

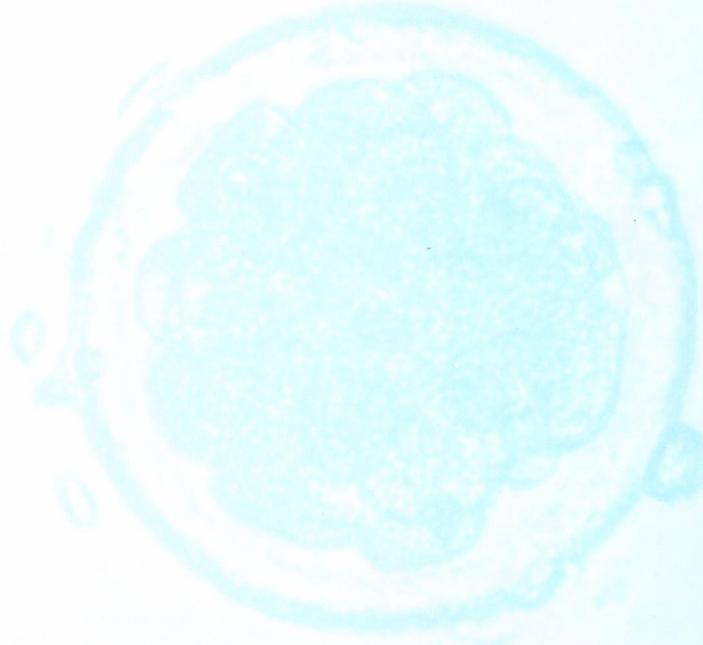
ISSN 0289-5439

哺乳卵研誌

J. Mamm. Ova Res.

# 哺乳動物卵子研究会誌

Journal of Mammalian Ova Research



哺乳動物卵子研究会

Japanese Society of  
Mammalian Ova Research

Vol. 6 No. 2

October 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

## プログラムフリーザー

### ET-1

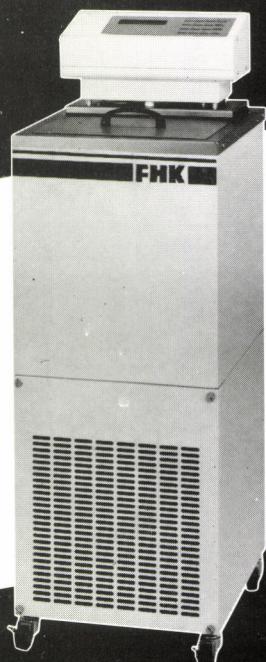
新発売

- 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・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

ボーズ機構▶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シミリ(03)812-3663

## 第31回 哺乳動物卵子研究会開催のお知らせ

哺乳動物卵子研究会

会長 豊田 裕

下記により第31回哺乳動物卵子研究会および総会を開催いたします。多数の会員のご参加をお願いいたします。

○日 時：平成2年4月13日（金） 9：00より

○場 所：日本大学会館 大講堂

東京都千代田区九段南4-8-24

TEL 03-262-2271

○一般講演：前回の大会と同様に講演内容をオフセット印刷し、哺乳動物卵子研究会誌第7巻 第1号に講演要旨として掲載いたします。各演題は2ページにおまとめいただきます。

発表時間は1題につき10分、討論5分を予定します。

なお、演題多数の場合は、会場の都合などで演題の採否は会長にご一任下さいますよう。

○演題申込：締切 平成2年1月25日必着

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

講演原稿の〆切は平成2年2月20日（厳守）とさせていただきます。

〒252 神奈川県藤沢市亀井野1866

日本大学農獣医学部獣医生理学教室

遠藤克宛

TEL 0466-81-6241 内332



## 会長あいさつ -- 新たなる飛躍に向けて --

豊田 裕

秋が一段と深まり、紅葉の美しい秀節になりました。北国ではもう初雪でしょうか。会員の皆様には益々御健勝にて御活躍のことと拝察申し上げます。

さて、わが「哺卵研」は前身の談話会が昭和35年(1960)にスタートして以来、来年で満30年になります。この間における哺乳動物卵子に関する研究の発展は、眼を見張るものがあります。第3回の談話会から参加させていたゞいている私自身にとっても正に隔世の感があります。当初10名足らずのメンバーが、いまや384名の一般会員を擁するに至りました。発足当初からの特色であった学際的な性格は益々顕著になり、会員の所属も多方面にわたっています。

このような発展を踏まえて、談話会が研究会に脱皮したのは5年前(1984)ですが、最近の5年間ににおける研究の進展もまた目覚ましいものがあります。その具体的な現われが、医学における体外受精、胚移植であり、また、自然界になかった新しい動物、トランスジェニック動物の出現でしょう。いまや哺乳動物卵子を取りまく問題は、自然学者だけの研究課題ではなく、社会全体の英知を集めて考えるべき問題になってきました。

さて、このような情勢の中で、わが研究会はどうあるべきでしょうか。この問題は、こゝ数年来、研究会の度に話題に上っていたのですが、遂に本年5月の理事会において『今後のあり方委員会』が設けられ、本格的な検討に入ったことは本年度の総会で佐久間前会長から御報告があった通りです。委員会のメンバーは、石島芳郎(東農大)、井上正人(東海大)、遠藤克(日大)、小栗紀彦(畜試)、久保春海(東邦大)、佐藤嘉兵(日大)、鈴木秋悦(慶應大)および私の7名で、約半年の間、種々検討を重ねました。その結果、次のような原案がまとまりましたので、会員の皆様の御批判を仰ぎたいと考える次第です。

1. 世界に類を見ない哺乳動物卵子の研究集会として本会を益々発展させる。
2. 本会の特色である自由に発表討論できる雰囲気を維持しながら、一方では研究発表の活性化と質の向上に努める。
3. とくに機関誌である、J. Mamm. Ova. Rer. の内容の充実に努力する。
4. 上述の目的を達成するためには、研究会を学会にすることが望ましい。このことによって講演および投稿が業績としてより正当に評価されるようになり活性化につながると期待される。
5. 学会への移行は、もし可能であれば、平成2年4月(第31回総会時)が適当と思われる。
6. 学会の名称は「哺乳動物卵子学会」、機関誌は「哺乳動物卵子学会誌」が適当と考えられる(英文名は現在のまま)。
7. 学会へ移行する場合の規約等の検討をあらかじめ行うために小委員会を設け、会長・副会長、井上正人・久保春海、両理事および遠藤克・佐藤嘉兵、両幹事がこれに当る。

以上が骨子です。この案の背景には、最近、関連学会の設立が相次いでいること、およびそれらの関連学会と比較し、本会が会員数・会員構成・年会・学術雑誌の発行など、どの点をとっても遜色なく、十分な実績を積んでいるとの判断があります。

勿論、このような重大な事項は、少数のメンバーで決められるべきものではなく、会員の皆様の総意によって決定されるべきです。たゞ、本会をより充実させ、発展させたいという熱意をお汲み取りいたゞければ有難く思います。どうか忌憚のない積極的な御意見をお寄せ下さるようお願い申し上げ、御挨拶といたします。

# 哺乳動物卵子研究会誌

第6卷 第2号

平成元年10月

## 目 次

### 原 著

着床前の子宮内に移植されたマウス初期分割卵の透明帯剥離について(英文)	辻井弘忠	85
ハムスター卵子細胞質内へのウサギ精子マイクロインジェクションによる受精について(英文)	佐藤嘉兵、塩田和也、後藤 勤	89
射出精子によるウサギ卵胞卵の体外受精	亀山祐一、石島芳郎	95
体外成熟ウシ卵胞卵子への精子注入操作による体外受精	亀山賢次、菅原七郎、正木淳二	108
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	113
マウス受精卵(第1分割期)における染色体異常の出現率と性比(英文)	吉沢 緑、高田 勝、村松 隆	119
マウス着床実験モデルによる高エストロゲン環境の着床におよぼす影響について	久保春海、安部裕司、臼井 彰、雀部 豊、片山 進、黄 傳益	126
マウス2細胞期胚凍結保存用耐凍剤の検討	渡辺清彦、星 和彦、佐藤 章、堀内俊孝	136
透明帯開孔術後卵子(ハムスター、ヒト)の走査型電子顕微鏡による観察	井上正人、松井素子、小林善宗、本田育子、淡路英雄、津田朋男、藤井明和	143
各種系統マウスにおける自然排卵数と誘起排卵数について	横山峯介、長谷川孝徳	151
DMSO処理による卵丘除去マウス卵子の受精能の消失とそれに対する牛胎児血清の防御効果(英文)	河野恵子、東 貞宏、豊田 裕	156

# Journal of Mammalian Ova Research

Vol. 6 No. 2

October 1989

## Contents

### Originals

Lysis of the zona pellucida in mouse early cleavage eggs transferred to the mouse preimplantation uterus.	TSUJII, H. ....	85
In vitro fertilization of hamster eggs by microinjection of rabbit spermatozoa.	SATO, K., K. SHIOTA & T. GOTO .....	89
In vitro fertilization of rabbit follicular oocytes by ejaculated spermatozoa.	KAMEYAMA, Y. & Y. ISHIJIMA .....	95
In vitro fertilization by microinjection of bovine sperm into bovine oocytes matured in vitro.	KAMEYAMA, K., S. SUGAWARA & J. MASAKI .....	108
Chimerization of asynchronously aggregated mouse embryos.	INUI, Y., J. TAKAHASHI & Y. YASUDA .....	113
Incidence of chromosomal aberrations and primary sex ratio in first-cleavage mouse eggs.	YOSHIZAWA, M., M. TAKADA & T. MURAMATUS .....	119
The influence of hyperestrogenism on implantation of mouse embryo.	KUBO, H., Y. ABE, A. USUI, Y. SASABE & S. KATAYAMA, C. HUANG .....	126
A study of the cryoprotectant used for freeze preservation of mouse embryos.	WATANABE K., K. HOSHI, A. SATO & T. HORIUCHI .....	136
Scanning electron microscopic observation of zona drilled hamster and human oocysts.	INOUE, M., M. MATSUI Y. KOBAYASHI, I. HONDA, H. AWAJI, T. TUDA & A. FUJII .....	143
Number of spontaneous and induced ovulation in various strains of mice.	YOKOYAMA, M. & T. HASEGAWA .....	151
Loss of fertilizability of cumulus-free mouse oocytes upon exposure to DMSO and its prevention by fetal calf serum.	KOHNO, K., S. AZUMA & Y. TOYODA .....	156

Hirotada Tsuji

Laboratory of Animal Breeding and Reproduction, Faculty of Agriculture, University of Shinshu, Kamiina, Nagano, 399-45

**Abstract** Transfer of mouse early cleavage eggs into the mouse preimplantation uterus was carried out in this experiment. Completely denuded early cleavage eggs were obtained for 23.6% of the eggs recovered. This suggested that a proteolytic enzyme is contained in the preimplantation intrauterine fluid.

### Introduction

The zona pellucida that encloses an egg plays an important role in transportation and protection of the egg. Lysis of the zona pellucida in the mouse blastocyst began as early as the afternoon of Day 4 and was over by 2:00 a.m. of Day 5 of pregnancy<sup>1-4)</sup>. Lysis of the zona pellucida in the blastocyst is an essential process at the initiation of implantation, but its mechanism has not been completely clarified.

The zona pellucida in an early cleavage egg is easily lysed by proteolytic enzyme. This experiment was carried out to investigate whether lysis of the zona pellucida occurs in early cleavage eggs transferred into the preimplantation uterus.

### Materials and Methods

Mature virgin female mice of ICR strain, 6-9 weeks old and 25-35g in body weight, were kept in a light controlled room, supplied with water and a standard laboratory diet ad libitum. The mice at proestrous were caged overnight with males, and were checked for copulation plug the morning of the following day, which was set as the first day of pregnancy. At 1:00 p.m. of Day 1 of pregnancy, the oviduct was unilaterally exposed by a dorsal approach under anesthesia with pentobarbital sodium

and was ligated at the oviduct-uterus junction using a thin silk suture. The other oviduct was kept intact. At 1:00 p.m. of Day 4 of pregnancy, under reanesthesia with pentobarbital sodium the upper end of the uterus of the ligated side was punctured with a pin to transfer 6 to 14 1-cell and 2-cell stage eggs of Day 1 of pregnancy using a pipette. The mice were then autopsied from 2:30 to 7:00 a.m. of Day 5. The ligated oviduct, non-ligated oviduct and uterus were removed. Intraoviductal eggs were collected by tearing the oviduct. Intrauterine eggs were collected by flushing using a KRB buffer solution (pH 7.2). The collected eggs were examined by high-magnification microscopy to determine the presence or absence of zona pellucida.

### Results

One hundred and ninety-eight eggs of the 1-cell and 2-cell stage eggs were transferred to the preimplantation uteri of 20 mice. Total 89 eggs were recovered, the zona pellucida was completely lysed in 21 of them (Table 1).

Of 78 eggs collected from the ligated oviduct, 18 were degenerated. The cleavage stages ranged from the 1-cell stage to the hatched blastocyst stage. Lysis of the zona pellucida was found in 24 blastocysts (Table 2).

In the intact oviduct, there were 22/117 eggs, although the time was after 2:00 a.m. of Day 5 of pregnancy. The 22 eggs consisted of 6 denuded blastocysts, 8 segmentation spheres and 8 degenerated eggs. Of 95 eggs collected from the uterus of the non-ligated side, 74 were denuded blastocysts, 5 were blastocysts with zona pellucida and 16 were degenerated eggs (Table 2).

Table 1. Lysis of the zona pellucida in mouse early cleavage eggs transferred to the mouse preimplantation uterus.

No. of egg recovered/transferred*	Lysis of zoneae			eggs with zona pellucida			No. of degeneration
	1-cell	2-cell	4-cell	1-cell	2-cell	4-cell	
89/198	10	11	0	3	39	6	20

\* Total 20 mice.

Table 2. The number of denuded blastocysts in collected eggs from the ligated oviduct, non-ligated oviduct and uterus.

Site	Total no. recovered	No. of denuded eggs	eggs with zona pellucida			Degeneration
			1~8 cell	Morula	Blastocyst	
ligated oviduct	78	24	8	16	12	18
non-ligated oviduct	22	6	8	0	0	8
non-ligated uterus	95	74	0	0	5	16

\* Total 20 mice.

### Discussion

The zona pellucida was lysed in 23.6% of the eggs recovered from the early cleavage eggs which had been transferred into the preimplantation uteri. Mintz<sup>5, 6)</sup> has proposed that 'zona-lytic' activity in the uterine lumen is involved in implantation and that the factor responsible for lysis of zonae is also responsible for altering the surface of embryos and thus initiating embryo attachment. Hoversland & Weitlauf<sup>7)</sup> reported that preimplantation mouse embryos with intact zonae pellucidae were transferred into the uteri of ovariectomized females treated with progesterone, oestradiol-17 $\beta$  plus progesterone, or oestradiol-17 $\beta$  alone: lysis did occur when oestradiol-17 $\beta$  was combined with progesterone. They suggested that the disappearance of zonae from the uterine lumen was used to determine the presence of 'zona-lytic' activity *in situ*.

The factor responsible for lysing the zonae pellucidae and altering the embryo surface is thought to be a proteolytic enzyme or enzyme complex in uterine fluid<sup>6, 8-10)</sup>. Peak levels of 'zona-lytic' activity is induced within 18 h after removal of sucking young or an injection of oestradiol-17 $\beta$  into mice with lactational delay<sup>5, 11, 12)</sup> and between 12 and 24h after the injection of oestradiol-17 $\beta$  combined with progesterone<sup>7)</sup>, and these time coincided with the initiation of embryo attachment to the uterine epithelium<sup>7)</sup>. The present experiments are in agreement with the above reports.

Some of the transferred 1-cell and 2-cell stage eggs developed into 4-cell stage eggs but some others were degenerated. The presence of a considerable number of degenerated eggs in the uterus of the non-ligated side, the presence of eggs in the non-ligated oviduct even after 2:00 a.m. of Day 5 of pregnancy and the presence of eggs enclosed by the zona pellucida seemed to suggest that twice-performed surgical manipulation under anesthesia with pentobarbital sodium exerted some stress to the mice.

### References

- 1) Orsini, M.W. & McLaren, A. : J. Reprod. Fertil., 13, 485, 1967.
- 2) McLaren, A. : J. Reprod. Fertil., 14, 159, 1967.
- 3) Rumery, R. E. & Blandau, R. J. : Loss of zona pellucida and prolonged gestation in delayed implantation in mice. In The Biology of the Blastocyst. 115, The University of Chicago Press, 1971.
- 4) Tsujii, H. & Itoh, S. : J. Mamm. Ova Res., 3, 122, 1971.
- 5) Mintz, B.: Adv. Biosci., 6, 317, 1971.

- 6) Mintz, B.: Implantation-initiating factor from mouse uterus. In Biology of Fertilization and Implantation, 344, Thomas, Springfield.
- 7) Hoversland, R. C. & Weitlauf, H.M. : J. Reprod. Fert., 62, 111, 1981.
- 8) Bowman, P. & McLaren, A. : J. Embryol exp. Morph., 24, 331, 1970.
- 9) Pinsker, M.C., Sacco, A.G. & Mintz, B. : Devel. Biol., 38, 285, 1974.
- 10) Hoversland, R.C. & Weitlauf, H.M. : Biol. Reprod., 19, 908, 1978.
- 11) McLaren, A. : J. Endocrin., 42, 453, 1968.
- 12) McLaren, A. : J. Embryol. exp. Morph., 23, 1, 1970.

着床前の子宮内に移植されたマウス初期分割卵の透明帯剥離について

辻井 弘忠

信州大学農学部 家畜育種繁殖学教室

マウスの初期分割卵を着床前のマウス子宮に移植したところ、透明帯が完全に剥離した初期分割卵23.6%を得た。このことから、着床前の子宮液中にタンパク分解酵素が存在することが示唆された。

## In Vitro Fertilization of Hamster Eggs by Microinjection of Rabbit Spermatozoa

Kahei SATO<sup>1</sup>, Kazuya SHIOTA<sup>2</sup> and Tutomu GOTO<sup>2</sup>

Laboratory of Animal Cell Biology<sup>1</sup> and Laboratory of Animal Reproduction<sup>2</sup>,  
College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University  
Fujisawa 252, Japan

### Abstract

In the present study, in vitro fertilization of hamster eggs by microinjection of rabbit spermatozoa was investigated. The nuclei of frozen-thawed and lysophosphatidyl choline(LC)-treated rabbit spermatozoa were capable of developing into male pronuclei when injected into ovulated hamster eggs. When examined between 1 and 4 hr after injection of spermatozoa in all experimental groups, male pronucleus formation was observed. In some eggs with male and female pronuclei syngamy was seen.

### Introduction

In 1976, Uehara and Yanagimachi observed that unfertilized hamster eggs microinjected with isolated sperm nuclei were capable of undergoing egg activation and then the successful formation of both female and male pronuclei. Since Uehara and Yanagimachi's report was published, sperm microinjection has been reported by a number of workers(Uehara and Yanagimachi,1977; Thadani,1980;Perreault and Zirkin,1982;Markert,1983;Barg et al.,1986;Sato et al.,1976;Sato and Kaneta,1987;Lassalle et al., 1987;Lanzendorf et al.,1988;Lanzendorf et al.,1988;Perreault et al .,1988). Using this technique, the fertilizing ability of immotile or defective spermatozoa is capable of examination. Recent studies suggest its evidence (Lanzendorf et al., 1988;Lanzendorf et al.,1988). We already reported successful in vitro fertilization of rabbit eggs, using sperm microinjection techniques and that embryos obtained by microinjection of spermatozoa developed to the full term stage(Sato and Kaneta,1987). Microinjection of spermatozoa is considered to provide more detail information on mechanisms of fertilization and of male gamete physiology in mammals. In the present work, we traced behavior of rabbit spermatozoa after its' microinjection into hamster eggs.

### Materials and Methods

A modified tyrode's solution(mTALP,Yanagimachi,1982) was used as the regular medium. This medium is useful for the induction of capacitation of rabbit spermatozoa(Sato and Suzuki,1985). All

media were prepared immediately before use. Cultures were in petri dishes(35 mm,Falcon) at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in air. Semen samples were collected from 5 males proven fertility by an artificial vagina(Sato,1984) and the samples were pooled. Pooled samples were mixed in a 1:1 dilution of the fresh medium and sperm suspensions were centrifuged at 800 r.p.m. for 6 min. Sperm clots were resuspended in the fresh medium and then supplied for experiments. Some samples of washed spermatozoa suspended in the medium were frozen by placing at -23°C for 3 hr. Frozen samples were thawing immediately before use. Other sperm samples were incubated in the regular medium for 5 hr and then exposed to lysophosphatidyl choline(LC)(50 ug/ml medium) for 15 min in order to induce the acrosome reaction. By this procedure in 68-86% spermatozoa exposed to LC the acrosome reaction was observed. Immediately before use, the sperm suspension was diluted by addition of the medium.

Adult females of golden hamsters were superovulated by intraperitoneal injection of 30 IU pregnant mare serum gonadotropin(PMSG,Tekoku Zoki Co.) followed by 30 IU human chorionic gonadotropin(hCG,Tekoku Zoki Co.) 54 hr later. The females were killed 15 hr after hCG injection and then ovulated egg were collected by flushing oviducts with the medium. Collected eggs were pooled and applied for microinjection performed 30 min later.

Micropipets were made by pulling glass capillary tubes on a vertical pipet puller(Narishige Inst.). The pulled pipet tip was beveled by grinding at an angle of 26° on a Narishige rotating grinding wheel. The ID of injected pipets was about 8-12 um. Holding pipets were pulled by Narishige puller from capillary tubes. The tip of holding pipets(ID 20-25 um) was polished using a microforge(Narishige Inst.). A spermatozoon for injection was picked up from sperm head by the tip of the injection pipet(Fig 1-a) and the egg was maintained by the holding pipet. The sperm injection pipet was inserted into egg cytoplasm through the zona pellucida(Fig 1-b and -c) and the held spermatozoon was injected by a slight pressure on the injecting syringe. Eggs microinjected were then cultured for 3 hr(Fig 1-d). At various intervals after the start of culture eggs were observed by the phase-contrast microscope.

### Results

As shown in Fig 1, injected rabbit spermatozoa first were a well defined shape. The head of spermatozoa injected swelled gradually and transformed into a male pronuclei. The sperm head swelled by 1 hr after injection. When examined between 4 and 4.5 hr after injection of fresh spermatozoa, of 21 eggs only 2 contained male and female pronuclei. The spermatozoa which had been frozen-thawed or treated with LC were capable of transforming into male pronuclei when they were injected microsurgically into hamster eggs. Male pronucleus formation rates by frozen-thawed and LC-treated spermatozoa were 44.7%(17/39 eggs) and 37.1%(13/35

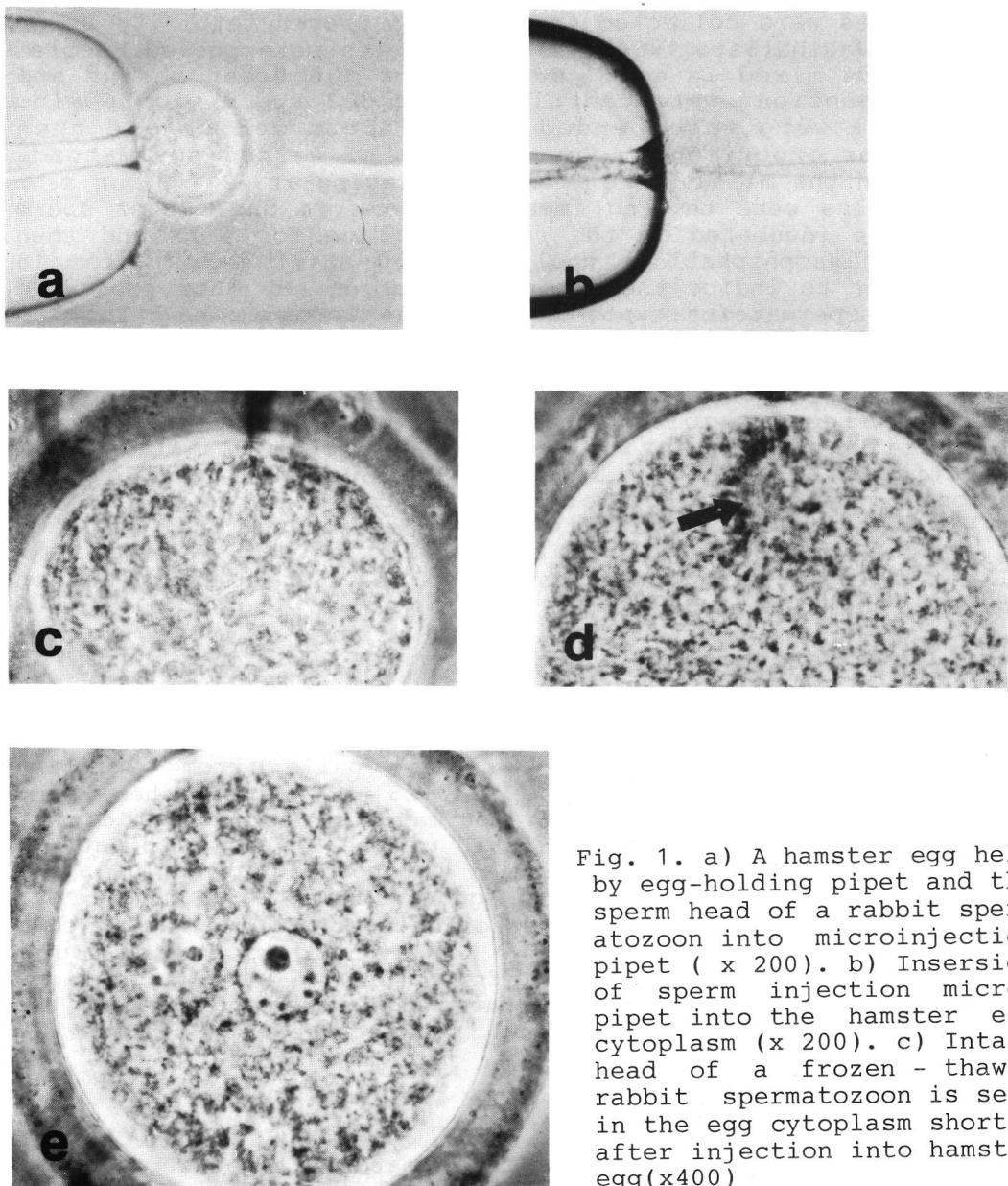


Fig. 1. a) A hamster egg held by egg-holding pipet and the sperm head of a rabbit spermatozoon into microinjection pipet ( $\times 200$ ). b) Insertion of sperm injection micro-pipet into the hamster egg cytoplasm ( $\times 200$ ). c) Intact head of a frozen - thawed rabbit spermatozoon is seen in the egg cytoplasm shortly after injection into hamster egg( $\times 400$ )

d) A frozen-thawed rabbit sperm head swelling (arrow) in the egg cytoplasm 2 hours after injection( $\times 400$ ). e) A hamster egg with two pronuclei, the left one is judged to be a male pronucleus which developed from a injected rabbit spermatozoon, 3 hours after injection( $\times 400$ ).

eggs), respectively. The polynucleus formation of spermatozoa was observed in cases of 2 or more spermatozoa injection.

#### Discussion

In the present study we succeeded fertilization by rabbit spermatozoa into hamster eggs. From the present results, also, it is suggested that frozen-thawed and LC-exposing treatment of rabbit spermatozoa is available for inducing the acrosome reaction. Uehara and Yanagimachi(1976) have reported that frozen-thawed and freeze-dried human spermatozoa are capable of developing into male pronuclei when injected into hamster eggs. The acrosome reaction is necessary for fusion of sperm membrane and egg membrane. LC is known to induce the acrosome reaction of guinea pig(Fleming and Yanagimachi,1981) and hamster(Ohzu and Yanagimachi,1982)spermatozoa. Also, we observed ultrastructually that acrosomes of hamster and rabbit spermatozoa were destructed by freezing spermatozoa(unpublished). Although the status of acrosomes of rabbit spermatozoa was not examined after both treatments, acrosomes of spermatozoa which developed into male pronuclei are considered to remove or destructure by two treatments used in the present study.

In the present study, we observed low pronucleus formation (44.7%) in frozen-thawed spermatozoa. Also, male pronucleus formation by injection of LC-treated spermatozoa was 37.1%. The present results suggest that there is no significant difference for inducing the acrosome reaction between two sperm treatments used. We have already observed that frozen-thawed hamster spermatozoa injected into hamster eggs undergo decondensation or male pronucleus formation(74.8%)(kaneta and sato,1987). A recent study have pointed out that sperm nuclei of heterologous species undergo decondensation at very different rates(Perrault et al.,1988). These results mentioned above including our results indicate species differences in sperm nuclear decondensation or male pronucleus formation. Further studies are required on this problem.

#### References

- 1) Barg, P.A., Wahrman, M.Z., Talansky, B.E. and Gordon, J.W.(1986) Capacitated, acrosome reacted but immotile sperm, when microinjected under the mouse zona pellucida, will not fertilize the oocyte. *J.Exp.Zool.*, 237, 365-374.
- 2) Fleming, A. and Yanagimachi, R.(1981) Effects of various lipids on the acrosome reaction and fertilizing capacity of guinea pig spermatozoa with special reference to the possible involvement of lysophospholipids in the acrosome reaction. *Gamete Res.*, 4, 253-273.
- 3) Kaneta, H. and Sato, K.(1988) Change of rabbit sperm cells after microinjection into hamster oocytes. *Jpn.J.Fertil Steril.*, 33, 235.

- 4) Lanzendorf, S., Ackerman., M.M., Acosta, A. and Hodgen, G.(1988) Fertilizing potential of acrosome defective sperm following microsurgical injection into eggs. *Gamete Res.*, 19, 329-337.
- 5) Lanzendorf, S.E., Slusser, J., Maloney, M.K., Hodgen, G.D., Veek, L.L. and Rosenwaks, Z.(1988) A preclinical evaluation formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil Steril*, 49, 835-842.
- 6) Lassalle, B., Courtot, A.M. and Testart, J.(1987) In vitro fertilization and human oocytes by microinjection of human sperm. *Gamete Res.*, 16, 69-78.
- 7) Markert, C.L.(1983) Fertilization of mammalian eggs by sperm injection. *J.Exp.Zool.*, 228, 195-201.
- 8) Ohzu, E. and Yanagimachi, R.(1982) Acceleration of acrosome reaction in hamster spermatozoa by lyssolecithin. *J.Exp.Zool.*, 224, 259-263.
- 9) Perreault, S.D. and Zirkin, B.R.(1982) Sperm nuclear decondensation in mammals: role of sperm-associated proteinase in vivo. *J.Exp.Zool.*, 224, 253-257.
- 10) Perreault, S.D., Barbee, R.R., Elstein, K.H., Zucker, R.M. and Keefer, C.L.(1988) Interspecies differences in the stability of mammalian sperm nuclei assessed in vivo by sperm microinjection and in vitro by flow cytometry. *Biol.Reprod.*, 39, 157-167.
- 11) Sato, K.(1984) In vitro fertilization of ejaculated rabbit sperm cells. *Jpn.Fertil.Steril.*, 29, 179-185.
- 12) Sato, K. and Suzuki, Y.(1985) In vitro fertilization of rabbit eggs by ejaculated spermatozoa capacitated in a modified Tyrode's solution. *J.Mamm.Ova Res.*, 2, 149-155.
- 13) Sato, K., Endo, M. and Wakata, S.(1986) Fertilization of rabbit eggs by sperm injection. 12th World Congress on Fertility and Sterility, Abstract: No.2, 841.
- 14) Sato, K., and Kaneta, H.(1987) Development of rabbit embryos from eggs injected microsurgically with sperm cells. With World Congress on Human Reproduction, Abstract: 246.
- 15) Thadani, V.M.(1982) A study of hetero-specific sperm-egg interactions on the rat, mouse and deer mouse using in vitro fertilization and sperm injection. *J.Exp Zool.*, 212, 435-441.
- 16) Uehara, T. and Yanagimachi, R.(1976) microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol.Rerod.*, 15, 467-470.
- 17) Uehara, T. and Yanagimachi, R.(1977) Behavior of nuclei of testicular, caput and cauda epididymal spermatozoa injected into hamster eggs. *Biol.Reprod.*, 16, 315-321.

ハムスター卵子細胞質内へのウサギ精子マイクロインジェクションによる受精について

佐藤 嘉兵<sup>1</sup>、 塩田 和也<sup>2</sup>、 後藤 勤<sup>2</sup>

日本大学農獣医学部 <sup>1</sup>動物細胞学教室、 <sup>2</sup>家畜繁殖学教室

ハムスター卵子の細胞質中へマイクロマニピュレーターを用いてウサギ精子を注入して、それ以後に起こる受精変化について観察を行なった。凍結-融解処理、あるいはlysophosphatidyl choline(LC)感作処理をおこなったウサギ精子頭部はハムスター卵子細胞質中で雄性前核に発生することが確認できた。各処理群の精子はマイクロインジェクション後、1から4時間において前核形成を示した。少数の卵子においては形成された雄性前核は卵子の中央部に移動して雌性前核と一見融合する様な像を示した。

# 射出精子によるウサギ卵胞卵の体外受精

In Vitro Fertilization of Rabbit Follicular Oocytes

by Ejaculated Spermatozoa

亀山祐一・石島芳郎

Yuichi KAMEYAMA and Yoshiro ISHIJIMA

東京農業大学農学部畜産学科

Department of Zootechnical Science, Faculty of Agriculture,  
Tokyo University of Agriculture

(現在：東京農業大学生物産業学部生物生産学科)

The present study was undertaken to examin the method for in vitro fertilization of rabbit follicular oocytes by ejaculated spermatozoa.

Ovaries were removed from superovulated females 9 hour after HCG injection. Oocytes were collected by puncturing follicles of 1~5 mm in diameter. Ovulated oocytes were recovered 15 hour after HCG injection. Zygote and two-cell ova were collected 18 or 24 hours after mating and HCG injection. Ejaculated spermatozoa was collected from bucks by artificial vagina. BO medium was used for in vitro fertilization, sperm washing and preincubation of ejaculated spermatozoa and follicular oocytes. The media used for in vitro culture of zygote and two-cell ova was BO, TCM199 and M16. TCM199 and M16 were added 20% heat-inactivated rabbit serum (RS) or fetal bovine serum (FCS). In vitro insemination was done in 1.0 ml BO medium added preincubated spermatozoa ( $1 \times 10^6 / \text{ml}$ ) for 8 hours.

Results obtained are as follow : 1)Acrosome reaction was hardly observed just after sperm collection. But, when spermatozoa incubated for 6 hours, 30% of them showed acrosome reaction. 2)Oocytes collected at 9 hours after HCG injection resumed meiosis, but part of them completed maturation division. Completion of maturation required additional 4 hours incubation. 3)No oocytes without preincubation observed sperm entry at 8 hours after insemination. 4 hours preincubation produced 15% fertilized oocytes. 4)Zygote and two-cell

ova collected at 24 hours after mating and HCG injection cultured in five media. Good results obtained in TCM199+FCS, M16+RS and M16+FCS. Furthermore, 81.4% of zygotes collected at 18 hours after mating and HCG injection developed to blastocysts in M16+RS. 510.6% of ovulated oocytes fertilized in vitro were cleaved at 24 hours after insemination and 20% of them formed blastocyst in M16+RS. 6.2% of oocytes preincubated for 4 hours and fertilized in vitro were cleaved but no one formed blastocyst.

### 緒 言

近年、哺乳動物卵胞卵の体外成熟・体外受精に関する研究はウシおよびブタを中心として活発に行われている。しかし、これら大家畜は経済動物であるがゆえに研究材料が屠場材料に限定される場合が多く、より詳細な基礎研究を遂行するためには、実験動物で代替することが要求される。

比較的大型な実験動物であるウサギは、射出精子および卵胞卵の採取が容易であり、なおかつ過排卵、体外培養、胚移植などの周辺技術が整備されているため、家畜のモデルとして極めて有効であると思われる。

ウサギ卵胞卵の体外受精は、1968年にSuzuki and Mastroianni(1968)が試みて以来、子宮内射出精子(Suzuki and Mastroianni 1968, Brackett et al. 1972, Mills et al. 1973, Hahn et al. 1980, Trotnow et al. 1981, Asakawa et al. 1988)あるいは精巣上体精子(Sato 1981, 細井ら 1987)を用いて行われ、卵管卵よりも受精率および受精後の胚発生率は劣るが正常産子(Mills et al. 1973, Trotnow et al. 1981)を得るところまでこぎつけている。しかし、受精能獲得がより困難な射出精子を用いた場合については、ほとんど報告が見られないのが現状である。

そこで本実験では、射出精子による排卵前ウサギ卵胞卵の体外受精法、特に射出精子の先体反応誘起、受精および受精後の発生能に及ぼす卵胞卵前培養の影響について検討した。

### 材料および方法

本実験には、日本白色種および雑種の成熟未経産雌と日本白色種の成熟雄を供試した。供試卵は、石島ら(1968, 1969<sup>a</sup>)の方法で過排卵処理した雌より採取した。卵胞卵は、過排卵処理ウサギの排卵がHCG注射後9~10時間で開始され、14~15時間で終了することが知られているので(石島ら 1969<sup>b</sup>)、HCG注射後9時間に、排卵直後の未受精卵は、HCG注射後15時間に回収した。培養成績の比較のための受精1細胞期卵および2細胞期胚は、交配およびHCG注射後18時間および24時間にそれぞれ回収した。卵の採取には、20%のウサギ非動化血清(RS)を添加したPBSを用い、卵胞卵は可視卵

胞を有柄針で穿刺することにより、また卵管卵は卵管を上向灌流することにより採取した。卵胞卵は体外受精に先立ち、BO液1.0ml 当り5個前後の卵を収容し、2~6時間前培養した。培養卵胞卵の一部については、成熟段階を検査した。

精液は、採取前2日間以上を禁欲期間とした雄ウサギより、当研究室で考案した人工腔（亀山・石島 1989）を用いて採取した。精子の洗浄は、5mlのBSA欠BO液 (Brackett and Oliphant 1975) で希釈し、50G 5分間の遠心分離後に上清を採取して、350G 10分間の遠心分離を2回繰り返すことにより行った。精子前培養はBO液を用い、精子濃度が $1 \times 10^8 / \text{ml}$ となるよう調整して2~12時間行った。これらの前培養精子は、経時的に精子生存指数と先体反応誘起率を検査した。なお、先体反応精子の判別にはBryan and Akruck(1977)の染色法を用いた。

体外受精は、採取直後および4時間前培養した卵胞卵について行った。媒精は、2~4時間前培養した精子を $1 \times 10^6 / \text{ml}$ となるよう添加したBO液1.0mlに5個前後の卵を入れ、8時間行った。媒精終了後、一部の卵は受精状態を観察し、残る卵はピペッティングにより洗浄した後に、発生用培地に移した。培養条件は、すべて炭酸ガス5%、空気95%、湿度100%、温度37°Cとした。

## 結 果

### 1) 射出精子の体外における先体反応の誘起

5頭の雄から採取した射出精子をBO液中で前培養し、その精子生存指数と先体反応誘起率を経時に観察した結果を表1に示した。先体反応精子は採取直後にはほとんど観察されなかつたが、洗浄、前培養を行うことにより、前培養3時間の時点では平均25%、6時間以後で平均30%程度の精子に先体反応が誘起された。精子生存指数は、ほぼ直線的に低下した。また、先体反応誘起率、精子生存指数ともに若干の個体差が認められた。

### 2) 排卵前卵胞卵の体外成熟

HCG注射後9時間に回収した排卵直前の卵胞卵を前培養し、その成熟段階を経時に観察した結果を表2に示した。採取直後(培養0時間)の卵胞卵は、検査した33個すべてが中期I(Met I)以降の成熟分裂像を示し、すでに減数分裂を再開していた。成熟を完了したと思われる中期II(Met II)の分裂像を示す卵胞卵は、前培養0時間の時点では51.5%にすぎなかつたが、前培養2時間で65.2%と上昇し、前培養4時間以降は79.2および73.9%とほぼ一定値を示した。

### 3) 排卵前卵胞卵の体外受精に及ぼす卵胞卵前培養の効果

表2の結果を参考に、BO液中で4時間前培養した排卵直前の卵胞卵を体外受精に供試し、授精後8時間の段階で固定、染色して受精状況を観察した。その結果は表3に示す通りである。体外受精に

Table 1 Acrosome reaction of rabbit ejaculated spermatozoa incubated in vitro.

Rabbit No.	1	2	9	13	15	Total
No. of tests	3	3	5	2	3	16
Mean biability index after collection	90.0	95.0	76.0	87.5	86.7	85.6
Acrosome reaction(%)*	1.5	3.8	5.8	0.9	2.0	2.5
0hr Mean biability index	69.2	91.7	65.0	77.5	78.3	74.8
Acrosome reaction(%)	8.4	4.1	22.8	9.9	8.2	12.2
3hr Mean biability index	46.3	60.0	44.0	60.0	62.5	52.9
Acrosome reaction(%)	11.8	7.4	48.2	25.3	17.3	25.1
6hr Mean biability index	39.6	51.3	22.0	52.5	45.8	39.1
Acrosome reaction(%)	17.2	10.7	49.5	28.0	28.2	29.5
9hr Mean biability index	16.3	35.0	15.0	43.8	25.8	24.6
Acrosome reaction(%)	23.0	11.1	55.0	53.3	23.5	31.1
12hr Mean biability index	9.2	29.2	8.3	32.5	15.8	16.8
Acrosome reaction(%)	21.8	13.2	52.0	51.0	31.1	31.9

\*Acrosome reaction rate after collection is n=2, n=3, n=1, n=3, n=1 and n=10, respectively.

Table 2 Stages of maturation division of preovulatory rabbit  
follicular oocytes preincubated in vitro.

	No. of oocytes cultured	No. of oocytes examined	Met I (%)	Ana I (%)	Tel I (%)	ProMet II (%)	Met II (%)
0 hr	35	33	5 (15.2)	2 (6.1)		9 (27.3)	17 (51.5)
2 hr	25	23	4 (17.4)		1 (4.3)	3 (13.0)	15 (65.2)
4 hr	26	24	2 (8.3)			3 (12.5)	19 (79.2)
6 hr	25	23	2 (8.7)	1 (4.3)		3 (13.0)	17 (73.9)

Table 3 In vitro fertilization of preovulatory rabbit follicular oocytes preincubated in vitro.

Duration of preincu- bation	No. of oocytes utilized	No. of oocytes examined	G	V	Met I	Pro Met II	Met II Ana II	Total (%)	No. of fertilized oocytes Met II Ana II Tel II ProN	Total (%)			
0 hr	43	42	1		4	37 (9.5)	37 (88.1)	42 (100.0)					
4 hr	110	101	1	5	5	73 (5.8)	2 (84.9)	86 (2.3)	3 (85.1)	2 (20.0)	5 (13.3)	5 (33.3)	15 (14.9)

は、表1の結果を参考に2~4時間前培養した射出精子を用いた。対照区としては、卵胞卵を前培養なしに体外受精する区を設けた。

前培養なし(0時間)で体外受精した卵胞卵は、検査した42個のうち37個(88.1%)がMet IIに達していたにもかかわらず、いずれも精子侵入が認められず未受精と判定された。これに対し4時間前培養してから体外受精した卵胞卵は、101個中15個(14.9%)に精子侵入が観察され、卵胞卵前培養による受精能向上が認められた。これら15個の受精卵のうち14個(93.3%)が単精子侵入卵であり、うち5個が前核期卵であった。

#### 4) 体外受精卵の発生用培地の選択

体外受精卵の発育に至適な培養液を選択するために、交配およびHCG注射後24時間に回収した2細胞期胚および1細胞期卵を5種類の培養液で120時間培養し、胚盤胞および拡張胚盤胞への発育を観察した。その結果は表4に示す通りである。比較的良好な成績を示したのは、TCM199+FCS、M16+RSおよびM16+FCSの3種の培養液であった。これら3種の培養液の2細胞期胚(1細胞期卵)から胚盤胞以降への発育率は、TCM199+FCSが80.0%(60.0%)、M16+RSが92.9%(60.0%)、M16+FCSが70.4%(62.9%)でいずれも有意な差は認められなかった( $P < 0.05$ )。

Table 4 Culture of one- and two-cell rabbit ova collected about 24hr after HCG injection.

Medium	Cell stage	No. of ova cultured	No. and (%) of ova developed to:		Total (%)
			Blastocyst	Expanding blastocyst	
B0	2 cell	23	0 ( 0 )	0 ( 0 )	0 ( 0 )
	1 cell	31	0 ( 0 )	0 ( 0 )	0 ( 0 )
TCM199 + RS	2 cell	56	15 (26.8)	14 (25.0)	29 (51.8)
	1 cell	68	11 (16.2)	1 ( 1.4 )	12 (17.6)
TCM199 + FCS	2 cell	15	1 ( 6.7 )	11 (73.3)	12 (80.0)
	1 cell	25	5 (20.0)	10 (40.0)	15 (60.0)
M16 + RS	2 cell	42	13 (31.0)	26 (61.9)	39 (92.9)
	1 cell	40	14 (35.0)	10 (25.0)	24 (60.0)
M16 + FCS	2 cell	27	11 (40.7)	8 (29.6)	19 (70.4)
	1 cell	35	9 (25.7)	13 (37.1)	22 (62.9)

Table 5 In vitro development of ovulatory and preovulatory rabbit oocytes fertilized in vitro.

Type of oocyte	No. of oocytes examined	No. of oocytes cleaved	No. and (%) of oocytes developed to:			
			2~4cell	8~16cell	Morula	Blastocyst
Ovulatory	47	5 (10.6)	2 (40.0)	1 (20.0)	1 (20.0)	1 (20.0)
Pre- ovulatory	113	7 (6.2)	0 (0)	7 (100)	0 (0)	0 (0)

## 5) 前培養後体外受精したウサギ卵胞卵の体外発育

体外受精卵の培養に先立ち、M16+RSを用いて交配およびHCG注射後18時間に回収した1細胞期卵を144時間まで培養したところ、81.4%の卵が胚盤胞以上に発育した。

次に、HCG注射後9時間に回収してBO液中で4時間前培養した卵胞卵とHCG注射後15時間に回収した卵管卵を体外受精し、授精後8時間の段階でM16+RSに移して144時間培養してた。その結果は表5に示す通りである。卵管卵は、受精後24時間の段階で47個中5個(10.6%)が分割を示した。これら5個の分割卵のうち、2個が2~4細胞期で発育を停止したものの、1個が8~16細胞期胚に、1個が桑実期胚に発育し、残る1個(20.0%)が胚盤胞に発育した。

一方、BO液中で前培養した卵胞卵は、受精後24時間で113個中7個(6.2%)が分割を示した。しかしながら、いずれも8~16細胞期胚で発育を停止し、胚盤胞を形成するには至らなかった。

## 考 察

今回の実験の結果、ウサギ射出精子をBO液中で前培養することにより、前培養3時間で25%、6時間以降で30%程度の精子に先体反応を誘起できた。この先体反応誘起率は、高張液で8分間処理後、40%ウシ卵胞液を含むBO液中で2時間IncubateしたOliphant(1976)の30%およびノイラミニダーゼ添加BO液で6時間IncubateしたSrivastava et al.(1988)の27.8%という報告と良く一致した。先

体反応誘起率を個体別に見ると若干の個体差が認められ、この個体差が射出精子を用いた体外受精系における受精率の個体差(Brackett and Oliphant 1975, Kubo 1977, Akruk et al. 1979)と関係するものと思われる。

また、本実験においては、採取直後に2.5%、洗浄終了時に12.2% の先体反応精子が観察された。採取直後については先体異常と考えられるが、洗浄終了時については採取から培養開始まで約1時間半を要したことから、この間に先体反応を起こしたものと考えられる。この事実は、Brackett and Oliphant(1975)が20分間B〇液中で処理した射出精子を用いて体外受精を行い、受精卵を得ている事実によっても裏づけられる。

本実験では、先体反応の判定に Bryan and Akruk(1977)の染色法を用いたが、同法は先体の有無しか判定できず、トリプルステイン(楠ら 1984, 1987)のように生死判別を同時に行えない難点があった。しかし、ウサギ射出精子は加熱、高pH、低pHで死滅後にIncubateしても先体損傷が起こらないことはすでに確かめられており(Oliphant 1976)、少なくとも本実験で判定された先体反応精子は、生存先体反応精子か、先体反応後に死滅した精子であると考えられる。一方、受精能獲得は、精子原形質膜からの糖蛋白除去による生理的変化であり、先体反応は受精能獲得後に起こる形態的変化である(柳町・岩松 1974, 野田 1976, 入谷 1981)ことから、実際の受精能獲得精子の割合は、先体反応精子の割合より多いものと思われる。さらに、精子生存指数が経時に低下することを考えると、本実験系により前培養した精子を体外受精に用いる場合には、3時間前後前培養するのが適当と思われた。

一般に哺乳動物は、ウマ、イヌなどの特殊なものを除けば第一極体を持った状態で排卵され、その割合はウサギでは80%程度とされている(鈴木 1981)。本実験においても、排卵直前にあたるHCG注射後9時間における直径1~5mmの卵胞を穿刺して卵胞卵を回収したところ、第一極体を持つ卵胞卵は75%程度であった。さらに、metaphase IIを示す卵胞卵の割合は51.5%にすぎなかったが、HCG注射後10時間に回収を行ったBrackett et al. (1972)の72.7%と概ね一致した。このmetaphase IIの低出現率は、種特有の排卵時における成熟段階はもちろんのこと、過排卵処理ウサギの排卵時間がかなり幅がある(石島ら 1969<sup>b</sup>)ことも関与したと思われる。このことは、排卵直前の卵胞卵を用いて体外受精を行う場合でも、卵の未熟性について考慮する必要があることを示唆している。

採取した卵胞卵をB〇液中で培養したところ、prometaphase IIおよびmetaphase IIを示す卵胞卵の割合は経時に上昇し、前培養4時間の段階でほぼ一定値を示した。今回得られた成熟率は、prometaphase IIおよびmetaphase IIを成熟完了と考えると90%程度であり、GV卵胞卵を成熟培養した場合(Thibault 1972, Motlik and Fulka 1974, Smith et al. 1978, Bae and Foote 1975<sup>a,b</sup>)とほぼ同等の成績であった。

無処理雌より採取したG V卵胞卵の成熟は、体内、体外にかかわらず8~11時間要するとされている (Chang 1955, Thibault 1972)。本実験においては成熟に達するまでに体内9時間、体外4時間の合計13時間を要したので若干の成熟分裂の遅れが認められた。この遅れは採卵時すでに2~3時間に相当する成熟段階のずれが認められたことに起因すると考えられる。

次に、これまで得た結果を参考に、採取直後(前培養0時間)および4時間前培養した卵胞卵を体外受精したところ、前培養0時間の卵胞卵はすべて未受精であった。これに対して4時間前培養した卵胞卵は約15%の卵が受精し、卵胞卵前培養により受精能が向上した (Suzuki and Mastroianni 1968, 中渕ら 1988)。この受精率は、子宮精子を用いて排卵直前の卵胞卵を体外受精した場合の40~70% (Brackett et al. 1972, Mills et al. 1973, Hahn et al. 1980, Trotman et al. 1981, Asakawa et al. 1988)に比べるとかなり低いが、射出精子を合成培地中で受精能獲得させて体外受精しても必ずしも良好な成績が得られていない (Brackett and Oliphant 1975, Kubo 1977, Brackett et al. 1978, Akrum et al. 1979, Sato 1984, 1985)、妥当な成績と言えるかもしれない。

今回の実験では、卵管卵を体外受精すると前核形成は受精後4~9時間に起こる (Brackett 1970, 沖永 1972, Kubo 1977, 細井ら 1981) という報告を参考に、授精後8時間の段階で固定、染色した。しかしながら、この段階では前核形成が認められた受精卵は33.3%にすぎず、前核期への移行が完了していないものと思われた。これは、HCG後10時間の卵胞卵を体外受精すると前核形成は受精後8.25~14時間に起こるというBrackett et al. (1972) の報告と一致し、卵胞卵は卵管卵に比べて前核形成が遅れることが示唆された。未受精卵の成熟段階は、前培養時間にかかわらずほとんどの卵がpro-metaphase II以降に達しており、前培養0時間の卵胞卵は 培養中に成熟を完了したものと思われた。一方、4時間前培養した卵胞卵の未受精卵のうち、2.3%に精子進入が認められない anaphase IIの像が観察された。これは未受精卵が何らかの刺激で附活化され、単為発生を起こしたものと思われる。

体外受精卵の発生率は体内受精卵のそれに比べて低いとされており、至適な発生用培地を選択することは成否の鍵を握るともの思われる。そこで、5種類の培地を用いて2細胞期胚および1細胞期卵の発生試験を行ったが、B0液以外の培地では胚盤胞以降への発育が観察され、とりわけTCM199+FCSとM16+RSにおいて良好な発育率が得られた。このため、M16+RSを用いて排卵直後にあたる交配およびHCG注射後18時間の1細胞期卵を培養したところ、従来の報告 (Ogawa et al. 1971, Kane 1972, 1974, Kane and Buckley 1977, Kane and Headon 1980, 小野寺ら 1987) と一致し、交配およびHCG注射後24時間に回収した2細胞期胚および1細胞期卵の培養成績に劣らない良好な結果が得られた。すなわち、M16+RSは受精直後のウサギ1細胞期卵の培養に至適で、体外受精卵をも十分に胚盤胞に発育せしめることが推測された。

射出精子による体外受精卵の分割能は低く、卵管卵を用いた場合でも供試卵の15~40%が分割を示すにすぎない(沖永 1972, Brackett and Oliphant 1975, Kubo 1977, Brackett et al. 1978, Akruk et al. 1979, Sato 1984)。本実験においても、10.6%とほぼ同程度の卵管卵が分割したにすぎず、さらに胚盤胞まで発育したものはごく一部にすぎなかった。一方、排卵直前のウサギ卵胞卵は、子宮精子を用いた場合には10~80%程度の分割卵が得られることが報告されており(Suzuki and Mastroianni 1968, Brackett et al. 1972, Mills et al. 1973, Hahn et al. 1980, Trotnow et al. 1981)、体外受精後の分割能は卵管卵と差がないものと思われる。本実験においては、射出精子を用いて体外受精を行ったために分割率自体は低いものであったが、卵管卵と卵胞卵の差は認められず、同様の傾向がうかがわれた。さらに、分割卵の胚盤胞への発育率については、Hahn et al.(1980)およびTrotnow et al.(1981)が40%前後と卵管卵に遜色ない成績を得ているが、本実験では大部分の卵が8~16細胞期胚で発育を停止し、ここでは卵胞卵前培養の効果は(中湯・田中 1988)は認められなかった。

### 要 約

排卵前ウサギ卵胞卵の体外成熟および射出精子による体外受精法について検討した。

- 1) 人工膜で採取した射出精子をB〇液中で前培養したところ、前培養3時間の時点で25%、6時間以降で30%程度の精子に先体反応が誘起された。
- 2) HCG注射後9時間に卵胞卵を回収したところ、いずれの卵胞卵も成熟分裂を再開していたが、一部の卵は成熟を完了しておらず、すべての卵が成熟を完了するには4時間の体外培養を必要とした。
- 3) 前培養0および4時間の卵胞卵を2~4時間前培養した射出精子で体外受精し、受精後8時間で固定、染色したところ、前培養0時間の卵胞卵は検査した42個すべてが未受精であったが、前培養4時間の卵胞卵は101個中15個(14.9%)が受精し、卵胞卵前培養の効果が認められた。
- 4) 交配、HCG注射後24時間に回収した2細胞期胚および1細胞期卵を5種類の培養液で培養し、胚盤胞以降への発育を観察したところ、TCM199+FCS(80.0および60.0%)、M16+RS(92.9および60.0%)、M16+FCS(70.4および62.9%)において良好な発育が認められた。さらに、M16+RSは交配、HCG注射後18時間に回収した1細胞期胚の81.4%を胚盤胞以降に発育させたことから、体外受精卵の発生用培地に適するものと思われた。
- 5) HCG注射後15時間に回収した卵管卵とHCG注射後9時間に回収し、4時間前培養した卵胞卵を体外受精、培養したところ、卵管卵は47個中5個(10.6%)が2~4細胞期胚に発育し、そのうち1個(20.0%)が胚盤胞を形成した。これに対して前培養した卵胞卵は113個中7個(6.2%)が2~4細胞期胚に発育したが、いずれも8~16細胞期胚で発育を停止し、胚盤胞を形成するには至らなかった。

文 献

- 1)Akruk, S. R., Humphreys, W. J. and Williams, W. J. (1979) : In vitro capacitation of ejaculated rabbit spermatozoa. *Differentiation*, 13, 125-131.
- 2)Asakawa, T., Ishikawa, M., Shimizu, T. and Dukelow, W. R. (1988) : The chromosomal normality of in vitro-fertilized rabbit oocytes. *Biol. Reprod.*, 38, 292-295.
- 3)Bae, I. -H. and Foote, R. H. (1975a) : Carbohydrate and amino acid requirements and ammonia production of rabbit follicular oocytes matured in vitro. *Exp. Cell Res.*, 91, 113-118.
- 4)Bae, I. -H. and Foote, R. H. (1975b) : Effects of hormones on the maturation of rabbit oocytes recovered from follicles of various sizes. *J. Reprod. Fert.*, 42, 357-360.
- 5)Brackett, B. G. (1970) : In vitro fertilization of rabbit ova: time sequence of events. *Fertil. Steril.*, 21, 169-176.
- 6)Brackett, B. G., Mills J. A. and Jeitles, G. G. (1972) : In vitro fertilization of rabbit ova recovered from ovarian follicles. *Fertil. Steril.*, 23, 898-909.
- 7)Brackett, B. G. and Oliphant, G. (1975) : Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* 12, 260-274.
- 8)Brackett, B. G., Hall, J. L. and Oh, Y. K. (1978) : In vitro fertilizing ability of testicular, epididymal, and ejaculated rabbit spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 29, 571-582.
- 9)Bryan, J. H. D. and Akruk, S. R. (1977) : A naphthol yellow S and erythrosin B staining procedure for use in studies of the acrosome reaction of rabbit spermatozoa. *Stain Technol.*, 52, 47-51.
- 10)Chang, M. C. (1955) : The maturation of rabbit oocytes in culture and their maturation, activation, fertilization and subsequent development in the fallopian tubes. *J. Exp. Zool.*, 128, 379-405.
- 11)Hahn, J., Al-Hasani, S. and Schneider, U. (1980) : In vitro fertilization of preovulatory rabbit oocytes. World Conference for instrumental insemination, in vitro fertilization, and embryo transfer. *Arch. Androl.*, 5, 63-64(abstr.).
- 12)細井美彦, 丹羽皓二, 入谷明 (1981) : ウサギ精巢上体精子の体外における受精能獲得と卵子の体外受精. 日畜学会第72回大会講演要旨, 145.
- 13)入谷明 (1981) : 精子. 哺乳動物の初期発生 (妹尾左知丸, 加藤淑裕, 入江明, 鈴木秋悦, 菊鄰

編), 7-23, 理工学社, 東京.

- 14)石島芳郎, 伊藤雅夫, 平林忠, 佐久間勇次 (1968) : PMSによる家兎の過排卵誘起におけるEstrogen併用の効果. 家畜繁殖誌, 14, 43-46.
- 15)石島芳郎, 伊藤雅夫, 田暢淇 (1969a) : PMSによる家兎の過排卵誘起におけるEstrogen併用の効果(その2). 家畜繁殖誌, 15, 109-111.
- 16)石島芳郎, 伊藤雅夫, 平林忠, 佐久間勇次 (1969b) : 過排卵処理家兎の排卵時間の検討. 東京農業大学農学集報, 13, 145-149.
- 17)龜山祐一, 石島芳郎 (1989) : 人工膜で採取したウサギ精液の一般性状. 畜産の研究, 43, 71-73.
- 18)Kane, M. T. (1972) : Energy substrates and culture of single cell rabbit ova to blastocysts. Nature, Lond., 238, 468-469.
- 19)Kane, M. T. (1974) : The effects of pH on culture of one-cell rabbit ova to blastocysts in bicarbonate buffered medium. J. Reprod. Fert., 38, 477-480.
- 20)Kane, M. T. and Buckley, N. J. (1977) : The effects of inhibitors of energy metabolism on the growth of one-cell rabbit ova to blastocysts in vitro. J. Reprod. Fert., 49, 261-266.
- 21)Kane, M. T. and Headon, D. R. (1980) : The role of commercial bovine serum albumin preparations in the culture of one-cell rabbit embryos to blastocysts. J. Reprod. Fert., 60, 469-475.
- 22)Kubo, H. (1977) : Fertilization in vitro using rabbit tubal ova recovered at different intervals after HCG treatment with ejaculated or in vivo capacitated spermatozoa. Jpn. J. Fertil. Steril., 22, 78-85.
- 23)楠比呂志, 安井司, 加藤征史朗, 莢田淳 (1984) : トリプルステイン簡便法によるヤギ先体反応精子の判別. 日畜会報, 55, 832-837.
- 24)楠比呂志, 阪上守人, 加藤征史朗, 莢田淳 (1987) : トリプルステイン法によるブタ先体反応精子の判別, 家畜繁殖誌, 33, 123-127.
- 25)Mills, J. A., Jeitles, G. G. and Brackett, B. G. (1973) : Embryo transfer following in vitro and in vivo fertilization of rabbit ova. Fertil. Steril., 24, 602-608.
- 26)Motlik, J. and Fulka, J. (1974) : Fertilization and development in vivo of rabbit oocytes cultured in vitro. J. Reprod. Fert., 40, 183-186.
- 27)中渴直己, 田中温 (1988) : 排卵直前のマウス卵胞卵の受精能および初期発生能に及ぼす卵子前

- 培養の効果について. 日不妊会誌, 33, 161-168.
- 28)野田善郎 (1976) : 精子成熟と受精. 代謝, 13, 1563-1571.
- 29)Ogawa, S., Sato, K. and Hashimoto, H. (1971) : In vitro culture of rabbit ova from the single cell to blastocyst stage. Nature, Lond., 233, 422-424.
- 30)沖永洋子 (1972) : 家兎卵管卵の体外受精. 日不妊会誌, 17, 107-122.
- 31)Oliphant, G. (1976) : Removal of sperm-bond seminal plasma components as a prerequisite to induction of the rabbit acrosome reaction. Fertil. Steril., 27, 28-38.
- 32)小野寺政一, 塩田ゆみ, 河野友宏, 角田幸生 (1987) : 細胞培養用汎用培地G I Tによるマウスおよびウサギ胚の培養・凍結ならびに移植試験. 日畜会報, 58, 839-844.
- 33)Sato, K. (1984) : In vitro capacitation of ejaculated rabbit sperm cells. Jpn. J. Fertil. Steril., 29, 179-185.
- 34)Sato, K. (1985) : In vitro fertilization of rabbit eggs by ejaculated spermatozoa capacitated in a modified Tyrode's solution. J. Mamm. Ova Res., 2, 149-155.
- 35)Smith, D. M., Tyler, J. P. P. and Erickson, G. F. (1978) : Effects of medium composition and progesterone on maturation in vitro of rabbit oocytes from graffian follicles of different sizes. J. Reprod. Fert., 54, 393-400.
- 36)Srivastava, P. N., Kumar, V. M. and Arbtan, K. D. (1988) : Neuraminidase induces capacitation and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. J. Exp. Zool., 245, 106-110.
- 37)Suzuki, S. and Mastroianni, L. (1968) : In-vitro fertilization of rabbit follicular oocytes in tubal fluid. Fertil. Steril., 19, 716-725.
- 38)鈴木秋悦 (1981) : 卵子, 哺乳動物の初期発生(妹尾左知丸, 加藤淑裕, 入江明, 鈴木秋悦, 館鄰編), 23-36, 理工学社, 東京.
- 39)Thibault, C. (1972) : Final stages of mammalian oocyte maturation. Oogenesis, Proc. Symp., (Edited by Bigger, J. D.), 397-411, Univ. Park Press, Baltimore, Md.
- 40)Trotnow, S., Al-Hasani, S. and Sadtler, C. (1981) : Experience with in vitro fertilization of follicular rabbit oocytes and embryo transfer. Arch. Gynecol., 231, 41-50.
- 41)柳町隆造, 岩松鷹司 (1974) : 哺乳類の受精. 科学, 44, 293-299.



## 体外成熟ウシ卵胞卵子への精子注入操作による体外受精

In vitro fertilization by microinjection of bovine sperm  
into bovine oocytes matured in vitro

亀山賢次<sup>1)</sup>・菅原七郎・正木淳二

Kenji KAMEYAMA<sup>1)</sup>, Shichirou Sugawara, Junji MASAKI

東北大学農学部家畜繁殖学教室

Dept. of Anim. Sci., Fac. of Agric., Tohoku Univ., Sendai

<sup>1)</sup>Embryo Transfer Lab. Zen-Nou, Tsukuba Ibaragi

### 【Abstract】

By microsurgery, bovine spermatozoon was injected into bovine oocytes matured in vitro, to elucidate a role of sperm components such as acrosome, neck, middle piece and tail playing in fertilization and subsequent development. The injected spermatozoon was selected from the pretreated sperm as follow: 1) washed sperm 2) preincubated sperm 3) sonicated sperm head 4) freeze-dried sperm head 5) preincubated sperm head. The sperm successfully injected were almost decondensed and 10.5-26.4 percent of them developed into male pronucleus in egg cytoplasm. The results indicate that bovine gametes may be available for in vitro fertilization by microsurgery, e. g. microfertilization, in spite of these pretreatment of sperm, and also this technique shall be useful for elucidation the mechanism of the development in an interaction between oocytes and spermatozoa.

### 【緒言】

家畜では、体外受精が、受精能力の判定に役立つだけでなく、配偶子の利用や交配の組み合わせを自由に行なえる点で有効な方法として期待されている。しかし、分娩に至る成功例はまだ少なく、技術的に多くの問題点を残している。そこで、もし受精能力のある精子を直接卵子に注入して発生させることができれば、最少の精子数で最高の受精率が得られ、多精子侵入も防げると期待される。

ハムスターでは、精子を卵子内に注入すると雄性前核に発達することが知られている<sup>1)</sup>。精子は物理的処理に対してかなり安定しており、超音波処理ハムスター精子<sup>2)</sup>や凍結乾燥ヒト精子<sup>3)</sup>でもハムスター卵細胞質内で雄性前核に発達する。このほか実験動物では、マウス精子をラット卵子に注入して2細胞期まで発生し<sup>3)</sup>、マウス配偶子を用いた実験で胚盤胞まで発生することが報告されている<sup>6)</sup>。また、最近、ウサギでは精子注入法により産子が得られた<sup>5)</sup>。

本研究では、体外成熟ウシ卵胞卵子へいくつかの処理を施した精子を注入し、その後の発生について調べた。

### 【材料および方法】

屠場材料のウシ卵巣からの卵胞卵子採取と成熟培養は菅原ら<sup>6)</sup>の方法に従った。成熟培養後の卵子は、0.1%ヒアルロニダーゼを含むHam's F-12+20mM HEPESに移し、ピペッティングにより5%FCS, 0.25mMピルビン酸ナトリウム、21.58mM乳酸ナトリウムを含むHam's F-12+20mM HEPESに移し、精子の注入を行なうまでCO<sub>2</sub>インキュベーター内に保管した。この培養液は精子注入操作中にも用いたが、操作後はHEPESを加えない液に移し、培養を行なった。なお、操作は、第1極体の確認できた卵子のみを用いて行なった。

原材料のウシ精液は、凍結ストロー精液を用いた。37°Cの温水中で融解した精液は、生理食塩水を加えて遠心(1,200rpm, 5分間)洗浄を1回行なった後、次の各処理を行なった。

#### 1. 洗浄精子

再度、生理食塩水で遠心洗浄し、3%ポリビニルピロリドン(3% PVP)を含む生理食塩水に浮遊させた。その後、運動性を抑制するために-20°Cの冷蔵庫に5分間入れた後使用した。

#### 2. 前培養精子

菅原ら<sup>7)</sup>により体外成熟ウシ卵胞卵子の体外受精における精子の前培養(Ham's F-12+25%BFF+2mM Caffeine, 1.5時間)と同様の処理を行なった後、生理食塩水で洗浄して3% PVPを含む生理食塩水に浮遊させた。その後、洗浄精子と同様に-20°Cの冷蔵庫に入れたのち使用した。

#### 3. 超音波処理精子頭部

超音波処理には、SONIFIER(Bronson Sonic Power社, w-185, 出力目盛5, 4~5秒)を用いた。この処理により精子の頭部と尾部は分離し、先体も剥離した。超音波処理した精子浮遊液は、生理食塩水で2回洗浄した後、3% PVPを含む生理食塩水に浮遊させた。

#### 4. 凍結乾燥精子頭部

超音波処理を行なった精子浮遊液を2回洗浄した後、0.1mlずつ分注し、凍結乾燥機(LOBCONCO社, 75034)に1時間かけた。凍結乾燥した精子頭部は冷蔵庫(4°C)に保存し、1週間から6か月経過したものを使用した。使用時には0.1mlの蒸留水を加えた後、さらに3% PVPを含む生理食塩水1mlを加え、良く振盪して使用した。

#### 5. 前培養精子頭部

前培養精子と同様の前培養を行なった後、超音波処理を行ない、2回洗浄後3% PVPを含む生理食塩水に浮遊させた。

また対照として、精子注入と同様の機械的刺激により前核期像が見られるかどうか調べるため、精子浮遊液を用いた3% PVPを含む生理食塩水を卵子に注入した。

顕微操作終了後20時間後に卵子を固定・染色して、注入精子の変化を調べた。精子の頭部のみを注入した場合、2前核の観察された卵子において精子が前核まで発達したものと判定した。なお、超音波処理精子頭部を注入した卵子について、注入後10、20時間目に固定し、透過型電子顕微鏡(TEM)による観察を行なった。

### 【結果】

#### A. 注入精子頭部の変化

卵子へ注入した精子の変化は、表1に示した。すなわち、精子の各処理区間で有意差はなく、注入

の報告と一致する。精子核が変性した場合は、卵細胞質中で正常な反応を示すことはないと考えられるので、超音波処理や凍結乾燥処理は、精子核の性状に本質的な損傷を与えることはなかったものと思われた。また、注入の失敗により精子が卵胞腔に停留することがあったが、このような精子や精子頭部は卵子と反応することなく、その後の変化は全く見られなかつた。一般的に、卵子原形質膜と融合した精子は食作用的に卵子内に取り込まれることが知られており、運動性は関与しないと考えられている<sup>9)</sup>。したがつて、本実験において、前培養を行なつた精子が卵胞腔に入った場合でもその後の変化が見られなかつたことから、膜融合の開始には精子の運動性が重要であることが示唆された。

以上、体外成熟ウシ卵胞卵子へ直接精子を注入することにより前核期まで発達することが確認された。この場合精子の前培養は必要なく、超音波処理後の精子頭部のみでも前核に発達し、さらには保存の簡便な凍結乾燥精子頭部でも同様の前核形成率を示した。

Table.2 TEM observation on morphological changes of sonicated sperm heads injected into bovine oocytes matured in vitro.

Time after injection	No. of eggs	Changes of sperm head			Non-detectable
		Intact	Decondensation	Pronucleus	
10h	5	0	0	2	3
20h	10	1*	0	5	4

\* This sperm head was not attached to ooplasm.

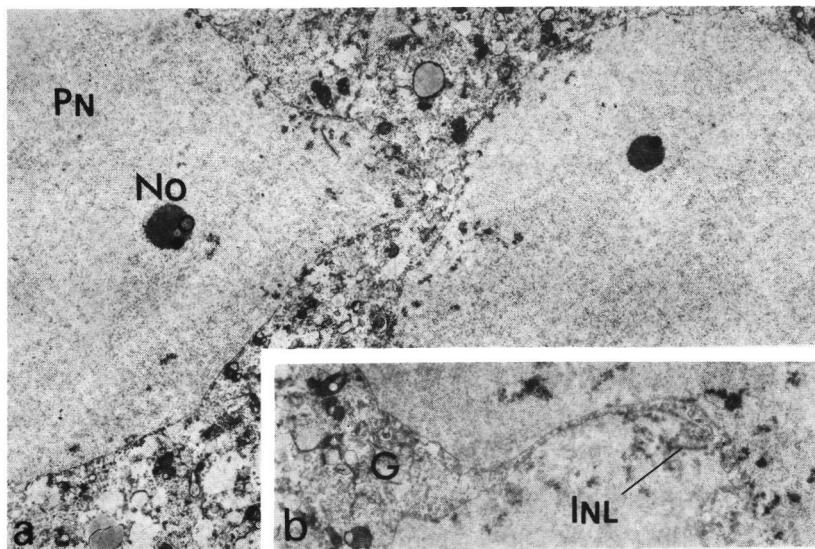


Fig.1 Eggs in pronuclear stage 20h after injection of sperm head. a) Two pronuclei (PN) and nucleoli (NO) are visible.  $\times 1,300$  b) Two pronuclei are close. G; Golgi apparatus, INL; intranuclear lamellae  $\times 3,300$

精子の大部分は膨化以上の変化が見られ、前核形成率は10.5~26.4%であった。一方、精子頭部がほとんど変化しなかったもの (intact) は、尾部のついたまま注入した区で多くなる傾向がみられた。3% PVPを含む生理食塩水を卵子に注入した対照区では、2前核は観察されず、単為発生によると思われる1つの前核が2/60 (3.3%) の卵子で観察された。また、注入の失敗により、精子が卵胞腔に停留することがあったが、このような場合、その後の精子の変化は全く見られなかった。

Table.1 Morphological changes of pretreated sperm 20h after injection into bovine oocytes matured in vitro.

Substance injected	No. of eggs	Changes of sperm head		
		Intact	Decondensation	Pronucleus
washed sperm	38	6 <sup>a</sup>	28	4(10.5%)
Preincubated sperm	33	4 <sup>a b</sup>	24	5(15.8%)
Sonicated sperm head	53	2 <sup>a c</sup>	37	14(26.4%)
Freeze-dried sperm head	49	1 <sup>b c</sup>	38	10(20.4%)
Preincubated sperm head	47	0 <sup>c</sup>	40	7(14.9%)
3%PVP-saline (control)	60	—	—	—

Different superscripts indicate statistically different subsets (Chi-square test,  $p<0.05$ ).

## B. 注入精子頭部の電顕観察

超音波処理精子頭部を注入した卵子の電子顕微鏡による観察結果は、表2に示した。技術的に実験に供した卵子すべてで注入精子頭部を捕えられなかつたが、注入後10時間でも2前核が観察され、20時間では2前核が卵子中央部で接近したものが観察された。前核期卵子の微細構造に関しては、精子尾部が無いこと以外、ウシ体内受精卵子での報告<sup>8)</sup>、体外成熟後に体外受精を行なった卵子における観察結果と同様であった。すなわち、核小体、核内ラメラ、核膜に接近した小胞体やゴルジ装置等が観察された（図1）。

### 【考察】

注入精子の前核形成率には、精子の処理の違いによる差は見られなかつた。このことは、凍結ストローー精液の精子を直接卵子内に注入した場合、精子の注入時の状態には関係なく精子核は卵子内で膨化し、前核形成できることが示された。したがつて、精子の受精能獲得の過程は卵子内に侵入するために必要な変化であり、その後の膨化・前核形成には関係しないことが確認された。超音波処理により精子尾部を除去しても、また、凍結乾燥処理後に冷蔵保存した精子でも、卵細胞質中で精子頭部の膨化。前核形成に進むものが見られたことは、ハムスター卵子で観察された Uehara & Yanagimachi

【文献】

- 1) Uehara, T. and R. Yanagimachi (1976) Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol. Reprod.*, 15, 467-470.
- 2) Uehara, T. and R. Yanagimachi (1977) Behavior of nuclei of testicular, caput and cauda epididymal spermatozoa injection into hamster eggs. *Biol. Reprod.*, 16, 315-321.
- 3) Thadani, V. M. (1980) A study of hetero-specific sperm-egg interactions in the rat, mouse, and deer mouse using in vitro fertilization and sperm injection. *J. Exp. Zool.*, 212, 435-453.
- 4) Markert, C. L. (1983) Fertilization of mammalian eggs by sperm injection. *J. Exp. Zool.*, 228, 195-201.
- 5) Sato, K. and H. Kaneta (1987) Development of rabbit embryos from eggs injected microsurgically with sperm cells. *World Cong. Human Reprod.* 246. (Abstr.).
- 6) Sugawara, S., K. Hamano, A. Miyamoto, K. Kameyama, T. Horiuchi and J. Masaki (1984) In vitro fertilization and subsequent development of bovine oocytes precultured in synthetic media. *Proc. 10th Int. Cong. Animal Reprod. and AI.* III., Vol. 3, No. 382.
- 7) 菅原七郎・浜野光市・亀山賢次・橋本伸二・正木淳二 (1985) ウシにおける体外受精—ウシ卵胞液(BFF)処理によるウシ凍結精子の受精能獲得, *家畜繁殖誌*, 30, 62-67.
- 8) Corzett, N. (1984) Ultrastructural aspects of in vitro fertilization in the cow. *Gamete Res.*, 10, 241-251.
- 9) Wassarman, P. M. (1987) The biology and chemistry of fertilization. *Science*, 235, 553-560.



## 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学教室

Laboratory of Animal Breeding, Faculty of Agriculture, Iwate University

### Summary

The regulative capacity of mouse embryos aggregated different stages and their developmental potential in the postimplantation have been examined.

Seventy-eight percent of asynchronously aggregated embryos between 4-cell and 8-cell stage developed into integrated blastocysts. However, aggregation between 4-cell and 16-cell stage embryos was not occurred.

Two adult mice have been obtained from asynchronously aggregated embryos by embryo transfer to normal pregnant hosts. One showed chimeric features, but the other was apparently derived from the one of the pair of asynchronously aggregated embryos.

These results suggest that early mouse embryos tend to keep their own time-chronological development regardless of aggregation and that younger embryo in asynchronously aggregated embryos can incorporate into inner cell mass of integrated blastocyst.

## 緒 言

初期マウス胚を用いて、集合キメラ胚、あるいはキメラマウスを作出する場合、一般的には、8細胞期の胚が用いられる<sup>1)</sup>。これは、8細胞期以降の割球の偏平化が高い接着性を伴うために<sup>2)</sup>、割球間の連絡面が増大する一方で、それが比較的緩やかな結合様式であるイオン透過性チャンネル（ギャップ結合）<sup>3)</sup>により維持されていることから、集合が短時間で容易に起こるからである。そして、胚の間の発生時期が同調であれば、これらの起こる時間的条件が等しくなり、統合胚盤胞の内部細胞塊が各胚の割球集団で構成される確率が高くなる<sup>4)</sup>。しかし、発生時期が非同調である場合には、その程度により、各胚の内部細胞塊への寄与率が様々なものとなる、あるいは、胚の集合そのものが阻害されることが考えられる。本研究では、初期マウス胚がもつ調節能力に着目して、4細胞期胚と8細胞期胚との集合（4細胞↔8細胞）を試み、さらに、その着床後の発生能を調べるために移植を試みた。

## 実験材料および実験方法

### 1. 胚の集合

実験には、当研究室でクローズドコロニーとして継代繁殖している、ICR系および、C57BL/6系マウスを使用した。管理交配を行い、交配確認日を1日目として、交配2日目の20時以降に4細胞期胚を卵管より回収し、37°C、湿度 100%、5%CO<sub>2</sub> 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時以降にも、同様の操作により4細胞期胚を回収し、前日からの24時間培養によって得られた8～16細胞期胚とともに、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群を対照とした。培養12時間ごとに、ICR↔ICR、あるいは、ICR↔C57BL/6の集合胚を光学顕微鏡下で観察した。

### 2. 胚の移植

移植は、培養36～48時間後の4細胞↔8細胞、8細胞↔8細胞の各集合胚について行った。正常妊娠、あるいは偽妊娠3～4日目のICR、または、C57BL/6の片側子宮角に、正常妊娠の場合は1～2個、偽妊娠の場合は4～6個の集合胚を移植した。

### 3. G P I (glucose phosphate isomerase)のモニタリング

Peterson らの方法<sup>5)</sup>に基づき、処理を施した溶血液、あるいは、尾静脈より得た無処理の血液をデンプンゲル電気泳動に供した。

## 結 果

### 1. 胚の集合

4細胞↔8細胞では、その78% (39/50)が、8細胞↔16細胞では、その33% (3/9)が、それぞれ、培養60時間後、培養48時間後に統合胚盤胞へと発生した。しかし、4細胞↔16細胞からは集合胚が得られなかった (0/16) (Table 1)。

一方、対照群の統合胚盤胞への発生率は、4細胞↔4細胞では85% (11/13)、8細胞↔8細胞では95% (44/46)、16細胞↔16細胞では69% (25/36)となり、統合胚盤胞への発生時間は、それぞれ、60, 36, 24時間であった (Table 2)。

なお、4細胞↔8細胞の集合過程を Fig. 1, a-f に、集合胚が得られなかった4細胞↔16細胞については、その過程を Fig. 2, a-c に示した。

### 2. 胚の移植、G P I

4細胞 (C57BL/6) ↔8細胞 (ICR) の集合胚を正常妊娠4日目のC57BL/6 に、また、4細胞 (ICR) ↔8細胞 (C57BL/6) の集合胚を正常妊娠3日目のICRに移植することにより、現在まで2例の成体マウスが得られている。

前者は雄であり、眼色、体毛色からキメラであると判定される (Fig. 3)。G P I はAB型であった。なお、AB型は当研究室のICR系マウスに多く検出されている。

後者は雌であり、眼色、体毛色はC57BL/6タイプであり、また、G P I もB型であった。

Table 1. Development of asynchronously aggregated embryos.

Type of aggregated embryos	No. of aggregated embryos	No. of integrated blastocysts(%)
4-cell↔8-cell	50	39 (78)
4-cell↔16-cell	16	0 (0)
8-cell↔16-cell	9	3 (33)

Table 2. Development of synchronously aggregated embryos.

Type of aggregated embryos	No. of aggregated embryos	No. of integrated blastocysts(%)
4-cell↔ 4-cell	13	11 (85)
8-cell↔ 8-cell	46	44 (95)
16-cell↔16-cell	36	25 (69)

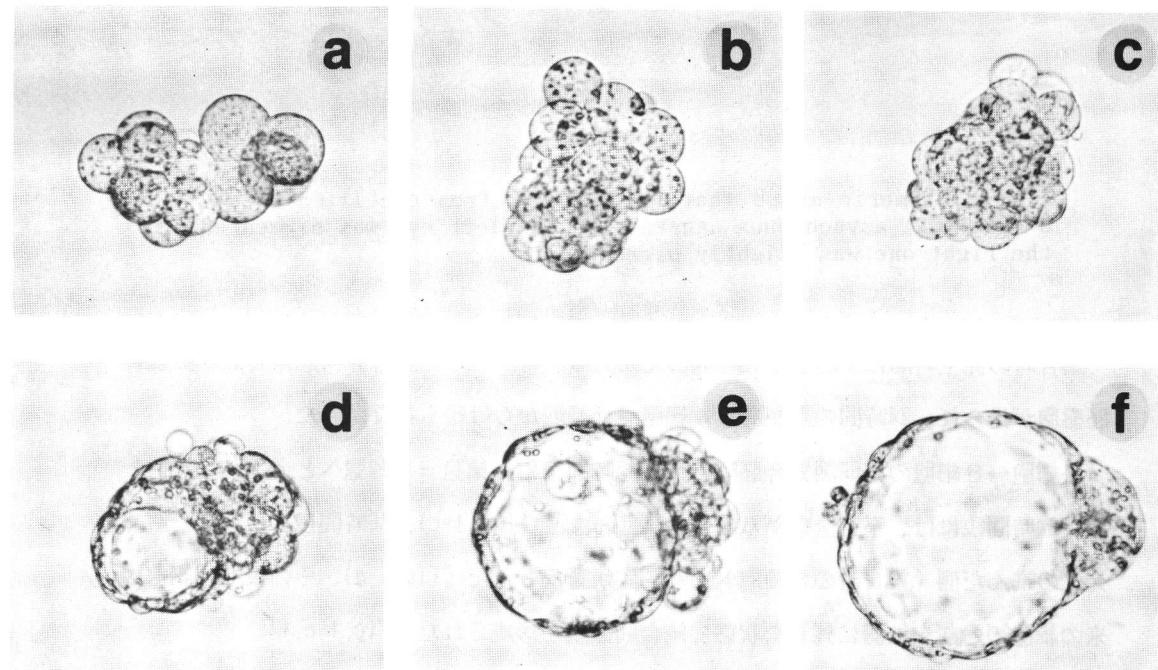


Fig.1  
Culture of asynchronously aggregated embryos (4-cell↔8-cell).

a,Start of culture    b,After 12hr    c,After 24hr  
d,After 36hr                         e,After 48hr    f,After 60hr

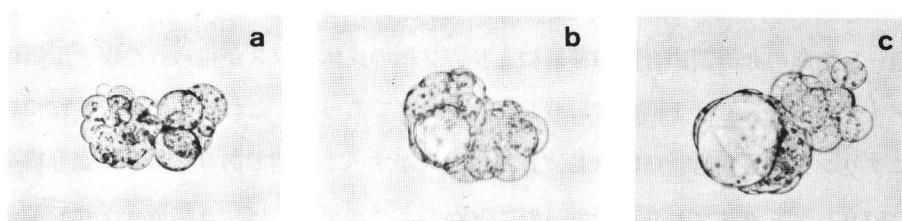


Fig.2  
Culture of 4-cell↔16-cell. Aggregation did not occur due to formation of tight junction of older embryo.

a,Start of culture    b,After 12hr    c,After 24hr

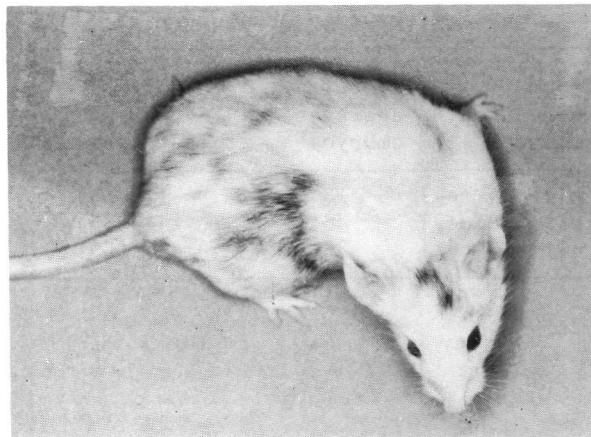


Fig. 3

A male chimeric mouse that was derived from 4-cell(C57BL/6)↔8-cell(ICR) asynchronous aggregation. The left eye was pigmented, the right one was slightly pigmented.

### 考 察

集合時の発生時間に、およそ12時間の差がある4細胞↔8細胞の非同調集合胚から統合胚盤胞が得られ、24時間の差がある4細胞↔16細胞からは得られなかった。

4細胞↔8細胞の非同調集合胚は、集合12時間後に8細胞↔16細胞へと発生し (Fig. 1-b)、24時間後には、不完全ながら統合桑実胚となり (Fig. 1-c)、36時間後には、おそらく発生の進んだ側 (集合時の8細胞) より割腔が形成された (Fig. 1-d)。その後、4細胞由来の細胞の一部を外側に残した状態で統合胚盤胞が形成された (Fig. 1-e, f)。

4細胞↔16細胞では、集合12時間後の段階で16細胞が初期胚盤胞へと発生し、外側の細胞膜が栄養膜細胞へと分化してしまったために集合が阻害された<sup>4)</sup> (Fig. 2-a, b, c)。これらのことから、発生の異なる時期での集合には限界があり、それぞれの胚が本来保持している発生時間を保ちながら集合を進めることができた<sup>1)</sup>。

4細胞↔8細胞の非同調集合胚の移植により、2例の成体マウスが得られたが、1例はキメラタイプであり、もう1例はC57BL/6タイプであった。これまでのGPIについてのモニタリング結果から、C57BL/6系マウスがすべてB型であり、移植により得られた、C57BL/6タイプもB型であったことから、この場合には、4細胞 (ICR) が統合胚盤胞の内部細胞塊に寄与しなかったことが考えられる。以上のことから、8細胞期胚と集合した4細胞期胚は、統合胚盤胞における内部細胞塊に寄与することが可能ではあるが、それが不確実なものであることが示唆された。

今後は、非同調集合胚の移植例を増やすとともに、同調集合胚の移植を試み、比較検討を行う必要があると思われる。

本研究は、昭和62年度文部省科学研究費補助金、一般研究(C)「着床における胚と子宮内膜上皮の相互認識に関する研究」(課題番号 62560256)の一部であることを付記する。

## 文 献

- 1) Mulnard,J.G.(1971) Manipulation of cleaving mammalian embryos with special reference to a time-lapse cinematographic analysis of centrifuged and fused mouse eggs. *Adv.Biosci.*6:255-274.
- 2) Kimber,S.J.,M.A.H.Surani and S.C.Barton(1982) Interactions of blastomeres suggest changes in cell surface adhesiveness during the formation of inner cell mass and trophectoderm in the preimplantation mouse embryo. *J.Embryol.exp.Morph.*70:133-152.
- 3) Goodall,H.and M.H.Johnson.(1982) Use of carboxyfluorescein diacetate to study formation of permeable channels between mouse blastomeres. *Nature,Lond.*295:524-526.
- 4) Burgoyne,P.S.and T.Ducibella(1977) Changes in the properties of the developing trophoblast of preimplantation mouse embryos as revealed by aggregation studies. *J.Embryol.exp.Morph.*40:143-157.
- 5) Peterson,A.C.,P.M.Frair and G.G.Wong(1978) A technique for detection and relative quantitative analysis of glucosephosphate isomerase isozymes from nanogram tissue samples. *Biochem.Genet.*16:681-690

## Incidence of Chromosomal Aberrations and Primary Sex Ratio in First-Cleavage Mouse Eggs

Midori Yoshizawa, Masaru Takada and Takashi Muramatsu

Department of Animal Breeding and Reproduction, Faculty of Agriculture

Utsunomiya University

350 Mine-machi, Utsunomiya 321, Japan

### Abstract

Chromosome preparations were made from first-cleavage mouse eggs obtained from ICR mice superovulated and mated with the same strain of males. All preparations were stained by the C-band method. Successful chromosomal analysis was made in 96.6 % of the eggs in mitosis. The incidence of chromosomal aberrations were 0.5 % triploidy, 0.2 % tetraploidy, 0.9 % haploidy, 0.9 % hyperdiploidy, and 0.5 % structural aberrations. Chromosomal sexing was achieved in 93.8 % of normal diploid and hyperdiploid eggs. The combined primary sex ratio at pre-syngamy and syngamy stages was 45.2 % males, but with no significant deviation from equality.

### Introduction

Chromosomal analysis of mouse embryos at the first cleavage mitosis has been conducted by several workers with the aim to evaluate the incidence of chromosomal aberrations and the sex ratio at this crucial stage in embryonic development (Donahue, 1972; Kaufman, 1973; Luthardt, 1976; Maudlin & Fraser, 1977; 1978; Fraser & Maudlin, 1979; Katoh & Tanaka, 1980; Yoshizawa et al., 1985; Santalo et al., 1986). The work, however, has been frequently handicapped by a limited proportion of countable preparations. To improve this fault, we developed a simple method which consists of two-step fixation and retarded air-drying under heavy moisture to obtain many chromosome preparations with high quality. This paper deals with the results of chromosome analysis with preparations made by this method from first-cleavage mouse eggs superovulated and fertilized *in vivo*.

### Materials and Methods

Virgin female ICR mice (2 - 3 months of age) maintained in a 14-hr-light (05:00 - 19:00) and 10-hr-dark cycle were induced to superovulate by an i.p. injection of 5 i.u. PMSG followed by 5 i.u. hCG 48 hr later. After mating with fertile ICR males, females having vaginal plugs, a proof of successful mating, were killed at 27 hr after the hCG injection. Eggs were recovered by flushing the excised oviducts, and then incubated in Whitten's

medium containing 0.1  $\mu\text{g/ml}$  colcemid for 5 hr. Eggs were briefly rinsed in 1 % sodium citrate solution, and placed in a culture well containing 0.4 ml of the same hypotonic solution for 15 min. A preliminary mild fixation was made by injecting 0.01~0.02 ml of a mixture of methanol and acetic acid (3 : 1). Each egg was placed on a slide glass, and then fixed on the glass by dropping several drops of the fixative. Chromosome preparations were made under heavily moisturized conditions to secure good spreading chromosomes. Immediately after drying, eggs were examined microscopically for the degree of chromosome spreading. Cytoplasmic remnants, if present, were cleaned by supplemental dropping of the fixative. Slides were stained by the C-band method described in our previous report (Yoshizawa et al. 1985). The data obtained were analysed by the chi-square test.

### Results

All but degenerated and fragmented eggs were prepared for chromosome analysis. Fertilization was determined by the presence of two or more mitotic genomes or pronuclei. Out of 538 prepared eggs, 499 (92.8 %) were fertilized (Table 1). Of these, 443 (88.8 %) were in mitosis and the remaining were at pronuclear stage. The majority (68.4 %) of the eggs in mitosis were at prometaphase (pre-syngamy) stage and the rest (31.6 %) were at syngamy stage. Among unfertilized eggs, there were 4 eggs with only one genome ( $n=20$ ). Their chromosomes resembled in shape those at first-cleavage mitosis. Incidences of chromosomal aberrations in first-cleavage mouse eggs were shown in Table 2. Out of 447 eggs with metaphase figures, 432 (96.6 %) eggs showed analysable chromosomes. Of these, 414 (95.8 %) were normal diploid. Hyperdiploidy and hypodiploidy were observed in 4 eggs (0.9 %) and 7 eggs (1.6 %), respectively. There were also 2 triploid eggs (0.5 %) and one tetraploid egg (0.2 %). Chromosomes with chromosomal breakage were observed only in 2 eggs (0.5 %).

Chromosomal sexing was made with 418 eggs including the normal diploid and hyperdiploid eggs. Those eggs with the Y chromosome, which had no C-band, were determined to be males. Successful sexing was accomplished in 392 eggs with a sexing rate of 93.8 %. The primary sex ratio was 45.2 % (177 males and 215 females), but with no significant deviation from equality (Table 3). The primary sex ratio was classified into two groups according to the stage of pre-syngamy and syngamy, but there was no significant difference between them (Table 4). Sex chromosome combinations in the two triploid eggs were XXX and XXY, respectively. We could not determine, however, the origin of triploidy because we had no reliable markers to distinguish paternal and maternal genomes.

Table 1. Fertilization rate and incidence of mitosis in 1-cell stage mouse eggs

No. of eggs prepared	538
fertilized	499 (92.8%)
at pronuclear stage	56 (11.2%)
in mitosis	443 (88.8%)
pre-syngamy	303 (68.4%)
syngamy	140 (31.6%)
unfertilized	39
in mitosis*	4 (10.3%)

\* Only a haploid set of chromosomes was seen.

Table 2. Incidence of chromosomal aberrations in first-cleavage mouse eggs

No. of egs prepared	538
in mitosis	447 (83.1%)
with countable chromosomes	432 (96.6%)
2n	414 (95.8%)
2n+1	4 ( 0.9%)
2n-1	7 ( 1.6%)
3n	2 ( 0.5%)
4n	1 ( 0.2%)
n	4 ( 0.9%)
-----	-----
with structural aberrations	2 ( 0.5%)

Table 3. Sexing rate and sex ratio in diploid mouse eggs at the first cleavage division

No. of eggs with 2n or 2n + 1	418
sexed	392 (93.8%)
males	177 (45.2%)
females	215

Table 4. Sex ratios classified by the stages of first-cleavage mitosis in diploid mouse eggs

Stage of mitosis	No. of			Sex ratio ( % males )
	Males	Females	Total	
Pre-syngamy*	117	143	260	45.0%
Syngamy	60	72	130	45.5%
Total	177	215	392	45.2%

\* Two genomes were seen to be separated.

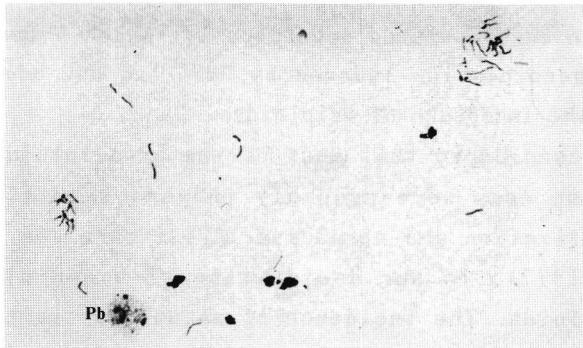


Fig. 1. A hyperdiploid mouse egg at the first cleavage mitosis. A right group has a chromosome complement of  $n+1$ . Because of the absence of the Y chromosome, this egg was judged to be female. C-band staining was performed after air-drying.

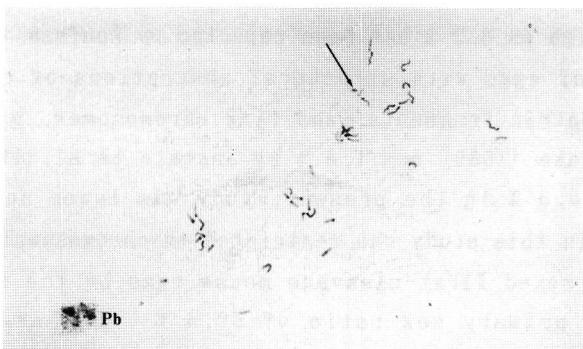


Fig. 2. A normal diploid mouse egg at the first cleavage mitosis. Because of the presence of the Y, a small chromosome with no C-band ( arrow ), this egg was judged to be male. C-band staining was performed after air-drying.

### Discussion

A considerable low level of triploidy is to be noted in the present study with first-cleavage mouse eggs superovulated and fertilized in vivo. Comparable studies have reported the incidences of triploidy to be 1.2 % (Donahue 1972), 4.1 % (Kaufman 1973), and 3.2 % (Luthardt 1976). Maudlin & Fraser (1977), who examined the effect of PMSG dose on the incidence of chromosomal anomalies, showed that the incidence of triploidy in in-vivo fertilization was 4.9 % in a dose of 1.5 i.u. and 0.6 % in a dose of 7.5 i.u. Takagi & Sasaki (1976) reported that the incidence of digynic triploidy increased in superovulated mouse eggs, and Chang (1977) described that digynic triploidy after superovulation may be closely related to the aging of egg, during the time of ovulation more spread out in superovulation than in spontaneous ovulation. More recently, Santalo et al. (1986) obtained a high incidence of 10.1 % in superovulated eggs from immature mice. The incidence (0.5 %) of triploidy in the present study is lower even when compared with an incidence of 1.4 % in eggs ovulated spontaneously (Katoh & Tanaka 1980). Thus, we consider that superovulation induced by PMSG and hCG administration does not always increase the incidence of triploidy.

Donahue (1972) considered that most of the hypodiploidy he observed in first-cleavage mouse eggs were probably induced by artifactual loss of chromosomes during fixation and spreading. Great care was taken, as did by Maudlin & Fraser (1977), in our designation of hypodiploidy to exclude "uncertain" hypodiploids. The incidence of aneuploidy in the present study was 1.6 % for hypodiploidy and 0.9 % for hyperdiploidy. These values correspond to the reported incidence of aneuploidy, 0.6 to 2.5 % for hypodiploidy (Fraser & Maudlin, 1979; Katoh & Tanaka, 1980; and Glenister et al., 1987) and 0.3 to 0.9 % for hyperdiploidy (Katoh & Tanaka, 1980; Kaufman, 1973; Fraser & Maudlin, 1979; Glenister et al., 1987), although an incidence of hypodiploidy as high as 8.3 % has been reported by Kaufman (1973).

The incidence of eggs with structural aberrations of chromosomes, such as gaps, breaks,acentric fragments, and ring chromosomes, was reported to be 2.2 % by Katoh & Tanaka (1980) and 1.8 % by Santalo et al. (1986). As compared with these values, 0.5 % in the present study was lower and the structural aberration observed in this study was restricted to chromosomal breakages.

Kaufman (1973) sexed first-cleavage mouse eggs by the method of Stich & Hsu (1960), with a primary sex ratio of 50.4 %. Luthardt (1976), using G-band staining method with trypsin, reported the primary sex to be 51.4 %. Santalo et al. (1986) sexed first-cleavage mouse eggs using C-staining method, and reported the primary sex ratio to be 51 %. As compared with these values, we have reported lower primary sex ratio. Yoshizawa et al. (1985),

demonstrating the usefulness of C-band staining in sexing mouse embryos, showed that the combined primary sex ratio at pre-syngamy and syngamy was 43.5 %, with a significant bias toward female at syngamy. The primary sex ratio in the present study was 45.2 %, which is comparable to the sex ratio at pre-syngamy reported in our previous paper (Yoshizawa et al., 1985).

We thank Dr. Masaki, Professor of Tohoku University, for his interest and criticism of this manuscript for publication.

#### References

- 1) Donahue, R. P. (1972) Cytogenetic analysis of the first cleavage division in mouse embryo. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69 : 74-77
- 2) Kaufman, M. H. (1973) Analysis of the first cleavage division to determine the sex-ratio and incidence of chromosome anomalies at conception in the mouse. J. Reprod. Fert. 35 : 67-72
- 3) Luthardt, F. W. (1976) Cytogenetic analysis of oocytes and early preimplantation embryos from X0 mice. Develop. Biol. 54 : 73-81
- 4) Maudlin, I. & Fraser, L. R. (1977) The effect of PMSG dose on the incidence of chromosomal anomalies in mouse embryos fertilized in vitro. J. Reprod. Fert. 50 : 275-280
- 5) Maudlin, I. & Fraser, L. R. (1978) The effect of sperm and egg genotype on the incidence of chromosomal anomalies in mouse embryos fertilized in vitro. J. Reprod. Fert. 52 : 107-112
- 6) Fraser, L. R. & Maudlin, I. (1979) Analysis of aneuploidy in first-cleavage mouse embryos fertilized in vitro and in vivo. Environmental Health Perspectives 3 : 141-149
- 7) Katoh, M. & Tanaka, N. (1980) Relationship between chromosome aberrations in the first-cleavage metaphases and unscheduled DNA synthesis following paternal MMS treatment. (in Japanese) Japan J. Genetics 55 : 55-65
- 8) Yoshizawa, M., Muramatsu, T. & Okamoto, A. (1985) Sexing of mouse eggs at the first cleavage division by C-staining method. Jpn. J. Anim. Reprod. 31 : 78-83
- 9) Santalo, J., Estop, A.M., and Egozcue, J. (1986) The chromosome complement of first-cleavage mouse embryos after in vitro fertilization. J. in Vitro Fert. Embryo Trans. 3 : 99-105
- 10) Takagi, N. & Sasaki, M. (1976) Digynic triploidy after superovulation in mice. Nature 264 : 278-281
- 11) Chang, M. C. (1977) Digynic triploidy after superovulation. Nature 266 : 382-383
- 12) Stich, H.F. & Hsu, T.C. (1960) Cytological identification of male and

female somatic cells in the mouse. Exp. Cell Res. 20 : 248-249

マウス受精卵（第1分割期）における染色体異常の出現率と性比

吉澤 緑、高田 勝、村松 隆  
宇都宮大学農学部家畜育種繁殖学教室  
321 宇都宮市峰町350

ICR 雌マウスに、PMSGとhCG を投与して過排卵を誘起し、同系の雄と交配後、受精卵を回収して第1分割期の染色体標本を作製し、C バンド染色を施した。染色体の分析率は96.6% であり、3倍体の出現率0.5%、4倍体0.2%、1倍体0.9%、高2倍体0.9%、構造的異常0.5%であった。また、C バンド染色標本においてのY染色体の識別による性判別率は93.8% と高いものであった。1次性比（雄率）は45.2% であり、理論値の50% から有意な偏りを示さなかった。



## マウス着床実験モデルによる高エストロゲン環境の 着床におよぼす影響について

The Influence of Hyperestrogenism on Implantation of Mouse Embryo.

久保春海、安部裕司、白井 彰、雀部 豊、片山 進、黃 傳益

Harumi KUBO, Yuji ABE, Akira USUI, Yutaka SASABE, Susumu KATAYAMA, Chuang-Yi HUANG.

東邦大学第1産科婦人科学教室

The 1st Department of Obstetrics and Gynecology, Toho University School of Medicine.

### <Summary>

This study was undertaken to discover any influences of hyperestrogenism on implantation of mouse embryos in vivo and in vitro.

#### I . In Vivo Implantation Experiment:

Mouse oocytes were collected from superovulated Crj-CD1(ICR) females. In vitro fertilization was performed according to the method of Toyoda et.al. Pronuclear stage eggs were transferred to m-WM medium added 100  $\mu$ M EDTA six hours after insemination. Blastocysts developed after ninety-six hours of culture, were transferred into uterine horn of recipients on Day4 of pseudopregnancy which mated with BDF<sub>1</sub> sterilized male mice by a modified McLaren's technique. Each amounts (0, 0.1, 1, 10, 100 $\mu$ g/mouse) of estradiol-17 $\beta$  were injected subcutaneously to recipient mice during Day1 to Day5 (Group I ) or on Day4 and 5 (Group II ) of pseudopregnancy. On the other hand, 1 or 5mg of progesterone was injected simultaneously with E<sub>2</sub> injection to determine the effect of luteal support on implantation.

The recipients were killed on Day 9 of pseudopregnancy by cervical dislocation. The proportion of implantation sites and live embryos were examined in bilateral uterine horn.

#### II . In Vitro Implantation Experiment:

Uteri were removed from mice at D<sub>4</sub> of pseudopregnancy. The monolayer cells were made by the digestion of uterine epithelium with a trypsin-EDTA-DNase solution according to the technique of Salomon et. al. The uterine cells were seeded with a concentration of  $6 \times 10^6$  cells/dish in a 35mm culture dish (Falcon 3001) containing BME+AA medium (Spindle, A. I., et. al.), and were allowed to settle and attach to the dish for 24 hours. Five blastocysts

fertilized in vitro were transferred directly onto the monolayer cells. Hormonal treatment was performed from the day 1 of co-culture with addition of E<sub>2</sub> or E<sub>2</sub> & P in the medium. Attachment, TbOG and two layered ICM were scored by counting under a dissecting microscope. Results; In Group I, 1μg or more of E<sub>2</sub> treatment had affect on implantation in vivo. In Group II, 10μg or more of E<sub>2</sub> had affect on implantation. However, the injection of 1 or 5 mg of progesterone with E<sub>2</sub> overcame the influences. Addition of E<sub>2</sub> or E<sub>2</sub> and P had no affect on attachment, TbOG and two-layered ICM up to a concentration of 10ng/ml E<sub>2</sub>. 10<sup>2</sup> ng/ml or more of E<sub>2</sub> had influence on the number of two-layered ICM, and 10<sup>3</sup>ng/ml or more of E<sub>2</sub> had affect on TbOG. However, progesterone had no influence on these phenomena.

#### <緒言>

現在、ヒト体外受精-胚移植(IVF-ET)における問題点のひとつとして、着床率の低さがあげられる。この理由として、受精卵の染色体異常、また卵胞刺激法による高エストロゲン環境や卵胞壁の損傷が黄体化を妨げプロゲステロン産生を抑制し、着床期内膜の生理的変化を阻害するといわれている。このためP/E<sub>2</sub>比の向上が妊娠率の上昇をもたらすとして、ゲスターーゲン剤やhCG投与による黄体賦活法(luteal support)を行う方法が一般に行われている。しかし、他のグループでは黄体賦活化の有効性を認めなかったとする報告<sup>1)</sup>もある。

我々は、今回この矛盾を解決するために、マウスの高エストロゲン環境実験モデルを作製し、胚発生能や着床率に影響をあたえるかどうかを検討した。

#### <方法>

##### I. 体外受精胚の in vivo 着床実験；

採卵： Crj:CD-1(ICR)雌マウス4~6週齢を人工昼夜(08:00-20:00点灯)下で飼育し、8~10週齢にてPMS(セロトロピン)2.5IUおよびhCG(ゴナトロピン)5IUを48時間間隔で腹腔内注射して過排卵処理をおこなった。hCG注16時間後に頸椎脱臼にて屠殺、両側卵管を子宮角より切断摘出し、卵管間膜、脂肪組織を除去後流動パラフィン内に投じ、解剖針で卵管膨大部を小切開によって、卵丘細胞塊に包まれた卵子塊を採取し、速やかに流動パラフィン下TYH培地(Toyoda et al 1971)<sup>2)</sup>中に移した。

精子処置：採卵直前に豊田らの方法<sup>2)</sup>に準じ12週齢のICR雄マウスを屠殺、精巣上体尾部精子を採取し、流動パラフィン下TYH培地に浮遊させ、受精能獲得を誘起するため1~2時間の前培養を行った。培養終了後、精子浮遊液を最終精子濃度が150cells/μlとなるように卵子浮遊培地に媒精した。

受精卵子の培養：媒精後、3時間で実体顕微鏡下に前核期受精卵を選別し、修正Whitten培地(m-WM)+100μM EDTAに移して培養を継続した。さらに媒精後96時間培養し、胞胚期に達した胚を移植に供

した。

移植および受容雌：受容雌は ICR 雌(8~10週齢)に BDF<sub>1</sub>、精管結紉雄を交尾させ、IVF 実験の翌朝に腔栓形成を認めたものを偽妊娠誘起Day1(D<sub>1</sub>)とした。胞胚期に達した胚を Bronson et al<sup>3)</sup> の方法に準じて偽妊娠 D<sub>4</sub> 受容雌をペントバルビタール 50mg/kg (ネンブタール) 麻酔下に背部切開し、両側子宮角に各々 10 個ずつマイクロピペットで移植した。

ホルモン処理：実験 1: E<sub>2</sub> 処理は偽妊娠 D<sub>1</sub> より D<sub>5</sub> までの午前 9:00 に連日それぞれ 0.1, 1, 10, 100μg/マウスのエストラジオール・17β を皮下注した群を第Ⅰ群、また、偽妊娠 D<sub>4</sub> および D<sub>5</sub> にそれぞれ前記と同量の E<sub>2</sub> 皮下注をした群を第Ⅱ群とした。実験 2: Ⅰ、Ⅱ 群とも上記と同じ処理日に E<sub>2</sub> 10μg + P 1mg を同時皮下注した区および E<sub>2</sub> 100μg + P 5mg を同時皮下注した区を作製した。これにより P の補充療法の効果を検討した。

移植成績の検討：移植後、偽妊娠 D<sub>5</sub> に受容雌を屠殺し、妊娠個体数（率）、着床胚、着床数（率）を摘出子宮で観察した。

## II. *in vitro* 着床実験：

子宮内膜上皮細胞単層培養系の作製法<sup>5)</sup>：ICR 系偽妊娠 D<sub>4</sub> 雌の両側子宮角を摘出し、PBS 中で脂肪組織を除去した。子宮角は 0.5% トリプシン (typeⅢ, Sigma) + 2.5% パンクレアチニン添加 Ca, Mg(-) ハンクス塩類溶液中に 4 °C、2 時間静置した。その後、室温にて、さらに 30 分～1 時間酵素作用させた後新鮮 PBS 中に移した。実体顕微鏡下に、間質より遊離しつつある内膜上皮組織を分離採取した。分離した内膜上皮組織は、0.05% トリプシン + 0.02% EDTA + 200units DNase を溶解した Ca, Mg(-) PBS を入れた 25ml 培養フラスコ中で 37°C、5 分間温浴振盪させた。その後、10% 濃度に冷 FCS を添加して、酵素作用を止め、細胞浮遊液を 100g × 3 分間遠沈した。沈渣を BME + AA<sup>4)</sup> にチャコールデキストラン処理した FCS 10% を添加した培地 (Spindle et al) で再浮遊させてから、細胞塊をフィルター (F-100-B) 濾過後、再遠沈した。分散細胞は上記培地をいれた 35mm 培養用ディッシュ (Falcon3001) に 6 × 10<sup>6</sup> cells ずつ植え込み、6 時間後に培地交換、24 時間後に confluent な内膜上皮单層細胞系を作製した。

体外受精卵の細胞および co-culture：媒精後 6 時間で前核期に達した受精卵を 100 μM EDTA 添加 m-WM に移し、さらに 96 時間培養して胞胚期に達した胚を用いた。これらの胞胚は、5~6 個ずつ confluent な子宮内膜上皮細胞单層培養系のディッシュへ移植した。

ホルモン処理：E<sub>2</sub> 添加は、co-culture 後直ちに 1, 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> ng/ml 濃度となるようにエストラジオール・17β をエタノール溶解して、それぞれ培地中に 5 日間連日添加した。また、他系列として、E<sub>2</sub> 添加と同時に 1, 5 μg/ml のプロゲステロン (6α-methyl-17α-acetoxypregnesterone) を同時に連日 5 日間添加した。コントロールとしてホルモン溶解量と同量のエタノール添加群を作製した。

in vitro における着床周辺期の胚発育の検討：着床周辺期胞胚は図のごとく、経日的にハッチング、接着 (attachment)、栄養芽細胞の伸展 (trophoblast outgrowth, TbOG)、2 層性胚盤 (two-layered ICM) へと発育分化する。in vitro 着床モデルとしてこれらの各発育段階に対してエストロゲンとプロゲステロンの高濃度環境が与える影響について観察した。すなわち、添加 E<sub>2</sub> および P 濃度に対する % 接着率、%TbOG 率、% 2 層性胚盤率との相関を検討した。

## &lt;結果&gt;

1. In Vivo 着床に対する効果：  $E_2$ 添加のコントロール雌の妊娠率は、100%(5/5)、総移植胚数52個に対する総着床胚数34個、着床率65%であった。また、1個体あたりの平均着床胚数は6.8個であった。これに対して、第Ⅰ群では $E_2$ 0.1~1.0 $\mu$ g皮下注区で妊娠率、着床率、平均着床率は各々0.1 $\mu$ g区75%、53%、6.7個、1.0 $\mu$ g区60%、26%、4.0個であり、コントロール群と比較して低下した。また、10~100 $\mu$ g皮下注区では受容雌それぞれ4匹、3匹に対して42、31個の胚を移植したが、着床を認めなかった。

第Ⅱ群ではコントロール区と0.1 $\mu$ g皮下注区とでは妊娠率、移植率、平均着床数各々100%、70%、6.4個、100%、65%、6.8個と有意差を認めなかった。しかし、1.0~10 $\mu$ g皮下注区では各々75%、51%、7.0個と40%、11%、2.5個で低下傾向を示した。また、100 $\mu$ g皮下注区では5匹の受容雌に対して45個の胚を移植したが、着床胚は皆無であった。この後さらに高エストロゲン環境による妊娠率の低下に対してプロゲステロンの同時投与が拮抗作用があるかどうかを検討した。Ⅰ群の $E_2$ 10 $\mu$ g皮下注区に対してP1 $\mu$ gを同時皮下注した場合には妊娠率、着床率、平均着床数は各々50%、36%、6.5個、また $E_2$ 100 $\mu$ g皮下注区にP5mgを同時皮下注した場合には40%、29%、6.0個と $E_2$ 単独投与群では着床率0%であったのに対してPの着床改善効果が認められた。また、第Ⅱ群でも $E_2$ +P=10 $\mu$ g+1mg皮下注区および $E_2$ +P=100 $\mu$ g+5mg皮下注区で各々妊娠率、移植率、平均着床胚数は60%、44%、6.7個、50%、33%、6.5個と $E_2$ 単独投与区と比較して同様にPの着床改善効果が認められた。

2. In Vitro 着床に対する効果： 写真1はコントロール群における子宮内膜上皮細胞単層培養系に接着直後の移植2日目の胚である。栄養芽細胞の伸展はまだ認められていない。写真2の左は、接着直後の胚盤における2層性発育をしめし、右は栄養芽細胞の伸展によって、周囲の子宮内膜上皮細胞は圧迫されICMのまわりにhaloを形成しているところである。

$E_2$ 無添加のコントロール区における胞胚の子宮内膜上皮細胞単層培養系に対する接着率は65%(13/20)、TbOG 60%(12/20)、2層性ICM 55%(11/20)であった。これに対して $E_2$ 添加各々1.0~10<sup>4</sup>ng/ml区での胞胚接着率は各添加区ともコントロール区と比較して有意差を認めなかった。TbOGは $E_2$ 1.0~10<sup>2</sup>ng/ml区まで有意差を認めなかつたが10<sup>3</sup>ng/ml添加区以上では低下傾向を認めた。また、2層性ICMでは1.0~10ng/ml添加区で有意差を認めなかつたのに対して、10<sup>2</sup>ng/ml添加区以上ではやはり低下傾向を認めた。

## &lt;考察&gt;

ヒトIVF-ETにおいて受精率に比較して、着床率が低い原因はまだ未解決の問題である。原因としては第1に受精卵の染色体異常によるもの、すなはち胚自身の問題。また、第2にIVF-ET卵の培養による発育遅延と子宮内膜とのギャップによる胚-子宮内膜不相関の問題。そして第3の問題点として、高エストロゲン環境下における着床不全の問題である。

第1番目の体外受精卵の染色体異常の問題では安部<sup>6)</sup>は体外受精・培養条件を4群に分類して、それぞれの条件下における発育胚の染色体における姉妹染色分体交換(SCE)スコアを報告している。これによると体外受精段階での接合子発生条件ではSCEスコアに影響を与えないが、受精後の環境要因では生体外培養系で胚を培養した場合、SCEスコアの上昇を認め、体外培養の胚に対する至適性の点

で問題があることを指摘している。また、Roslyn et al<sup>7)</sup>もヒトIVF-ETにおける受精卵の染色体異常の発生頻度は約20%程度であると報告しており、着床率を向上させるためには体外培養胚のquality controlを常に念頭においておく必要がある。

第2の問題点は体外受精培養胚の発育遅延が移植卵子と子宮内膜との位相のズレを引き起こすためいわゆるimplantation windowとの不相関が生じる問題である。体外受精培養胚の発育遅延はヒトを始め、マウス<sup>8)</sup>、サル<sup>9)</sup>その他の哺乳類で報告されている。この遅延に対して子宮内膜の位相がある程度同調することが必要である。安部<sup>6)</sup>はマウスの採卵同一個体による移植実験モデルを作製し、各体外培養時間ごとの移植実験を行った結果、採卵同一個体移植では過排卵処理、採卵時の麻酔剤など、何らかの子宮内膜増殖遅延因子が存在すると考えられ、このため子宮内膜が移植胚と調和し得る可能性を示唆している。しかし、実際にはどの程度調和し得るか、すなわちimplantation windowをどの程度ズラす可能性があるのかは不明である。このため、近年では体外受精卵の凍結胚を用いる方法で同調させる報告が見られるが着床率の大巾な向上は認められていない。

第3の問題点はIVF-ETが自然周期で実施されていた頃には問題にならなかった点である。しかし、卵胞刺激周期採卵がルチン化した現在のIVF-ET法においては多卵胞成熟を目的とする以上、高エストロゲン状態を回避することは出来ない。この高エストロゲン環境すなわち、P/E<sub>2</sub>比の低下やLH基礎値の高値が胚の着床に抑制的に働くのではないかという報告は以前より論議的である。<sup>10)11)12)</sup>着床周辺期の高エストロゲン環境が子宮環境の破壊<sup>11)</sup>もしくは直接的に胚発育に悪影響を及ぼすのであろうか。実際、ヒトIVF-ETにおいて高エストロゲン環境による妊娠率の低下と、これに対してPまたはhCGによる黄体補充療法により妊娠率の改善が認められている。<sup>13)</sup>しかし、この報告とは逆にDiamond et al<sup>1)</sup>は高エストロゲン(E<sub>2</sub>≥2,000pg/ml)群と低エストロゲン群との臨床的妊娠率の比較において有意差は全く無く、またこの高エストロゲン群に対するP補充療法を行っても、妊娠率に有意差はなかったと報告している。これらの相反する結論を検討することを目的として我々は今回の実験を行った。

in vitro 着床実験の結果からすると、移植直後D<sub>1</sub>より持続的に高エストロゲン状態に置かれた場合にはE<sub>2</sub>10μg以上で完全に着床阻害が起きているが、着床周辺期(D<sub>4</sub>～D<sub>5</sub>)のみの高エストロゲン状態では100μg以上の高濃度でないと完全阻害は認められなかった。Humphrey(1966)<sup>14)</sup>によれば卵巣摘除受容雌に対して移植胚の着床至適環境を形成するためにはE<sub>2</sub>0.025μgをD<sub>4</sub>とD<sub>5</sub>に、またはD<sub>1</sub>～D<sub>5</sub>までE<sub>2</sub>0.008μgを皮下注すれば充分であると報告している。この結果から考えれば今回のE<sub>2</sub>投与量は過剰であり、高エストロゲン環境であるといえる。適量のエストロゲンは移植胚そのものにも作用し、移植遅延胚の拡張期胞胚の形成や透明帯伸展によるハッチングを促進するといわれている。しかし、過剰なエストロゲンはFinn(1966)<sup>15)</sup>によれば子宮内膜の過剰状態、すなはち脱落膜腫を形成し、着床を阻害する。Gidley-Bairdら<sup>16)</sup>(1986)は自然交配による妊娠D<sub>4</sub>マウスにそれぞれE<sub>2</sub>単独群とE<sub>2</sub>+P注群を比較した結果、E<sub>2</sub>0.1μgではコントロール群(E無負荷)と妊娠率、平均着床数とも有意差はなかったが、E<sub>2</sub>10μg負荷群では妊娠率はコントロール群と比較して12.5%、平均着床胚数も22%に減少したと報告している。このように高エストロゲン環境下で着床不全が起きるのはマウスのみに限らず、猿

やヒトにおいても同様であり、避妊法開発の目的で研究がおこなわれている。今回の我々が行ったマウス体外受精卵移植における *in vivo* 着床結果も Gidley-Baird らの実験結果とほぼ同じ結果が得られ、体外受精卵を移植した場合にも、受容雌を高エストロゲン状態に置けば着床阻害が発生することが立証された。しかし、この高エストロゲン環境における着床阻害も P との同時投与によりエストロゲンの阻害効果は拮抗されることが判明した。この実験結果からすれば、胚移植後に黄体補充療法を行うことが妊娠率の向上に直結することは充分あり得ることである。ただし、ヒトとマウスでは黄体機能に差があり、マウスでは排卵後はっきりした黄体形成が認められないことから P の補充が効果的に作用している可能性が考えられる。

*in vitro* における高エストロゲン環境下の着床実験は今回の我々の報告以外に見当たらない。*in vitro* における胞胚の動態、すなわち接着、栄養芽細胞の伸展、胚葉形成などは *in vivo* の着床や栄養芽細胞の子宮内膜浸潤と必ずしもアナログとはいきれない点もあるが、Gwatkins<sup>17)</sup>によれば同一視を可としている。今回の我々の *in vitro* の着床実験では高エストロゲン環境は胚の着床になんの効果も与えなかつたが、 $10^2 \text{ ng/ml}$  以上で胚盤胞の分化が阻害され、 $10^3 \text{ ng/ml}$  以上の  $E_2$  濃度で TbOG が阻害された。この結果から、高エストロゲン環境は着床初期段階である胚の子宮内膜への接着には影響を及ぼさないが、接着後の栄養芽細胞の分化、子宮間質部への浸潤を阻害する。また、胚葉発育自体も阻害することによって着床、妊娠率の低下を引き起こしていると考えられる。しかしながら、 $10^2 \sim 10^3 \text{ ng/ml}$  以上の高  $E_2$  濃度は胞胚に対してかなり細胞毒性を発揮することも考えられ、これが栄養芽細胞や胚葉の分化を阻害している可能性も否定できない。この点を考慮にいれれば、これ以下の濃度では *in vitro* 着床や栄養芽細胞、胚葉分化にはなんら影響を及ぼさないことが明らかであるから、*in vivo* における高エストロゲン環境の着床阻害効果はエストロゲンの環境が直接に胚- 子宮内膜相関を阻害するのではなく、卵管における胚の輸送 (transport)に対する影響や子宮内での胚の定位 (aposition) や間隔どり (spacing) などの子宮筋の機能的な運動面に対して変化を与えることが考えられ、間接的に胚の着床阻害が惹起される可能性が示唆された。

写真 1

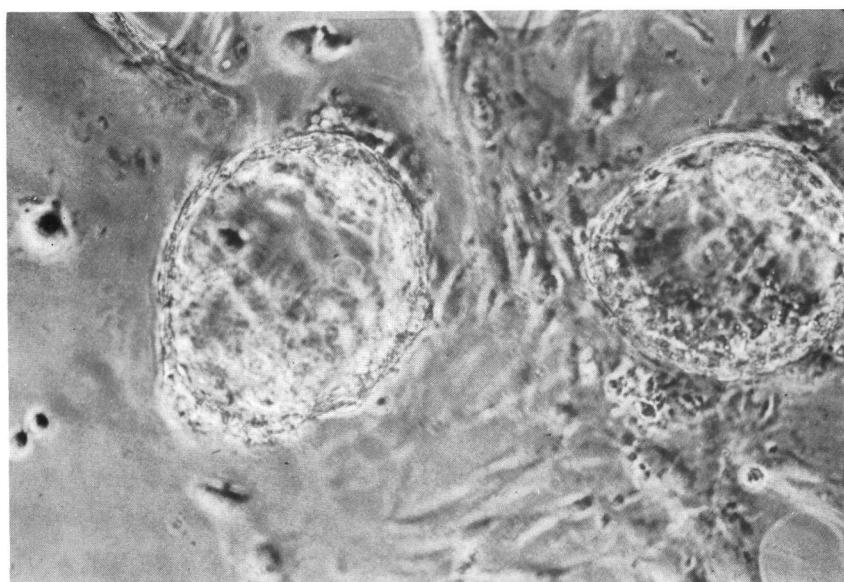


写真 2

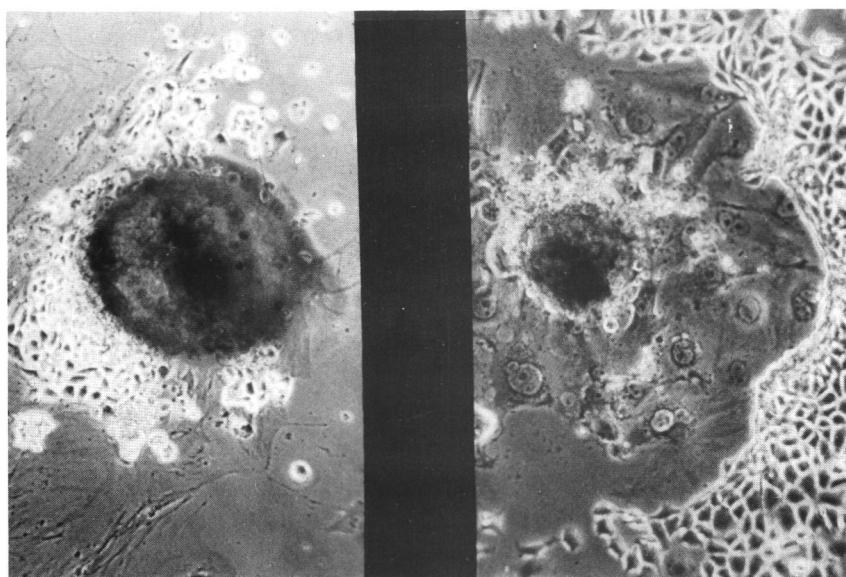


図 1

### In vivo 着床実験

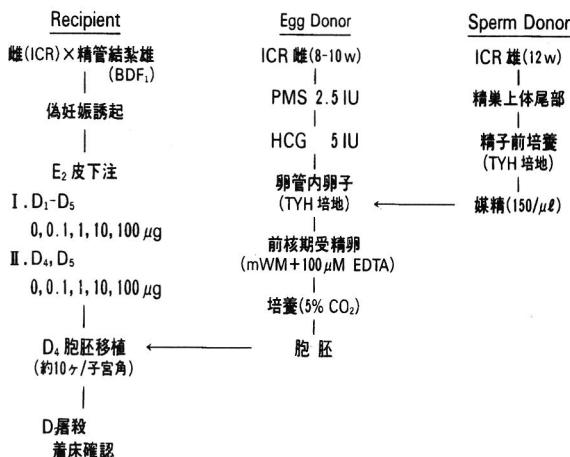


図 2

図 3

### In vitro 着床実験

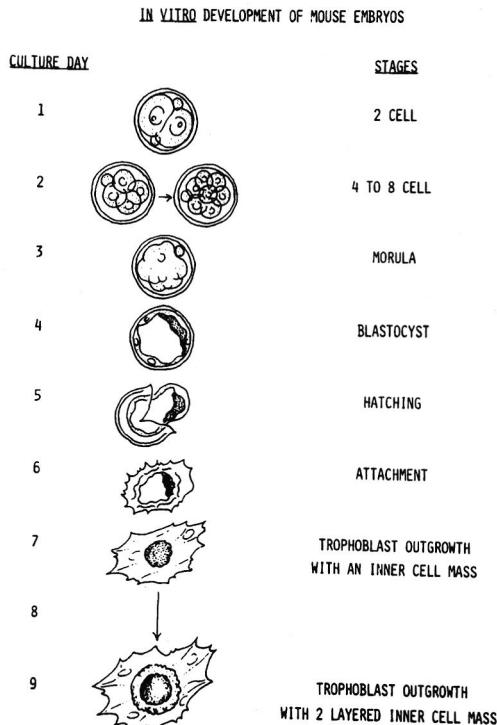
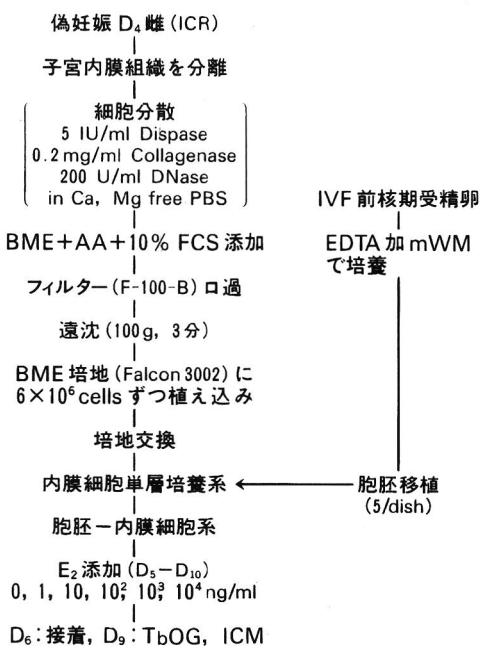


表 1

**Effect of E<sub>2</sub> on Implantation in Mice**

E <sub>2</sub> ( $\mu$ g)	No. of mice with implants /total (%)	No. of embryos transferred	No. of embryos implanted/ transferred (%)	Mean No. of implants/ mouse
0	5/5 (100)	52	34 (65)	6.8
0.1	3/4 (75)	38	20 (53)	6.7
I. (D <sub>1</sub> -D <sub>5</sub> )	1	3/5 (60)	47	12 (26)
	10	0/4 (0)	42	0
	100	0/3 (0)	31	0
	0	5/5 (100)	46	32 (70)
	0.1	5/5 (100)	52	34 (65)
II. (D <sub>4</sub> , D <sub>5</sub> )	1	3/4 (75)	41	21 (51)
	10	2/5 (40)	46	5 (11)
	100	0/5 (0)	45	0

表 2

**Effect of E<sub>2</sub> and P on Implantation in Mice**

E <sub>2</sub> ( $\mu$ g)+P( $\mu$ g)	No. of mice with implants /total (%)	No. of embryos transferred	No. of embryos implanted/ transferred (%)	Mean No. of implants/ mouse
I.	10+1	2/4 (50)	36	13 (36)
	100+5	2/5 (40)	42	12 (29)
II.	10+1	3/5 (60)	45	20 (44)
	100+5	2/4 (50)	39	13 (33)

表 3

**Effect of E<sub>2</sub> on Attachment and Development of Mouse Embryos In Vitro**

E <sub>2</sub> (ng/mℓ)	No. of BI. examined	Attachment (% of total)	Tb OG (% of total)	Two-layered ICM (% of total)
0	20	13 (65)	12 (60)	11 (55)
1	23	15 (65)	13 (57)	13 (57)
10	21	14 (67)	12 (57)	11 (52)
10 <sup>2</sup>	18	12 (67)	10 (56)	8 (44)
10 <sup>3</sup>	20	14 (70)	9 (45)	7 (35)
10 <sup>4</sup>	17	11 (64)	6 (35)	2 (12)

文献

- 1) Diamond, M. P., Buchholz, T., Boyers, S. P., Gadlavy, Shapiro, B. S. and DeCherney, A. H. : Super High Estradiol Response to Gonadotropin Stimulation in Patients Undergoing in Vitro Fertilization. *J. IVF & ET.* 6:81-84, (1989)
- 2) 豊田裕, 横山峰介, 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*, 16:4-10, (1971)
- 3) Bronson, R. A. and McLaren, A. : Transfer to the Mouse Oviduct of Eggs with and without the Zona Pellucida. *J. Reprod. Fert.* 22:129-137, (1970)
- 4) Spindle, A. I. : An Improved culture medium for mouse blastocysts, *In vitro*. 16:669-674, (1980)
- 5) Sherman, M. I. : Implantation of Mouse Blastocysts in Vitro. In *Methods in Mammalian Reproduction*, Edited by J. C. Daniel, Jr., New York, Academic Press, Inc. p247, (1978)
- 6) 安部裕司: マウス体外受精卵の移植成績に及ぼす環境因子と子宮内膜相関の検討, *日産婦会誌*, 40:821-827, (1988)
- 7) Roslyn, R. A., Aitken, R. J., VanLook, P. F. A., Mary, A. L. and Templeton, A. A. : Chromosome Abnormalities in Human Embryos after in Vitro Fertilization, *Nature*, 303:336-338, (1983)
- 8) Fisher, D. L. and Smithberg, M. : Host-transplant relationship of cultured mouse embryos, *J. Exp. Zool.*, 183:263-274, (1973)
- 9) Suzuki, S. and Mastroianni, I. Jr. : The Fertilizability of in-vitro cultured monkey ovarian follicular oocytes, *Fertil. Steril.*, 19:500-508, (1968)
- 10) Dirnferd, M., Lejeune, B., Camus, M., Vekemans, M., and Leroy, F. : Growth rate of follicular estrogen in relation to the outcome of in vitro fertilization and embryo replacement, *Fertil. Steril.*, 43:379-387, (1985)
- 11) DeCherney, A. H., Tarlatzis, B. C., and Laufer, N. : Follicular development: lessons learned from human in vitro fertilization, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 153:911-921, (1985)
- 12) Stanger, J. D., Yovich, J. L. : Reduced in-vitro fertilization of human oocytes from patients with raised basal luteinizing hormone levels during the follicular phase, *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 92:385-392, (1985)
- 13) Nader, S., Berkowitz, A. S., Ochs, D., Held, B., and Winkel, C. A. : Luteal-phase Support in Stimulated cycles in an in vitro fertilization/embryo transfer program: progesterone versus human chorionic gonadotropin., *J. IVF&ET*, 5:81-84, (1988)
- 14) Humphrey, K. W. : Induction of implantation of blastocysts transferred to ovariectomized mice., *J. Endocr.*, 44:299-305 (1969)
- 15) Finn, C. A. : Endocrine control of endometrial sensitivity during the induction of the decidual cell reaction in the mouse, *J. Endocr.*, 36:239-248, (1966)
- 16) Gidley-Baird, A. A., O'Neill, C., Sinosich, M. J., Porter, R. N., Pike, I. L. and Saunders, D. M. : Failure of implantation in human in vitro fertilization and embryo transfer patients: the effects of altered progesterone/estrogen ratios in humans and mice, *Fertil. Steril.*, 45:69-74, (1986)
- 17) Gwatkins, R. B. L. : Amino acids requirements for attachment and outgrowth of the mouse blastocyst in vitro, *J. Cell. Physiol.*, 68:335-347, (1968)

マウス2細胞期胚凍結保存用耐凍剤の検討

A study of the cryoprotectant used for freeze preservation of mouse embryos

\*渡辺清彦, \*星 和彦, \*佐藤 章, \*堀内俊孝

Kiyohiko Watanabe, Kazuhiko Hoshi, Akira Sato and Toshitaka Horiuchi

\*福島県立医科大学産科婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Fukushima Medical College,  
Fukushima 960-12, Japan

\*広島農業短期大学

Hirosshima Agricultural College, Shohara City, Hiroshima, Japan

#### Summary

We have studied the method of cryopreservation of mouse embryos.

First of all we examined the effect of propanediol(ROH) as a cryoprotectant on survival of frozen-thawed embryos. The highest survival rate was obtained when we used Embryo Transfer Freezing Medium(ETFM) included 1.5M PROH as a cryoprotectant.

Then we studied the effect of addition of sucrose or trehalose to freezing media (1.5M PROH, 1.5M Glycerol, 1.5M dimethyl-sulphoxide(DMSO)) on survival of mouse embryos. The survival of embryos frozen in the medium containing 1.5M PROH + 0.075M trehalose was considerably increased compared with others.

These results suggest that the medium containing 1.5M PROH + 0.075 M trehalose may be useful as the freezing medium of human embryos.

## 緒言

体外受精・胚移植法は重症不妊症に対する治療法として普及してきたが、妊娠率の向上と採卵回数の減少、多胎妊娠の回避など患者の身体的負担軽減を目的とした受精卵あるいは未受精卵の凍結保存が新たな検討課題になってきた。著者らはより安全で効率の良い凍結保存・融解法を確立すべく、基礎的研究を進めているが、今回マウス受精卵を用いて生存率の高い新たな凍結保存・融解法の開発を試みたので報告する。

胚凍結の耐凍剤には、細胞膜透過性の物質と非透過性の物質があるが、単独使用で有効なのは全て細胞膜透過性を有するものである。そこで細胞膜透過性のある物質を単独で用いた場合と、それに非透過性のものを添加した場合の胚生存性に与える影響を比較し、その有用性について検討を加えた。非透過性耐凍剤としては従来からショ糖(sucrose)が知られているが、本研究では同じ二糖類であるトレハロース(trehalose)もとりあげてみた。

## 研究材料ならびに方法

### 1. 受精卵の準備

C57BL マウスの2細胞期胚を実験に供した。

7~9週令のC57BL メスマウスに pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) 8i.u. と human chorionic gonadotropin(hCG) 8i.u. を48時間間隔で腹腔内投与し、その後受胎能力の確認されている同系オスマウスと交配させた。hCG 投与42~44時間後メスマウスを開腹し、両側卵管から2細胞期胚を乱切法にて採取した。

### 2. 凍結法

各割球とも正常な形態を呈する2細胞期胚を被検耐凍剤を含んだ凍結媒液に移し、その後0.25mlの凍結チューブに20~40個の割合で移した。凍結はプログラミングフリーザー(フジヤ矢野科学 ET-U3)を用い、室温より-1°C/minで-7°Cまで冷却して植氷した。その後、-30°Cまで-0.3°C/minで冷却し、10分間平衡させた後液体窒素(-196°C)に浸漬して一定期間保存した。凍結操作の手順の概略は図1に示した。

融解は凍結チューブを液体窒素から取り出し、37°C微温湯中に静置する方法で行なった。この時の温度上昇速度は約300°C/minになる。

### 3. 耐凍剤の除去

融解後、胚を細胞膜非透過性の耐凍剤(sucroseもしくはtrehalose)を含む溶液に移し、その中に5~10分置いた後modified Biggers, Whitten and Whittingham液(mBWW)<sup>1)</sup>に移して耐凍剤を除去した(1段階希釈)。

### 4. 融解後胚の培養と生存性の評価

融解胚をmBWWに移し、37°C, 5%CO<sub>2</sub> 大気下で48時間培養する。融解後の胚を観察し凍結前と同様の鮮明な輪郭と立体感のある形態を維持し、割球の変性が1個以下の場合を形態正常胚と判定し、その後胞胚まで発育したもの生存卵とした。

## 5. 凍結媒液

Embryo Transfer Freezing Medium (ETFM, GIBCO製) を使用した。

## 6. 被検耐凍剤の種類と調製

細胞膜透過性の耐凍剤としては、グリセロールglycerol, ジメチルスルフォキサイドdimethylsulphoxide(DMSO), プロパンダイオール propanediol(POOH)を、非透過性のものとしてはショ糖sucrose とトレハロースtrehalose を使用した。単独で用いるときは全て透過性の耐凍剤とし、その濃度は1.5Mにした。複合で使う時は、1.5Mの透過性耐凍剤に0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.3, 0.6, 1.0, 1.5, 2.0Mの非透過性耐凍剤を加えたものを使用した。融解時に耐凍剤除去のために使う希釀剤としては、添加したものと同じ細胞膜非透過性の物質を0.3Mの濃度で用いた。

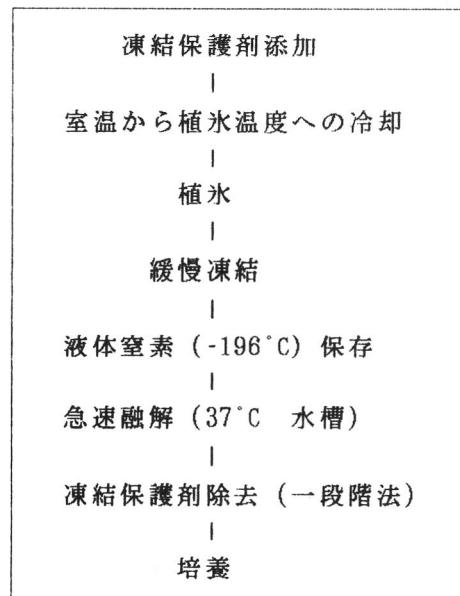


図1. マウス2細胞期胚の凍結操作手順

## 成績

各耐凍媒液を用いて行なった凍結保存後のマウス2細胞期胚が、融解直後少なくとも割球の1個が形態学的に正常であった率すなわち形態正常胚の割合は表1に示した通りである。

形態正常胚を培養液に移して調べた胚の生存率は表2に示した。凍結させない新鮮卵をcontrolとしたが、その生存率は97.0% (97/100) であった。

耐凍剤を単独で使用したときはPROHの成績が最も良く、しかも希釀液としては sucroseよりも trehaloseを使用した時の方が優れていた (1.5M PROHで凍結保存・0.3M trehaloseにて希釀…胚生存率70.1%，1.5M PROHで凍結保存・0.3M sucrose希釀…68%)。

細胞膜非透過性の耐凍剤添加の効果は、sucroseにしろtrehaloseにしろ0.075Mの添加時に特異的な生存率上昇効果(図2~3)を示した。今回検討した組合せの中では、1.5M PROH + 0.075M trehalose使用時の生存率が80%と最も高く、次いで1.5M glycerol + 0.075M trehalose及び1.5M DMSO + 0.075M trehaloseの76%であった。

表1. 凍結胚の融解時における形態正常率 (%)、形態正常胚数／凍結胚数)

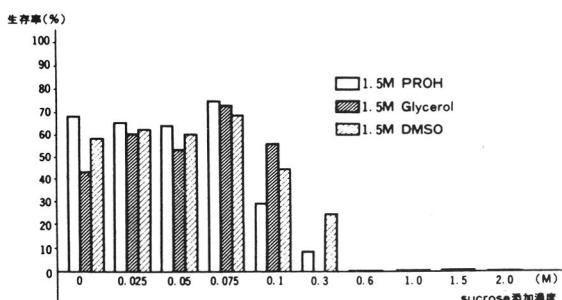
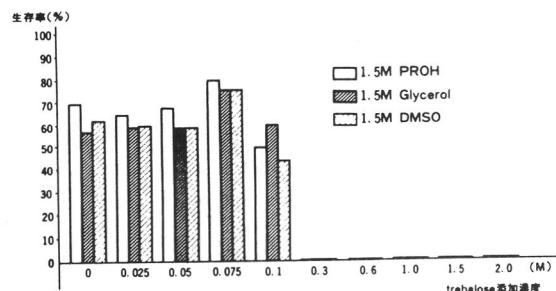
耐凍剤	sucrose の 添加濃度 M										
	0 M	0.025M	0.05M	0.075M	0.1M	0.3M	0.6M	1.0M	1.5M	2.0M	
1.5M PROH	82%	89%	91%	93%	87%	96%	95%	100%	55%	42%	
	90/110	49/55	50/55	51/55	41/47	26/27	19/20	3/3	6/11	5/12	
1.5M Glycerol	94%	94%	92%	98%	82%	100%	100%	100%	100%	100%	
	91/97	48/51	49/53	49/50	41/50	52/52	10/10	10/10	10/10	10/10	
1.5M DMSO	85%	91%	91%	95%	86%	92%	92%	100%	70%	73%	
	86/101	50/55	50/55	52/55	43/50	46/50	11/12	11/11	7/10	8/11	

耐凍剤	trehalose の 添加濃度 M										
	0 M	0.025M	0.05M	0.075M	0.1M	0.3M	0.6M	1.0M	1.5M	2.0M	
1.5M PROH	94%	94%	93%	93%	92%	85%	70%	100%	86%	90%	
	117/125	52/55	50/54	50/54	46/50	34/40	7/10	13/13	6/7	9/10	
1.5M Glycerol	95%	93%	94%	93%	94%	98%	100%	100%	100%	100%	
	101/106	51/55	51/54	50/54	47/50	49/50	10/10	10/10	10/10	10/10	
1.5M DMSO	83%	91%	92%	89%	86%	86%	92%	100%	100%	100%	
	85/103	50/55	49/53	50/56	43/50	43/50	11/12	10/10	10/10	10/10	

表2. 使用耐凍剤別凍結・融解胚の生存率 (%)、生存胚数／培養胚数)

耐凍剤	sucrose の添加濃度 M									
	0 M	0.025M	0.05M	0.075M	0.1M	0.3M	0.6M	1.0M	1.5M	2.0M
1.5M PROH	68% 61/90	65% 32/49	64% 32/50	75% 38/51	29% 12/41	8% 2/26	0% 0/19	0% 0/3	0% 0/6	0% 0/5
1.5M Glycerol	43% 39/91	60% 29/48	53% 26/49	73% 36/49	56% 23/41	0% 0/52	0% 0/10	0% 0/10	0% 0/10	0% 0/10
1.5M DMSO	58% 50/86	62% 31/50	60% 30/50	69% 36/52	44% 19/43	24% 11/46	0% 0/11	0% 0/11	0% 0/7	0% 0/8

耐凍剤	trehalose の添加濃度 M									
	0 M	0.025M	0.05M	0.075M	0.1M	0.3M	0.6M	1.0M	1.5M	2.0M
1.5M PROH	70% 82/117	65% 34/52	68% 34/50	80% 40/50	50% 23/46	9% 3/34	0% 0/7	0% 0/13	0% 0/6	0% 0/9
1.5M Glycerol	57% 58/101	59% 30/51	59% 30/51	76% 38/50	60% 28/47	35% 17/49	0% 0/10	0% 0/10	0% 0/10	0% 0/10
1.5M DMSO	62% 53/85	60% 30/50	59% 29/49	76% 38/50	44% 19/43	37% 16/43	0% 0/11	0% 0/10	0% 0/10	0% 0/10

図2. 凍結・融解胚の生存率  
sucroseの添加効果図3. 凍結・融解胚の生存率  
trehaloseの添加効果

## 考察

哺乳動物胚の凍結保存は、1972年にWhittinghamら<sup>2)</sup>及びWilmut<sup>3)</sup>によって、マウス胚を用いての優れた方法が開発されて以来、ラット<sup>4)</sup>・ウサギ<sup>5)</sup>などの実験小動物や主要家畜のウシ<sup>6)</sup>・ヒツジ<sup>7)</sup>・ヤギ<sup>8)</sup>・ウマ<sup>9)</sup>で成功が伝えられ、正常仔が得られている。ヒトでは体外受精・胚移植法の普及にともない、その成功率向上と患者の身体的負担軽減のために胚凍結保存の重要性が指摘され、基礎的臨床的検討が開始されて既に妊娠成功例の報告<sup>10)11)</sup>もなされている。われわれも本法を臨床の場に導入することの必要性を痛感し、先ず最良の凍結媒液開発をめざした。

今回実験に用いたのはマウス2細胞期胚である。凍結・融解に対する感受性は早期の胚程高く、ヒトの体外受精では現実的に初期胚の凍結保存が必要とされているため、2細胞期胚での検討は重要と思われる。

検討した耐凍剤は、従来から使用されている PROH<sup>12)</sup>・glycerol<sup>13)</sup>・DMSO<sup>14)</sup>・sucrose<sup>11)</sup>と最近注目されているtrehalose<sup>15)</sup>である。細胞膜透過性耐凍剤を1.5Mの濃度で単独で用いた時は、PROHがglycerolやDMSOよりも良好な生存率を示した。ポリオールの凍害保護効果はC鎖の炭素数が増すにつれて高くなり、炭素数が同じ場合-OHを多く有している物質程高いといわれる。しかし、われわれの検討では2価のアルコールであるPROHを使用したときの方が3価のglycerolより生存率が高く、単に-OHの数だけではない要因が働いている可能性がある。

trehaloseは sucroseと同じ二糖類で分子量・物理化学的性状ともよく似た細胞膜非透過性の物質である。trehaloseは植物に含まれ、その含有量の多いものは耐寒性に優れている。また、動物では昆虫の血液とリンパ液に比較的多く存在し、主要糖質になつてているばかりでなく不凍剤としての効力も有し、季節によってその濃度を調節して耐寒性を得ているといわれる。そのため、以前から耐凍剤として用い得る可能性が指摘されていた<sup>16)</sup>が、そのような報告例は少ない。trehaloseや sucroseは細胞膜非透過性であるため、単独使用は不可能で細胞膜透過性の耐凍剤へ添加したときの効果の有無が重要となる。今回のマウス胚を用いての検討では、細胞膜透過性の耐凍剤に0.075Mという微量の細胞膜非透過性耐凍剤を加えたとき胚の生存性・発生能に飛躍的上昇を認めることができた。細胞膜非透過性耐凍剤を加えることにより脱水効果を更に高めたことが胚の生存率を上昇させる結果に結びついたものと思われるが、0.075Mという濃度に特異的なことは興味深い。sucroseと trehaloseを比較すると、trehalose 添加の方が優れている。生存率に大きな差があるわけでは無いが、体外受精の成功率を上げるために少しでも良い成績を示す耐凍剤が望まれる。1.5M PROH + 0.075M trehaloseを含む凍結媒液の応用は、良好なヒト胚凍結保存への可能性を示唆していると考えられる。

文献

- 1) Overstreet, J.W., Yanagimachi, R., Katz, D.F., Hayashi, K. and Hanson, F.W.: Penetration of human spermatozoa into the zona-free hamster egg: A study of fertile donors and infertile patients. *Fertil. Steril.*, 35, 457-463, 1981
- 2) Whittingham, D.G., Leibo, S.P. and Mazur, P.: Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. *Science*, 178, 411-414, 1972
- 3) Wilmut, I.: The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sciences*, 11, 1071-1079, 1972
- 4) Whittingham, D.G.: Survival of rat embryos after freezing and thawing. *J. Reprod. Fert.*, 43, 575-578, 1975
- 5) Whittingham, D.G. and Adams, C.E.: Low temperature preservation of rabbit embryos. *J. Reprod. Fert.*, 47, 269-274, 1976
- 6) Polge, C., Wilmut, I. and Rowson, L.E.A.: The low temperature preservation of cow, sheep and pig embryos. *Cryobiol.*, 11, 560, 1974
- 7) Willadsen, S.M., Polge, C., Rowson, L.E.A. and Moor, R.M.: Deep freezing of sheep embryos. *J. Reprod. Fert.*, 46, 151-154, 1976
- 8) Bilton, R.J. and Moore, N.W.: In vitro culture, storage and transfer of goat embryos. *Aust. J. Biol. Sci.*, 29, 125-129, 1976
- 9) Yamamoto, Y., Oguri, N., Tsutsumi, Y. and Hachinohe, Y.: Experiments in the freezing and storage of equine embryos. *J. Reprod. Fert.*, Suppl., 32, 399-403, 1982
- 10) Trounson, A. and Mohr, L.: Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*, 305, 707-709, 1983
- 11) Quinn, P. and Kerin, J.F.P.: Experience with the cryopreservation of human embryos using the mouse as a model to establish successful techniques. *J. In Vitro Fertil. Embryo Trans.*, 3, 40-45, 1986
- 12) Renard, J.P. and Babinet, C.: High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straws with 1-2 propanediol as cryoprotectant. *J. Exp. Zool.*, 230, 443-448, 1984
- 13) Smith, A.U.: Biological effects of freezing and supercooling. Edward Arnold Ltd., London, p 10-12, 1961
- 14) Balmaceda, J.P., Heitman, T.O., Garcia, M.R., Pauerstein, C.J. and Pool, T.B.: Embryo cryopreservation in cynomolgus monkeys. *Fertil. Steril.*, 45, 403-406, 1986
- 15) Honadel, T.E. and Killian, G.J.: Cryopreservation of murine embryos with trehalose and glycerol. *Cryobiology*, 25, 331-337, 1988



透明帯開孔術後卵子（ハムスター，ヒト）  
の走査型電子顕微鏡による観察

Scanning Electron Microscopic Observation of Zona  
Drilled Hamster and Human Oocytes

井上正人・松井素子・小林善宗・本田育子・淡路英雄・  
津田朋男・藤井明和

Masato INOUE, Motoko MATSUI, Yoshimune KOBAYASHI  
Ikuko HONDA, Hideo AWAJI, Tomoho TSUDA, and  
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

Zona drilled hamster and human oocytes were examined by scanning electron microscope. In the hamster mechanical drilling by micropipette created a beautiful hole mimicking sperm penetration hole left on the zona. Chemical drilling with acidic solution (PH 2.2) made a round, straight hole with the size corresponding to the micropipette used. In the human oocytes, mechanical drilling formed a round, somewhat irregular, micropipette sized hole. Neither the zona surface, nor the microvilli were damaged. On the contrary, drilling with acidic solution resulted in the formation of a large, V-shaped hole, reflecting the different solubility properties of human zona pellucida. The microvilli on the plasma membrane were apparently affected. These results indicate that a simple drilling by micropipette is enough to create a hole sufficient for sperm passage, and that acidic solution is not recommended for human zona drilling because of potential damage to the vitellus.

緒 言

乏精子症は単に精子の数が少ないだけでなく、その多くは機能障害、すなわち精子の受精能力異常や受精能力障害を伴っている<sup>1</sup>。したがって、乏精子症の予後は不良で受精能力障害を合併する場合は妊娠は絶望的である。また受精能力異常を伴う場合は、IVF を行っても受精する確率はきわめて低く、GIFT に対しても多くは期待できない<sup>1</sup>。1986年 Gordon らはマウスをモデルに micromanipulator と酸性溶液で透明帯に小さな穴を開ける方法、透明帯開孔術 zona drilling を開発し、乏精子症の治療に新たな道をひらいた<sup>2</sup>。透明帯は精子侵入に対する最大の閑門であり、zona drilling は受精能力異常を伴う男性不妊にとって非常に魅力的な方法である。透明帯開孔術の臨床応用はその後急速に進み、partial zona dissection 法による妊娠、

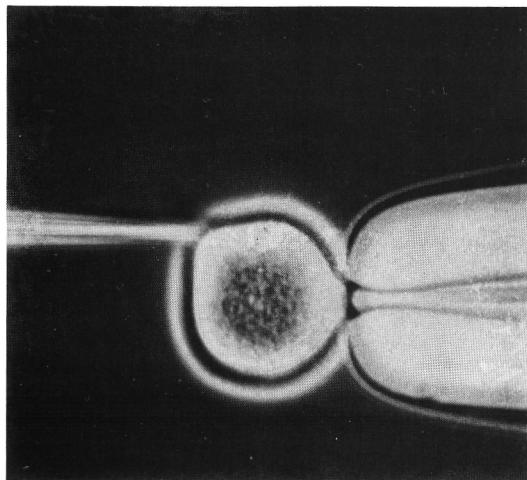


図 1 ハムスター卵子。酸性溶液 (PH2.2) を用いて開孔術を行っているところ。

分娩例がすでに報告されている<sup>3,4</sup>しかし透明帯開孔術によって、①どの程度の穴が生ずるのか、②酸性溶液の影響はないか、といった点については何も分かっていない。そこで我々は、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて、透明帯開孔術後のハムスターおよびヒト卵子を観察し、酸性溶液による化学的な開孔術と micropipette を用いた機械的な開孔術を比較検討した。

#### 実験材料および方法

**ハムスター卵子：**6～8周齢のゴールデンハムスターに PMS, HCG を定法に従って投与し過排卵誘起を行った。HCG 注射後 16～17 時間でハムスターを屠殺し、卵管膨大部より卵子を採取した。卵子は 0.1% hyaluronidase にて顆粒膜細胞を除去してから実験に供した。

**ヒト卵子：**ヒト卵子は IVF で受精しなかったものを患者の同意を得て使用した。過排卵は主として GnRHa-HMG-HCG にて行った。月経第 1 日目より GnRHa (スプレキュア) 600～900 μg/日を投与し、3 日目より HMG 150～300 IU を連日注射した。2 個以上の卵胞が 18mm 程度、血中 estradiol 300 pg/ml/卵胞 ( $\geq 15$  mm) 以上になった時点で HMG を中止し、約 32 時間後に HCG 1000 IU を筋注した。なお GnRHa の鼻腔内投与は HCG の注射までとした。採卵は HCG 注射後 36 時間で、経腔的に行った。成熟卵子は 5～7 時間

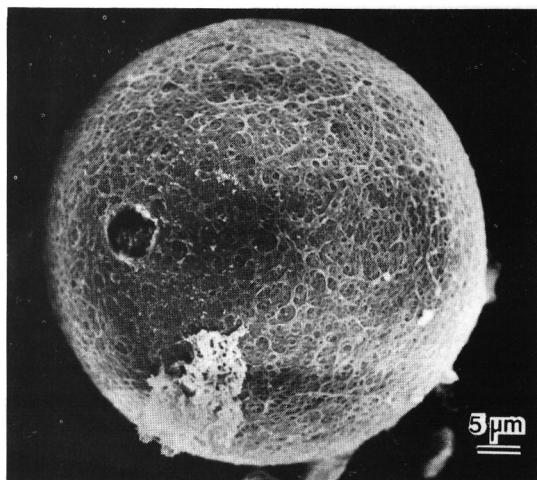


図 2 ハムスター卵子。図 1 の SEM 像。円筒状の穴が形成されている。

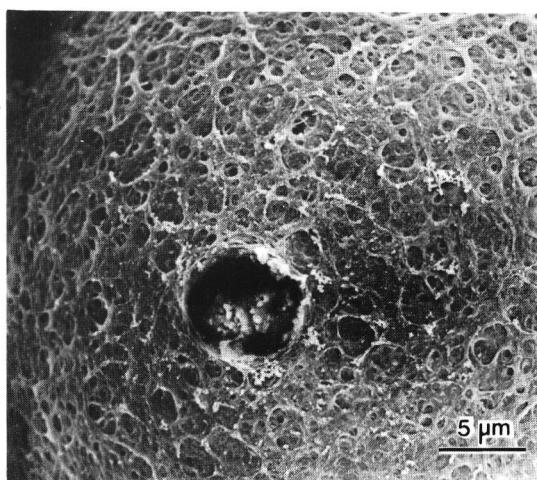


図 3 ハムスター卵子。図 2 の強拡大。microvilli に変化が認められる。

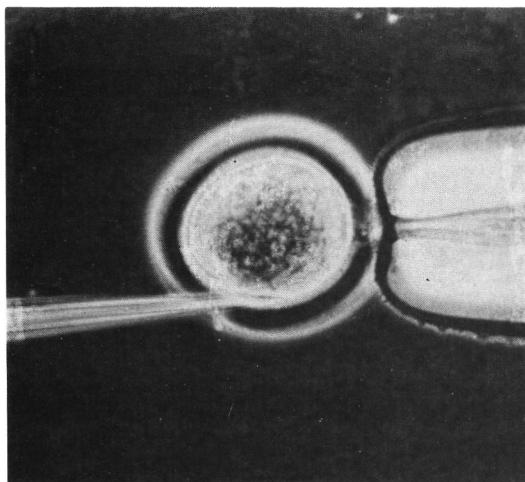


図4 ハムスター卵子。micropipette を用いて開孔術を行っているところ。

の前培養ののち, swim up 法で集めた運動精子 ( $5\sim10\times10^4/\text{ml}$ ) を加えてさらに培養した (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% air)。培養液は HTF に 7.5% 非働化臍帯血清を加えたものを使用した。受精の有無は媒精後約18時間で雌雄前後の存在により判定した。非受精卵は micropipette で顆粒膜細胞および精子をよく除去してから実験に供した。  
透明帯開孔術：卵子は卵丘腔を広くするため、まず 0.5M sucrose を加えた PBS で 15 分間処理した。ハムスター卵子は modifide BWW 液に、ヒト卵子は 15% 非働化臍帯血清を加えた HTF に移して実験を行った。micromanipulator (ナリシゲ, MO-102) を用いて倒立顕微鏡 (オリンパス, IMT-2) 下に卵子をマイクロホルダーで固定した。化学的な開孔術ではマイクロピペットに酸性溶液 (PH 2.2) を吸引し、先端を透明帯に軽く押しあて、ごく少量の酸性溶液を圧出した (図1)。透明帯が溶解したたらただちにマイクロピペットを離し、卵子を数回培養液で洗浄した。機械的な開孔術では、先端を円く塞いだ micropipette を卵実質を傷つけないように斜めに卵丘腔内に刺入した (図4)。ヒト卵子については、一回の操作で 2 個の穴を開けることができる串刺法を試みた。(図9)。開孔術後の卵子は 2% glutaraldehyde-0.025 M phosphate buffer で 22~24 時間固定した。ついで 0.2% poly-L-lysine であらかじめ処理したカバーガラス上に移し、培養させてから上昇アセトン系列で脱水し、臨界点乾燥を行った、炭素およ

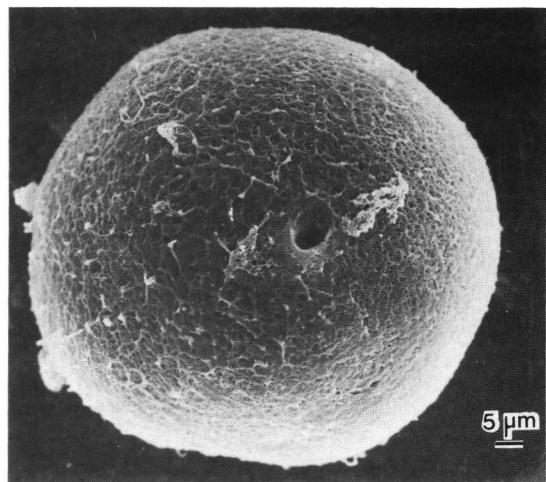


図5 ハムスター卵子。図4の SEM 像。精子侵入孔を思わせるきれいな穴が形成されている。

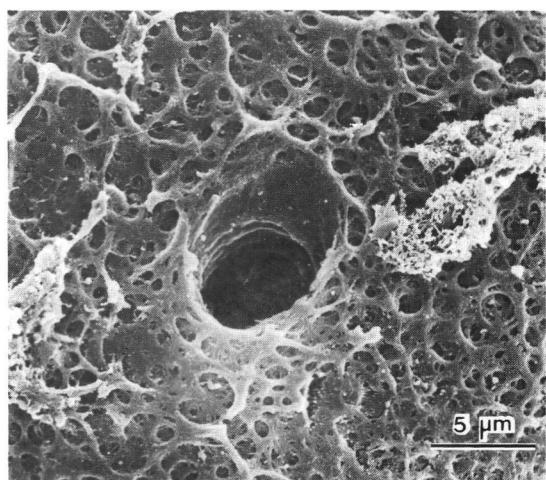


図6 ハムスター卵子。図5の強拡大。

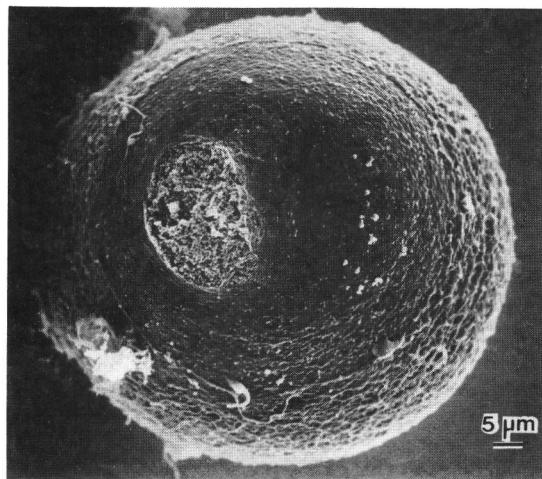


図7 ヒト卵子。酸性溶液を用いた開孔術。すり鉢状の大きな穴が形成されている。

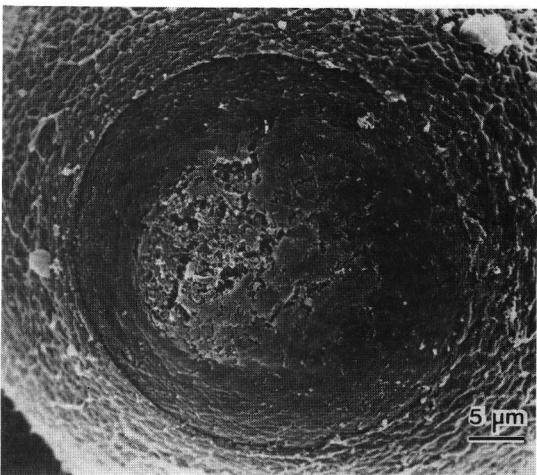


図8 もう一つのヒト卵子。酸性溶液による影響が microvilli に認められる。

び金で二重蒸着後、日本電子 JSM-35型 SEM にて観察した。

### 結 果

**ハムスター卵子：**酸性溶液 (PH 2) を用いた透明帯開孔術では、ほぼ micropipette の太さに見合った辺縁の比較的シャープな円い穴が形成された (図2, 3)。透明帯の表面にはとくに変化なく、酸性溶液による開孔部周辺への影響は認められなかった (図3)。しかし開孔部直下の卵子微絨毛にはかなりの変化が観察された (図3)。micropipette による機械的な開孔術では、micropipette の太さに相当する辺縁のシャープな、あたかも精子侵入孔を思わせるような穴が形成された (図5, 6)。開孔部周辺の透明帯はまったく正常で、斜めに開けられた穴の内面も平滑であった。(図6)。

**ヒト卵子：**化学的な開孔術では、ハムスター卵子と異なり、すり鉢状の大きな穴が形成された (図7, 8)。開孔部周辺の透明帯表面には広い範囲にわたって、酸性溶液による影響が観察された (図7)。また開孔部直下の卵子微絨毛にもかなりの変化が認められた (図7, 8)。これに対して、micropipette を用いた串刺し法では、辺縁のやや不規則な、大きさの多少ちがう 2つの穴が形成された (図10)。開孔部周辺の透明帯表面には異常なく、また外から見える範囲では卵子表面の微絨毛にもとくに変化は認められなかった (図11)。

### 考 察

IVF-ET, GIFT, IVF-ETR といった配偶子操作の開発により、女性不妊の治療は大きく進歩した<sup>1</sup>。借腹 surrogate mother や卵子提供 ovum donation まで入れれば、少くとも理論的には女性不妊のほとんどが治療可能になったと言っても過言ではない。

これに対して、男性不妊の予後はいまだ不良である。男性不妊に対しては適確な治療法が無いと言った方が

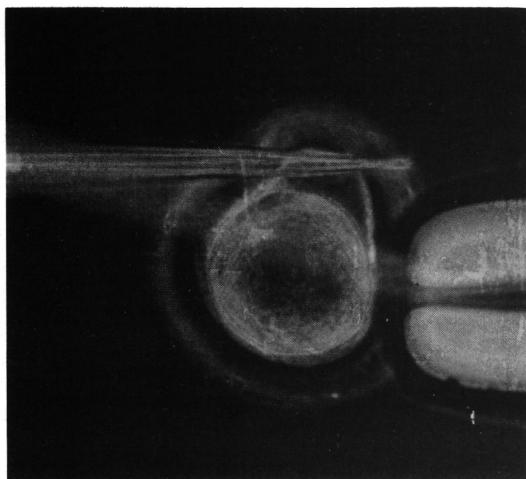


図9 ヒト卵子。串刺し法を行っているところ。

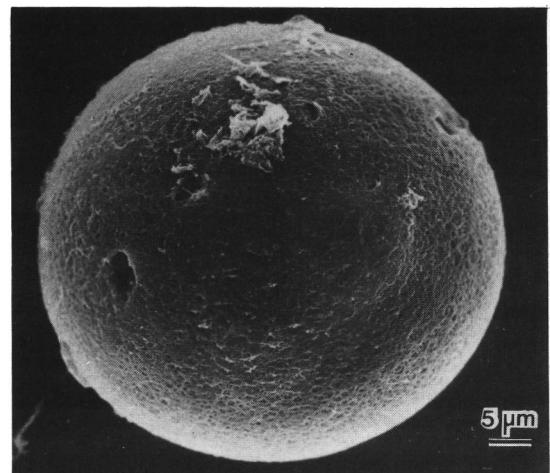


図10 ヒト卵子。串刺し法により2個の穴が形成されている。

正確かもしれない。薬物療法は古くから行われているが有効性の確立されたものはほとんど無い。もっとも汎用されている人工授精（AIH）においても、その有効性については疑問視されている<sup>5</sup>。男性不妊の予後が悪いのは、単に精子の数や運動率の問題ではなく、その多くが精子の機能障害を伴うためである<sup>1</sup>。Ca ionophore A23187 を用いた zona-free hamster egg sperm penetration test (ZSPT) を行うと、乏精子症 ( $\leq 20 \times 10^6 / \text{ml}$ ) の29.8%に精子受精能力障害 (ZSPT 0%) が、また 35.4% に精子受精能力異常 (ZSPT  $\leq 30\%$ ) が認められる<sup>1</sup>。男性の妊娠性にとてもっとも重要なのは精子の受精能力である。精子の受精能力に問題なければ、すなわち ZSPT が正常 ( $\geq 70\%$ ) であれば、乏精子症や精子無力症であっても、予後は正常男子の場合と変わらない<sup>1</sup>。これに対して精子受精能力障害を伴う場合は妊娠は絶望的である。IVF を行っても当然のことながら受精しない。精子受精能力異常を合併する場合も予後は明らかに悪い<sup>1</sup>。IVF で受精する確率はきわめて低く、また GIFT を行っても妊娠率は ZSPT 正常・中間群 ( $> 30\%$ ) の約1/3である（未発表データ）。

透明帯は受精、すなわち精子侵入に対する最大の閂門であり、この膜を除去すると容易に受精されることはよく知られている。1986年 Gordon and Talansky<sup>2</sup> はマウスをモデルに micromanipulator と酸性

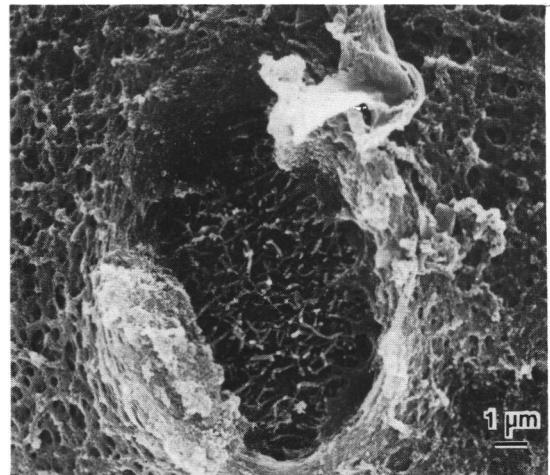


図11 ヒト卵子。図10の強拡大。microvilli は正常に保たれている。

Tyrode液を用いて透明帯に小孔を開ける方法、すなわち zona drilling を開発し、① $10^4$ 程度の低い精子濃度でも約15%受精すること、②卵子の損傷は4.7%と低く、多精子受精もとくに多くないこと、③受精卵の着床後の発育は対照群と変わること、を明らかにした。また、Talansky and Gordon(1988)<sup>6</sup>は、zona drilling 後の受精卵の発育について検討し、対照群と差のこと、drillingに伴う発育障害は8%に過ぎないことを報告し、乏精子症の治療に新たな道をひらいた。その後、酸性溶液を使わない方法、すなわち機械的に透明帯に裂孔を作る zona cutting<sup>7</sup>(partial zona dissection)<sup>2</sup>法や zona opening<sup>8</sup>法が開発され、臨床応用への気運が急速に高まった。Depypere ら (1988)<sup>7</sup>はマウスを用いて、drilling 法と cutting 法と比較し、①卵子の損傷は drilling (4%) の方が cutting (<1%) より多かったが、多精子受精には差はなかった。②受精卵の胞胚への発育率は drilling (66%), cutting (77%), 対照群 (71%) とも差はなかった。③また移植後の着床率も対照群を含めほとんど同じであった、と報告した。そして彼らは、drilling 法、cutting 法とも有効かつ安全であり、透明帯開孔術の臨床応用は十分可能であると結論した。

しかし透明帯の溶解性は動物の種類によって異なり、酸性溶液を用いた drilling 法はヒト卵子に対してはかなり問題があるようである。Gordon ら (1988)<sup>9</sup>は通常の IVF で受精しなかった 10 例の不妊患者を対照に drilling 法を行ったが、卵子の 34% (16/47) は変性し、受精率は 32% (10/31) に過ぎなかった。これは同時に裸化卵子を用いた通常の IVF の受精率 25% (4/16) と有意差のないものであった。しかも、drilling 法で受精した卵子の 50% (5/10) は多精子受精であった。彼らは、drilling 法で受精、分割した卵子を 3 例に移植したが妊娠には至らなかったという。今回の我々の SEM による観察でも、drilling 法の臨床応用には問題のあることが明らかになった。まず第 1 に、穴の大きさをコントロールすることが非常にむずかしいことである。ハムスターの卵子とは対照的に、ヒトの透明帯にはすり鉢状の大きな穴が形成された。しかも開孔部周辺の透明帯にかなりの変化が認められた。第 2 に卵子細胞質の微絨毛に対する酸性溶液の影響である。sucrose (0.5M) を用いて卵腔を広くしたにもかかわらず、開孔部直下の微絨毛は高度に損傷されていた。drilling 法で卵子生存率が低く、多精子受精率が高いのは、ヒト卵子の酸性溶液に対する感受性が、ハムスター やマウス卵子に比べて高いため、ピペットの直径よりもはるかに大きな穴が生じ、しかも微絨毛を含め卵子細胞質がかなりの損傷を受けるからであろう。Cohen ら (1988)<sup>3</sup>は、drilling 法では 30~50% が受精するが、受精卵の発育に難点のあることから、partial zona dissection (PZD) 法を開発し、6 例の男性不妊を対象に臨床実験を行った。PZD および同時に通常の IVF の受精率はそれぞれ 63% (10/16), 24% (4/17) で、4 例に胚移植を行ったところ、2 例が妊娠したという。妊娠した 2 例はいずれも双胎で、2 個の PZD 胚と 1 個の IVF 胚を移植した症例であった。その後 Malter and Cohen (1989)<sup>4</sup>は、PZD 単独を含め 6 例が透明帯開孔術により妊娠し、うち 1 例が正常に双子を分娩したと報告した。ヒト卵子の透明帯開孔術としては、PZD の方が酸性溶液を用いた drilling 法より確かにより有効のようである。しかし、精子の大きさからみて、はたして PZD のように大きなスリットを作る必要があるのだろうか。このような単純な疑問から、我々は micropipette を貫通させただけのヒト透明帯を SEM で観察してみた。結果は予想通り、micropipette の太さに相当する精子の通過には十分過ぎる程の穴が、ハムスターの卵子ほどシャープではなく

いが、きれいに形成されていた。酸性溶液による drilling 法とは異なり、開孔部周辺の透明帯には何の変化もなく、開孔部直下の微絨毛は SEM でみる限りまったく正常であった。micropipette の太さを変えることによって、穴の大きさを調節することは十分可能であり、また串刺し法のように一回の操作で 2 個の穴を開けることも容易である。IVF で受精しなかったヒト卵子を用いた受精実験では、串刺し法による卵子の生存率、受精率、多精子受精率はそれぞれ、96.8% (60/62), 43.3% (26/60), 11.5% (3/26) であった。<sup>10</sup>これに対して、Malter ら (1989)<sup>11</sup>の行った PZD による同様の受精実験では、卵子の生存率、受精率、多精子受精率はそれぞれ、95.0% (115/121), 45.2% (52/115), 48.1% (25/52) であった。串刺し法と PZD を単純に比較すると、卵子の生存率、受精率はほぼ同じで、多精子受精率だけが、PZD の方が串刺し法の約 3 倍高いということになる。透明帯開孔術でもっとも注意しなければならないのは、当然のことながら多精子受精率の上昇である。ヒト卵子の透明帯開孔術としては、今回の SEM による観察からも、酸性溶液を用いた drilling 法は不適当であり、機械的な開孔術を用いるべきであろう。micropipette による開孔術は、串刺し法を含め簡単で、しかも穴の大きさを自在にコントロールできるという利点がある。これまでの方法の中ではもっとも実用的な方法と思われる。PZD 法は多精子受精を誘発する危険性が多分にあり、精子側の条件がきわめて悪い患者など症例を選んで用いるべきであろう。透明帯開孔術では男性不妊以外の受精障害にとっても非常に魅力的な方法である。この新しい方法は、今後男性不妊だけでなく、透明帯異常による受精障害<sup>12</sup>や通常の IVF で受精しなかった卵子の再媒精などに対しても活用されるものと思われる。

### 文 献

- 1 井上正人、小林善宗、本田育子、淡路英雄、松山毅彦、津田朋男、藤井明和：配偶子操作による不妊症の診断、治療 臨婦産. 43 : 825, 1989
- 2 Gordon JW and Talansky BE : Assisted fertilization by zona drilling : a mouse model for correction of oligospermia. J Exp Zool, 239 : 347, 1986
- 3 Cohen J, Malter H, Fehilly C, Wright G, Elsner C, Kort H and Massey J : Implantation of embryos after partial opening of oocytes zona pellucida to facilitate sperm penetration. Lancet, July 16 : 162, 1988
- 4 Malter HE and Cohen J : Partial zona dissection of the human oocytes : a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. Fertil Steril, 51 : 139, 1989
- 5 Ho PC, Poon IML, Chan SYW. and Wang C : Intrauterine insemination is not useful in oligoasthenospeamia. Fertil Steril, 51 : 682, 1989
- 6 Talansky BE and Gordon JW : Cleavage characteristics of mouse embryos inseminated and cultured after zona pellucida drilling. Gamete Research 21 : 277, 1988

- 7 Depypere HT, McLaughlin KJ, Seemark RF, Warnes GM and Matthews, CD : Comparison of zona cutting and zona drilling as techniques for assisted fertilization in the mouse, J Reprod Fert, 84 : 205, 1988
- 8 Odawara Y and Lopata, A. :A zona opening procedure for improving in vitro fertilization at low sperm concentrations : a mouse model. Fertil Steril, 51 : 699, 1989
- 9 Gordon JW, Grunfeld L, Garrisi GJ, Talansky BE, Richards C and Laufer N : Fertilization of human oocytes by sperm from infertile male after zona pellucida drilling. Fertil Steril, 50 : 68, 1988
- 10 井上正人, 松井素子, 淡路英雄, 小林善宗, 本田育子, 津田朋男, 藤井明和: ヒト卵子における透明帯開孔術の試み 日不妊会誌 34 : 589, 1989
- 11 Malter H, Talansky B, Gordon J and Cohen J : Monospermy and polyspermy after partial zona dissection of reinseminated human oocytes. Gamete Research 23 : 377, 1989
- 12 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: 透明帯異常にによる受精障害 哺乳研誌 6 : 57, 1989

各種系統マウスにおける自然排卵数と誘起排卵数について

Number of spontaneous and induced ovulation  
in various strains of mice

横山峯介・長谷川孝徳

Minesuke YOKOYAMA and Takanori HASEGAWA

財団法人・実験動物中央研究所

Central Institute for Experimental Animals

Kawasaki 213, Japan

### Abstract

The number of spontaneous ovulations and number of ovulations induced by gonadotropic hormone were investigated in 12 strains of mice (nine inbred strains, one hybrid, two closed colonies). The number of spontaneous ovulations were in the 9.1 - 12.8 range in the inbred strains and 10.3 - 15.4 in the hybrid and closed colonies. The response to induction of ovulation differed among the strains, and the rate of increase in ovulations with respect to spontaneous ovulations was in the 1.7 - 4.8 fold range.

### 緒 言

マウスでは性腺刺激ホルモン（とくにPMSGとhCG）の投与により性周期に関わることなく排卵を誘起できる（1）ことから、未受精卵やオスと交配させた後の初期胚を得る方法として広く応用されている。とくに、近年進展の著しい発生工学や実験発生学の基本技術のひとつとしても重要性を増し大きな貢献を果している（2）。しかし、マウスでは投与するホルモン量や間隔、使用する動物の日齢や性周期、さらに系統の違いによってもその誘起排卵効果には大きな差があることも知られている（3～6）。本実験では、各種系統マウスの繁殖生理学的な特性を明らかにし、その有効利用を計るための検討の一環として、いくつかの近交系、交雑系ならびにクローズドコロニーの自然排卵数と、PMSG-hCG投与による誘起排卵数を調べた。

### 材料および方法

マウス：当研究所で維持・生産されたAKR/N,BALB/cA,CBA/N,C3H/HeN,C57BL/6N,DBA/2N,KK,NFS/N,NODの9系統の近交系と、日本クレアから購入した四元交雑系のJcl:MCH(ICR),クローズドコロニーのJcl:ICR,Jcl:NIH(S)の合計12系統のマウスを使用した。これらは未経産メスを対象として、生後10～16週齢で実験に供した。

飼育条件：動物室は、温度 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度60～70%、換気回数10～15/時間、照明14時間（6:00点灯・20:00 消灯）に調整した。

実験に使用するまでのメスマウスの飼育はプラスチック製ケージで、床敷は高压蒸気滅菌（121°C, 20分-600mmHg）したものを使用した。ケージ交換は週2回行った。飼料は固体飼料（CA-1,日本クレア）を自由に摂取させ、飲料水は、水道水を与えた。

自然排卵数の検査：メスマウスは夕刻 16:00～18:00 に外陰部の腫脹によって発情前期のものを選び出し(7)、同系統のオスと1対1の交配を行なった。交尾の確認は翌朝腔栓の有無で行い、腔栓の観察されたもののみを検査に供した。検査は殺処分したメスから卵管を摘出し、2枚のスライドグラスで挟んで軽く圧し、卵管膨大部にある卵を実体顕微鏡下（ $\times 40$ ）で数えた。

誘起排卵の検査：メスマウスに 1.25 ,2.5 ,5.0 ,10.0 I.U の PMSG (セロトロピン：帝国臓器) を16:30に腹腔内注射し、その48時間後に 5.0 I.U の hCG (ゴナトロピン：帝国臓器) を同様に腹腔内注射した。排卵数の検査は hCG 注射後18～20時間に、自然排卵数の場合と同様にして行った。

### 成 績

表1 に近交系 9系統、交雑系 1系統ならびにクローズドコロニー 2系統の自然排卵数を示した。近交系の排卵数は12.8～9.1の範囲で、AKR/Nが最も多く、DBA/2NとBALB/cAが中間、C3H/HeN,KK,NFS/N,NOD,CBA/N,ならびにC57BL/6N が少ない系統として大別された。クローズドコロニーのJcl:MCH(ICR)は13.7と近交系よりも多い排卵数であったが、Jcl:NIH(S)は近交系と差のない10.8という値であった。近交系ICRの四元交雑系であるJcl:MCH(ICR)は15.4と今回調べた系統で最も多い排卵数であった。

表2 にPMSGとhCGを投与した際の排卵陽性成績と誘起排卵数を示した。排卵成績ではNOD,BALB/cA,CBA/Nの一部の群で、陰性の個体がみられたが、その他は全例とも排卵が確認された。誘起排卵数は、PMSG 1.25 I.U群で自然排卵数に近い値が得られた。PMSG投与量の増加に伴って排卵数も多くなり、大多数の系統とも 5.0 I.U群で最も高い値であった。さらにPMSG投与量の多い 10.0 I.U群では、5.0 I.U群と同等か逆に減少する傾向が認められた。

図1に各系統における自然排卵数とPMSG

投与量 5.0 I.U 群の排卵数を示した。自然排卵数に対する誘起排卵数の増加率は、4.8~1.7倍の範囲であった。増加率の高い系統としてNOD, Jcl:NIH(S), DBA/2Nが、低い系統としてAKR/N, BALB/cAが認められた。

## 考 察

本実験での各系統の自然排卵数は、表1に示されるように同一系統内では大きなバラツキは認められなかった。これは使用したマウスが未経産の成熟した10~16週齢のもので、体重もほぼ揃っていたことによるものと考えられた。猪ら(8)はマウスの排卵数と産子数との関係を綿密に検討し、系統によって排卵数と産子数は必ずしも平行関係に無いことを報告している。本実験においても、近交系9系統の排卵数は、生産の場における初回産子数(未発表)に比較すると必ずしも平行関係は認められなかった。排卵数と産子数との差の少ない系統としてはC57BL/6NとNFS/Nを、逆に大きい系統としてはAKR/N, DBA/2N, CBA/NおよびBALB/cAをあげることができた。

誘起排卵では、ほぼ全ての系統ともPMSG 5.0I.U の組み合せで最も多い排卵数が得られた。自然排卵数に対する排卵増加率は、近交系において大きな差が認められた。NODならびにNFS/Nでは増加率は高く、4.5倍以上で平均45個以上を上まわる排卵数が得ら

表1. 各種系統マウスの自然排卵数

系統	使用動物数	排卵数 (平均±S.D.)
AKR/N	22	12.8±1.6
BALB/cA	25	11.3±1.8
CBA/N	20	9.2±1.0
C3H/HeN	20	10.2±0.9
C57BL/6N	23	9.1±2.4
DBA/2N	21	11.6±1.7
KK	21	10.0±1.6
NFS/N	24	10.0±1.2
NOD	22	9.7±1.0
Jcl:MCH(ICR)	31	15.4±2.9
Jcl:ICR	20	13.7±1.4
Jcl:NIH(S)	23	10.8±1.5

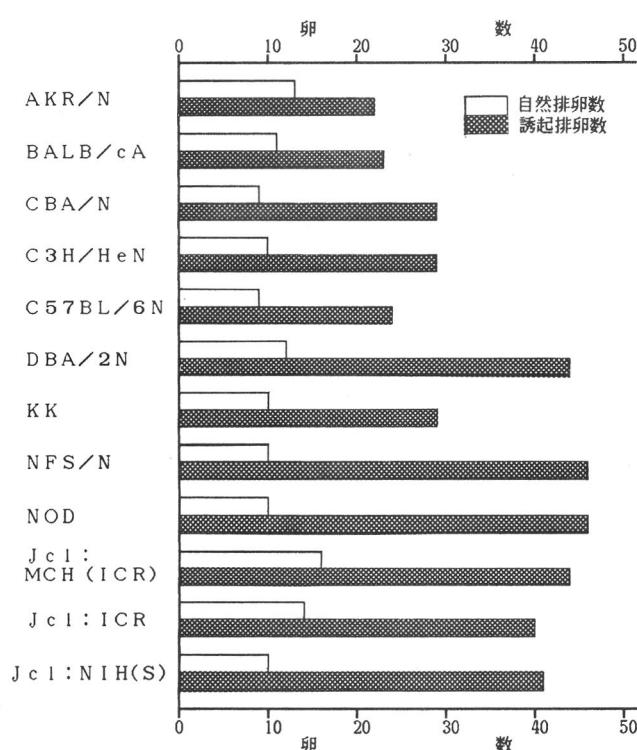


図1 各種系統マウスにおける自然排卵数と誘起排卵数との関係

表2. 各種系統マウスのPMSG-hCG処理による誘起排卵数

系統	PMSG 投与量 (I.U)	hCG 投与量 (I.U)	使用 動物数	排卵陽性 動物数 (%)	排卵陽性動物 あたりの排卵数 (平均 ± S.D)
AKR/N	1.25	5.0	5	5(100)	11.6 ± 3.9
	2.5	5.0	7	7(100)	13.3 ± 5.6
	5.0	5.0	6	6(100)	22.2 ± 11.8
	10.0	5.0	6	6(100)	21.8 ± 5.7
BALB/cA	1.25	5.0	10	10(100)	17.7 ± 10.8
	2.5	5.0	9	9(100)	20.8 ± 7.9
	5.0	5.0	10	10(100)	23.1 ± 13.5
	10.0	5.0	10	9(90)	30.8 ± 17.7
CBA/N	1.25	5.0	10	10(100)	11.6 ± 3.0
	2.5	5.0	11	11(100)	23.1 ± 6.3
	5.0	5.0	11	11(100)	29.5 ± 8.5
	10.0	5.0	10	8(80)	8.0 ± 9.3
C3H/HeN	1.25	5.0	5	5(100)	11.0 ± 1.6
	2.5	5.0	6	6(100)	17.2 ± 8.6
	5.0	5.0	5	5(100)	29.4 ± 8.2
	10.0	5.0	5	5(100)	18.6 ± 13.0
C57BL/6N	1.25	5.0	5	5(100)	10.6 ± 1.8
	2.5	5.0	5	5(100)	19.6 ± 4.0
	5.0	5.0	5	5(100)	23.6 ± 18.3
	10.0	5.0	5	5(100)	18.0 ± 12.6
DBA/2N	1.25	5.0	6	6(100)	12.8 ± 2.3
	2.5	5.0	5	5(100)	22.6 ± 11.7
	5.0	5.0	5	5(100)	43.6 ± 6.3
	10.0	5.0	6	6(100)	26.7 ± 16.4
KK	1.25	5.0	9	9(100)	5.8 ± 1.6
	2.5	5.0	9	9(100)	8.4 ± 4.0
	5.0	5.0	8	8(100)	29.3 ± 13.2
	10.0	5.0	10	10(100)	16.4 ± 9.6
NFS/N	1.25	5.0	6	6(100)	13.7 ± 3.8
	2.5	5.0	6	6(100)	22.5 ± 14.6
	5.0	5.0	6	6(100)	45.7 ± 22.0
	10.0	5.0	6	6(100)	43.5 ± 13.5
NOD	1.25	5.0	9	7(78)	9.6 ± 1.0
	2.5	5.0	9	8(89)	17.3 ± 10.0
	5.0	5.0	9	9(100)	46.3 ± 16.7
	10.0	5.0	9	8(89)	24.9 ± 8.0
Jcl : MCH(ICR)	1.25	5.0	10	10(100)	30.1 ± 12.1
	2.5	5.0	10	10(100)	21.9 ± 8.6
	5.0	5.0	10	10(100)	44.1 ± 8.0
	10.0	5.0	11	11(100)	20.0 ± 8.2
Jcl : ICR	1.25	5.0	7	7(100)	12.6 ± 1.1
	2.5	5.0	5	5(100)	14.0 ± 4.5
	5.0	5.0	5	5(100)	39.7 ± 23.1
	10.0	5.0	5	5(100)	23.6 ± 13.6
Jcl : NIH(S)	1.25	5.0	6	6(100)	9.5 ± 4.5
	2.5	5.0	6	6(100)	12.8 ± 11.5
	5.0	5.0	6	6(100)	41.2 ± 20.7
	10.0	5.0	6	6(100)	42.3 ± 7.7

れた。逆に低いものはAKR/NとBALB/cAで約 2倍の増加率であった。本実験ではメスの性周期を考慮することなしにPMSG-hCG投与を行ったが、性周期に同調させるかたちで投与することにより、さらに多くの卵を得ることができるかもしれない。

しかし、ホルモン投与によって過排卵させた卵の正常性については、現在はまだ十分解明されていいるとは言えないでの、今後さらに詳細な検討を行う必要があると考える。

## 文 献

- 1) 佐久間 勇次、石島 芳郎(1975). 哺乳動物の卵子 V. 排卵と過排卵. 畜産の研究. 29, 81~87
- 2) 横山 峰介、長谷川 孝徳、野村 達次(1989). トランスジェニックマウスの実験システム. 細胞工学. 8, 338-343.
- 3) Zarrow,M.X.,and Wilson,E.D.(1961). The influence of age on superovulation in the immature rat and mouse. Endocr. 69, 851.
- 4) Wilson,E.D.,and Zarrow,M.X.(1962). Comparison of superovulation in the immature mouse and rat. J.Reprod.Fert., 3, 148-158.
- 5) 伊藤 雅夫、樋口 勝啓、佐久間 勇次、猪 貴義 (1974). 過排卵処置マウスにおける排卵数と着床数の関係. 家畜繁殖誌, 19, 153-159.
- 6) 石島 芳郎、穴吹 一広、遠藤 克、佐久間 勇次 (1978). 反復過排卵処理に対するマウスの排卵反応の系統差. 日不妊会誌. 23, 59-63
- 7) Champlin,A.K., Dorr,D.L.,and Gates,A.H.(1973). Determining the stage of the estrous cycle in the mouse by the appearance of the vagina. Biol. Reprod., 8, 491-494.
- 8) 猪 貴義、吉川 早紀男、保谷 毅、佐久間 勇次. (1969). マウスの系統間における排卵数と産仔数との関係. 実験動物. 18, 47-51.



Loss of Fertilizability of Cumulus-free  
Mouse Oocytes upon Exposure to DMSO and  
its Prevention by Fetal Calf Serum

Keiko Kohno\*, S. Azuma and Y. Toyoda

Department of Animal Pathology, The Institute  
of Medical Science, The University of Tokyo,  
4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108

\* Present Address: Frontier Research Program,  
The Institute of Physical and Chemical Research,  
Wako-shi, Saitama 351-01

**Abstract** In vitro fertilization of cumulus-free mouse oocytes was studied in an effort to find the cause of reduced fertilizability in frozen-thawed oocytes. It was found that 1.5M DMSO in Hepes-buffered saline exerted deleterious effect on the fertilizability of mouse oocytes when added at room temperature for a period as short as 30 seconds. Oocytes retained the fertilizability after exposure to DMSO at 4°C, although the fertilization rate was significantly reduced. All oocytes were fertilized when zona pellucida was removed after treatment with DMSO. Oocytes frozen-thawed in 1.5M DMSO supplemented with 20% fetal calf serum or its high molecular weight ( $\geq 30,000$ ) fraction retained their fertilizing ability. These results suggest that the deleterious effect of DMSO is primarily due to its direct effect on zona pellucida and is prevented by high molecular weight serum component(s) other than albumin.

### Introduction

Freeze preservation of mammalian oocytes and embryos has important implications in animal breeding, biomedical research and medicine (1). It will provide a reliable method to protect valuable genetic materials against the loss by breeding failure, genetic contamination and diseases. Preservation of oocytes will have special advantages in making a large number of embryos with synchronous development and embryos of specific genetic combinations by in vitro fertilization.

The first success in freeze preservation of mouse oocytes was reported by Whittingham (2) using dimethylsulfoxide (DMSO) as a cryoprotectant. Oocytes were frozen-thawed by a slow cooling and slow warming method originally developed for embryo freezing. More recently, mouse oocytes have been shown to survive rapid freezing and thawing in 1.5M DMSO supplemented with fetal calf serum (3,4), although the variables influencing the survival after freezing have not been fully analyzed yet. Factors involved in oocyte freezing are more complicated than that in embryo freezing, because the oocytes must retain fertilizability together with morphological integrity (5).

In a preliminary experiment in which the freezing procedures for mouse embryos were applied to the unfertilized oocytes, it was found that the oocytes had lost their fertilizability almost completely (6). The present study was undertaken, therefore, to examine the cause of failure in fertilization of frozen-thawed mouse oocytes.

## Materials and Methods

### Animals

Seven to 8 weeks old Jcl:ICR female mice were used as oocyte donors and recipients of embryos. In freezing experiment, 3-4 weeks old C57BL/6N females were also used as oocyte donors. Eight to 10 weeks old Jcl:ICR male mice were used as sperm donors. All animals used were purchased from Clea Japan, Inc. They were allowed to free access to food and water.

### Media

Media used in this study were TYH (7) for in vitro fertilization, WM (8) for embryo culture and a modified Hepes-buffered saline (HBS) for freezing oocytes (9). Bovine serum albumin (BSA, Fr.V. Wako Pure Chemical) was included in all media at a concentration of 4mg/ml(TYH) or 3mg/ml(WM, HBS). Heat-inactivated (56°C for 30min) fetal calf serum (Gibco) was added to HBS in the freezing experiment. To get high and low molecular weight fraction, FCS was ultra-filtrated by centrifugation at 5,000rpm for 30min using Centricon 30 (Grace Co.). All media were sterilized through 0.20μm filter (Corning Lab.) just before use.

### Collection of oocytes

Oocytes were collected from females received superovulatory i.p. injections of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG, Sankyo Zoki) and human chorionic gonadotropin (hCG, Sankyo Zoki) given 48h apart. Females were killed by cervical dislocation 13h after hCG injection. Oocytes surrounded with cumulus cells were released from the ampulla of the oviducts and were treated with 150u/ml hyaluronidase (Type IV-s from bovine testes, Sigma) in TYH to remove the cumulus cells. Cumulus-free (denuded) oocytes were washed through three changes in TYH before being used for fertilization or freezing.

### In vitro fertilization

Oocytes were inseminated in vitro with preincubated epididymal spermatozoa as previously described (10). Sperm concentration was adjusted to 150-250 cells/μl. Oocytes were considered fertilized if they had male pronucleus, female pronucleus and the second polar body at 6-8h after insemination. Those considered fertilized were cultured in WM for the development to the 2-cell stage.

### Oocyte freezing and thawing

A simplified method for embryo freezing as described by Kasai and Toyoda (11) was slightly modified for oocyte freezing. Oocytes were placed in HBS (with or without FCS) containing 1.5M DMSO (Dojin Chemical Co.) at room temperature (24-26°C). They were transferred to a plastic straw (0.25ml, I.M.V.) containing the same medium. The straw was placed in the methanol bath in a programmed freezer (Fujiya Yano Science Co.), seeded and then cooled at a rate of 0.5°C/min to -30°C. The straw was kept at -30°C for another 10min before being plunged into liquid nitrogen (LN2).

The frozen straw was thawed rapidly by placing in a water bath at 30°C. The content was expelled from the straw into 0.5M sucrose in HBS. Oocytes were picked up from the sucrose solution 10min later, washed twice by transferring through fresh TYH at room temperature.

### Embryo transfer

The 2-cell embryos developed from in vitro fertilized oocytes were transferred to the oviducts of pseudopregnant females on Day 0 (the day on which vaginal plug was noticed). Each recipient was killed by cervical dislocation on Day 17 and was examined for live fetuses and implantation sites.

## Results

In vitro fertilization of cumulus-free oocytes after thawing at different stages of freezing process

The rate of fertilization of cumulus-intact eggs was 100% as shown in Fig.1. The removal of cumulus decreased the rate of fertilization to 61.5%. None of the oocytes were fertilized in all three groups in which the oocytes were recovered from different stages of freezing process, that is, before seeding, before plunging into liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>) and after plunging into LN<sub>2</sub>.

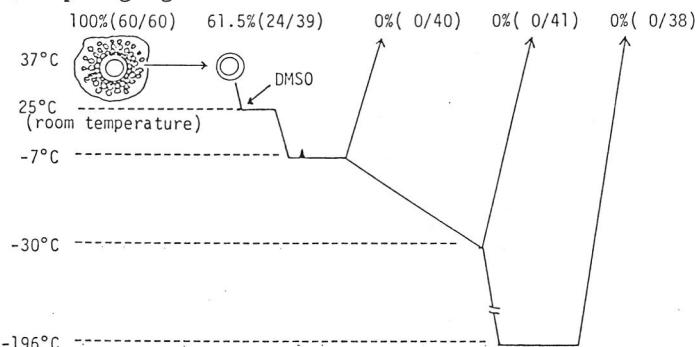


Fig.1. In vitro fertilization of ICR mouse oocytes at various stages of freezing

Effect of various treatments with DMSO on subsequent fertilization of cumulus-free oocytes

### 1) Effect of equilibration temperature

As shown in Table 1, only a few oocytes (8.5%) were fertilized after equilibration with 1.5M DMSO at room temperature. No sperm penetration of zona pellucida was observed in those oocytes which had failed to fertilize. Lower equilibration temperature (4°C) afforded significantly higher fertilization rate (42.3%), but it was still lower than that of control group (74.2%).

Table 1. Effect of equilibration with DMSO at different temperature on fertilization of cumulus-free ICR mouse oocytes in vitro

Conc. of DMSO (M)	Equilibration time (min)	with DMSO temp. (°C)	n. fertilized/n. examined (%)
1.5	10	room temp.	5/71 (8.5) <sup>a</sup>
1.5	10	4	30/71 (42.3) <sup>b</sup>
control	-	-	49/66 (74.2) <sup>c</sup>

Values with different superscript differ significantly ( $p < .5$ ).

### 2) Effect of different equilibration time

As shown in Table 2, exposure to 1.5M DMSO at room temperature for 1, 5 or 10 min resulted in complete failure in subsequent fertilization in vitro. Even in the oocytes exposed to DMSO for only 30 seconds, only one oocytes (2.4%) was found to have been fertilized. The fertilization rate in the 15sec group (42.9%) was significantly higher than those of longer period groups, but it was still lower than those of control (untreated) and 0sec (mock treated) groups.

**Table 2.** Effect of equilibration with DMSO for different time on fertilization of cumulus-free oocytes in vitro

Conc. of DMSO (M)	Equilibration time	n.fertilized/ n.examined (%)
-	0 sec	37/42 (88.1)a
1.5	15 sec	18/42 (42.9)b
1.5	30 sec	1/41 (2.4)c
1.5	1 min	0/24 (0.0)c
1.5	5 min	0/20 (0.0)c
1.5	10 min	0/20 (0.0)c
control	-	48/62 (77.4)a

Values with different superscript differ significantly.

3) Effect of different concentrations of DMSO (Table 3)

None of the oocytes were fertilized when they were equilibrated with 1M DMSO for 2 min before being inseminated in vitro. Fertilization rates were not significantly different from control group when the oocytes were equilibrated with lower concentrations (0.5 and 0.25M) of DMSO.

**Table 3.** Effect of equilibration with DMSO at different concentration on fertilization of cumulus-free oocytes in vitro

Conc. of DMSO	Equilibration time	temp.	n. fertilized/ n. examined (%)
0.25	2 min	room temp.	24/37 (64.9)a
0.5	2 min	room temp.	16/31 (51.6)a
1.0	2 min	room temp.	0/29 (0.0)b
control	-	-	15/25 (60.0)a

Values with different superscript differ significantly.

Effect of DMSO on fertilizability of zona-free oocytes (Table 4)

Zona pellucida was removed with acidic Tyrode (pH 2.5) solution after equilibration with 1.5M DMSO for 10 min at room temperature, and then used for fertilization in vitro. All the oocytes were fertilized whether they were previously exposed to DMSO or not.

**Table 4.** In vitro fertilization of zona-free oocytes

Exposure to DMSO	n. fertilized/ n. examined (%)
+	41/41 (100)
-	39/39 (100)

Effect of FCS on the fertilizability of frozen-thawed oocytes

As shown in Table 5, frozen-thawed oocytes showed significantly higher rate of fertilization when the freezing medium was supplemented with 20% FCS or its high molecular weight fraction ( $30000\leq$ ). On the contrary, no improvement of fertilization rate was observed when the medium was supplemented with low molecular weight fraction ( $<30000$ ).

**Table 5.** Effect of FCS or its fraction on in vitro fertilization of frozen-thawed oocytes

Freezing	20%FCS	No. oocytes recovered/ frozen(%)	morphologically normal(%)	fertilized/ examined(%)
+	+	24/35(68.6)	16/24(66.7)	11/16(68.8) <sup>a</sup>
+	≥ 30000	25/35(71.4)	17/25(68.0)	14/17(82.4) <sup>a</sup>
+	< 30000	17/22(77.3)	8/17(47.1)	0/ 8( 0.0) <sup>b</sup>
-	-	-	-	24/30(80.0) <sup>a</sup>

FCS was previously heat-inactivated (56°C, 30min) and was ultrafiltrated using Centricon-30(Grace CO.).

In vitro fertilization and development of frozen-thawed ICR and C57BL/6N oocytes after transfer (Table 6)

In both strains, cumulus-free oocytes frozen-stored in 1.5M DMSO supplementes with 20% FCS showed high rates of fertilization and fetal development, not significantly different from unfrozen control oocytes.

**Table 6.** In vitro fertilization and development following transfer of mouse oocytes frozen-stored with 1.5M DMSO and 20% FCS in HBS.

Oocyte strain	Freezing	Fertilization rate(%) n.fertilized/examined	Embryonic development(%) n.live fetuses/transferred
ICR	+	51/68 (75.0)	23/41 (56.1)
	-	50/68 (73.5)	30/48 (62.5)
C57BL/6N	+	183/217 (84.3)	66/134 (49.3)
	-	103/121 (85.1)	36/ 68 (52.9)

### Discussion

Present study clearly shows that DMSO added at room temperature exerts deleterious effect on the fertilizability of mouse oocytes. The results also show that the loss of fertilizability is primarily due to the direct effect of DMSO on the zona pellucida, and not due to the indirect effect mediating the changes in the oocyte itself as in the case of zona reaction that occurs after sperm penetration or parthenogenetic activation.

Very few studies have so far been reported on the effect of cryoprotectants on the zona pellucida of unfertilized oocytes. It was reported that DMSO has strong affinity toward glycochains of the membrane proteins as a binding site with lectin (12). In the same way, if DMSO has affinity to glycochains of sperm receptor protein(ZP3) on the zona pellucida (13), sperm binding and penetration might be prevented.

The present results have confirmed the beneficial effect of FCS in keeping the fertilizability of mouse oocytes during freezing and thawing, as have already been reported (3,4). Moreover, the results revealed that the high molecular weight fraction (30000 $\leq$ ) of FCS is as effective as the whole FCS. Some macromolecular component(s) other than albumin seems to protect the oocytes against the toxic effect of DMSO added at room temperature, since control medium containing 3mg/ml BSA could not keep the fertilizability of oocytes during exposure to DMSO.

Although successful freezing of mouse oocytes with subsequent fertilization and full term development is demonstrated in this experiment, further studies are needed to clarify the factors necessary for the optimum freezing of mouse oocytes.

This work is supported in part by a grant-in-aid for scientific research from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan.

### References

- 1) Wood,M.J.,Whittingham,D.G. and Rall,W.F.(1988) The low temperature preservation of mouse oocytes and embryos. In Mammalian Development, edited by M.Monk. IRL Press, Oxford. p255-280.
- 2) Whittingham,D.G.(1977) Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196°C. J.Reprod.Fert., 49, 89-94.
- 3) Michaelis,U.,Rubin,M. and Hahn,J.(1985) In-vitro-Befruchtung und Weiterentwicklung von tiefgefrorenen/aufgetauten Mauseooyten. Dtsch.tierarztl.Wschr., 92, 16-18.
- 4) Hiraizumi,S.,Azuma,S.,Naito,K.,Fukuda,Y. and Toyoda,Y.(1987) In vitro fertilization and development of frozen-thawed mouse oocytes. J.Mamm.Ova Res., 4, 49-50.
- 5) Glenister,P.H.,Wood,M.J.,Kirby,C. and Whittingham,D.G.(1987) Incidence of chromosome anomalies in first cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized in vitro. Gamete Res., 16, 205-216.
- 6) Kohno,K.,Azuma,S. and Toyoda,Y.(1988) Effect of DMSO on fertilizability of cumulus free mouse oocytes. J.Mamm.Ova Res., 5, 58-59.
- 7) Toyoda,Y.,Yokoyama,M. and Hosoi,T.(1971) Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. In vitro fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. Japan.J.Anim.Reprod., 16, 147-151.
- 8) Whitten,W.K.(1971) Nutritional requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro. Adv.Biosci., 6, 129-139.
- 9) Rall,W.F. and Fehy,G.M.(1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. Nature 313, 573-575.
- 10) Toyoda,Y.,Yokoyama,M. and Hosoi,T.(1971) Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro II.Effects of in vitro preincubation of spermatozoa on time of sperm penetration of mouse eggs in vitro. Japan.J.Anim.Reprod., 16, 152-157.
- 11) Kasai,K. and Toyoda,Y.(1982) Freezing mouse embryos in plastic straws as a simplified method for embryo preservation. Kitasato Arch.Exp. Med., 55, 25-30.
- 12) Bui-Xuan-Nguen,N.,Heyman,Y. and Renard,J.P.(1984) Direct freezing of cattle embryos after partial dehydration at room temperature. Theriogenology 22, 389-399.
- 13) Wasserman,P.M.(1988) Zona pellucida glycoproteins. Ann.Rev.Biochem., 57, 415-442.

DMSO処理による卵丘除去マウス卵子の受精能の消失とそれに対する牛胎児血清の防御効果

河野 恵子\*・東 貞宏・豊田 裕

(東京大学医科学研究所獣医学研究部、東京都 108 \*現所属：理化学研究所、和光市  
351-01)

凍結保存マウス卵子における受精能の低下の原因を知る目的で、卵丘除去卵子の受精能に及ぼすDMSOの影響について検討した。その結果、1. 5MのDMSOを室温で添加すると、30秒以内に卵子の透明帯を変化させ、精子の侵入が不可能になることが知られた。一方、牛胎児血清(FCS)の分子量約30,000以上の画分に、この変化を防ぐ効果があることが明らかになり、20%FCSを含む1. 5M DMSO溶液内で凍結保存された未受精卵の体外受精から正常な胎子が得られることが確認された。

# 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) 贊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) 会費の金額および徵集方法の決定、変更
- (6) 会則の変更
- (7) その他の必要事項

## 会 計

第15条 本会の会計年度は、毎年4月1日に始まり翌年3月31日に終わる。

2. 本会の経費は会費、寄付金およびその他の収入をもってこれにあてる。

## 附 則

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

# 哺乳動物卵子研究会誌投稿規定

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

## 雑誌の場合

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

## 単行本の場合

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

〒252

神奈川県藤沢市亀井野1866

日本大学農獣医学部獣医生理学教室内

TEL 0466-81-6241 内線332

哺乳動物卵子研究会編集委員会

# 哺乳動物卵子研究会役員

期間： 平成元年4月1日～平成3年3月31日

会長： 豊田 裕（東大）

副会長： 鈴木 秋悦（慶大）

理事： 石島 芳郎（東農大）、石田 一夫（新潟大）、石橋 功（北里大）  
井上 正人（東海大）、入谷 明（京 大）、久保 春海（東邦大）  
小栗 紀彦（農水省）、加藤征史郎（神戸大）、金川 弘司（北 大）  
香山 浩二（兵庫医大）、佐藤 和雄（日 大）、菅原 七郎（東北大）  
堤 義雄（広 大）、野田 洋一（京 大）、広井 正彦（山形大）  
平尾 幸久（和歌山県立医大）、福田 芳詔（北里大）、  
星 和彦（福島医大）、安田 泰久（岩手大）

監事： 佐久間勇次、 岩城 章

乾事： 遠藤 克（日 大）、佐藤 嘉兵（日 大）

編集委員： 委員長 石島 芳郎

委員 井上 正人、遠藤 克、岡田 詔子、小栗 紀彦  
久保 春海、香山 浩二、星 和彦、横山 峰介

## 編 集 後 記

会員の皆様に6巻2号をお届けいたします。早いもので、会誌を発刊するようになりまして6年が経過しようとしております。この間年2回の発刊ではありますが、滞りなく発刊できましたことは、会員の皆様方のご協力による賜ものと存じます。

本号には、原著論文11編を掲載することができました。体外受精、マイクロインジェクション、着床環境など内容が豊富ですので、秋の夜長にご一読下さい。

なお、7巻の掲載論文を受付ておりますのでご投稿下さいますようお願ひいたします。

(遠藤克)

## 編 集 委 員

委員長：石島芳郎

委員：井上正人，遠藤克，岡田詔子，小栗紀彦

久保春海，香山浩二，星和彦，横山峯介

哺乳動物卵子研究会誌

Journal of Mammalian Ova Research

第6巻 第2号

Vol. 6

No. 2

平成元年9月25日印刷

平成元年10月1日発行

(会員頒布)

発行者 哺乳動物卵子研究会  
代表 豊田裕

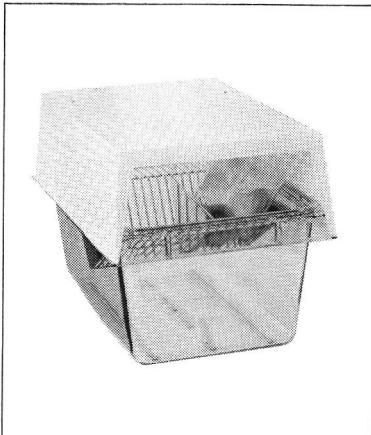
発行所 哺乳動物卵子研究会  
〒252 藤沢市亀井野1866  
日本大学農獣医学部獣医生理学教室内  
Tel 0466-81-6241(内332)  
郵便振替 横浜 8-20350

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

**NEW!**

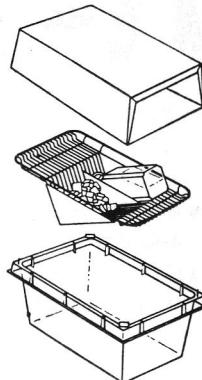
## M-7 (Isocage & Isocap)

### 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。

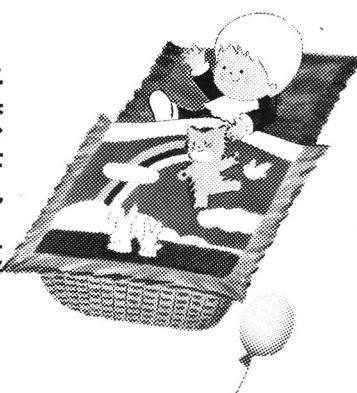


### 岡崎産業株式会社

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  
感染防御因子  
ラクトフェリン新配合

新製法で、さらに  
溶けやすくなりました



母乳に多いラクトフェリン新配合で赤ちゃんすこやか  
森永 B.F.-L ドライミルク



森永乳業

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

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



## 【効能・効果】

間脳性（視床下部性）無月経、下垂体性無月経の排卵誘発

## 【用法・用量】

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

## 【包　装】

パーゴナル注 75：10管  
パーゴナル注150：10管



帝國臓器製薬株式会社  
東京都港区赤坂二丁目5番1号

## 【使用上の注意】

### 1. 一般的注意

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

# 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

# プロベローゲン®

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

### 日本薬局方 注射用血清性性腺刺激ホルモン

動物  
専用

# ピーメックス®

1,000単位

販売元



三共株式会社

東京都中央区銀座 2-7-12



三共ゾーキ株式会社

東京都中央区日本橋本町 4-1-1

