0
② HTF + 10% NCS	54	44	81.5	3	5.6	11	20.4	36	66.7
③ HTF + 10% CS	34	19	55.9	1	2.9	12	35.3	9	26.5
④ HTF + 10% HS (spontaneous)	41	32	78.0	2	4.9	9	22.0	24	58.5
⑤ HTF + 10% HS (IVF-ET)	53	5	9.4	0	0	5	9.4	0	0
								5	9.4

^a, ^b versus ^a P<0.001, ^c versus ^a P<0.01, ^d versus ^a P<0.001

[考察] 培養液内の添加蛋白の可否については様々な報告

があり^{2) 3)}、統一した結論をみていない。以前我々は比較的高K濃度の培養液のほうが受精卵発育が良いことを報告した。今回K濃度5.06mMのHTF¹⁾を用い、添加血清の影響を検討した。マウス受精卵を用いた諸家の報告にも多く見られる様に、blastocystへの発育率をみると、controlと比較して添加血清の有無にかかわらず発育率に差異は認め

なかった。しかし、hatching率をみると、血清無添加群ではhatchingを認めなかった。高木ら⁴⁾も報告しているように、blastocyst以降の発生に蛋白などの何らかの因子が関与していることが推察される。ところが、体外受精患者血清を用いた培養液では、morulaまでは発育をしたが、blastocystへの発育率が著明に低かった。今回血清を検討した体外受精患者2例は、共に胚移植時2~4細胞期胚を移植している。したがって、誘発周期の患者血清には、2~4細胞期以降の胚に対する何らかのtoxic factorが含まれている可能がある。誘発周期では、特にプロゲステロン、エストラジオール値が著明な変動をするが、NCSに比較してやや低い発育率を示したCSは、誘発周期の患者血清よりも高プロゲステロン、高エストラジオール値である。従って、受精卵培養による発育においてP·Eはあまり関与しないことが予想される。もちろん、着床の点から考えるとP·Eの値は全く関与しないとは断定できないが、誘発周期の血清がなぜ良くないか、今後詳細な検討が必要と思われる。

- [文献] 1) Quinn P, Kerin JF, : Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 44:493, 1985
 2) Menezo Y, Testart J: Serum is not necessary in human in vitro fertilization, early embryo culture, and transfer. *Fertil Steril* 42:750, 1984
 3) Edwards RG, Purdy JM, Steptoe PC, Walters DE: The growth of human preimplantation embryos in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 141:408, 1981
 4) 高木優二, 他: BSA無添加培地におけるマウス胚の培養および移植試験. *哺乳卵研誌* 5(1)41, 1988

Table 2. Comparison of the Steroid Hormone Levels in different sera

Serum	Progesterone (ng/ml)	E ₂	E ₁ (pg/ml)	E ₃
① NCS	0.1	7.8	<15.0	<5.0
② CS	400 ^a	20290.0	80000.0 ^a	796560
③ HS (spontaneous) n=8	2.5 ± 4.0	152 ± 217	190 ± 47	<5.0
④ HS (IVF-ET) a) n=4	0.8 67.0	1855.0 611.6	<5.0 <5.0	<5.0
b)	1.1 58.0	887.0 598.8	1114.0 633.1	<5.0

透明帯異常による受精障害

Fertilization failure associated with zona pellucida abnormality in human IVF program

淡路英雄・小林善宗・本田育子・津田朋男・松山毅彦・
松井素子・井上正人・藤井明和

Hideo AWAJI, Yoshimune KOBAYASHI, Ikuko HONDA, Tomohiro TSUDA, Motoko MATSUI, Masato INOUE, Akikazu FUJII

東海大学医学部産婦人科学教室
Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine,
Tokai University

緒言：体外受精－胚移植 IVF－ET は今や不妊症の主要な治療法の 1 つであり、卵管性不妊のみならず、原因不明不妊や男性不妊などにも広く用いられている¹。ヒトの IVF はかなり効率がよく、成熟卵子の約 90% は受精する。したがって男性不妊の症例を除けば IVF で受精障害を起こすことはまれである。

今回、我々は透明帯の異常によると思われる受精障害の 1 例を経験したので報告する。

症例：患者は 36 才の主婦、初経 12 才、月経は整、結婚 33 才、昭和 60 年 12 月 2 日原発性不妊を訴えて当科を受診した。不妊症一般検査では異常なく、ZSPt は 100% (40/40)、精子不動化抗体はともに陰性であった。腹腔鏡検査で子宮内膜症 stage I (r-AFS) と診断、電気焼灼を行った。同時に施行した腹水中精子回収試験は正常であった。術後 6 カ月間経過観察し、その後 AIH 7 回行うも妊娠しないため、IVF－ET (ETR) の適応とした。

1回目のIVF (昭和 62 年 6 月 4 日) : clomid (100 mg) - HMG (150 IU) で superovulation を行った。月経 13 日目、血中 E₂ 1680 pg/ml、超音波で 18 mm 以上の卵胞 5 個を確認し、HCG 10000 IU 筋注、36 時間後に腹腔鏡下に採卵した²。卵胞液は平均 4.0 ml (2 ~ 7.2 ml) で成熟卵子 7 個を採取した。精液は採卵の 2 時間前にとり、swim up 法にて運動精子を回収した。精子自動分析装置 (CASA) による精子運動能の検索では、Velocity 60.25 microns/sec., Linearity 7.37 で、いずれも正常であった。5 時間前培養した卵子に精子 ($1 \times 10^5 / ml$) を加えてさらに培養し、14 時間後に受精の有無を判定した。結果は 7 個の卵子はすべて非受精卵で、透明帯は図 1 のような異常、すなわち表面が毛羽立った状態を示した。

2回目のIVF (昭和 63 年 2 月 3 日) : 前回と同様、clomid - HMG (日研) で superovulation を行い、経腔的に採卵した。6 個の卵胞から 4 個の卵子を採取したが、成熟卵子は 2 個であった。卵子は 5.5 時間前培養してから媒精し、17 時間後に観察した。swim up 精子の運動能は Velocity 50 microns/sec., Linearity 5.49 であった。結果は 4 個の卵子は非受精卵で、うち 2 個は変性過程にあった。透明帯表面はすべて前回同様の所見を呈し、走査電子顕微鏡による観察では図 2 のような異常が確認された³。夫婦の染色体検査はいずれも正常であった。

3回目のIVF (昭和 63 年 10 月 22 日) : GnRHa - HMG で superovulation を行い、スプレキュア (600 µg)

/日) は月経 1 日目より、HMG (300 IU) は 3 日目より投与した。月経 11 日目 E₂ 5765 pg / ml, 超音波上多数の発育卵胞を認め、HCG 10000 IU 注射、36 時間後に経腔的に採卵した。16 個の成熟卵子のうち 14 個は 0.1% hyaluronidase で顆粒膜細胞を除去してから 5 時間前培養した。裸化卵子はすべて第 1 極体を有し、透明帯は前 2 回と同様の異常所見を示した。swim up 精子の Velocity, Linearity はそれぞれ 68.87 microns/sec., 6.25 であった。媒精後 17 時間の観察で、4 個 (25%) が受精していた。hyaluronidase 处理卵子の一部に透明帯の膨化が認められた。受精卵は媒精後 24 時間で移植したが、妊娠には至らなかった。

4回目のIVF (平成元年 1月18日) : 3回目と同様 GnRH-a - HMG で superovulation を行い、経腔的に 11 個の成熟卵子を採取した。swim up 精子の Velocity, Linearity はそれぞれ 70.71 microns/sec., 6.71 であった。媒精後 16 時間の観察では 2 個 (18.2%) 受精していたが、透明帯表面はすべて毛羽立っていた。受精卵は前核期で移植したが、着床はしなかった。

考察: 卵子側の要因による受精障害は非常に少なく、今回のようなケースは我々の知る限りまだ報告がない。本症例は ZSPT 100% で、ASA による精子運動能も正常であり、精子の受精能力には問題ないと思われる。したがって受精障害は透明帯の異常によるものと考えるのが順当であろう。hyaluronidase 处理により、一部の透明帯が膨化したことからも、構造的異常のあることが推測される。走査電顕でみると、異常な透明帯も、場所によって正常に近い所が認められた (図 2)。また光顕レベルの観察では、卵子によって透明帯の “毛羽立ち” に多少の差が認められた。多数の卵子が採取された 3 回目、4 回目の IVF で低率ながら受精が成立したのは、卵子によって透明帯の異常の程度や範囲が異なるためではないかと思われる。

文献:

- 1) 井上正人, 他 (1988) : IVF, GIFT の現状と問題点, 日産婦誌, 40:101
- 2) 井上正人, 他 (1985) : 体外受精プログラムの実際, 臨婦産, 39: 764
- 3) 井上正人, 他 (1985) : 体外受精における非受精卵の走査電子顕微鏡による観察,

哺乳卵研誌 2: 157

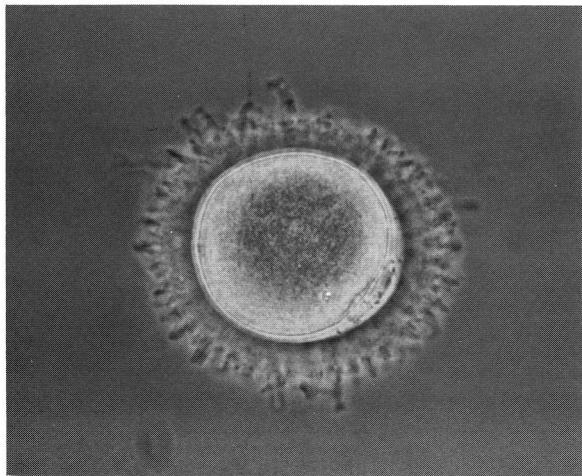


図 1. 非受精卵, 透明帯表面が毛羽立っている。

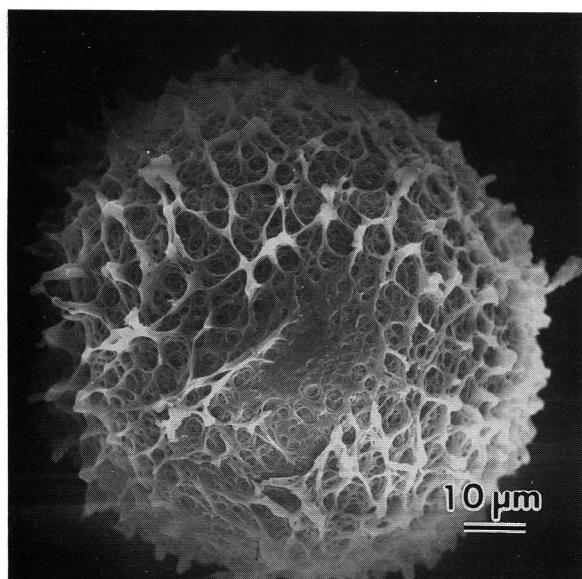


図 2. 非受精卵の走査電顕像

マウス卵子の体外受精における卵丘細胞層の 役割の再評価

Evaluation of the role of cumulus cells in
fertilization of mouse eggs in vitro

板垣佳明・東 貞宏・R. B. ABDULLAH・豊田 裕

Yoshiaki ITAGAKI, Sadahiro AZUMA,
R.B. ABDULLAH, Yutaka TOYODA

東京大学医科学研究所 獣医学研究部

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

目的：マウス卵子の体外受精は方法論的にはほぼ確立されており、精巣上体精子と排卵後の卵丘細胞層に包まれた卵子（以下、正常卵子）の体外受精では安定した高い受精成績を得ることができる¹⁾。しかしながら、卵丘細胞層を除いた裸化卵子の体外受精では、一般に正常卵子の受精成績よりも低く、変動も大きいことが知られている²⁾。しかし、卵丘細胞層は精子侵入に必須のものではないと考えられているために、その役割に関する詳細な検討は行われていない。そこで本実験では、今後未受精卵の顕微操作や凍結保存などの研究に必要と考えられる裸化卵子の体外受精についてより安定した受精成績を得ることを目的として、受精の場の環境を変えて体外受精を試み、その効果について検討した。

方法：卵子提供雌には ICR および B6CF₁、精子提供雄には ICR のそれぞれ成熟マウスを用いた。卵子は PM SG および hCG 各 5 iu を 48 時間間隔で投与した雌の卵管から hCG 投与後 15~16 時間に採取した。卵丘細胞層に包まれた卵子は 150 単位/ml ヒアルロニダーゼ (Sigma, type IV-S, cat No. H-3884) で卵丘細胞を除去した。精子の前培養用には TYH を、受精用には TYH および TYH に 25 mM 乳酸ナトリウムを添加しこれに相当する量の NaCl を減じて浸透圧を調節した培地 (mTYH) を用いた（実験 1）。次に、精子を 1 時間 TYH で前培養後、正常卵子を含む TYH に添加し、その 1 時間後に卵子（少量の精子および卵丘細胞を含む）を新しい別の TYH に移し換え、精子と卵丘細胞が残った TYH に新たに裸化卵子を導入し受精させた³⁾（実験 2）。体外受精は常法により行い¹⁾、受精の判定は精子添加後 6 時間以降にホールマウント標本を作製し、ノマルスキー微分干渉顕微鏡を用いて雌雄前核および受精精子の尾部の有無により行った。統計処理は χ^2 -検定を用いた。

結果：（実験 1） TYH に乳酸ナトリウムを添加した培地 (mTYH) での裸化卵子の体外受精では ICR で 72.5 % (40.0~90.3 %), B6CF₁ で 77.3 % (61.9~94.7 %) が受精した。一方、同じ前培養精子を用いて TYH のみで受精させた場合には ICR で 57.8 % (25.0~81.3 %), B6CF₁ で 68.3 % (42.1~89.2 %) であり、いずれも乳酸ナトリウムの添加により実験ごとの変動幅は小さくなり、若干の受精率の向上がみられたが、統計学的に有意な差は認められなかった (P > 0.01)。

(実験2)精子を TYH で1時間前培養後正常卵子と受精させ、その1時間後に別の TYH に移し換えた実験区では ICR, B6CF₁ ともに高い安定した受精率が得られた [ICR: 97.4% (95.1~100%), B6CF₁: 94.2% (87.1~98.8%)]。一方、裸化卵子については ICR では卵丘細胞と精子を1時間前培養後裸化卵子を導入した区で 63.4% (55.4~100%), TYHのみで受精させた区で 55.6% (46.3~81.3%) であり、正常卵子と較べていずれも受精率は有意に低下した ($P < 0.01$)。

しかしながら、B6CF₁ では同様の処理で 83.8% (56.5~96.8%) が受精し、TYH のみの 62.6% (13.6~80.0%) よりも有意に高くなつたが ($P < 0.01$)、正常卵子との受精率には及ばなかつた ($P > 0.01$)。

考察：卵丘細胞が精子の受精能獲得および先体反応を含む受精現象に重要な役割を果たすことを示唆する報告は多いが^{2,4)}、裸化卵子のみの体外受精は可能であり、卵丘細胞の受精に対する明確な役割については明らかでない。また、卵子の裸化処理に伴うヒアルロニダーゼを含む種々の酵素により透明帯自体の変化も示唆されており、問題をより複雑にしている。本実験では正常卵子での体外受精で高率かつ安定した成績の得られる TYH に乳酸ナトリウムを添加することにより裸化卵子の受精率の改善を試みたが、受精の場の精子は活発な運動性を示したにもかかわらず、乳酸ナトリウムの添加だけでは卵丘細胞の効果を明確にできなかつた。また、Gwatkin ら³⁾の方法に準じて、卵丘細胞を含む TYH での裸化卵子の体外受精では、B6CF₁において TYH のみの受精率よりも高くなり、卵丘細胞の受精に対する効果が認められたが、ICR ではこれらの効果は明確ではなかつた。以上のように本実験では裸化処理に用いた雌の系統による差が示唆されたが、卵丘細胞層の役割については今後、卵子の裸化処理に伴う透明帯の変化などの卵子側の要因、受精能獲得の機序解明を含む精子側の要因および卵丘細胞層による卵子および受精精子の動きの制限などの物理的要因などを含めたより精緻な検索が必要であると考えられる。

文献

- 1) 豊田 裕、横山峯介、星冬四郎：マウス卵子の体外受精に関する研究. I. 精巢上体精子による受精成績. 家畜繁殖誌. 1971;16:147-151.
- 2) Yanagimachi, R.: Mechanisms of fertilization in mammals. In Mastroianni, L. and Biggers, J.D. eds.: "Fertilization and Embryonic development in vitro." New York, Plenum Press. 1981; 81-182.
- 3) Gwatkin, R.B.L., Andersen, O.F. and Williams, D.T.: Capacitation of mouse spermatozoa in vitro: Involvement of epididymal secretions and cumulus oophorus. J. Reprod. Fert. 1974; 41: 253-256.
- 4) Rogers, B.J.: Mammalian sperm capacitation and fertilization in vitro: A critique of methodology. Gamete Res. 1978; 1: 165-223.

Table 1 In vitro fertilization of cumulus free mouse eggs in the presence or absence of Na-lactate in basic medium(TYH)

Strain	Na-lactate	No. of eggs examined	No. of eggs fertilized(%)
ICR	(-)	64	37(57.8)
	(+)	69	50(72.5)
B6CF ₁	(-)	161	110(68.3)
	(+)	163	126(77.3)

Table 2 In vitro fertilization of cumulus free mouse eggs in the presence or absence of cumulus cells in basic medium(TYH)

Strain	Eggs	Cumulus cells	No. of eggs examined	No. of eggs fertilized(%)
ICR	Cumulus free	(-)	108	60 ^a (55.6)
		(+)	101	64 ^a (63.4)
B6CF ₁	Cumulus free	(-)	99	62 ^a (62.6)
		(+)	99	83 ^b (83.8)
Control*			206	194 ^c (94.2)

*Eggs with cumulus cells were transferred to fresh medium at 1hr after insemination.

Values with different superscripts are significantly different at $P < 0.01$.

外来ベースの体外受精の成績

Results of IVF-ET on outpatient bases

小林善宗・本田育子・津田朋男・松山毅彦・

淡路英雄・松井素子・井上正人・藤井明和

Yoshimune KOBAYASHI, Ikuko HONDA,
Tomoo TSUDA, Takehiko MATSUYAMA,
Hideo AWAJII, Motoko MATSUI,
Masato INOUE, Akikazu FUJII

東海大学医学部産科婦人科学教室

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

目的：安全・確実・簡便性にすぐれた超音波ガイド採卵法を用いて、IVF-ETを外来ベースで行うことが十分可能となった。我々は本邦初の試みである外来IVF-ETを開始したので、その成績を検討した。

方法：外来IVF-ET 155回(142名)、入院IVF-ET(超音波採卵)104回(75名)を対象とした。両群間の平均年令、平均不妊期間に差はなかった(表1)。外来IVF-ETは8AMより採卵を開始し、1時間に3件のペースで1日最大5件の超音波経腔採卵(静麻又は局麻下)を外来にて行い、約6時間の観察で患者を帰宅させた。翌日又は2日後の0PMより外来にて経腹超音波観察下に胚移植を行い、4時間の骨盤高位安静後帰宅させた。IVFの方法は従来のとおりである。

結果：外来IVF-ETの成績は対周期妊娠率25.2%で、従来の入院IVF-ETの妊娠率24.0%と差はなかった(表2)。刺激法別の成績でも両群間に大きな差はなく、hMG刺激の成績が良好であったが、最近開始したGn-RHagonist使用によるhMG刺激でも24%の妊娠率が得られた(表3)。採卵成熟卵子数は、外来IVF-ETで平均5.7と入院IVF-ETの約2倍であるが、刺激法が異なるため単純に比較できない。正常受精卵、正常分割胚の比率には両群間に差はなかった(表4)。移植法別成績では、前核期移植で十分な妊娠率が得られたが、これも両群間に差はなかった(表5)。適応別の成績では、

は、外来IVF-ETで子宮内膜症と原因不明不妊で高い妊娠率が得られた。入院IVF-ETではほぼ全例が卵管閉塞の絶対適応症例であったため、単純な比較はできないものの、卵管疋通性を有する難治性子宮内膜症や原因不明不妊に対してIVF-ETが有効であることがわかった

IVF-ETの手順

	外来IVF-ET	入院IVF-ET
入院日数	0日	3~6日
hCG注射時間	8PM(-day 2)	3AM(-day 1)
採卵時間	8AM~9AM	3PM~4PM
精液採取時間	11PM	6PM
移植時間	0PM~1PM(day 1~2)	4PM~5PM (day 1~2)
骨盤高位安静	4時間	12時間

(表6)。妊娠例の予後をみると、流産率、多胎妊娠率とも両群間に差はなく、ともに許容範囲内であった。外来IVF-ETで7.7%の子宮外妊娠が発生したが、いずれも卵管疎通性のある症例であった(表7)。

考察：IVF-ETにおける最大の進歩の1つは採卵法の簡便化である。とくに最近の経腔採卵法は、場合により無麻酔でも穿刺可能であり、その簡便性からわが国でも一般化された。IVF-ETを外来ベースで安全に行えるのも、この経腔採卵法の開発にほかならない。外来IVF-ETの成績は従来の入院IVF-ETに比べて、まったく差はなかった。外来IVF-ETの適応に、卵管疎通性の認められる難治性不妊があるが、これは主に、GIFT¹⁾あるいはIVF-ETR^{2) 3)}の不成功例である。そのIVF-ETの成績で、とくに子宮内膜症や原因不明不妊ではかなり良好な成績が得られた。GIFT・IVF-ETR不成功例では、見かけでは判明しない卵管内環境の異常にその不妊原因があるのかもしれない。IVF-ETの成績の向上につながるもう1つの問題は、培養と移植時期である。前核期移植で分割胚移植とかわらない妊娠率が得られたことの意義は大きい。子宮内環境が受精卵の分割にとって現状の *in vitro* の培養より適したものならば、培養続行による受精卵の正常性 viability が損われないうちに移植してしまうのはとりあえず1つの解決策といえよう。ジョーンズ研究所(東バージニア医大)における1987年度のIVF-ETの成績では、573回のETにて妊娠169(29.5%)とのことであるが、我々の外来IVF-ETのペースでいけば、年間310回のETで78妊娠が可能である。2年遅れながら、臨床ベースでようやく世界のレベルが見えてきたといえよう。

文献：(1)小林善宗、本田育子、井上正人、金子みつ恵、藤井明和：配偶子卵管内移植の成績、哺乳卵研誌 3: 52, 1986. (2)小林善宗、本田育子、淡路英雄、松山毅彦、宮川和子、井上正人、藤井明和：体外受精卵卵管内移植の試み、哺乳卵研誌 4: 67, 1987. (3)小林善宗、本田育子、井上正人、淡路英雄、松山毅彦、津田朋男、藤井明和：体外受精卵卵管内移植の成績、哺乳卵研誌 5: 64, 1988.

	外来IVF-ET	入院IVF-ET
(1) 対象		
期間	S63.6～S63.12	S60.12～S63.5
患者数(回数)	142名(155回)	75名(104回)
原発性不妊	71名	30名
続発性不妊	71名	45名
平均年令	33.6才(25～42才)	33.3才(26～42才)
平均不妊期間	8.6年(7～17年)	8.4年(2～16年)
(2) 成績		
妊娠	39名	25名
対患者妊娠率	27.5%(39/142)	33.3%(25/75)
原発性不妊	29.6%(21/71)	36.7%(11/30)
続発性不妊	25.4%(18/71)	31.1%(14/45)
対周期妊娠率	25.2%(39/155)	24.0%(25/104)
(3) 刺激法別妊娠率(対周期)		
clomiphene-hCG	(0)	18.2%(8/44)
clomiphene-hMG-hCG	250%(4/16)	25.6%(10/39)
hMG-hCG	40.0%(4/10)	33.3%(7/21)
GnRHa-hMG-hCG	24.0%(31/129)	(0)
(4) 受精		
採取成熟卵子数	平均5.7	平均2.4
正常受精卵数	平均4.3	平均2.0
正常胚	平均2.5	平均1.3
(5) 移植法別妊娠率(対周期)		
前核期移植	28.6%(20/70)	28.6%(4/14)
分割胚移植	22.6%(19/84)	23.3%(21/90)
前核期、分割胚	0%(0/1)	(0)
(6) 適応別妊娠率(対周期)		
卵管性不妊	16.5%(14/85)	24.0%(24/100)
(うち絶対適応)	16.9%(11/65)	23.5%(23/98)
子宮内膜症	37.5%(18/48)	25.0%(1/4)
卵管内精子輸送障害	16.7%(1/6)	(0)
原因不明不妊	37.5%(6/16)	(0)
(7) 妊娠例の予後		
継続(胎児発育)	27名(69.2%)	21名(84.0%)
流産	8名(20.5%)	4名(16.0%)
子宮外妊娠	3名(7.7%)	0名
多胎妊娠	10名(25.6%)	6名(24.0%)

体外および体内受精由来マウス胚の着床率の比較

A comparison between implantation rate of mouse embryos
derived from in vitro and in vivo fertilization

* 森 匡・清水 弘・北嶋 朋子・一戸 喜兵衛 *

Tadashi MORI, Hiroshi SHIMIZU, Tomoko KITAJIMA, Kihyoe ICHINOE

北海道大学農学部畜産学科

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Hokkaido University

* 手稲一渓仁会病院 テイネ生殖研究室

Teine Reproduction Laboratory, Teine-Keijinkai Hospital, Sapporo, Japan

目的：体外受精胚の子宮内移植とともに配偶子卵管内移植や体外受精胚卵管内移植が不妊の治療に所期の目的をあげつつある。今回かかる治療法を基礎観察するため、マウスで配偶子卵管内移植（GIFT）や体外受精胚・卵管内移植（IVF-EIFT）について観察を行っているのでその成績を報告する。

方法：使用したマウスは ICR 系成熟マウス（60～80日齢）である。過排卵処理のため、供卵マウスに PMS 10IU、その後48時間後に hCG 10IUをそれぞれ腹腔内に投与した。採卵は hCG 投与の13～14時間後に、0.1%ヒアルロニダーゼを含む PBI 中で摘出卵管より行い、卵より卵丘細胞を除去しつつ PBI で数回洗浄してパラフィンオイル下の媒精用ドロップ（100μl）中に移した。一方またこのドロップに、精巣上体尾部より採取した精子を1～2時間前培養して活性化させたあと精子の浮遊液20μlを加えて媒精した。媒精時の精子濃度は $0.7 \sim 3.0 \times 10^6 / \text{ml}$ で、培養器内（37°C, 90%N₂, 5%O₂, 5%CO₂）で5～6時間の媒精のあと、卵を新しい培養液ドロップに移して、さらに培養を続けた。精子の浮遊液や、媒精液および受精卵培養液には0.3% BSA を加えた HTF を用いた。体外受精卵は媒精後27時間以内にほとんどが2細胞期胚となるが、IVF-EIFT にはこれを偽妊娠1日目に一側卵管あて4～8個を移植した。着床数と胎仔数は移植後14日目に開腹して調べ、また分娩日に新生仔数を調べた。また、体外受精による2細胞期胚の子宮内移植と IVF-EIFT の妊娠率を比較するため、偽妊娠1日目の受容マウスの片側子宮角と他側卵管に同時に胚移植して着床数、胎仔発生数、新生仔数を調べた。GIFT では上記処理で卵丘細胞を除去した卵6～8個と、精子浮遊液 0.04～0.08μl（精子数140～1200）を偽妊娠1日目の受容マウス卵管に移植した。着床数と胎仔発生数は、移植14日目に、また新生仔数は分娩日に調べた。一方また同様の GIFT のあと24時間目に卵管より卵を回収し、GIFT での卵管内2細胞期胚発生率（2細胞期卵数／全卵数）を算定した。

結果：

- (1) 体外受精での2細胞期胚発生率は72.2% (390/540) であった。
- (2) これら2細胞期胚 123個を9匹の受容雌の両側卵管に移植した結果、すべてのマウスが妊娠し、その着床率、胎仔発生率および新生仔率はそれぞれ86.2% (106/123)、62.6% (77/123)、59.3% (73/123) であった。
- (3) 受容マウス14匹に IVF-EIFT と子宮内胚移植を同時に行なった結果、11匹が妊娠（妊娠率78.6%）したが、この妊娠はすべて IVF-EIFT によるものであった。その着床率と胎仔発生率、また新生仔率はそれぞれ77.5% (62/80)、71.3% (57/80)、63.8% (51/80) であった。このため IVF-EIFT の(2)、(3)における2細胞期胚の総計203個の着床率、胎仔発生率、新生仔率は68.5%、65.7%、61.1%であった。一方子宮内に移植された2細胞期胚90個を移植24時間後に回収を試みたが胚形態を認めがたく、14日目も着床痕は認められなかった。
- (4) GIFT のあと24時間目の2細胞期胚発生率をみるため卵管から卵を回収したマウス11匹において、2細胞期胚の発生を認めたのは10匹 (90.9%) であったが、2細胞期胚の発生率は54.4% (98/180) に止まった。これは体外受精における胚発生率に比して低値であった ($P < 0.01$)。
- (5) また150個の卵を GIFT で10匹の受容マウスに移植したが、5匹が妊娠し、着床率、胎仔発生率および新生仔率はそれぞれ51.2% (43/84)、46.4% (39/84)、45.2% (38/84) であった。このように GIFT の着床率、胎仔発生率、新生仔率は IVF-EIFT の対応するそれぞれの値に比べて明かに低かったが、それぞれの率の差はすべて卵管内受精と体外受精での2細胞期胚発生率の差に由来することがわかった。

考察：ヒト IVF-ET では2細胞期胚の子宮内移植でも成功しているが、マウスでは偽妊娠1日目の子宮内に移植された2細胞期胚は着床をみなかった。このことから初期胚の発生に卵管の重要な役割が示唆されるとともに、2細胞期胚にとって偽妊娠初期の子宮内環境は、発生上不適であると考えられた。

また胚発生以後に卵管を介して子宮に着床した場合は、着床率、胎仔発生率、新生仔率の推移は胚発生が *in vitro* でも *in vivo* でも全く差異をみとめないことが指摘できた。なおまた *in vitro* での受精よりも GIFT での胚発生率が低かったが、その原因については向後追求する。

文献：

- 1) Toyoda, Y., Yokoyama, M. and Hosi, T.: Studies on the fertilization of mouse eggs *in vitro*. I. *In vitro* fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. *Jap J Anim Reprod* 16:147, 1971
- 2) Quinn, P., Kerin, J. F. Warnes, G. M.: Improved pregnancy rate *in vitro* fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 44:493, 1985

Superoxide Dismutaseによるマウス2-Cellブロック解除の機構について

Mechanisms of the effect of superoxide dismutase on 2-cell block releasing in mouse embryo in vitro.

松本 央・野田洋一・馬岡 陽・辰巳賢一・岸 淳二・森 崇英

Hisashi MATSUMOTO, Yoichi NODA, Yoh UMAOKA,
Kenichi TATSUMI, Junji KISHI, Takahide MORI

京都大学医学部婦人科学産科学教室

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

【目的】 各種哺乳類の初期胚培養において stage specific な胚発生の停止^{1) - 3)} が知られており、マウスでは2-Cellブロックが成立する。近年、野田らは^{4) 5)}、Superoxide Dismutase(SOD)⁶⁾によりマウス2-Cellブロックが解除されることを、初めて報告した。この解除の機構を知る目的で、ヒト赤血球由来銅・亜鉛型 r-hSOD の金属置換体及びアポ体を作成し、マウス初期胚培養系に添加して、その胚発生に及ぼす影響を検討した。

【方法】 培養に供した胚は、ICR幼若雌マウスに過排卵処置を行い、同系雄マウスと交配、翌朝膣栓の認められた雌マウスよりHCG投与18時間後に回収した前核期胚(写真1)で、0.3% BSA添加BWW mediumを基本培養液とし、37°C、5% CO₂ in air、の気相にて培養し、24時間毎に分割状態を観察した。2-Cellブロックの解除効果は、胚の形態及び胚盤胞(写真2)までの分割率で判定した。r-hSODの金属置換体およびアポ体の作成は、Weserらの方法⁷⁾に従った。

【結果】 基本培養条件のコントロール群では、胚盤胞率7.9%であったのに対し、Cu₂Zn₂のホロ体では51.6%，Cu₂X₂とCu₂Cu₂の金属置換体ではそれぞれ52.5%と49.3%，X₂X₂のアポ体では56.1%と有意に解除効果が認められた。また、ホロ体、金属置換体、アポ体の4種間には有意差は認めなかった。(表1)

【考察】 ホロ体及び金属置換体による2-Cellブロックの解除は、SODの酵素活性によると考えられるが、酵素活性に必須のCuイオンを持たないアポ体で2-Cellブロックの解除効果が認められたことは、この効果がSODの単なる酵素活性によるものばかりではない事を示している。おそらく銅・亜鉛の結合部位に、重金属が取り込まれることによる一種のキレート作用によるものか、あるいは細胞に取り込まれて一種のGrowth Factorとしての可能性が考えられるが、詳細については更なる検討を要する。本実験に際し、r-hSODを提供して頂いた日本化薬株式会社に深謝致します。また、本研究は昭和63年度文部省重点領域研究「生殖系列」によって助成された。

写真1

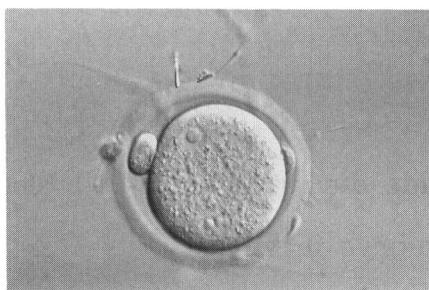


写真2

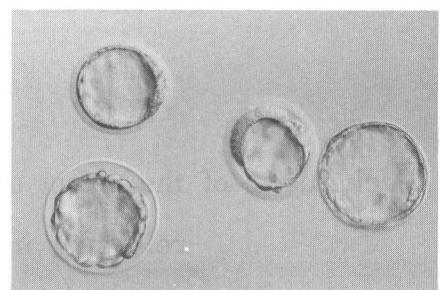


表1

Effect of SOD on Embryo^{a)} Development

Type of SOD	No. of experiment	No. of embryos employed	No. of embryos obtained		
			2-cell(%)	4-cell(%)	blastocyst (%)
Cu ₂ Zn ₂ ^{b)}	4	64	62(96.9)	57(89.1)	33(51.6)**
Cu ₂ X ₂ ^{c)}	4	61	60(98.4)	50(82.0)	32(52.5)**
Cu ₂ Cu ₂ ^{d)}	4	67	66(98.5)	55(82.1)	33(49.3)**
X ₂ X ₂ ^{e)}	4	66	64(97.0)	55(83.3)	37(56.1)**
control	4	63	61(96.8)	36(57.1)	5(7.9)

a) ICR ♀ × ICR ♂

** : χ^2 test $P < 0.01$

b) c) d) e) Apo enzyme of r-hSOD, 0.5mg/ml

【文献】

- 1) Biggers,J.D. et al: The culture of mouse embryos in vitro. In:Methods in Mammalian Embryology (Daniel,J.C.ed.), Freedman & Co., San Francisco, pp.86-116(1971)
- 2) Davis,D.L. et al: Cleavage and blastocyst formation by oig eggs in vitro. J.Anim.Sci. 46:1043-1053(1978)
- 3) Wright,R.J. et al: Aspects of in vitro fertilization and embryo culture in domestic animals. J.Anim.Sci. 53:702-728(1981)
- 4) 野田洋一, 松本 央, 森 崇英: Superoxide Dismutaseによるマウス 2-Cell ブロックの解除. 日産婦雑誌, 41巻臨時増刊:334(1989)
- 5) 野田洋一, 松本 央, 森 崇英: Superoxide Dismutaseによるマウス 2-Cell block の解除. 日産婦雑誌, 41巻6号, in press(1989)
- 6) McCord,J.M. and Fridovich,I.: Superoxide dismutase, an enzymic function for erythrocuprein. J.Biol.Chrm. 244:6049(1969)
- 7) Weser,U. & Hartmann,H.J.: FEBS Lett. 17:78-80(1971)

低酸素濃度培養系におけるマウス 2-cell

ブロック解除について

Release of 2-cell block phenomenon in mouse embryos
cultured under low oxygen tension.

馬岡 陽・野田洋一・松本 央・
岸 淳二・辰巳賢一・森 崇英

Yoh UMAOKA, Yoichi NODA, Hisashi MATSUMOTO,
Junji KISHI, Kenichi TATSUMI, Takahide MORI

京都大学医学部婦人科学産科学教室

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

目的：マウス 2-cell ブロックが superoxide dismutase (SOD)¹⁾ によって解除されることが、野田ら²⁾³⁾ によって初めて明らかにされた。この事実と以前から既に報告されている低酸素濃度下胚培養が高い胚盤胞率をあたえるという事実⁴⁾ から、2-cell ブロックが酸素毒性によってもたらされる可能性が示唆されている。広く哺乳類胚培養条件改良の見地から本研究ではマウス胚培養系を用いて低酸素濃度下及び SOD 添加の条件下における胚培養成績を形態及び胚盤胞率について検討した。

方法：TUCK 幼若雌マウスに過排卵処理 (PMSG 5 単位, hCG 5 単位, 48 時間間隔) を加えた後、同系雄マウスと交配させて hCG 投与 18 時間後に得た前核期胚を本実験に供した。

外気を遮断し混合ガス (5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂) を注入することにより、可及的に酸素濃度を 5% の条件に維持できる閉鎖系を infant incubator (ATOM 社) を改良して作製し、この装置内で胚の回収を行った。同混合ガスを連続的に注入した閉鎖系低酸素下培養 チェンバーに形態正常な前核期胚を移し、37°C, 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂ の気相下で 96 時間の培養を行った後に胚の発育を観察し、これを低酸素濃度培養群とした。なおコントロール群は同系の前核期胚を大気中で採卵し、37°C, 5% CO₂, in air の気相下で 96 時間培養した。また基本培養液である 0.3% BSA 添加 BWW 液に 0.5 mg/ml の SOD を加えて同様に低酸素濃度下及び大気中で採卵・培養を行い、それぞれを低酸素濃度下 SOD 群及び大気中 SOD 群とした。そして、各々の胚盤胞数を算定し胚盤胞率を χ^2 乗検定で、コントロール群と比較し 2-cell ブロックの解除効果を判定した。

結果：低酸素濃度培養群、大気中 SOD 群、低酸素濃度 SOD 群及びコントロール群の胚盤胞率は、それぞれ 28.4% (57/201), 31.0% (35/113), 75.2% (115/153), 1.3% (3/231) であった (表 1)。低酸素濃度群及び大気中 SOD 群の胚盤胞率は、コントロール群のそれに比較して有意に高値であり (P < 0.01), 両者とも 2-cell ブロックの解除効果が認められた。さらに低酸素濃度 SOD 群の胚盤胞率は他の三者のそれより著しく高値であり

(P<0.01), 低酸素とSODの相乗効果が認められた。

Table 1: The effect of a low oxygen tension gas phase and SOD^{a)} on the development of 1-cell embryos^{b)}

O ₂ concentration	SOD concentration	No. of embryos	No. of embryos obtained			
			2-cell (%)	4-cell (%)	8-cell (%)	Blastocyst (%)
20 %	0 mg/ml	231	209 (90.5)	80 (34.6)	16 (6.9)	3 (1.3)
	0.5 mg/ml	113	108 (95.6)	71 (62.8)	48 (42.5)	35 (31.0)**
5 % ^{c)}	0 mg/ml	201	175 (87.1)	128 (63.7)	90 (44.8)	57 (28.4)**
	0.5 mg/ml	153	148 (96.7)	140 (91.5)	137 (89.5)	115 (75.2)**

** : χ^2 test P<0.01

a) r-hSOD

b) TUCK ♀ × TUCK ♂

c) recovered and cultured in 5% O₂, 5% CO₂, 9% N₂

考察: 以上の結果から、胚の初期発生に酸素濃度が無視できぬ影響を及ぼしていることが明らかとなった。

現在までに、卵管液中の酸素分圧は大気中の酸素分圧の1/3程度である事⁵⁾が知られ、またin vitroで胚培養を行う場合に酸素分圧を5%に設定することによって高い胚盤胞率の得られる事実⁴⁾が報告されている。これらのこととSODが $2H^+ + 2O_2^- \rightarrow H_2O_2 + O_2$ という反応¹⁾を触媒すること等を考え合わせると、胚内部あるいは培養条件下で産生されるO₂⁻が細胞を障害しているのではないかと考える事ができる。マウス2-cellブロック成立機序の完全なる解明には更なる検討が必要であるが、より合理的な培養法を確立するためには、酸素毒性に対する配慮が必要であろうと考えられる。本実験に際し、r-hSODを提供して頂いた日本化薬株式会社に深謝致します。また、本研究は昭和63年度文部省重点領域研究「生殖系列」によって助成された。

文献:

- 1) McCord, J. M. and Fridovich, I: Superoxide dismutase, an enzymic function for erythrocuprein. J. Biol., Chem. 244: 6049 (1969)
- 2) 野田洋一, 松本 央, 森 崇英: Superoxide Dismutaseによるマウス2-cellブロックの解除, 日産婦雑誌, 41巻臨時増刊: 334, (1989)
- 3) 野田洋一, 松本 央, 森 崇英: Superoxide Dismutaseによるマウス2-cell blockの解除, 日産婦雑誌, 41巻6号, in press (1989)
- 4) Whitten, W.K.: Nutrient Requirements for the Culture of Preimplantation Embryos in Vitro. Advances in Biosciences 6: 129 (1970)
- 5) Mastroianni, L. Jr & Jones, R.: Oxgen Tension within the Rabbit Fallopian Tube., J. Reprod. Fertil. 9: 99 (1965)

マウス2細胞期胚割球の発生能におよぼす 透明帯、卵巣腔、および割球の形状の影響

The effects of zona pellucida, perivitelline space and cell size on
the development of single blastmeres of 2-cell mouse embryos

河野友宏・小川美代子・中原達夫

Tomohiro KONO, Miyoko OGAWA, Tatsuo NAKAHARA

東京農業大学総合研究所

NODAI Research Institute, Tokyo University of Agriculture.

目的：マウス2細胞期胚の分離割球(1/2胚)は、産子への発生能を十分に有していることが知られている。しかし、透明帯を除去された1/2胚では体外培養による胚盤胞への発生が低下するばかりでなく、移植により産子を得ることは困難とされていた^{1, 2)}。富樫ら(1987)³⁾は透明帯除去1/2胚から得られた胚盤胞を妊娠雌に移植して40%の産子を得たと報告している。そこで本実験では、マウス1/2胚の発生能と透明帯、卵巣腔、および割球の形状との関係を明らかにしようとした。

方 法：F1(C57BL/6jXCBA)の成熟雌にPMSGとhCG、5IUを48時間間隔で腹腔内注射し過排卵処理した後、同系統の雄と交配した。hCG注射後48時間目に屠殺しM2液を用いて卵管を灌流して2細胞期胚を回収した。マイクロマニュピレーションと電気細胞融合により4種類の1/2胚と4倍体胚とを作成し、その発生能を比較検討した。作成した操作胚は次の通りである。

- 1) 一核除去2細胞期胚(以下1/2+C胚)：透明帯の一部を切断した胚をサイトカラシンB(5μg/ml)とコルセミド(10μg/ml)を含むM2液に浸漬した後、片側割球核を除去した。
- 2) 一割球除去2細胞期胚(以下1/2ZP胚)：1)と同様に処理した後、片側割球を除去した。
- 3) 裸化1/2割球(以下1/2ZPF)：透明帯の一部を切断した胚を、Ca⁺⁺、Mg⁺⁺ Free M2液で処理した後、ピペッティングより割球を分離した。
- 4) 核除去割球融合2細胞期胚(以下1/2FC胚)：1)で作成した1/2+C胚を電気融合法により割球と細胞質を融合させた。
- 5) 割球融合4倍体胚(以下4N胚)：正常2細胞期胚を電気融合し4倍体胚とした。

作成胚は、M2液およびM16液でそれぞれ数回洗浄した後、37°Cで5%CO₂、5%O₂、90%N₂の気相条件下にあるM16液にて2日間培養し、胚盤胞への発生率を調べた。また、得られた胚盤胞は偽妊娠3日目のレシピエントの子宮に移植し産子への発生能を検討した。

結果：体外培養による胚盤胞への発生率は、1/2+C胚：97%(161/166)、1/2FC胚：96%(15/120)および4N胚：96%(97/107)では極めて高く対照区(99%, 371/376)に匹敵する値であった。1/2ZP胚および1/2ZPF胚では有意な低下が認められ、それぞれ87%(149/172)および88%(134/153)であった。また、1/2胚の

Table 1. The effects of zona pellucida, perivitelline space and cytoplasmic volume on the development of single blastomeres of mouse 2-cell embryos

Group	No. of embryos cultured	Develop to		No. of embryos transferred	No. pregnant/ recipient	No. of implan- tation	No. of live young	No. of live young /implantation
		2-cell	Blastocyst					
1/2+C	166	166	161(97)	62	6/6	59(82)	37(60)	37/51(73)
1/2ZP	153	152	134(88)**	62	6/6	49(79)	37(60)	37/49(76)
1/2ZPF	172	171	149(87)**	56<46>	5/6	24(52)**	14(30)**	14/24(58)*
1/2FC	120	120	115(96)	59	6/6	33(56)*	24(41)**	24/33(73)
4N	101	101	97(96)	40	5/5	32(80)	—	—
Control	376	376	371(99)	134	13/13	111(83)	92(69)	92/111(83)

*:P<0.01, **:P<0.001, (%)

囲卵腔に核除去割球を残存させるか、あるいは細胞質量を増化させることにより、胚盤胞への発生率を向上させることができた。移植試験では、合計42匹のレシピエントのうち1例を除き全てが妊娠し204匹の産子を得た。1/2+C胚および1/2ZP胚由来の胚盤胞では、ともに移植後60%(37/62)が産子へ発生したのに対し、1/2ZPF胚由来の胚盤胞の産子への発生率は30%(14/46)で最も低く、他区との間に有意差を認めた。また、着床数に対する産子率をみても1/2ZPF胚由来の胚盤胞では58%(14/24)で、他区の73%~76%に比べ低い値となった。したがって、2細胞期胚の片側割球から核を除去した1/2胚+C胚において最も優れた発生率が得られ、操作胚の58%を産子にまで発生させることができた。

考 察 : 1/2ZPF胚と1/2ZP胚の胚盤胞への発生率は等しいこと、ならびに核除去割球の残存、融合により1/2胚の胚盤胞への発生率が向上することから、1/2胚の胚盤胞への発生率に対しては、透明帯の存在自身より、囲卵腔内の胚の形状が重要であることが示された。しかし、1/2ZPF胚由来の胚盤胞は移植後の産子への発生率が明らかに低下することから、1/2胚から高い産子への発生能を有する胚盤胞を得るには、やはり透明帯の存在も必要であると考えられる。

文 献 :

- 1) Tsunoda, Y. and McLaren, A.: Effect of various procedures on the viability of mouse embryos containing half the normal number of blastomeres. *J Reprod Fert* 1983; 69:315-322.
- 2) Fiser, P.S. and Macpherson, J.W.: Development of embryonic structures from isolated mouse blastomeres. *Can J Anim Sci* 1976; 56:33-36.
- 3) Togashi, M., Suzuki, H., Miyai, T. and Okamoto, M. T.: Production of monozygotic twins by splitting of 2-cell stage embryos in mice. *Jpn J Anim Reprod* 1987; 33:51-57.

マウスにおける非同調集合キメラ胚の発生能

Chimerization of asynchronously aggregated mouse embryos

乾 嘉孝 · 高橋寿太郎 · 安田泰久

Yoshitaka INUI, Jutaro TAKAHASHI
and Yasuhisa YASUDA

岩手大学農学部動物育種教室

Laboratory of Animal Breeding, Faculty of Agriculture, Iwate University

目的：当研究室ではマウス、ラットを用いての同種間、あるいは異属間の集合キメラ胚の作出を試みてきた。集合キメラ胚作出の際には、8細胞期の同調胚を用いており、その統合胚盤胞への発生率も高いものであった。しかし、非同調胚を用いての集合キメラ胚の作出については、これまで試みられなかった。そこで、初期胚がもつ調節能力に着目し、マウスにおける非同調胚の集合キメラ胚の作出¹⁾を試み、その統合胚盤胞への発生能を調べた。

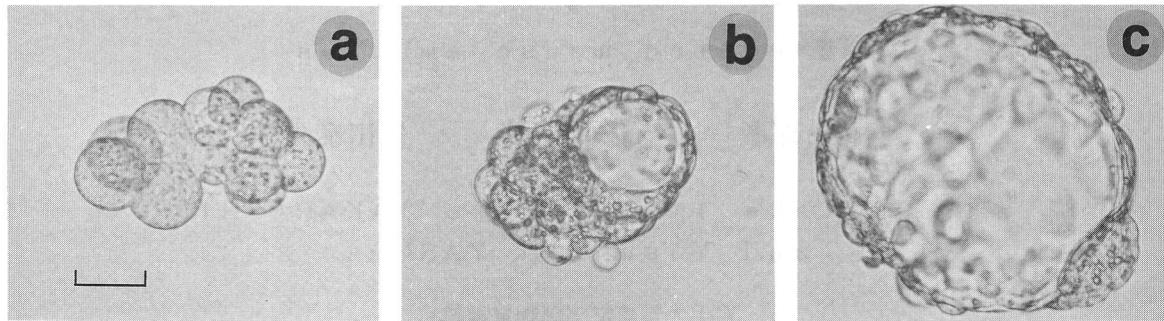
方法：実験には ICR/Jcl 系（以下、ICR と略す）、C57BL/6J 系（以下、C57BL と略す）マウスを用いた。交配確認日を 1 日目として、2 日目の 20 時以降に 4 細胞期の胚を卵管より回収し、37°C、湿度 100%、5% CO₂ 95% 空気混合気相下、0.3% BSA 添加ダルベッコ変法イーグル培地を用いて培養した。翌日の 20 時以降、交配 2 日目のマウスの卵管より回収した 4 細胞期の胚と、前日よりの 24 時間培養によって得られた 8～16 細胞期の胚とを、透明帶除去後、植物性凝集素を用いて接着し、先と同様の条件で培養した。非同調の集合胚は、4 細胞 ↔ 8 細胞、4 細胞 ↔ 16 細胞、8 細胞 ↔ 16 細胞の 3 群を作出した。また、4 細胞 ↔ 4 細胞、8 細胞 ↔ 8 細胞、16 細胞 ↔ 16 細胞の 3 群を対照群とした。培養 12 時間ごとに、ICR ↔ ICR、あるいは ICR ↔ C57BL の集合させた胚を光学顕微鏡下で観察した。

結果：4 細胞 ↔ 8 細胞ではその 80% (20/25) が、8 細胞 ↔ 16 細胞では、その 43% (3/7) が、それぞれ培養 72 時間後、培養 48 時間後に拡張統合胚盤胞へと発生した。しかし、4 細胞 ↔ 16 細胞では集合胚が得られなかった (0/13) (Table 1)。

Table 1. Development of asynchronously aggregated embryos

Type of aggregated embryos	No. of aggregated embryos	No. of integrated Blastocysts (%)	No. of disintegrated embryos			
			8-cells	Morulas	Blastocysts	degenerated embryos
4-cell ↔ 8-cell	25	20 (80)		3	5	2
4-cell ↔ 16-cell	13	0 (0)	4	1	21	
8-cell ↔ 16-cell	7	3 (43)		1	7	

一方、対照群の統合胚盤胞への発生率は、4細胞 \leftrightarrow 4細胞では80% (8/10)、8細胞 \leftrightarrow 8細胞では95% (20/21)、16細胞 \leftrightarrow 16細胞では69% (18/26)であり、拡張統合胚盤胞への発生時間は、それぞれ培養開始後、72, 48, 36時間であった。Fig. 1-a, -b, -c には4細胞 \leftrightarrow 8細胞のそれぞれ培養開始直後、培養36時間後、培養72時間後のものを示した。



考察：4細胞 \leftrightarrow 4細胞と4細胞 \leftrightarrow 8細胞の統合胚盤胞への発生時間が72時間と同様であることから、4細胞 \leftrightarrow 8細胞の統合に際しては、4細胞が8細胞に対し、その発生を遅延させるような細胞間調節作用^{1, 2)}をよばすものと考えられる。4細胞 \leftrightarrow 16細胞においては胚の統合が起こらなかった。これは、16細胞の胚が先に胚盤胞へと発生したためで、4細胞の胚と16細胞の胚の間に微絨毛などの組織学的相違³⁾があるために、細胞間の連絡³⁾が起こらないものと考えられる。今後は、非同調集合キメラ胚における細胞分化の方向を確定するために ICR \leftrightarrow C57BL 胚の移植、また生体標識¹⁾などの方法を用いる必要があると思われる。

文献

- 1) Stern, M. S. and Wilson, I. B. (1972). Experimental studies on the organization of the pre-implantation mouse embryos. I. Fusion of asynchronously cleaving eggs. *J. Embryol. exp. Morph.*, 28, 247-254.
- 2) Prather, R. S. and First, N. L. (1988). Chimerization of highly asynchronous murine blastomeres: developmental alteration? *Gamete Research*, 19, 359-367.
- 3) Goodall, H. and Johnson, M. H. (1982). Use of carboxyfluorescein diacetate to study formation of permeable channels between mouse blastomeres. *Nature*, 295, 524-526.

Fig. 1. Culture of asynchronously aggregated mouse embryos (4-cell \leftrightarrow 8-cell)
 a, Start of culture
 b, After 36hr of culture
 c, After 72hr of culture
 Scale bar, 50 μ m

悪性テラトカルシノーマ細胞凝集キメラマウス胚の発生

Development of mouse chimeric embryos produced from malignant teratocarcinoma cells

平野 裕子、 後藤 勤、 佐藤 嘉兵
Yuko HIRANO, Tsutomu GOTO, Kahei SATO

日本大学農獣医学部応用生物科学科動物細胞学教室

Laboratory of Animal Cell Biology, Department of Applied Biological Sience,
College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University
Fujisawa, Kanagawa 252

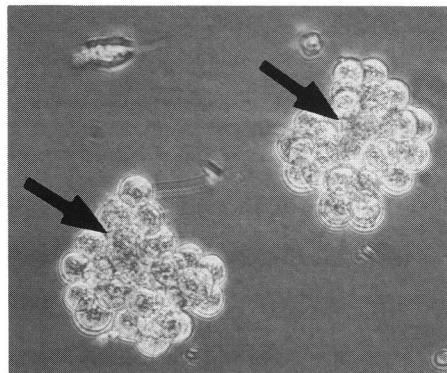
目的：Brinster(1974)、Mintz and Illmensee(1975)によってテラトカルシノーマと正常マウス胚間のキメラ胚作出が初めて報告された。これ等はいずれもblastocyst stageのマウス胚のblastocoelにテラトカルシノーマ幹細胞(EC細胞)をmicroinjectionする方法により作出された。一方、キメラ胚の作出にはもう一つの方法である凝集法がある。現在のところは、もっぱら前者のmicroinjection法によるものが主流を占めている。しかし、集合法には特殊な装置を用いる事なく比較的簡単に行われる利点があり、発生学上の諸問題の解析にキメラ胚が有効で使用頻度が増加することを考えると、凝集キメラ胚作出法の検討は意義あるものと思われる。我々は、malignant teratocarcinomaと正常マウス胚間のキメラマウス作出についての基礎的検討を行った。

方法：ddY系成熟マウスにPMSG8IU、その後48時間でhCG10IUを腹腔内投与し、過排卵処理を行い、hCG投与後直ちに同系統の成熟雄マウスと交配させた。交配後55～75時間後に4～16細胞期胚を卵管および子宮灌流により回収し、プロナーゼ0.5%を含むBrinster培養液を用い透明帯除去を行った。その後、フィトヘマグルチニン-pを5μl/mlとFCS10～20%(v/v)を含むMEM培養液中にてddY胚とEC細胞が培養中剥離しないように二つの胚ではさみこむように接着させ、キメラ胚を作成した。なおEC細胞は、可移植性のテラトーマの代表的なものとしてあげられるOTT6050よりクローニングされたF9を用いた。さらに培養24時間後に桑実胚移行にまで発生した胚を偽妊娠処理したマウスの子宮内に移植した。

結果および考察：キメラ胚作成後24時間培養した結果、正常胚同士接着させたキメラ胚と変わらない発生率を示し、EC細胞接着のため、発生が停止した胚はみられなかった。また、正常胚とEC細胞は正常胚細胞と区別する事ができるが胞胚期に至ったキメラ胚中では、正常胚の構成細胞と全く同じ形態を示し、光学顕微鏡下では、EC細胞の形態的な特徴は観察できなかった。

なお移植により6匹のマウスが得られたが、その成長については正常マウスと変わらず、特に大きな差は認められなかった。出生4ヶ月後に開腹し、観察したところ腫瘍の発生は認めていない。

以上の事より、本来癌細胞としての働きを示すはずのEC細胞は正常胚細胞と接触したことにより、癌細胞としての無秩序な増殖が抑制され、胚の正常な発生機構に組み込まれEC細胞が正常化した可能性が考えられる。今後、詳細に検討する予定である。



EC細胞凝集キメラ胚（凝集直後） ×100 胚胎期に達したEC細胞キメラ胚 ×200
(矢印はEC細胞を示す)

文献：

Brinster, R.L(1974): The effect of cell transferred into the mouse blastocyst on subsequent development. J.Exp.Med., 140:1045-1056.

Mintz, B. and Illmensee, K.(1975): Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.), 72:3585-3589.

ラットおよびマウスの凍結卵巣の培養

The culture of freezed ovary in rats and mouse

利部聰・萬場光一・牧田登之

KAGABU Satosi, MAMBA Kouichi, MAKITA Takashi

山口大学農学部獣医学科家畜解剖学教室

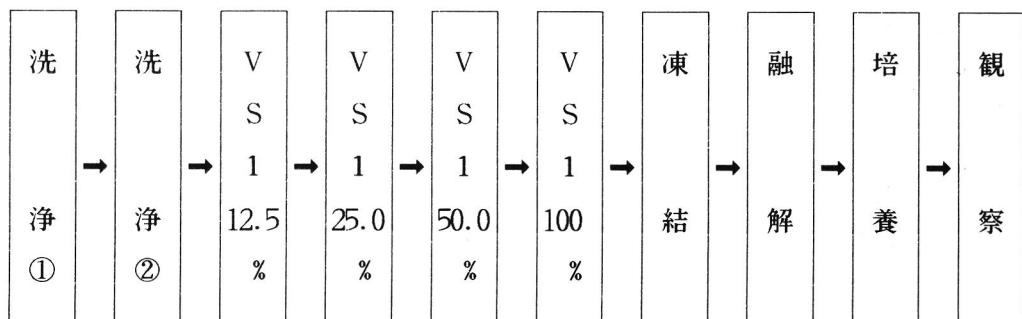
Department of Veterinary anatomy, Yamaguchi University

－目的－

ラットの卵巣内には35000個の卵細胞が存在すると言われている¹⁾。これらの卵細胞のわずか0.01%が排卵に至りのこりの99.99%が閉鎖卵胞となる²⁾。他の動物種でもこの傾向は同様でほとんどの卵細胞が閉鎖してしまう。最近の発生工学の進歩はめざましく、卵子の需要が増大しており卵巣の凍結保存－培養－排卵系または凍結保存－培養－採卵系の確立がまたれている。本研究は凍結保存－培養－排卵（採卵）系を確立するためにラットとマウスの凍結卵巣を培養して形態学的に卵胞の状態を調べたものである。

－方法－

ICR系6～8週齢マウス、ウイスター・今道系11～12週齢ラットの卵巣を取り出し、1～2mmの厚さに細切した。4mgBSA/mlをくわえたPBIおよびM-199を基質液としてRall & Fahy³⁾が開発したVS1を用いて超急速無段階凍結法によって凍結した。5～7日間液体窒素内に保存したのち融解し、それぞれの基質液に入れ2日間37℃ 5%CO₂ インキュベーター内で金網台法によって培養した。また、基質液にケタミンを0.5, 1.0, 2.0μg/ml添加して同様に培養した実験区も設定した。培養終了後パラフィン連続切片にして形態学的な観察に供した。卵胞の閉鎖の判定は、Braw & Tsafriri⁴⁾によった。



-結果-

ラットにおいては、PB1マウスではM-199による培養でやや良好な結果を得たが、明らかな差異はなかった。培養液の違いによるよりも、ケタミン添加による影響が認められ

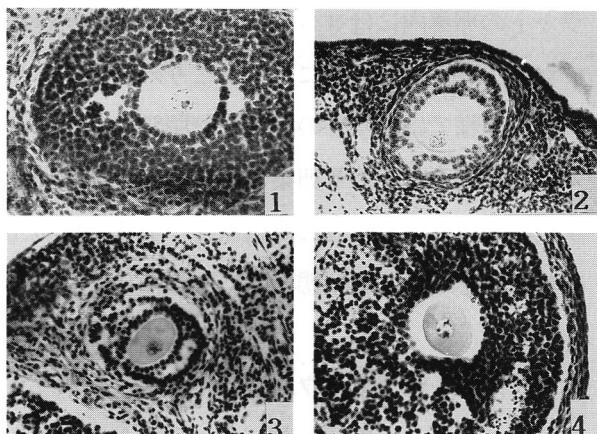
た。+、++と判定した卵胞は培養液と接する箇所に多数認められた。

-考察-

以上の結果から、超急速無段階凍結法によるマウス、ラットの凍結卵巣は融解後2日までの培養が可能であることが認められた。また、ケタミン添加によって培養成績が良好になったが、これはケタミンのマイトージェン作用によるものと考えられる⁵⁾。本実験ではおもに果粒層細胞の形態によって凍結前の形態を保持しているか否かを観察したものである。さらに卵巣を移植し生着を認めて凍結-培養卵巣の生存性を明らかにしなければならない。

表1. 凍結融解卵巣の培養

	PB1				M-199			
	ケタミン(μg/ml)				ケタミン(μg/ml)			
	0	0.5	1.0	2.0	0	0.5	1.0	2.0
ラット	+	+	++	++	+	+	+	+
マウス	+	+	++	+	+	+	++	++



写真説明

1. 凍結前の卵巣 (マウス)
2. ++と判定した凍結培養卵巣 (マウス)
3. +と判定した凍結培養卵巣 (ラット)
4. +と判定した凍結培養卵巣 (ラット)

果粒層細胞にピクノーシスが認められる

-文献-

- 1) ARAI, H., Am. J. Anat., 27, 405, 1920.
- 2) HIRSHFIELD, A. N. & A. R. MIDGLEY Jr., Biol. Reprod., 19, 597, 1978.
- 3) RALL, W. F. & FAHY, G. M., Nature, 313, 573, 1985.
- 4) BRAW, R. H. & TSAFRIRI, A., J. Reprod. Fert., 59, 267, 1980.
- 5) CULLEN, B. F. & CHRETIEN, P. B., Anesth. Analg., 52, 518, 1973.

耐凍剤として 1-2 Propanediolを用いた マウス胚盤胞胚の凍結保存条件の検討

Freezing strage of mouse blastocysts by using 1-2 Propanediol
as cryoprotectant

吉村 格・本好茂一・大久範幸*・沼辺 孝*・高田直和*
石川勇志*・堀内俊孝**

I taru Yosimura, Shigekazu Motoyosi, Noriyuki Ohhisa,
Takasi Numahe, Naokazu Takada, Yushi Isikawa,
Toshitaka Horiuti

日本獣医畜産大学, *宮城県畜産試験場, **広島農業短期大学

Nippon Veterinary and Zootechnical College,
Miyagi-ken Exp. Station of Anim. Sci., Hiroshima Agricultural College

目的：哺乳動物胚の凍結保存において、現在用いられている耐凍剤はグリセリン、DMSO、エチレンギリコール、1-2 Propanediol (PrOH) 等がある。最近、PrOHは冷却中の氷晶形成を限定する作用が注目され、PrOHの一段階添加、凍結保存後のストロー内での一段階希釈（融解）により高い生存率が得られている。しかし、耐凍剤として PrOHを用いた場合の凍結条件については、詳細に検討した報告は少ない。

今回我々は、マウス胚において PrOHを用いた場合の至適濃度、浸漬時間、冷却速度、植氷温度、保持時間、液体窒素 (LN₂) への投入温度及びストロー内希釈液（ショ糖）の至適濃度について検討した。

方法：6-7週齢のICR系雌マウスに PMSGと HCGを 48時間間隔で腹腔内に注射し、同系の雄と交尾させた。臍栓確認を DAY 1として DAY 4に PB1で子宮を灌流して Blastocystを回収した。採取した胚は PrOH溶液に一段階で移し、0.25mlのストローに封入し両側をショ糖液層ではさみ、室温から -7°C までを -1°C/分、-7°Cで植氷、10分間保持後 -0.3°C/分で -30°Cまで冷却し、10分間保持後 LN₂ (-196°C) に投入した。LN₂ 中で 2~3日間保存後融解し、一段階希釈を行い Ham's F10 培地で培養 (37°C, 空気下 5% CO₂) した。Hatched Blastocystまで発生したものを生存胚とし、以下の諸条件で生存率を調べた。

〔実験1〕 PrOHの至適濃度；0.8~2.2M 溶液に一段階で移した。〔実験2〕 1.5M PrOH における浸漬時間； 20分、40分、60分、90分浸漬した後、Ham's F10 に移し培養。〔実験3〕 室温から-7°C までの冷却速度；毎分 -1°C、-5°C、-10°C及び -7°Cに直接投入した。〔実験4〕 植氷温度；-1~ -9°C。〔実験5〕 -7°Cにおける保持時間； 0分、5分、10分。〔実験6〕 -7°Cから-30°Cまでの冷却速

度；毎分 $-0.3\sim-2.0^{\circ}\text{C}$ 。〔実験7〕 -30°C における保持時間；0分，5分，10分，15分。〔実験8〕 LN_2 への投入温度； $-10\sim-50^{\circ}\text{C}$ 。〔実験9〕 希釀液（ショ糖）の至適濃度； $0\sim1.2\text{M}$ 。〔実験1〕から〔実験9〕までの生存率を χ^2 検定により有意差を求めた。

結果：〔実験1〕 PrOH 濃度が $1.0\sim1.8\text{M}$ で90%以上の生存率が得られ， 1.5M では96%と最も高かった。〔実験2〕 浸漬時間が経過するとともに生存率は100%から85%に低下した。〔実験3〕冷却速度による差は見られず，全ての試験区で90%以上の高い生存率を示した。〔実験4〕 植氷温度は， -7°C で96%と最も高い生存率であった。〔実験5〕 -7°C における保持時間によって生存率の差は認められなかった。〔実験6〕冷却速度が $-0.3,-0.5,-1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ において90%以上の生存率が得られ， -0.3°C で96%と最も高かった（Table 1）。〔実験7〕 -30°C における保持時間での生存率に差は認められなかった。〔実験8〕 LN_2 の投入温度は -25°C から -45°C で高い生存率を示し -30°C で96%と最も高かった（Table 2）。〔実験9〕 希釀液としてのショ糖の濃度は， 0.15M から 0.6M で高い生存率が得られ， 0.3M で96%と最も高かった。

Table 2. Effects of plung temperature on the survival of freezing and thawing mouse blastocysts.

Plung temp. (°C)	No. of embryos frozen-thawed	No. of hatched blastocysts	Survival rates (%)
-10	31	6	19a
-15	34	8	24a
-20	77	53	69b
-25	43	37	86c
-30	76	73	96d
-35	42	36	86c
-40	83	73	88cd
-45	40	37	93cd
-50	40	32	80bc

a-d: Significant difference by χ^2 -test

Table 1. Effects of cooling rate on the survival of freezing and thawing mouse blastocysts.

Cooling rates/min	No. of embryos frozen-thawed	No. of hatched blastocysts	Survival rates (%)
-0.3	76	73	96a
-0.5	51	46	90ab
-1.0	43	40	93ab
-1.5	41	32	78b
-2.0	41	25	61c

a-d: Significant difference by χ^2 -test

考察：Renard, 堀内らは PrOH を用いたマウス胚の凍結保存で 1.5M の PrOH , -7°C で植氷, -30°C で LN_2 投入により高い生存率が得られたと報告しているが, 我々は, これらの諸条件に加え, 浸漬時間, 保持時間, 冷却速度及び希釀液（ショ糖）の至適濃度についても検討した。その結果, 1.5M の PrOH 濃度, 植氷温度は -7°C , -7°C から -30°C までの冷却速度は $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$, LN_2 への投入温度は -30°C 及び希釀液としてのショ糖は 0.3M がそれぞれ最も高い生存率であった。今後は他種の動物胚における PrOH の耐凍能について, また他の耐凍剤の効果についても検討する必要があると思われる。

文献 1. Horiuchi, T. Numabe, T. et al. T. ; J. Mamm. Ova Res. : 3, 1, 22-23, 1986

2. Lasalle, T. Testart, et al. ; Human embryo and cryopreservation : 44, 5, 645-651, 1985

3. Renard, J. P. and Babinet, C. ; J. Exp. Zool. : 230, 443, 1984

ゴールデンハムスター未受精卵の
凍結融解後の生存性について

The effect of cryopreservation on the viability
of unfertilized hamster oocytes

加納 宏・関口総一郎・関本邦敏・下郡洋一郎

Hiroshi KANO, Soichiro SEKIGUCHI, Kunitoshi SEKIMOTO, Yoichiro SHIMOGORI

日本農産工業（株） 中央研究所

Research Center, Nihon Nosan Kogyo K.K.

目的：透明帯を除去したハムスター卵子には、多種類の異種動物精子が侵入することが知られている。Yanagimachi¹⁾は、このことを利用して一般の精液性状だけでは推測できないヒト精子の受精能を評価できる可能性を示した。今日、これはハムスター・テストと称した新しいヒト精子機能検査として注目されている。しかし、その実際は、卵子供給源としての動物の管理や過排卵処置、採卵操作など繁雑な作業を伴うため実施が困難な場合が多い。本実験では、これに利用するハムスター卵子の凍結融解後の生存性について、ウシ精子との異種間体外受精を行い検討した。

方法：凍結用の培養液はDMSO 1Mを含む HEPES緩衝 Tyrode's solution(3.0% BSA含む)を用いた²⁾。過排卵を施したハムスターより卵子を回収、0.1% hyaluronidaseで卵丘細胞を除去し、凍結用培養液を三段階で徐々に加え平衡させた。その後、0.25mlストローに卵子を収めプログラムフリーザーにセットし、凍結した。植氷は-6℃で行い、10分間保持した後、0.3℃/分で-60℃まで下降させ、その後、直接液体窒素中に投下し保存した。融解は37℃の温湯中に直接入れる方法(急速融解; Method I)と-60℃から0℃までを4℃/分で上昇させ、0℃で37℃の温湯中に移す方法(緩慢融解; Method II)の2種類について検討した。卵子は融解後、媒精用の培養液(B.O.液、2.0% BSA含む)で段階的に希釗し耐凍剤の除去を行った。ウシ精子は、花田らの方法³⁾によって処理し、 $6.0 \sim 8.0 \times 10^6 / \text{ml}$ の媒精スポットとした。0.1% trypsinで透明帯を除去した卵子は媒精スポットに移し6時間培養した後、固定、染色し精子侵入の有無を調べた。

結果：耐凍剤除去後の卵子をtrypan blueで染色し、その生存性を調べた(Table 1)。染色された卵子は凍結融解後に透明帯および細胞膜損傷等の形態的ダメージを受けていた。また、受精率は

それぞれ、72.7%(Control)、53.3%(Method I) および64.4%(Method II) であり、多精子受精率はそれぞれ、39.3%(Control)、54.4%(Method I) および38.2%(Method II) であった。多精子受精は多くの場合一つの卵子に2~3個の精子が侵入したものであったが、中には5~6個入るものも見られた。しかし、いずれも6時間の媒精終了の時点では頭部を膨化させるか、前核の段階で発生を停止していた。

Table 1. The survival of frozen-thawed hamster oocytes

	Oocytes used	Negative/Oocytes stained, (%)
Control ¹⁾	136	136/136 (0)
Method I ²⁾	346	270/346 (78.0)
Method II ³⁾	644	587/644 (91.1)

1) Fresh oocytes, 2) Rapid thawing method, 3) Gradual thawing method

Table 2. The penetration of frozen-thawed hamster oocytes by bull spermatozoa

	Oocytes fixed after insemination	Penetrated (%)	Polyspermy rate (%)
Control	238	173/238 (72.2)	68/173 (39.3)
Method I	407	217/407 (53.3)	118/217 (54.4)
Method II	191	123/191 (64.4)	47/123 (38.2)

考察：上口⁴⁾らはヒトの、立野⁵⁾らはウシの精子を用い、新鮮ハムスター卵に対してそれぞれ81.0%の受精率を得ている。今回、検討した凍結未受精卵はコントロールと比較して、形態的正常率、受精率が低いものの、簡便な急速融解法で得られた卵子についてもその半数以上が受精しておりハムスターテストに利用できる可能性が示唆された。

主要文献

1. Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. & Rogers, B. J. (1976) Biol. Reprod., 15, 471-476.
2. Chung, C. J. & Coulam, C. B. (1986) Am. J. Obstet. Gynecol., 155, 6, 1240-1245.
3. 花田 章 (1985) 家畜繁殖誌 31, 56-61.1
4. Kamiguchi, Y. & Mikamo, K. (1986) Am. J. Hum. Genet., 38, 724-740.
5. Tateno, H. & Mikamo, K. (1987) J. Reprod. Fert., 80, 1-7.

細胞数を半数にしたマウス胚の凍結解凍後の生存性

Development of mouse half-embryos after freezing and thawing

○石森久雄 佐伯和弘 宇高健二

Hisao ISHIMORI, Kazuhiro SAEKI, Kenji UTAKA

雪印乳業(株)受精卵移植研究所

Embryo Transplantation Laboratory, Snow Brand Milk Products Co., Ltd.

【目的】ウシ胚の凍結保存において、形態的に低質の胚は良質の胚に比べて解凍後の生存性や受胎率が低下すると言われている^{1, 2)}。しかし実際の受精卵移植においては、低質胚をも凍結保存しなければならない場合があり、受精卵移植の効率化のためには、このような低質胚を有効利用することが重要と思われる。そこでマウス胚を用いて変性割球を有する胚と細胞数の少ない胚を人為的に作製し、それらを低質胚のモデルとして凍結解凍後の生存性について検討した。

【材料と方法】マウス (B6C3F₁; 4~5週令) にPMSGとhCG を各 5 i. u. ずつ48時間間隔で腹腔内投与し、hCG 投与44~46時間後Dulbecco's PBS+BSA(3mg/ml) (以下PBS) で卵管還流し、2細胞期胚を得た。得られた胚をパラフィンオイル下の培養液滴中に移し、倒立顕微鏡下でマイクロマニピュレーターを用い、次の各操作を行った。1: サクションピペットで1割球を吸引除去し、1割球を残した(吸引区)。2: ニードルで穿孔して1割球を破碎し、1割球を残した(破碎区)。3: ニードルで透明帯を卵胞腔まで穿孔した(対照区)。これらの胚をパラフィンオイル下のM16に移し、37°C、95% 空気 5%CO₂、飽和湿度下で培養した。各区の胚を24時間培養し、8細胞期胚(対照区で8細胞胚、処置区で4細胞胚)を得た。そのうち一部はさらに48時間培養を継続してその発育性を調べた。また残りの胚を以下のように凍結した。胚を10%Glycerol 加 PBSに移し、室温で20分間平衡後、ストローに充填した。室温から-6°Cまで 2°C/分で冷却、植氷後15分間保持して、-30°Cまで 0.3°C/分、-33°Cまで 0.1°C/分で冷却後、LN₂ 中へ投入した。解凍は37°Cの温水で、耐凍剤の除去は胚を2%Glycerol加PBS 中に10~12分間保持することにより行った³⁾。その後M16中で48時間培養して生存性を判定した。胚の生存性は、胚盤胞への発育により検定した。

【結果】継続して培養を行った胚の胚盤胞への発育率をTable 1. に示した。培養48時間における胚盤胞への発育率は、吸引区(71%)、破碎区(80%)、対照区(92%)と吸引区と対照区で有意な差が認められた。培養72時間での各区の発育率はそれぞれ吸引区(100%)、破碎区(97%)、対照区(100%)となり、有意な差は認められなかった。しかし、Table 2. に示すように各区の8細胞期胚の凍結解凍後の胚盤胞への発育率については、対照区(87%)と比べて処置を行った吸引区(63%)と破碎区(62%)の胚の発育率は有意に低下した($P < 0.001$)。吸引区と破碎区の発育率には、有意な差は認められなかった。

Table 1. Development of half-embryos to blastocysts for 48-72h

Treatment	No. of 8-cell stage embryos	No. (%) of embryos developed to blastocysts	48h	72h
Aspiration of 1-blastomere	38	27(71) ^a		38(100)
Destruction of 1-blastomere	59	47(80) ^{a,b}		57(97)
Control	65	60(92) ^b		68(100)

a, b: P<0.001

Table 2. Development of frozen-thawed half-embryos
(8-cell stage) to blastocysts

Treatment	No. of embryos recovered	No. (%) of embryos developed to blastocysts
Aspiration of 1-blastomere	79	50(63) ^a
Destruction of 1-blastomere	66	41(62) ^a
Control	89	77(87) ^b

a, b: P<0.001

【考察】凍結せずに培養を続けた8細胞期胚の胚盤胞への発育率(Table 1)については、培養48時間の吸引区が対照区に比べ低下が認められた。しかし培養72時間では各区間に有意な差は認められず、処置区は対照区と差のない胚盤胞への発育が認められた。また、変性割球の有無にかかわらず発育率に差が認められなかったことから、変性割球の存在は胚盤胞への発育に影響しないと思われた。

低質胚(ウシ)^{1, 2)}や人為的に2分離された胚(ヤギ⁴⁾、ウシ⁵⁾の凍結解凍後の生存性の低下が報告されている。それらの原因に関して、低質胚についてはSheaら¹⁾が、分離胚については Niemann ら⁵⁾が、細胞数の減少を示唆している。今回の実験では、細胞数を減じた8細胞期胚の凍結解凍後の生存率は対照区に比べて有意に低下し、また両処置区間に差は認められなかった(Table 2)。これらのことからSheaらの示唆と同様に、細胞数の減少が凍結解凍後の生存性の低下の原因の一つと推察された。また凍結解凍の過程において変性割球が生存細胞に影響しているとは思われなかった。

今後、更に発育の進んだ胚において細胞数が凍結解凍後の生存性に及ぼす影響について検討していきたい。

【文献】1)B. F. Shea, R. E. Janzen, R. J. McAlister and D. P. McDermand, Theriogenology 20:205-212 (1983). 2) L. G. Kennedy, M. P. Boland and I. Gordon, Theriogenology 19:823-832 (1983). 3)T. Takeda, R. P. Elsden and G. E. Seidel, Jr., Theriogenology 28:101-108 (1988). 4)Y. Tsunoda, T. Tokunaga, Y. Okubo and T. Sugie, Theriogenology 28:317-322 (1987). 5)H. Niemann, G. Brem, B. Sacher, D. Smidt, and H. Kräusslich, Theriogenology 25:519-524 (1986).

マウス胚の凍結保存による系統維持に関する検討 ：胚の回収率およびVitrification法による凍結・ 融解角化後の発生率の系統差について

Strain differences in the recovery rate
of embryos and the development after
freezing and thawing by vitrification
method in mice

森口佳之・鈴木宏志・富樫守・安達二朗

Yoshiyuki MORIGUCHI, Hiroshi SUZUKI, Mamoru TOGASHI, and Jiro ADACHI

中外製薬 開発研究所

Drug Development Laboratories, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.

目的： 1985年Rall & Fahyによって発表されたVitrification法は、従来の胚凍結法の概念を一新させる方法として注目を浴び、これまでいくつかの機関で追試が行われた結果、再現性の高い方法であることが確認されている。しかしながら本法での系統差を調べた報告はほとんどなく(Dagnes-Hansen & Hau, 1988)、胚凍結による系統維持・生産を実用化するためには、これらを予め検討しておくことが極めて重要であると思われる。そこで当研究所で維持しているマウス7系統を対象に、過排卵処理後の胚回収率およびVitrification法による凍結融解胚のその後の発生率について系統差が認められるか否かの検討を行い、若干の知見を得たので報告する。

方法： 供試動物は、BALB/cAnN, CBA/NCr, DDI, C3H/HeN, FRG, HLM, ICRの成熟マウスを用いた。過排卵処理は各系統の雌マウスにPMSG 5 i.u. および48時間後にhCG 5 i.u.を腹腔内に投与することにより行った。そしてhCG投与日の18:00に同系統の雄と交配して、翌日plugを確認した(Day0)。plug(+)の個体の卵管から4-cell～Morulaの胚を採取し、Day2の15:00～16:00に凍結した。凍結融解操作は、Rall & Fahy(1985)の原法を若干改良した河野・角田(1987)の方法に準じて行った。融解した胚は1～2回洗浄後、100 μMのEDTAを含むWhitten培地内で48時間培養し、胚盤胞への発生について観察した。

結果： plug形成率、回収胚数および凍結融解胚の発生成績をTable 1に示した。plug形成率(40.9-88.9%)および平均回収胚数(1.0-16.0)には顕著な系統差がみられた。HLMはplug形成率および回収胚数のどちらもが低いため、平均回収胚数が最も少なかった。また凍結融解後の胚の胚盤胞への発生率は、DDIが極端に低率であった(27.6%)が、他の系統については比較的高率に発生した(70.0-95.6%)。Table 2は、Table 1で得られた数値をもとに供試動物1個体あたりの胚盤胞への発生数を算出したものであるが、0.7～11.4と系統間に著しい差がみられた。この値は平均回収胚数が

大きな要因となっており、今回検討した7系統以外についても、plug形成から凍結融解胚の発生までのいわゆる生産効率は、系統ごとに大きな差が生じることが推測される。

以上の成績より凍結保存を系統維持の実際的な手段とする場合、一定数の胚を確保するために、系統差を考慮した十分な動物数の確保が必要であると考えられる。しかしながら、作業の効率性あるいは動物の有効利用を考えれば、plug(-)個体から採卵して体外受精を行う方法ならびに極端にplug形成率の低い系統においては、最初から体外受精を行い、胚を凍結する方法も有用であると思われる。今後は体外受精および自然交配によって得られた胚について、凍結・融解後の生存性および産仔への発生能について検討し、より効率的な系統維持の方法の確立に努めたい。

Table 1. 胚の回収成績および凍結融解後の発生成績

系統	plug形成率 (%)	回収胚数 (4-cell~ Molura)	平均回収 胚数 ¹⁾	培養胚数	胚盤胞への発生数(%)	
					24h ²⁾	48h ²⁾
BALB/cAnN	14/17 (82.4) ^b	109	6.4	61	24	49 (80.3) ^{b, c}
CBA/NCr	8/14 (57.1) ^{a, b}	91	6.5	40	2	28 (70.0) ^b
C3H/HeN	8/9 (88.9) ^b	144	16.0	53	38	48 (90.6) ^{c, d}
DDI	9/14 (64.3) ^{a, b}	59	4.2	58	0	16 (27.6) ^a
FRG	15/18 (83.3) ^b	75	4.2	40	3	31 (77.5) ^{b, c}
HLM	9/22 (40.9) ^a	22	1.0	-	-	-
ICR	13/17 (76.5) ^b	173	10.2	68	40	65 (95.6) ^d

1) plug(+)および(-)を合わせた数を母数として算出した。

2) 培養後の時間。

異符号間に有意差あり($p < 0.05$)。

Table 2. 供試動物1個体あたりの凍結融解後の胚盤胞への発生数

系統	BALB/cAnN	CBA/NCr	C3H/HeN	DDI	FRG	ICR
発生数	3.9	2.5	11.4	0.7	2.4	6.5

plug形成率(%) × 平均回収胚数 × 融解後の回収率(%) × 発生率(%) × 10⁻⁶

Rall, W. F., and Fahy, G. M. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. Nature, 313: 573-575.

Dagnes-Hansen, F., and Hau, J. (1988). Cryopreservation of mouse strains by a simple and inexpensive method. Mouse News Letter, 80: 154-155.

河野友宏・角田幸生(1987). ガラス化超急速凍結法によるマウス初期胚の生存性および移植試験. 家畜繁殖学雑誌, 33: 77-81.

+

七

哺乳動物卵子研究会会則

名 称

第 1 条 本会は、哺乳動物卵子研究会と称する。

事 務 局

第 2 条 本会の事務局は、東京都内または近隣県内に置く。

目 的

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

事 業

第 4 条 本会は、前条の目的を達成するために、次の事業を行う。

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

会 員

第 5 条 本会は、次の会員をもって組織する。

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

入 会

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

退 会

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

第 8 条 会員は、次の事項に該当する時は会員の資格を失う。

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

役 員

第 9 条 本会に次の役員を置く。

会 長 1名

副 会 長 1名

理 事 若干名

監 事 2名

幹 事 2名

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

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

第11条 役員の選出は、次によって行う。

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

第12条 役員の任期は2年とし、再任を妨げない。

総 会

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

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

第14条 総会は次の事項を審議し、決定する。

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

会 計

第15条 本会の会計年度は、毎年4月1日に始まり翌年3月31日に終わる。

2. 本会の経費は会費、寄付金およびその他の収入をもってこれにあてる。

附 則

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

哺乳動物卵子研究会誌投稿規定

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

雑誌の場合

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

単行本の場合

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

〒252

神奈川県藤沢市亀井野1866

日本大学農獣医学部獣生生理学教室内

TEL 0466-81-6241 内線 332

哺乳動物卵子研究会編集委員会

医療施設むけ医理科機器ならびにシステムの販売

医界のニーズに添う製品を速やかにご提供させて頂くことを常に志して、人命の尊重こそ当社の至上命と心得る所存です。

販 売 品

サクラ精機製品	薬剤室用品	電顕用周辺機器
手術室用品	病棟用品	各種医用システム
材料室用品	研究・検査室用品	各種光学器械

株式会社 メド城取

代表取締役 木口啓司

〒155 東京都世田谷区代沢4-37-2 ハイツ馬場1F TEL (412)1925(代)

あなたの研究に役立つ

供 給 品 目

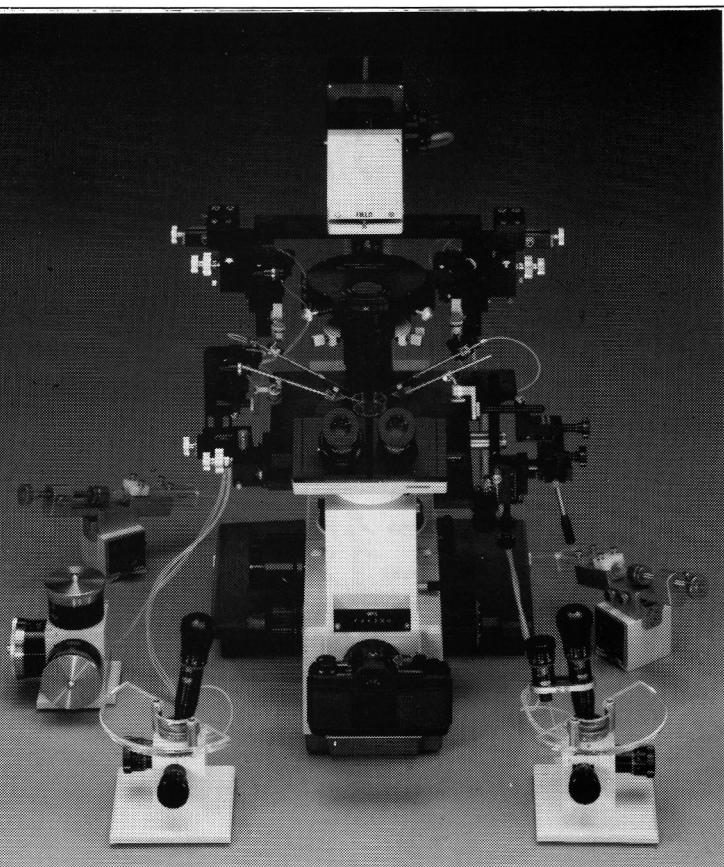
- | | |
|--------|---------|
| ・ラツト | ・ハムスター |
| ・マウス | ・ネコ |
| ・ウサギ | ・サル |
| ・モルモット | ・固型飼料各種 |

(株)埼玉実験動物供給所

〒345 埼玉県北葛飾郡杉戸町清地3-9-12

TEL (0480) 34-3691(代)

バイオテクノロジーをはじめ、 最先端の研究分野に対応する倒立型システム顕微鏡。



製品写真はIMT-2に(株)ナリシゲ製のマイクロマニピュレーターを組み合わせたものです。

5種の検鏡法を同時に取り付けられる、倒立型システム顕微鏡です。明視野検鏡をはじめ、位相差、蛍光、ノマルスキーリー、そして簡易偏光。いずれの検鏡法もワンタッチで切換えが可能です。また、両端支持構造による固定式ステージは安定性に優れ、マニピュレーション等の微細なテクニックを駆使できます。IMT-2は、今までにない新しいシステムをもって、先進の研究分野に大きく貢献いたします。

- 5種の検鏡法を同時に装着可能、装置付け換えなどのわずらわしさから解放されます。
- コンデンサー部は、ハネあげ/スwingアウトの2つの機能をもっています。標本の装着やインジェクションシステム等の取付けが容易になりました。
- 1×と1.5×の中間変倍装置を内蔵。
- ステージ上面での標本移動などが楽に行なえる最適なステージ高さ、275mm。
- 独自のマルチ鏡筒システム(オプション)で、映像システム(35mmカメラ、大版ポラロイド、TV装置、16mmシネなど)が拡がります。

未知をひらく光学技術

〈仕様〉●12V・50W高輝度ハロゲンランプ、位相制御調光方式、バーグラフ式Vメーター表示付●ステージ最大ストロークX方向110mm・Y方向76mm●位相差、落射蛍光、微分干渉用各対物レンズ●コンデンサー(LWCD、ULWCD)

IMT-2 series

倒立型システム顕微鏡

顕微鏡・内視鏡・医療器・カメラ等の光学総合メーカー

OLYMPUS

オリノバス光学工業株式会社

販売元・株式会社オリノバス

カタログ・パンフレットのご請求は株式会社オリノバス
〒101 東京都千代田区神田駿河台3-4(龍名館ビル)
TEL.03(251)8981 ~

福田理化学

東京都豊島区池袋本町四丁目25番4号
電話 東京(984)4745
郵便番号 170

更正不要!!CO₂濃度はいつも正しく指示します。

CPDシリーズはCO₂濃度の0更正、スパンとも必要ありません。

テ一ハ一式

CO₂培養器/CPD-170型

新しい機能が備わりました。

1. 湿度指示もできます。<オプション>
2. PID制御になりました。
3. 初期設定で運転できます。
4. 自己診断機能もあります。
5. CO₂ガス切れも警報。
6. 記録計(オプション)も取付可。
7. 温度精度・分布・耐雑菌なども性能向上。

外法 W727×D660×H950(鉄台高:600mm)

内法 W460×D530×H700(内容積:170ℓ)

仕様温度: ~50°C

CO₂濃度: 0~19.9%

温度精度: ±0.1°C

温度分布: ±0.1°C

湿度範囲: 95~98%

攪拌: 微風循環式

警報装置: 17種

電気: 100V.AC.350W

価格 ￥1,070,000(本体)

<付属品は多く用意されています>



株式会社ヒラサワ

〒113 東京都文京区湯島2丁目24-7

TEL 東京(03) 834-2331(代)

FAXTEL 東京(03) 836-1140

●テ一ハ一綜合カタログがあります。お申込み下されば、ご送付致します。

健保適用

下垂体性性腺刺激ホルモン パーゴナル[®]注75・150

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



【効能・効果】

間脳性（視床下部性）無月経、下垂体性無月経の排卵誘発

【用法・用量】

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

【包 装】

パーゴナル注 75：10管
パーゴナル注150：10管



日本製薬株式会社
東京都港区赤坂二丁目5番1号

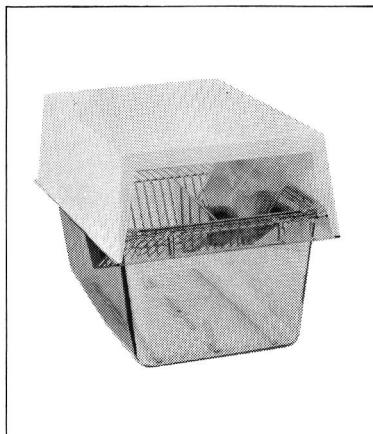
【使用上の注意】

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

NEW!

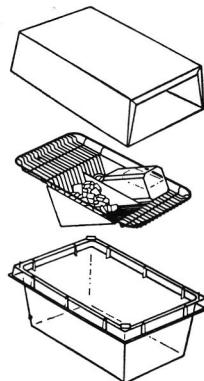
M-7 (Isocage & Isocap)

マウス用 アイソレーションケージ



特長

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



岡崎産業株式会社

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



また一步、母乳に近づきました
ラクトフェリンは、赤ちゃんを
病気から守る感染防御物質
です。
森永B.F.-L.ドライミルクは
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ー
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
ラクトフェリン新配合
感染防御因子



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

新製法で、さらに
溶けやすくなりました



森永乳業



株式会社 池田理化

本 社	東京都千代田区岩本町2丁目15番12号
〒101	TEL 03 (861) 6211 (大代表)
	FAX 03 (861) 6269
八王子支店	八王子市横山町22番2号
〒192	TEL 0426 (42) 0570 (代表)
三島支店	三島市東本町1丁目15番6号
〒411	TEL 0559 (75) 0975 (代表)
平塚支店	平塚市明石町26番25号
〒254	TEL 0463 (21) 2974 (代表)
千葉支店	市原市白金町2丁目14番2号
〒290	TEL 0436 (22) 3738 (代表)
筑波支店	土浦市下高津2丁目6番27号
〒300	TEL 0298 (24) 2681 (代表)
埼玉支店	川越市大字豊田新田2183-5
〒350	TEL 0492 (45) 7831 (代表)
横浜支店	横浜市瀬谷区本郷2丁目15-1
〒246	TEL 045 (303) 6621 (代表)
藤枝支店	藤枝市青木3丁目9番2号
〒426	TEL 0546 (44) 5551 (代表)

理化学器機 T.R.K. 設計製作

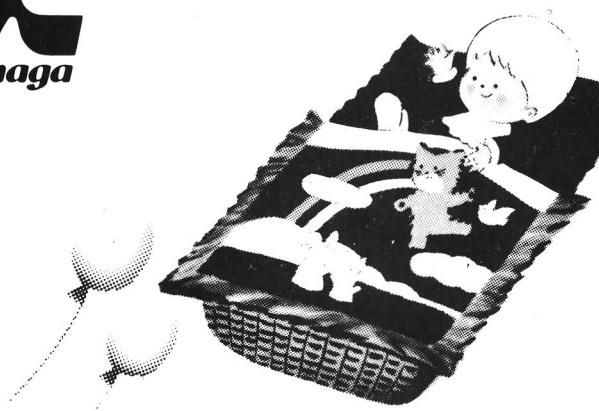
株式会社 帝国理化

日本橋本町

TEL 270-4541

本郷赤門前

TEL 812-0038



抵抗力の弱い赤ちゃんのために…
母乳に多いラクトフェリンを

世界で初めて新配合
また一步、母乳の理想に近づきました

●森永BF-Lドライミルクは、ラクトフェリンを新配合。ラクトフェリンは母乳に多く含まれている感染防御物質です。

抵抗力の弱い赤ちゃんの健康のために…。

●赤ちゃんのおなかを整えるビフィズス菌。この大切な菌をもつとも増やす働きのあるラクチユースを配合しました。

●赤ちゃんの脳や神経の大切な栄養素、タウリン。赤ちゃんはまだ体内でタウリンを十分につくれません。

森永BF-Lドライミルクには、1~2ヶ月の母乳に近いタウリン量を配合しました。

らくらく調乳
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 **BF-Lドライミルク**

森永乳業



雪印乳業

さっと とけます
スピード調乳

- 溶解性の改良
- γ -リノレン酸の新配合
- オリゴ糖の配合
- アルギニンの配合
- タウリンの配合
- ビタミン、ミネラルの調整
- 母乳に近い調乳濃度
- かんたんオープン缶の採用



母乳と赤ちゃんを
しつかりサイエンス。

母乳研究をいかした
雪印ネオミルク Le エルイー ニュータイプ

MICROPROCESSOR CONTROL

TOMY SSオートクレーブ

- かんたんデジタル
面倒な操作はありません
- デジタルセーフティ
誤操作防止、安全優先設計
- デジタル温度コントロール
理想の広域高精度温度管理
- 前面メンテナンス
お手入れは本体前面から
- SS-245: 60~123°C、容量22L
SS-325: 60~132°C、容量53L



DIGITAL

株式会社・トミー精工
本社 03(976)3111
仙台 022(273)5033
つくば 02975(6)0811
神奈川 0462(48)5101
大阪 06(305)3333

プログラムフリーザー ET-1

新発売

- 受精卵移植用のプログラムフリーザーに
新機種が登場しました
- 低価格で高性能なET-1型
- 容易な操作性と扱い易い
コンパクトサイズ
- 数多くの特長を備えています
- 定置型として御使用ください

（特長）
標準冷却プログラム▶4パターン内蔵
ユーザープログラム▶3パターン設定可
異常検出機構▶水位低下・センサ異常・常・ヒータ異常・オーバーヒート時自動制御停止
バックアップ機構▶停電時などでも設定温度・時間を記憶
ポーラス機構▶温度保持
その他
（仕様）
●使用温度範囲：-40～50°C
●冷凍機：600W
●外寸法：360×400×1000mm



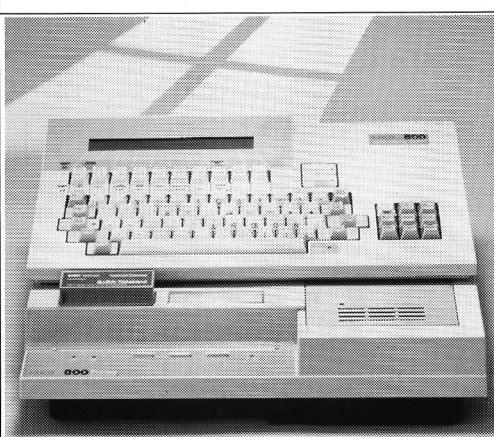
FHK 富士平工業株式会社

東京都文京区本郷6丁目11番6号 〒113
電話 東京(03)812-2271 フax(03)812-3663

さらに便利になったKROY 800

フォントカードの入れかえなしで5書体（ヘルベチカ レギュラー・ボールド・メティウム・ライト・イタリック）が印字可能です。また、その他の書体も、フォントカードの対応により、自由自在に印字できます。文字サイズは、6pt～60ptまで1ptきざみでサイズ指定が可能な画期的な設計でギリシャ文字、カタカナ印字もできます。

●印字方式：熱転写 ●永久メモリー：32,000文字まで ●当座メモリー：1,500文字まで ●外形寸法：プリンター：W38cm×H9.2cm×D28.6cm キーボード：W38cm×H7cm×D23.2cm (分離ができる、プリンターの上にキーボードをのせても使用できます) ●重量 プリンター：4.54kg キーボード：2.27kg



忙しい人に、 クロイレタリングシステム

クロイ800・レタリングマシンは粘着テープの上に文字を正確に印字するシステムです。操作が簡単でスピーディに鮮やかに仕上り、有能な、レタリングアシスタントとして、多用途に活躍します。

例えば…

1. 学会・会議資料の作成

- スライド原稿の作成 ●O.H.P.用原稿作成
- ポスター・セッション ●ファイル整理 ●ネームプレート・ネームカード (原稿のタイトリング等、英文タイプとの併用も可能)

2. 研究・実験室で

- ラベリング ●カルテ分類
この他、オフィス、デザインルーム等あらゆる分野で利用できます。

NEWS!

4/1～6/30
新発売記念キャンペーン実施中！

期間中お買い上げの方に、
もれなく便利な旅費精算電卓
を差し上げます。



資料請求・お問い合わせは…

本社 〒160 東京都新宿区大京町29番地 ☎(03)359-0361㈹ FAX(03)341-7913
千葉営業所 ☎(0472)73-1175㈹
甲府営業所 ☎(0426)45-4866㈹

八王子営業所 ☎(0552)43-2451㈹



アッベ科学株式会社

編 集 後 記

昨年に引き続き暖冬の平成元年であり、桜の開花も3月に見られました。哺乳研誌の第6巻第1号をお届けいたします。

本研究も昭和35年に発足以来30年を迎えることとなり、歴史を感じるしだいであります。

今回は、原著論文2編と創設30周年記念大会で企画いたしました、特別講演およびシンポジウムの内容を各先生にご依頼いたしまして掲載いたしました。また、一般演題25題の要旨を掲載いたしましたので新しい研究の内容をご一読下さい。

(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6巻 第1号

Vol. 6

No. 1

平成元年3月25日印刷

平成元年4月1日発行

(会員頒布)

発行者 哺乳動物卵子研究会
代表 佐久間 勇次

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

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

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



テンカ製薬株式会社

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

プロローゲン[®]

1,500単位
3,000単位
5,000単位
10,000単位

日本薬局方 注射用血清性性腺刺激ホルモン

動物
専用

ピーメックス[®]

1,000単位

販売元



三共株式会社
東京都中央区銀座2-7-12

製造元



三共ゾーキ株式会社
東京都中央区日本橋本町4-1-14

