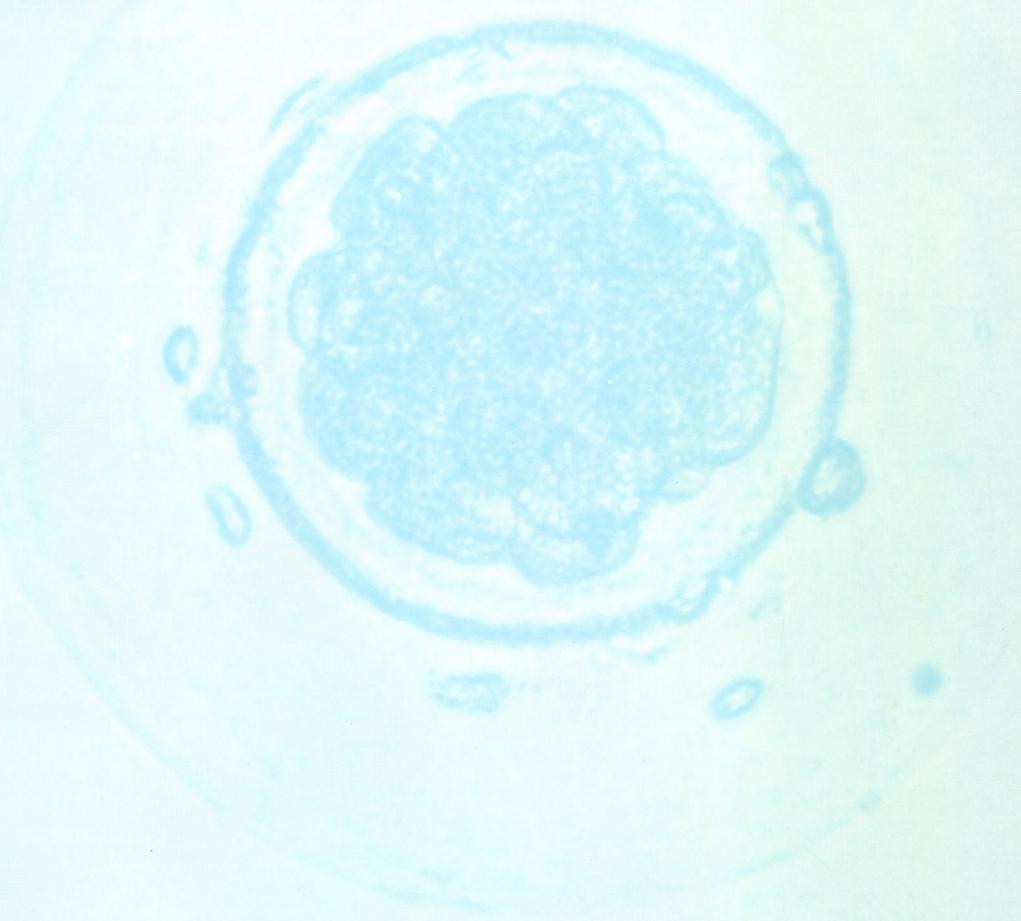


哺乳動物卵子研究会誌

Journal of Mammalian Ova Research



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

Vol. 7 No. 1

April 1990



◆牛の繁殖障害の
分野に新しい可能性！



タケダのすぐれた合成技術が生んだ

LH放出ホルモン製剤

動物用医薬品

コンセラール[®]注射液

牛の卵胞のう腫、排卵障害、
卵巣静止の治療、排卵促進に

(要指示)

製造発売元
武田薬品工業株式会社

提携
帝国臓器製薬株式会社

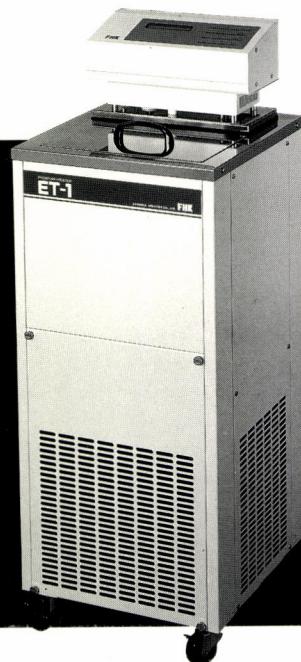
プログラムフリーザー

ET-1

- 電子プログラムによる受精卵凍結装置
- 操作はキイスイッチで容易に行えます
- 7プログラムを容易に設定・実行できます
- ET-1専用の植水・凍結用ラック装備
- ポーズ機能・異常検出機能・バックアップ機能・オートスタート／ストップ機能などを装備

仕様

ストロー収納数	0.25mL 20本(専用ラック)
使用温度範囲	-40°C~50°C
冷凍機	600W
電源	AC100V 20A 50 60Hz
外寸法	360×400×1000mm
重量	約50kg



FHK 富士平工業株式会社

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

哺乳動物卵子研究会誌

第7号 第1号

平成2年4月

目 次

原 著

家兎胚盤胞の走査型電子顕微鏡による観察

戸津川 清、菅原七郎、正木淳二	1
圧電素子を用いた細胞操作用マイクロマニピュレータの開発	
工藤謙一、後藤 勤、佐藤嘉兵、山形 豊、 古谷克司、樋口俊郎	7
ハムスター卵子の体外受精におよぼすサイトカラシンBの影響(英文)	
佐藤嘉兵、後藤 勤、千代倉由子	13

第31回哺乳動物卵子研究会講演要旨集

特別講演

卵の細胞周期の調節機構

岸本健雄	17
------	----

一般演題

ラット卵巣におけるイソヒビンおよびアクチビン α 、 β Aおよび

β Bサブユニットの局在に関する免疫組織化学的研究

小川健司、林 良博、九郎丸正道、塩田邦郎、	
-----------------------	--

高橋 迪雄、西田 隆雄	19
-------------	----

子宮腔内移植卵巣のhCGによる「生存」時間延長

利部 聰、石田哲也、萬場光一、牧田登之	21
---------------------	----

ウサギの発生初期胚におけるNADP依存性プロスタグランジン

脱水素酵素の存在——組織化学的研究——

新村末雄、石田一夫	23
-----------	----

哺乳動物胚における割球分化の時期

四谷伊公子、新村末雄、石田一夫	25
-----------------	----

マウス始原生殖細胞の全能性ならびに多能性に関する研究

——特に集合法による検討——

加藤容子、角田幸雄	27
-----------	----

ハムスター卵成熟過程の電気生理学的解析 藤原敏博、堤 治、綾部琢哉、矢野 哲、三橋直樹、 水野正彦、宮崎俊一	29
マウス初期胚発生段階におけるDNA合成の検討 原田 省、谷川正浩、大野原良昌、見尾保幸	31
牛体外受精における屠殺時の血液性状とその発生能について 高木優二、森 一樹、長谷川喜久、菅原七郎、正木淳二	33
ラット卵子の体外培養—完全合成培地での発生能— 松本浩道、高木優二、菅原七郎、正木淳二、	35
近交系マウス未受精卵の超急速凍結保存 中瀧直己	37
混合耐凍剤によるマウス胚の凍結 石森久雄、宇高健二	39
マウス裸化卵子の体外受精におよぼすカルシウムの効果について 板垣佳明、豊田 裕	41
体外受精・受精卵移植を用いたマウスのクリーニング(病原微生物の除去) 鈴木宏志、森口佳之、萬 啓悟、渡辺利彦、 名倉政雄、龍味哲夫	43
精子ベクター法によるトランスジェニックアニマル作出の試み 保地真一、二宮 隆、本間美保、結城 慎	45
新しいpartial zona dissection法 斉藤英和、佐藤文彦、沼崎政良、椎名有二、小池数与、 斉藤隆和、広井正彦	47
卵胞腔内精子注入によるヒト卵子の受精 松井素子、木村麻美、淡路英雄、小林善宗、本田育子、 中村加代子、井上正人、藤井明和	49
体外受精—胚移植(1988-1989) 小林善宗、本田育子、津田朋男、中村加代子、松山毅彦、 淡路英雄、井上正人、藤井明和	51
偽妊娠子宮日齢からみた移植マウス胚(2細胞～胚盤胞)の着床率 森 匡、清水 弘、北嶋朋子、一戸喜兵衛	53

Journal of Mammalian Ova Research

Vol.7 No.1

April 1990

Contents

Originals

- Observation of the rabbit blastocyst by the scanning electron microscopy. TOTSUKAWA, K., S.SUGAWARA & J.MASAKI ----- 1
Development of piezo micromanipulator for cell micromanipulation. KUDOH, K., T.GOTOH, K.SATO, Y.YAKAGATA, K.FURUTANI & T.HIGUCHI ----- 7
Effect of cytochalasin B on in vitro fertilization of hamster eggs. SATO, K., T.GOTO & Y.CHIOKURA ----- 13

Proceeding of the 31th Annual Meeting of Japan Society of Mammalian Ova Research

Special report

- Regulation of cell cycle during oocyte maturation and early embryonic cleavages. KISHIMOTO, T. ----- 17

General reports

- Histochemical localization of inhibin and activin α , β A and β B subunits in the rat ovary. OGAWA, K., Y.HAYASHI, M.KUROHMARU, K.SHIOTA, M.TAKAHASHI, & T.NISHIDA ----- 19
Prolongation of lifespan of rat ovary by hCG in homoplastic ovary into uterine cavity. KAGABU, S., T.ISHIDA, K.MANBA, & T.MAKITA ----- 21
NADP-dependent prostaglandin dehydrogenase in preimplantation rabbit embryos. NIIMURA, S. & K.ISHIDA ----- 23
The time of blastomere differentiation in preimplantation mammalian embryos. YOTSUTANI, I., S.NIIMURA & K.ISHIDA ----- 25
Studies on the totipotency and pluripotency of the mouse primordial germ cells, with a special reference to aggregation method. KATO, Y. & Y.TSUNODA ----- 27
Electrophysiological study on the maturation of hamster oocytes. FUJIWARA, T., O.TSUTSUMI, T.AYABE, T.YANO, N.MITSUHASHI, M.MIZUNO & S.MIYAZAKI ----- 29

DNA synthetic activity in preimplanted mouse embryos.	
HARADA,T.,M.TANIKAWA,Y.ONOHARA & Y.MIO-----	31
Serum hormones at slaughter and development of oocytes matured, fertilized and co-cultured in bovine IVF.	
TAKAGI,Y.,K.MORI,Y.HASEGAWA,S.SUGAWARA & J.MASAKI -----	33
In vitro culture of rat eggs.	
— Development of rat eggs in chemical defined media —	
MATSUMOTO,H.,Y.TAKAGI,S.SUGAWARA & J.MASAKI -----	35
Cryopreservation of unfertilized mouse oocytes from inbred strains by ultrarapid freezing.	
NAKAGATA,N. -----	37
Freezing of mouse embryos in cryoprotectant mixture.	
ISHIMORI,H. & K.UTAKA -----	39
Effect of elevated calcium concentration on fertilization of cumulus free mouse eggs in vitro.	
ITAGAKI,Y. & Y.TOYODA -----	41
Rederivation of mice by means of in vitro fertilization and embryo transfer.	
SUZUKI.H.,Y.MORIGUCHI,K.YOROZU,T.WATANABE, M.NAKURA & T.TATSUMI -----	43
Attempt to produce transgenic animals by sperm-mediated DNA transfer.	
HOCHI,S.,T.NINOMIYA,M.HONMA & A.YUKI -----	45
New method of partial zona dissection.	
SAITO,H.,F.SATO,M.NUMAZAKI,Y.SHIINA,K.KOIKE, T.SAITO & M.HIROI -----	47
Fertilization of human oocytes by subzonal insertion of spermatozoa.	
MATSUI,M.,A.KIMURA,H.AWAJI,Y.KOBAYASHI,I.HONDA, K.NAKAMURA,M.INOUE & A.FUJII -----	49
Results of IVF-ET(1988-1989).	
KOBAYASHI,Y.,I.HONDA,T.TSUDA,K.NAKAMURA,T.MATSUYAMA, H.AWAJI,M.INOUE & A.FUJII-----	51
Implantation rate of mice embryos(2-cell~blastocyst) transferred to the uterine associated with pseudopregnant days.	
MORI,T.,H.SHIMIZU,T.KITAJIMA & K.ICHINOE -----	53

家兎胚盤胞の走査型電子顕微鏡による観察

Observation of the Rabbit Blastocyst

by the Scanning Electron Microscopy

戸津川 清¹⁾・菅原七郎・正木淳二

Kiyoshi TOTSUKAWA¹⁾, Shichirou SUGAWARA
and Junji MASAKI

東北大学農学部家畜繁殖学教室

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai.

¹⁾ 山形大学農学部畜産学教室

¹⁾ Laboratory of Animal Science, Faculty of Agriculture., Yamagata University, Tsuruoka.

Abstract

In order to elucidate the surface ultrastructure in blastocysts recovered from the rabbit on Days 5 and 6 of pregnancy, this study was conducted by the use of scanning electron microscopy.

1. The blastocyst covering was lack of uniformity, and constituted with two thin layers.
2. The trophoblastic cells had a polygonal appearance although each cell varied in shape and size. Each of them was covered with slender microvilli.
3. The cells of inner cell mass made a group of cells as a disk. Each cell varied two types. The large cells were covered with some short microvilli, and the small cells had shorter one.

緒 言

哺乳動物の受精卵は、分割をくり返しながら、卵管を下降し、桑実胚をへて胚盤胞 (blastocyst) となり子宮に着床する。着床の過程は、種により異なっており、それが胚盤胞の形態や機能と密接な関連を持っている。特に、家兎胚盤胞は、他の齧歯類と異なり、着床前に栄養膜細胞の数を著しく増やし、胚盤胞腔液を内部に多

量蓄積し、外表面には被膜を付けたまま子宮上皮との接触 (cell contact) を行い着床過程を進行してゆくと言われている¹⁾。この一連の着床過程については、これまで光学顕微鏡を用いて検討されてきた^{2~3)}。また、微細構造については、主として透過型電子顕微鏡 (TEM)^{4~8)}を用いた報告がなされてきた。しかし、走査型電子顕微鏡 (SEM)^{9~10)}を用いたものは、比較的少ない。前報¹⁰⁾において、6日齢家兎胚盤胞の表面微細構造について報告したが、本実験ではさらに各部位について詳細な観察を加えた。

材料および方法

日本白色種家兎より、交尾後5日および6日齢胚盤胞を滅菌生理食塩水で、子宮灌流法により採取した。一部の胚盤胞は被膜を付けたままで、他のものは0.05%トリブシンにより被膜を溶解したものを使用した。リン酸緩衝液 (pH=7.4, 0.2M) で2回洗った後、2.5%グルタール・アルデヒドで5~6時間固定した。再び、リン酸緩衝液で12~14時間洗った後、1%四酸化オスミウムで一時間固定を行った。次に、常法に従いアルコール系列で脱水を行い、ステンレスのかごに入れ、日立HCP-1型で臨界点乾燥にかけ、金蒸着をした。処理材料の観察には、日立S-70型電子顕微鏡を行った。

結果

家兎胚盤胞の形態は、図1の模式図で示す通りである。すなわち、最外層に非細胞性の糖蛋白質の被膜、その内側に単層の栄養膜細胞が球形をつくるように連なり、一部に数層の細胞集団となる円盤状の内細胞塊が局在し、内部に多量の胚盤胞腔液を満たした胞胚腔から構成されている。SEMによる観察結果を以下に示す。

胚盤胞被膜：家兎胚盤胞被膜は、光学顕微鏡によれば均一で平らな膜表面を有しているが、電子顕微鏡 (SEM) での観察によれば、均一な層ではなく、部分により表面構造に違いを示した。すなわち、何らかの物質が層状に付着したか、あるいは外部が剥がれ内部が裸出した様な不均一な部位が認められ、6日齢の被膜に5日齢で認められない小孔状の窓が認められた (図1~3)。被膜は著しく菲薄化しており、構造的には明らかに2つの層よりできている像が観察された (図4)。

栄養膜細胞：細胞は特に一定の形を示さず、連なってほぼ球状を呈していた。また、細胞は一定の厚さを有して、内外両面にやや隆起し (図5)、被膜側の自由表面側の細胞表面には多数の長く伸びた微絨毛 (microvilli) がほぼ直立した状態で細胞全域を被っていた (図6)。他方、胚盤胞腔側の表面は、糸状に長く伸びた粘液性のものが全面を被っていた (図7~8)。

内細胞塊の細胞：橢円形及び不正円形状の大小の細胞が重なっており、全体としてはほぼ円形の細胞集団を形成していた (図9)。

大型細胞は栄養膜細胞よりやや短い微絨毛で被われ、一方、小型細胞には短い突起がまばらに散在していた。これら大、小2型の細胞は、上述の栄養膜細胞とは形及び細胞表面において明かな差異を示していた。また、

2つの細胞の結合様式は極めてゆるく、数層に重なっていた（図10）。

考 察

家兔胚盤胞は子宮内に入り、著しく細胞数を増加させながら、それに続く着床への準備を行う。この時期の受精卵は機能的に変化が著しく、その性状が形態的変化として微細構造に反映していることが推測される。そこで、この微細構造の変化を電顕的に検討することは、胚盤胞の性状を知る手段として有効と考えられる。

著者らは、本実験において胚盤胞被膜や内細胞塊の細胞についての詳細な観察を行うことができた。胚盤胞被膜の起原については、透明帯 (zona pellucida) とするものと^{2, 4, 11)}、子宮分泌物が付着した結果によるとする^{12~15)}、2つに大別される。古くはBöving¹²⁾が、卵胞卵の透明帯と胚盤胞被膜の容積の比較から、両者を同一とは考えられないとして、さらに、Dickmann¹³⁾は透明帯は二層性であると報告している。また、野沢¹⁴⁾、岩城¹⁵⁾らは、透明帯と被膜は異質のものであり、被膜の主体は子宮分泌液であろうと推測している。著者らは、明かに異なる二つの層を観察したことにより、野沢らの説を支持するものである。さらに、被膜の外表面の観察からすると、一様な構造ではなく、部位により異なるものであった。表面全体に見られる小孔状の窩も整然としたものではなかった。野沢らは、胚胎胞の発育に伴い透明帯が非薄化し、ついには途切れ、ムチン層の内壁に沿って分断片が棍棒状に存在したと報告している。これらは、着床へ進展するための形態的変化を反映しているのかもしれない。

また、内細胞塊の細胞表面をSEMにより観察した報告はこれまでなかったが、著者らは他のトロホラスト細胞と異なる細胞集団を鮮明に認めることができた。これら大小の細胞は形状だけでなく、表面の微絨毛の形態もトロホラスト細胞のものと明らかに異なっており、細胞そのものの機能の違いと関係あるものと推測される。

文 献

- 1) 岩城 章(1977). 胚胎の形態と機能. *Sexual Medicine*. 4, 24-30
- 2) STEER, H.W. (1970). The trophoblastic knobs of the preimplanted rabbit blastocyst: a light and electron microscopic study. *J. Anat.* 107, 315-325
- 3) HESSELDALH, H (1971) Ultrastructure of early cleavage stages and preimplantation in the rabbit. *Z. Anat. Entw. Gesch.* 135, 139-155
- 4) LARSEN, J.F. (1961). Electron microscopy of the implantation site in the rabbit, *Amer. J. Anat.* 109, 319-334
- 5) 西脇俊幸. (1969). 家兔胞胚の電子顕微鏡的研究. *日不妊会誌*. 14, 50-66
- 6) ENDERS, A.C. (1971). The fine structure of the blastocyst. In the *Biology of the Blastocyst*.

Edited by BLANDAU, R.J. The Univ. of Chicago, Chicago & London, P71-94

- 7) ENDERS, A. and SCHLAFKE, S. (1971) Penetration of the uterine epithelium during implantation in the rabbit. Am. J. Anat. 132, 219-240.
- 8) KIRCHNER, C. and SEITZ, K.A. (1972). Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Blastozyste des Kaninchens vor der Implantation in Bezug auf ihre Wechselbeziehung zur Uterinen Umgebung. Wilh. Roux Archiv, 170, 221-233
- 9) BERGSTROM, S. and LWTWAK-MANN. (1974). Surface ultrastructure of the rabbit blastocyst. J. Reprod. Fert. 36, 421-422
- 10) 戸津川 清・堀内俊孝・菅原七郎・正木淳二. (1979). ウサギ胚盤胞の表面微細構造. 家畜繁殖誌. 25, 46-47
- 11) EI-BANNA, A.A. and DANIEL, J.C. (1972). The effect of protein fractions from rabbit uterine fluids on embryo growth and uptake of nucleic acid and protein precursors, Fert. Steril. 23, 105-114
- 12) BÖVING, B.G. (1957). Rabbit egg coverings, Anat. Rec. 127, 270-271
- 13) DICKMANN, Z. (1963) The zona pellucida of the rabbit egg. Fert. Steril. 14, 490-493
- 14) 野沢あき子. (1976) 家兔胞胚の被膜に関する研究. 日不妊会誌. 21, 59-69
- 15) 岩城 章・黒沢忠彦・野沢あき子. (1977) 胞胚の形態と機能. Sexual Medicine, 4, 24-30

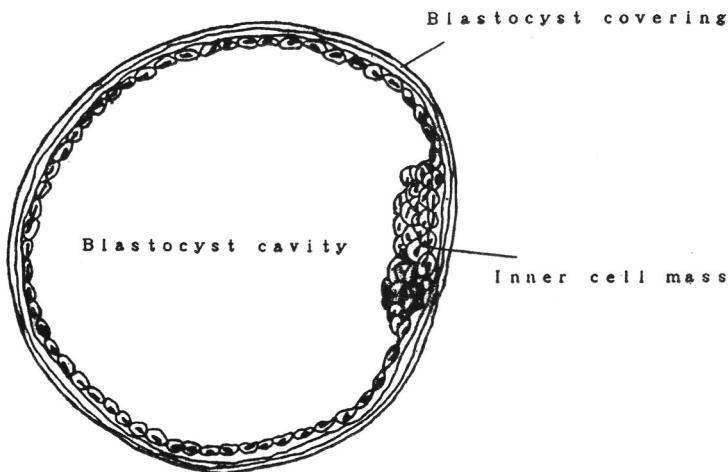
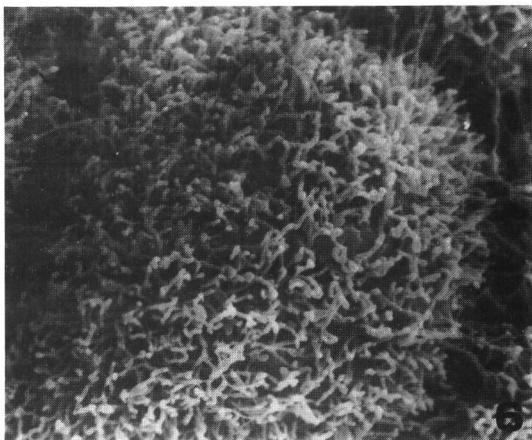
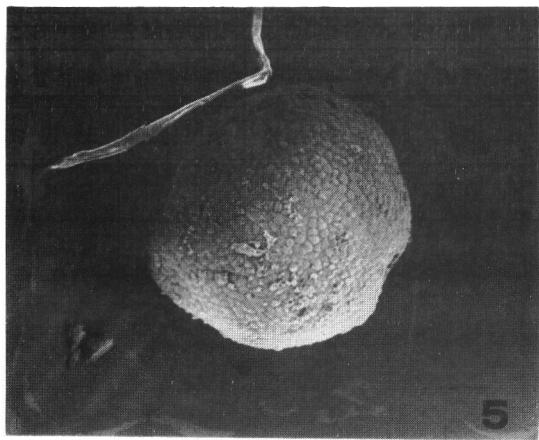
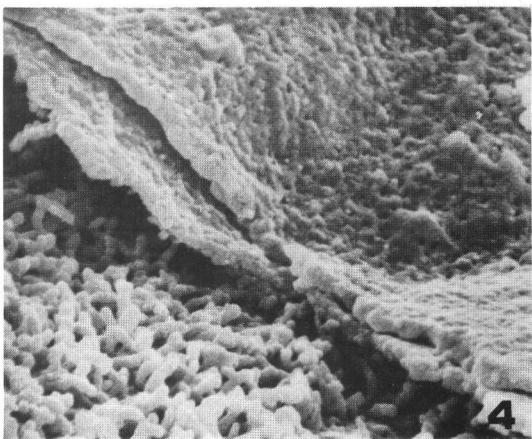
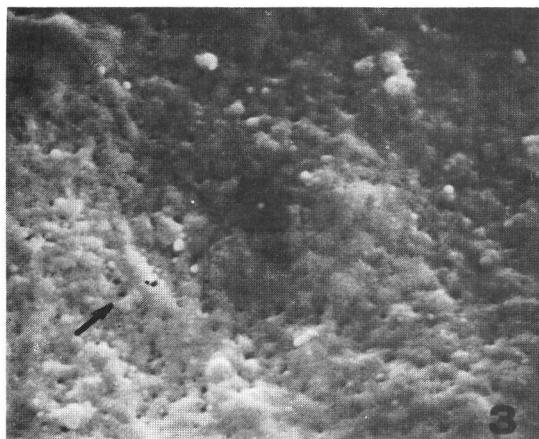
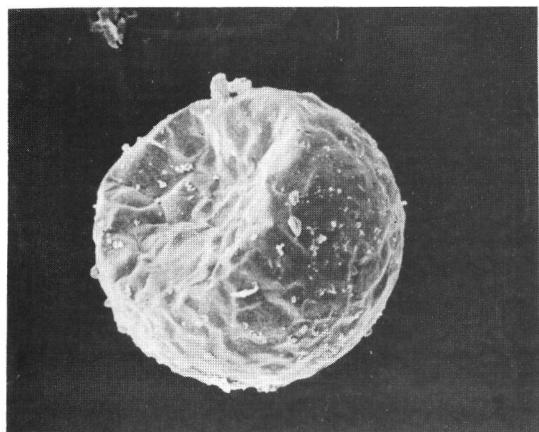
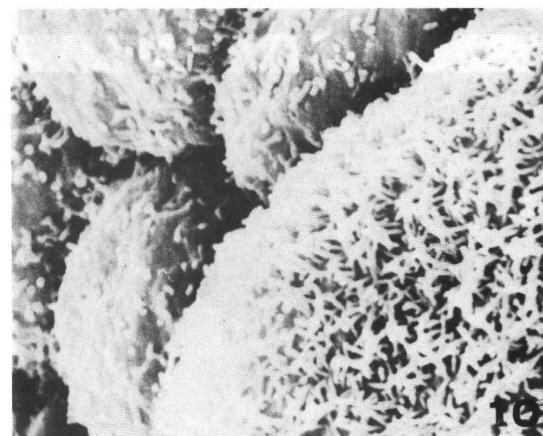
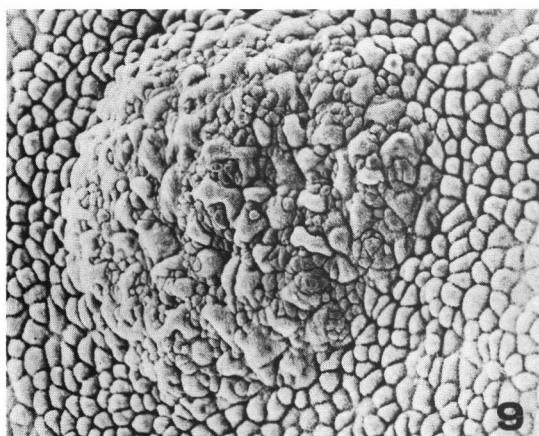
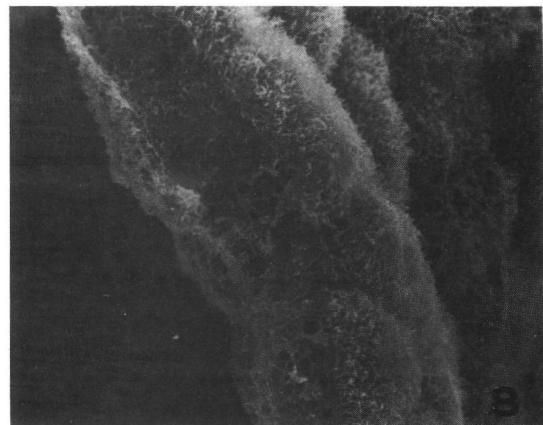
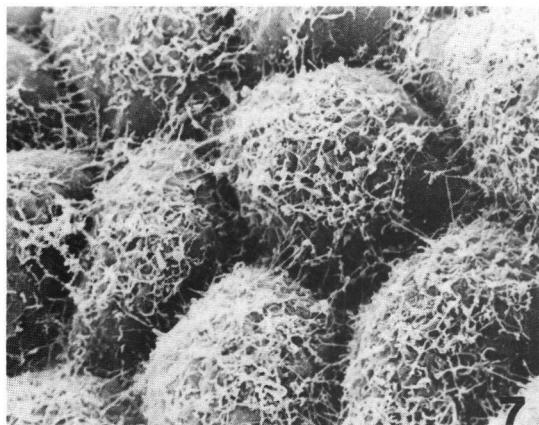


図1. 家兔胚盤胞の形態





EXPLANATION OF FIGURES

1. In blastocyst covering 5 Day rabbit blastocyst. ($\times 180$)
2. The surface of blastocyst covering; lacking uniformity of cell surface. ($\times 4500$)
3. Micro-hole (arrow) can be seen on the surface of blastocyst covering ($\times 18000$)
4. The blastocyst covering is observed as two layers. ($\times 15000$)
5. A membrane free blastocyst; showing a ball of trophoblastic cells. ($\times 180$)
6. A slender microvilli of outer surface of trophoblastic cells. ($\times 9000$)
7. The inner surface facing the blastocoel has sparse, long microvilli. ($\times 3600$)
8. Outer (the right part of the picture) and inner (the left part) surface of a blastocyst. ($\times 3000$)
9. Cells of the inner cell mass can be seen as a disk; 6 days blastocyst. ($\times 450$)
10. A large type (the right part of the picture) and small type (the left part) cells of the inner cell mass can be seen. ($\times 9000$)

圧電素子を用いた細胞操作用 マイクロマニピュレータの開発

Development of Piezo Micromanipulator
for cell Micromanipulation

工藤謙一¹, 後藤 勤², 佐藤嘉兵², 山形 豊³, 古谷克司³, 樋口俊郎³

Ken-ichi KUDOH, Tsutomu GOTOH, Kahei SATO, Yutaka YAMAGATA,
Katsushi FURUTANI and Toshiro HIGUCHI

1) プリマハム株中央研究所

Prima Meat Packers, Ltd, Reserch and Development

2) 日本大学農獸医学部 動物細胞学教室

Department of Cell Biology College of Agriculture and Veterinary
Medicine, Nihon University

3) 東京大学生産技術研究所

Institute of Industrial Science, University of Tokyo

Positioning mechanisms with the resolution of micro-meter order are required for precise cell manipulation in biotechnology. Conventional hydraulic manipulators and electromagnetic ones have following two problems: (1)The performance of manipulation depends on operator's skill. (2)It is difficult to insert a capillary into elastic membrane of a cell, and the cell is sometimes destroyed. A new micro-manipulator and micro-injector for cell manipulation are introduced in this paper. These are driven by the precise positioning mechanism utilizing rapid deformations of piezoelectric elements, which have high positioning resolution. This micro-manipulator can insert a capillary into elastic membrane of a cell smoothly and seldom damage membrane, because this mechanisms uses impacts caused by rapid deformations of piezoelectric elements. This micro-injector can inject less volume per pulse than the conventional ones. Therefore these mechanisms solve previous problems. They are very simple, compact and suitable for cell manipulation and its automation.

1. まえがき

近年、哺乳動物における体外受精の研究には、精密な細胞操作を行なう必要があり、ミクロンオーダの精密位置決め機構に対する要求がある。体外受精の方法のひとつとして、細胞操作用マイクロマニピュレータを用いた精子の卵子囲卵腔内あるいは細胞質内注入による受精、並びに卵子透明帯の一部を切除して体外受精をさせる方法は、今後、受精機構の解明の手段として、また、家畜生産、不妊症治療法としても大いに期待される方法である¹⁾²⁾³⁾。しかし、大方の研究者の使用している既存の油圧駆動マイクロマニピュレータによる操作、特に細胞内における微小位置決め操作には、オペレータの熟練を必要とし、また細胞膜の弾性の強い卵子などは、マイクロピペットの挿入時に卵子が変形し破壊されてしまい、成功率は低い。我々は、圧電素子の急速変形によって微小移動する機構を開発して、種々の装置を試作し実験を行なって来た⁴⁾⁵⁾。今回、この機構を細胞操作用マイクロマニピュレータのマイクロピペットの微動装置、及びマイクロインジェクターの駆動に用い、この機構が細胞操作用マイクロマニピュレータの駆動機構として優れた性能を持っていることを確認した。

2. 駆動原理

図1に今回開発したマイクロマニピュレータに使用している微小駆動装置の駆動原理を示す。

移動体はベース上に置かれて、摩擦力で保持されている。この移動体(M)の端面に慣性体(m)が圧電素子を介して接着されている。圧電素子を縮めた状態から急激に電圧を印可して圧電素子を伸ばすと、移動体と慣性体が逆方向に移動する(①～②)。次に圧電素子を縮め、慣性体を一定の加速度で加速しながら引き戻してやる。このとき移動体が動かないように、この加速により引き起こされた慣性体の慣性力が、移動体とベースの間の静止摩擦力よりも小さくなるようにする。圧電素子が縮んだところで、慣性体の動きを急に止めてやれば、移動機構全体が、静止摩擦力に打ち勝って運動を始め、そして、運動エネルギーを動摩擦力によって失うまで移動して停止する(③～⑤)。逆方向への移動も伸縮のパターンを逆にすることにより、同様に行なうことができる。

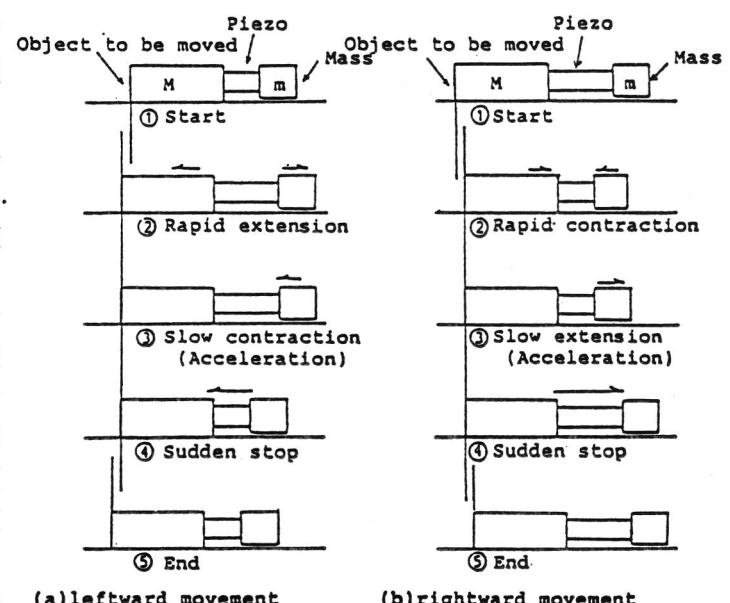


Fig.1 Mechanism of Movement

3. 実験装置

図2は今回開発した圧電素子を用いた微小駆動装置（ピペット駆動装置）を市販の倒立顕微鏡に取り付けた実験装置である。図3に微動部を示す。微動部分である直径4mmのピペットホルダ（ステンレス製）に、圧電素子2個と8gの慣性体2個を接着したプレート（アルミ製）を固定して、静止摩擦発生機構であるガイド部（真鍮製）に取り付けた。ピペットホルダにはマイクロピペット（ガラス製）を取り付けた。今回使用した圧電素子は、PMN系積層型素子（5×5×10mm）で、最大印加電圧150Vにおいて約8μmの変位を生じる。図4はピペットホルダの移動の様子を示す。今回実験に使用したピペット駆動装置は、電圧振幅が20Vの時、1ステップ0.18μmの微小移動を記録している。なお、本機構は原理上ナノメータオーダの超微小移動を可能にしている。今回の開発装置での兔の卵子を使用しての実験では、印加電圧30V、パルスレート80Hzの時、良好な結果を得ている。

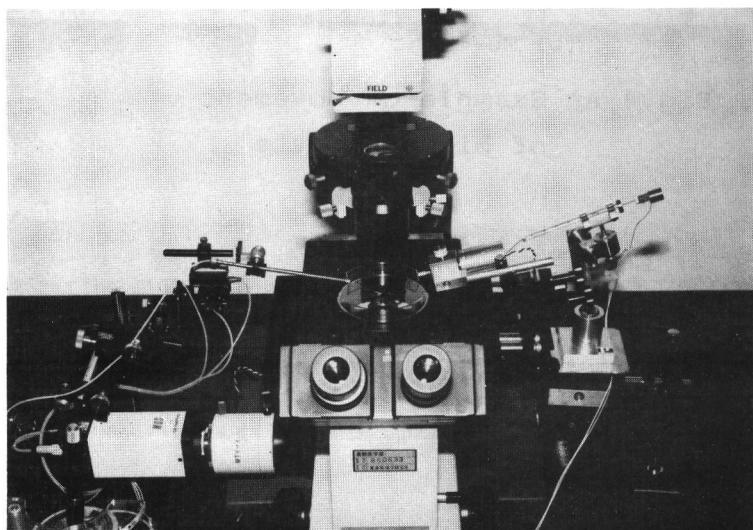


Fig. 2 Micro Manipulator

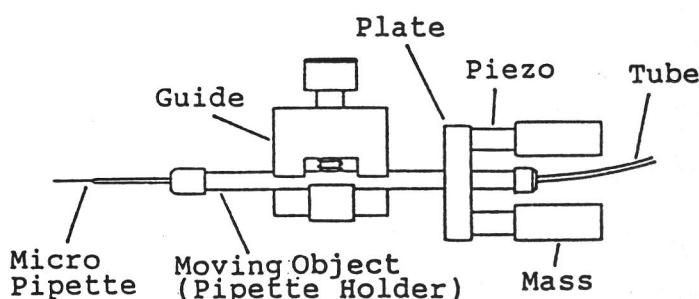


Fig. 3 Sketch of the Equipment

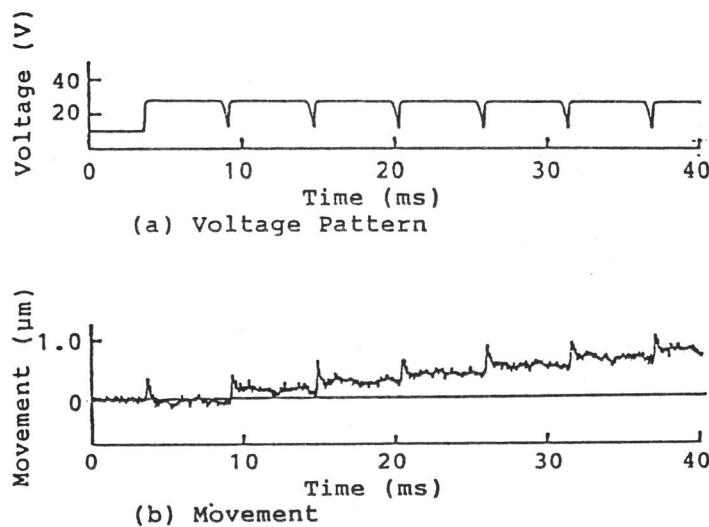


Fig.4 An Example of Movement
of Micro Pipette

図5は圧電駆動マイクロインジェクタである。市販のマイクロシリンジ ($100\mu\text{l}$) の端面に圧電素子と慣性体を取り付けただけの簡単な構造ながら、図6に示す様に、印加電圧 10v の時、1パルスで、約 243 pl ($2.43 \times 10^{-7}\text{CC}$) の吐出量を得た。

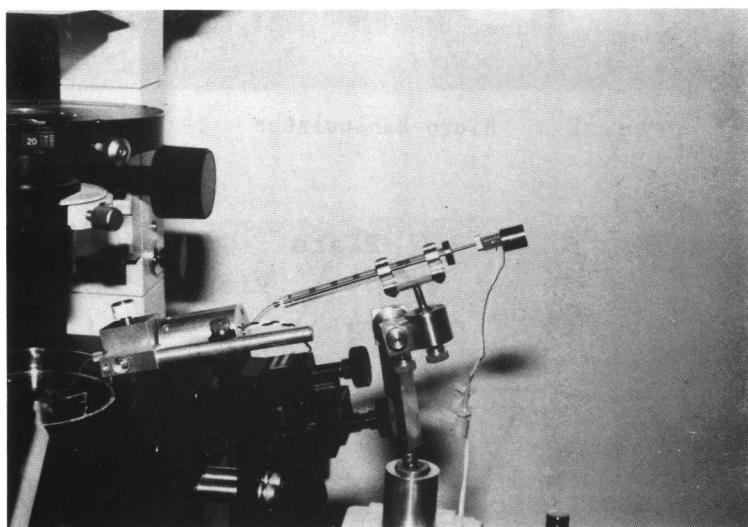


Fig. 5 Micro Injector

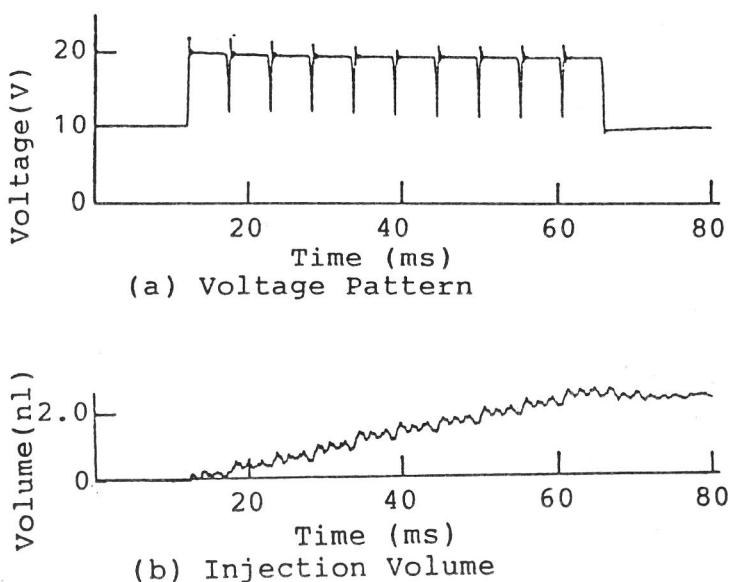
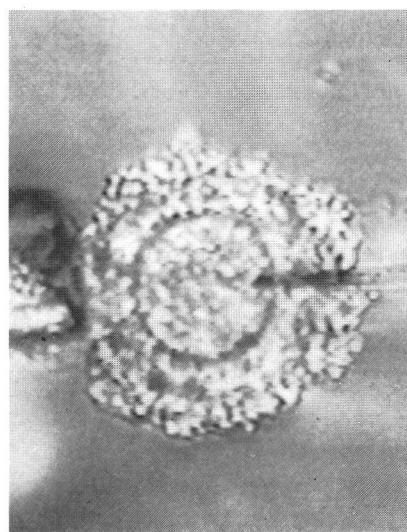


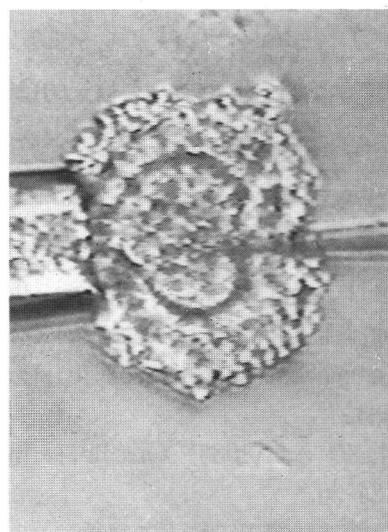
Fig. 6 An Example of Injection Volume of Linear Type Injector

4. 実験結果とまとめ

図7に圧電方式マイクロマニピュレータと油圧駆動マイクロマニピュレータの細胞操作の様子を示す。実験に使用した細胞は兎の卵子で、大きさは約 $180\mu\text{m}$ である。表1は圧電マイクロマニピュレータを用いて行った実験結果である。



(1) Piezo Manipulation



(2) Hydraulic Manipulation

Fig. 7 Micro Manipulation

Table.1 In Vitro development of rabbit eggs Fertilized by sperm microinjection

Exp No.	No. of Eggs injected	No. of Eggs fertilized (%)	No. of Egg developed (%)
01	13	8 (61.5)	5 (62.5)
02	20	17 (85.0)	13 (76.5)
03	14	9 (64.3)	7 (77.8)
Total	47	34 (72.3)	25 (73.5)

従来の細胞操作用マイクロマニピュレータの駆動には、一部に電磁力などを用いたものもあるが、一般的には油圧駆動であり、油圧方式では、微小領域のマニピュレーションには大変熟練を必要とし、微細針の位置決め分解能や細胞操作の良否もオペレータの能力次第である。また、弾性の強い細胞膜などに微細器具を挿入する際、細胞が変形し挿入がうまく行かないことがあった。今回、開発した圧電方式は、最小駆動ステップが非常に微小であり、駆動に圧電素子の急速変形に伴う衝撃力を利用しているので、弾性のある細胞膜などに微細器具を非常にスムースに挿入でき、細胞に与えるダメージが非常に少ないという特徴があり、非熟練者でも微小領域における正確な作業が可能なので、細胞操作用マイクロマニピュレータの駆動機構に適していることが確認できた。本機構をインジェクタにも応用することにより、さらに微小なインジェクションを可能にした。また、本機構は単純な構造でコンパクトであり、電気的に制御可能なので自動化に適している。

<参考文献>

- 1) SATO,K (1989) In vitro fertilization of hamster eggs by microinjection of rabbit spermatozoa ; J.Mamm. Ova Res., 6, 89-94
- 2) Mann,J.R(1988) Full term development of mouse eggs fertilized by a spermatozoon microinjection under the zona pellucida. Biol.Reprod., 38, 1077-1083.
- 3) 井上正人ら. (1988) Zona drilling 法による男性不妊の治療, 産科と婦人科, 57, 24-30.
- 4) 樋口俊郎, 渡辺正浩, 工藤謙一 ; 圧電素子の急速変形を利用した超精密位置決め機構, 精密工学会誌 54, 11, 2107.
- 5) 樋口, 山形, 古谷, 佐藤, 後藤, 工藤 : 圧電素子の急速変形を利用したマイクロマニピュレータの開発, 平成元年, 農業機械学会関東支部講演要旨集, 28.

Effect of Cytochalasin B on In Vitro Fertilization of Hamster Eggs

Kahei SATO, Tutomu GOTO and Yuko CHIOKURA

Department of Cell Biology, College of Agriculture
and Veterinary Medicine, Nihon University, and
Department of 2nd Obstetrics and Gynecology, Toho
University School of Medicine,

Abstract: When hamster eggs were exposed to cytochalasin B (1.0 - 10.0 ug/ml) for 20 min and then fertilized under in vitro conditions by capacitated spermatozoa, the majority of them were polyspermic fertilization. While, in control (no treatment) eggs, polyspermy was 6.0%. At 30 min after insemination eggs treated with cytochalasin B contained rich cortical granules (CGs) in the cytoplasm, but in control eggs CGs almost disappeared.

Introduction

Generally, cytoskeletal systems have been known to involve in migration of intracellular substances (Hopkins, 1978). The cortical granules (CGs) in mammalian eggs are released from the egg cortex during fertilization or egg activation (Austin, 1956). Thus, it is interesting to investigate the role of the cytoskeletal system in migration of CGs in mammalian eggs during fertilization. In the present study, we examined the effect of cytochalasin B, an inhibitor for actin depolymerization, on in vitro fertilization of hamster eggs.

Materials and Methods

Golden hamsters were used. Females were superovulated by gonadotropins, according to the method of Sato and Suzuki (1986). Briefly, female hamsters were injected intraperitoneally with 30 IU pregnant mare serum gonadotropin (PMSG, Teikoku Zoki Co.,) followed by an ip injection of 30 IU human chorionic gonadotropin (hCG, Teikoku Zoki Co.,) 52 hr later. At 15.0 hr after hCG injection all animals were autopsied. Oviducts were removed and then were flushed with the medium (mTALP medium, Bavister, and Yanagimachi, 1978; Yanagimachi, 1982) to collect ovulated eggs. The eggs obtained were exposed to 0.1% hyaluronidase in mTALP medium (to disperse the cumulus cells for 5 min at 37°C). Eggs were rinsed with fresh enzyme-free medium, and then were exposed to cytochalasin B at the various concentration for 20 min. Cytochalasin B was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and then the solution was added into the mTALP medium. After exposure to cytochalasin B, the eggs were transferred into the regular medium and supplied to experiments.

Spermatozoa were collected from the distal portion of the cauda

epididymis and suspended in the medium in test tubes. The tubes were placed in 37° C to obtain active motile spermatozoa by swim-up. Collected spermatozoa by swim-up method were resuspended in fresh mTALP medium at the concentration of $2 \times 10^7/\text{ml}$ and the medium droplet was prepared in plastic culture dishes. These sperm suspension droplets were covered with mineral oil and the incubation was performed under conditions of 5% CO₂ in air at 37° C for 3-5 hr.

Insemination was performed by addition a small volume(0.01-0.02 ml) of sperm suspension into a droplet of the medium containing 5-7 egg covered with mineral oil. The sperm-egg preparations were incubated at 37° C under 5%CO₂ in air. At various intervals after the start of incubation the sperm-egg samples in a drop of the medium were mounted between a slide and cover slip supported by paraffin-wax mixture dots. Observations for sperm-egg preparations was performed, using the phase-contrast microscope. In some eggs, the CGs in the egg cytoplasm were observed by using the phase-microscope.

Results and Discussion

Results obtained were presented in Table 1. In control, the rate of fertilization was in 91.0 - 99.0 %(ave.97.3%). In cytochalasin -treated groups, there is no significant differences in the fertilization rate. While, treatment of cytochalasin B induced clearly polyspermy, as shown in Table 1. In control only 6.0% of eggs inseminated was polyspermic fertilization, but in cytochalasin-treated egg groups polyspermy was seen in the range of 53.5 - 83.5% of fertilized eggs.

When eggs treated with cytochalasin B were observed 30 min after insemination, a large number of CGs was seen in the egg cytoplasm. On the other hand, in control eggs, the cortical granules have disappeared at the same time after insemination.

Table 1. Effect of cytochalasin B on fertilization in vitro of hamster eggs

Dose of cytochalasin B (ug / ml)	No. of eggs inseminated	No. of eggs fertilized (%)	No. of eggs with polyspermic penetration(%)
0 (Control)	113	110(97.3)	9(6.0)
1.0	119	114(95.8)	61(53.5)*
5.0	118	114(96.6)	94(82.5)*
10.0	118	114(96.6)	80(70.2)*

Cytochalasin B was dissolved in dimethyl sulfoxide(10 ug/ml). Dimethyl sulfoxide(10 ug/ml) was added into the control medium.

Examination for the evidence of fertilization was performed 1 hr after insemination.

* Significantly different from the control ($P > 0.01$).

The present results have indicated that cytochalasin B inhibits the release of the CGs from the egg cytoplasm at the time of fertilization in vitro. CGs are presented in unfertilized eggs; these CGs subsequently disappeared during fertilization (Austin, 1956). The CGs of mammalian eggs are known to contain hydrolytic enzymes and saccharide components (Gulyas, 1980) and the CG contents which are released from the egg cortex during fertilization can induce the zona reaction. The CG-mediated zona reaction is known to block polyspermy (Yanagimachi, 1988). In the present study, the high rate of polyspermy observed in hamster eggs treated with cytochalasin B depend clearly upon the blockade of the cortical granules release. Cytochalasin B is known to inhibit the addition of actin molecules to actin filaments, leading to filament depolymerization. Thus, it is suggested that actin filaments of the cytoskeleton involves in the release of cortical granules during fertilization in vitro of hamster eggs.

References

- Austin, C.R.(1956) Cortical granules in hamster eggs. *Exp. Cell Res.*, 10, 533-540.
- Bavister, J.D. and yanagimachi, R.(1977) The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.*, 16, 228-237.
- Gulyas, J.B.(1980) Cortical granules of mammalian eggs. *Int. Rev. Cytol.* 63, 357-392.
- Hopkins, C.R.(1978) The Cytoplasmic Matrix. In "Structure and Function of Cells", Edited by C.R. Hopkins. London, Philadelphia, Tront, W.B.Saunders Company Ltd, 207-233.
- Yanagimachi, R.(1981) Mechanisms of fertilization in mammals. In "Fertilization and Embryonic Development In Vitro", Edited by L. Mastroianni and J.D. Biggers. New York, Plenum Publishing, pp 81-182.
- Yanagimachi, R.(1982) In vitro sperm capacitation and fertilization of golden hamster eggs in a chemically defined medium. In "In Vitro Fertilization and Embryo Transfer", Edited by E.S.E. Hafez and L. Semm. Lancaster, MTP Press, pp 65-76.
- Yanagimachi, R.(1988) Mammalian Fertilization. In "The Physiology of Reproduction", edited by E. Knobil and J. Neill et al. Raven Press, pp 135-185.

ハムスターの体外受精におよぼすサイトカラシン Bの影響

佐藤 嘉兵¹、後藤 勤¹、千代倉由子²

日本大学農獣医学部動物細胞学教室¹

東邦大学医学部産婦人科学教室²

ハムスター卵子の体外受精におよぼすサイトカラシン Bの影響について。サイトカラシン B(1.0 - 10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を含む培養液に排卵卵子を2間隔作させた後にcapacitationを誘起させた精子を用いて体外受精を行なった結果、どの処理群においても高い多精子受精(53-82%)を示した。一方 controlにおける多精子受精は僅かに6%であった。また、媒精後30分に卵子細胞層における表層顆粒を観察したところ、controlの卵子においては表層顆粒ほとんど見られなかった。一方、サイトカラシン B処理を行なった各群の卵においては大多数の卵子において多数の表層顆粒が観察された。

第 31 回
哺 乳 動 物 卵 子 研 究 会

講 演 要 旨 集

会 期 平成 2 年 4 月 13 日
会 場 日 本 大 学 会 館

卵の細胞周期の調節機構

Regulation of cell cycle during oocyte
maturation and early embryonic cleavages

岸本 健雄

Takeo KISHIMOTO

東京工業大学・理学部・生物学教室

Biological Laboratory,

Tokyo Institute of Technology

個体の発生は、卵子と精子の受精に始まる。この直前に卵母細胞では、卵成熟分裂がおこって染色体数を半減させ、雌性配偶子として完成する。受精直後のいわゆる初期卵割では、細胞数が一挙に増加して、そのあとの形態形成に備える。本講演では、こうした受精前後の時期の卵の中では細胞分裂周期がいかにして調節されているかについて、最近の成果を報告したい。

卵成熟分裂を開始する直前の卵母細胞はいわゆる未成熟卵で卵核胞をもち、その細胞周期は第1減数分裂前期、つまりM期の始まりに停止している。こうした卵母細胞で卵成熟開始の引金がひかれると、卵内で蛋白質性の卵成熟促進因子 (maturation-promoting factor, MPF) が活性化され、これが核膜崩壊と染色体凝縮をひきおこして、第1減数分裂の進行を再開させる。このようにMPFは当初、卵成熟誘起ホルモンの作用を卵細胞室内で仲介する活性として同定された。しかしその後、MPF活性は単に卵細胞（減数分裂）にとどまらず体細胞（有糸分裂）のM期にも現れ、その作用は分類上の門を越えて非特異的であると判明した。このためMPFは、真核細胞に共通の分裂中期誘起因子として位置づけられるに至っている。そこで本講演では、MPF活性の制御機構を鍵として、卵の分裂周期を調節するしくみを論じていきたい。

MPFの分子的実体は長らく不明であった。しかしごく最近の研究の世界的な急進展により、分裂酵母cdc2遺伝子産物ホモログと分裂期特異的蛋白質サイクリンとの複合体がMPFであると考えられ始めている(図1参照)。

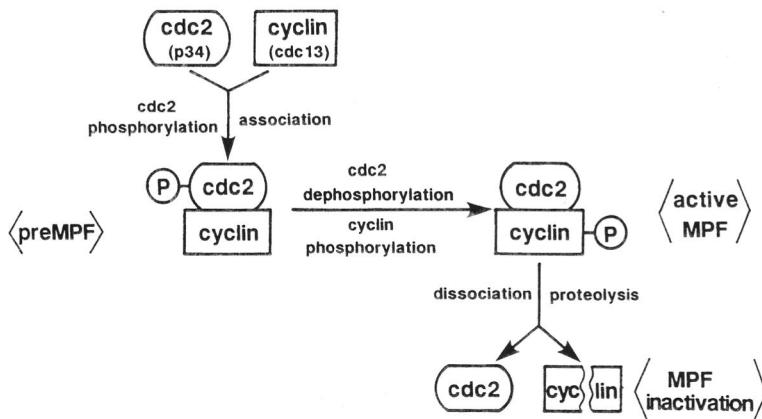


図1. MPF活性の調節機構についてのモデル。

その証拠は、高度に精製したMPFにはSDS-PAGEで約34kdと約50kdの二つのサブユニットが存在し、それぞれが抗cdc2抗体と抗サイクリン抗体によって認識され、しかも一方の抗体による免疫沈澱物に他方が含まれることである。

cdc2産物は酵母からヒトに至るまで高度に相同意が保存された蛋白質で、細胞周期を通じて常に存在する。cdc2蛋白質はヒストンH1・キナーゼ活性をもつが、このための活性化にはチロシン残基の脱リン酸化が必要であると判明している。サイクリンは分裂酵母cdc13遺伝子産物のホモログで、やはりヒトに至るまで相同なものがとられており、そのmRNAは未成熟卵内に微小注射したとき卵成熟誘起活性をもつ。サイクリン蛋白質は、各分裂間期に合成が始まって分裂期に最も蓄積し、各分裂期末に一旦分解されて、分裂周期に応じた量的変動を示す。サイクリンは分裂期にはリン酸化されており、MPF分子内で自己リン酸化がおこることから、サイクリンのリン酸化はcdc2キナーゼによると推測されている。

以上のことから、脱リン酸化型cdc2蛋白質とリン酸化型サイクリンとの複合体が活性型MPFの分子的実体をなすと考えられている(図1)。この活性型MPFは不活性型のMPF前駆体から活性化されるが、MPF前駆体は未成熟卵中に既に存在している。未成熟卵中のcdc2蛋白質は、サイクリンと既に複合体を形成してはいるが、しかし未だリン酸化型である。従って、分裂中期への移行の鍵を握るMPFの活性化の実体は、cdc2蛋白質とサイクリンの複合体形成そのものではなく、既に形成された複合体内でcdc2蛋白質の脱リン酸化とサイクリンのリン酸化がおこることであるといえる。このあと、サイクリンの蛋白質分解がおこりcdc2蛋白質との複合体が解離することによって、MPFが不活性化され、分裂中期から後期への移行がもたらされると考えられる。

ラット卵巣におけるインヒビンおよび アクチビン α 、 β A および β B サブユニット の局在に関する免疫組織化学的研究

Histochemical Localization of
Inhibin and Activin α , β A and β B Subunits
in the Rat Ovary

小川健司、林 良博、九郎丸正道、*塩田邦郎、*高橋迪雄、西田隆雄

Kenji OGAWA, Yoshihiro HAYASHI, Masamichi KUROHMARU,
*Kunio SHIOTA, *Michio TAKAHASHI, Takao NISHIDA

東京大学農学部獣医解剖学教室、*獣医生理学教室

Laboratory of Veterinary Anatomy and *Laboratory of
Veterinary Physiology, Faculty of Agriculture,
The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

目的：インヒビンはLHの放出に影響を与えることなく、下垂体からのFSH放出を抑制する糖タンパク質であり、 α 鎖と β 鎖（ β Aまたは β B）からなるヘテロダイマーであることが知られている。一方、ブタ卵巣からインヒビンを精製する過程でFSH分泌刺激活性を持つタンパク質が発見され、インヒビンの β 鎖からなる（ β A β Aまたは β A β B）二量体であることが判明し、アクチビンと名付けられた。また、インヒビンの β 鎖とTGF- β との間に相同性が見出され、細胞の増殖や分化を調節するTGF- β ファミリーと呼ばれる一群のタンパク質を構成するに至っている。近年、TGF- β ファミリーに属するMISやTGF- β 、またインヒビンが卵成熟に影響をおよぼすとの報告がなされ、その生理的意義に興味が持たれている。

本研究では、成熟、未成熟および胎生期のラット卵巣における、インヒビンおよびアクチビンの局在を α 、 β A および β B subunit のそれぞれに対する抗体を用いて、免疫組織化学的に検討した。

方法： Wistar Imamichi系ラットを用い、成熟（8-10週令）、未成熟（3-4週令および10日令）および胎生期（交尾後15.5-20.5日令）のラットを実験に供した。成熟ラットでは発情前期の11時および23時（PE1100およびPE2300）に卵巣を、また発情期の

11時に卵管を摘出した。組織は摘出後、速やかに2%酢酸カルシウム加10%フォルマリンで固定し、常法に従いパラフィン切片とした後、免疫組織化学的手法を施した。

結果：結果はTable 1.に示す通りである。実験を行った全ての時期において卵細胞質が α 、 βA および βB 抗体に対して陽性反応を示した。成熟ラットでは、全ての抗体に対して顆粒層細胞よりも黄体細胞に強い反応が見られた。卵丘細胞における反応はPE1100では陽性であったが、PE2300およびOE1100では陰性であった。

考察：卵細胞質が強陽性反応を示すことから、インヒビンおよびアクチビン α 、 βA および βB サブユニットが卵細胞質に存在する可能性が示唆された。また、これらのペプチドは顆粒層細胞よりも黄体細胞により多く存在することが示された。卵丘細胞が排卵の前に反応性を減弱させることから、これらのペプチドは卵成熟に伴ったイベントにおいて機能しているものと考えられる。

Table 1. The results obtained with immunohistochemistry

	18.5dpc	10 days	3 weeks	Adult		
				PE1100	PE2300	OE1100
Germ cells	2	4	3	3	3	3
Follicle						
Granulosa cells	-	1	1	1	1	-
Cummulus cells	-	-	1	1	0	0
Corpus Luteum						
Luteal cells	-	-	-	2	2	-

0=Negative reaction

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

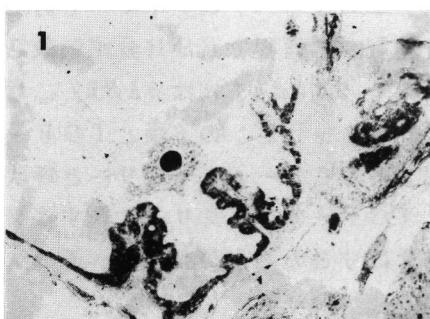


Fig. 1. The ovulated ovum in the oviduct exhibited intensely positive reaction.
 βA (Protein A-gold-silver)

- Feng, P., Catt, K.J. & Knecht, M. (1988) Transforming growth factor- β stimulates meiotic maturation of the rat oocyte. *Endocrinol.* 122, 181-186.
- Massague, J. (1987) The TGF- β family of growth and differentiation factors. *Cell* 49, 437- 438.
- O, W.-S., Robertson, D.M & De Kretser, D.M. (1989) Inhibin as an oocyte meiotic inhibitor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 62, 307-311.
- Takahashi, M., Koide, S.S. & Donahoe, P.K. (1986) Mullerian inhibiting substance as oocyte meiosis inhibitor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 47, 225-234.

子宮腔内移植卵巣のhCGによる「生存」時間延長

Prolongation of lifespan of rat ovary by hCG

in homoplastic ovary into uterine cavity

利部 聰・石田哲也・萬場光一・牧田登之

KAGABU Satosi, ISHIDA Tetsuya, MANBA Kouichi & MAKITA Takashi

山口大学農学部獣医学科家畜解剖学教室

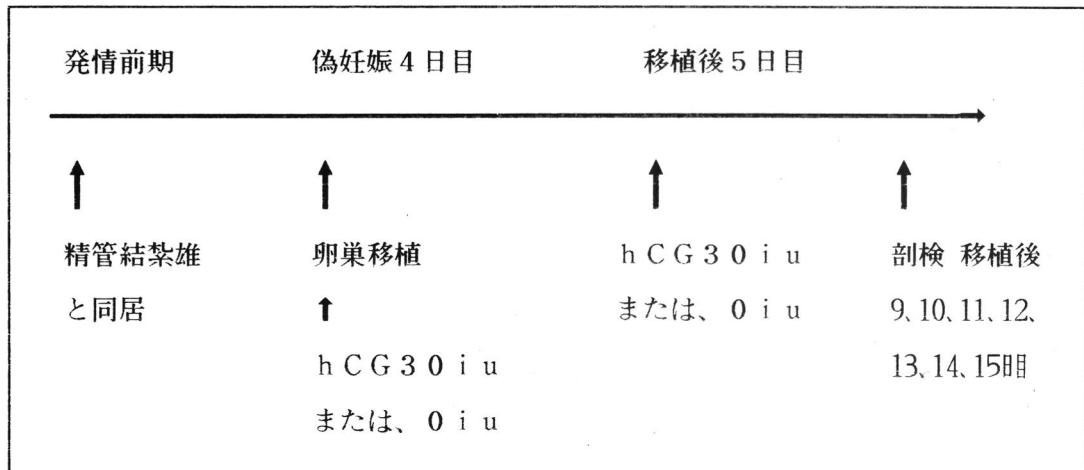
Department of Veterinary anatomy, Yamaguchi University

〔目的〕

一時期、子宮腔内は移植片にたいして「治外法権」になることを応用して、卵巣の子宮腔内移植を試み、異種動物の卵巣の生着が可能であることを認めた¹⁾。さらに、移植卵巣の子宮腔内「生存」期間を9日間まで延長させることに成功した²⁾。本報告では、移植後hCGを投与して9日間以上の期間延長をめざした。

〔方法〕

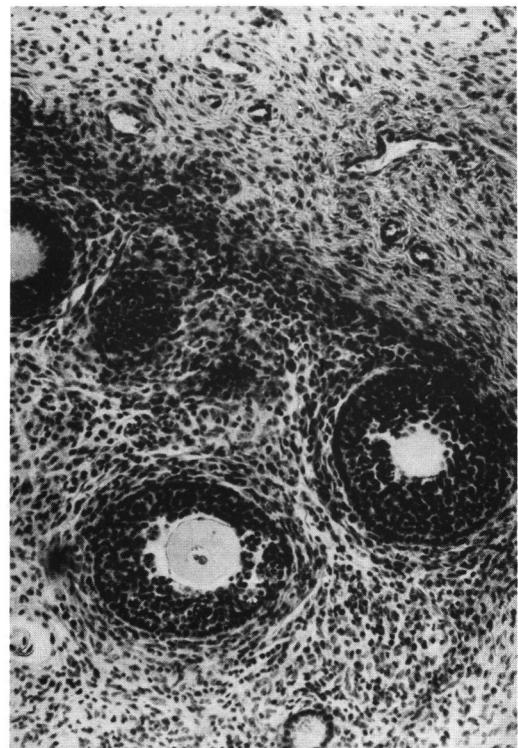
実験に用いた動物はドナー、レシピエントともウイスター・今道系ラットである。ドナーとして21日齢、レシピエントとして12週齢・未経産の4日型発情周期を3回以上繰り返した健康な雌ラットを用いた。発情前期の夜に精管結紮雄ラットと同居させ翌日腔栓を確認したものをレシピエントとした。腔栓確認日を0日として偽妊娠4日目に卵巣を移植した。ペントバルビタール・ソヂウム(5mg/ラット)で前麻酔、ジエチルエーテルで追麻酔したレシピエントの子宮角を露出して、子宮角中央部反間膜側に小孔をピンセット(INOX7番)で開け、移植直前に麻酔下で摘出した卵巣をそのまま挿入した。挿入後直ちに眼科用縫合糸で子宮角の小孔を縫い合わせ、続いて腹壁を縫合し移植を終了した。注射用脂肪乳剤(イントラファット、大五栄養化学)でhCGを融解し移植後投与した。生着の判定は、おおむねBraw & Tsafiririの判定基準によった。すなわち、果粒層細胞に核濃縮が認められること、同細胞に分裂増殖像が認められること、ならびに卵母細胞の核膜が崩壊していないことをもって生着卵巣とみなした。閉鎖卵胞、黄体はど卵巣のほかの構成物を観察対象から除外し非閉鎖卵胞にだけ注目した理由は本研究の目的は、最終的には卵母細胞の採取だからである。卵巣移植後9、10、11、12、13、14、15日目に剖検した。



「結果」

hCG投与による移植卵巣「生存」の延長

h C G	0iu+0iu	30iu+30iu
生	9日 3 0 %	3 7 %
着	10日 2 7	3 0
率	11日 2 7	2 3
	12日 1 0	1 3
	13日 1 5	1 7
	14日 1 0	9
	15日 3	2



〔考察〕

hCGにより移植卵巣「生存」のあきらか <写真説明>

な延長は、認めることができなかった。 移植後12日に剖検し、生着とみなした例。hCG30iu+hCG30iu

「文献」

- 1) 第76回家畜繁殖学会、1989年
 - 2) 第83回日本畜産学会大会、1990年
 - 3) Braw, R. H. & Tsafiriri, A., J. Reprod. Fert., 56, 267-272, 1980

ウサギの発生初期胚におけるNADP依存性 プロスタグランジン脱水素酵素の存在 —組織化学的研究—

NADP-dependent prostaglandin dehydrogenase in preimplantation rabbit embryos
- A histochemical study -

新村末雄・石田一夫

Sueo NIIMURA and Kazuo ISHIDA

新潟大学農学部畜産学科

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Niigata University

目的：近年、ウサギ、ブタ、ヒツジおよびウシの胚盤胞は各種のプロスタグランジン(PG)を含有しているとともに、PGの合成能を持っていることがin vitroの実験で調べられている。なお、合成されたPGは胚盤胞の着床過程に密接な役割を果たしているといわれている。一方、哺乳動物胚において、PGの不活化の第一歩を担っているPG脱水素酵素(PGDH)は、ハムスター¹⁾、マウス^{2,3)}およびブタ⁴⁾で各種のPGを基質に用いてそれぞれ組織化学的に検出されている。PGDHは補酵素に対する依存性からI型(NAD依存性)とII型(NADP依存性)に分けられているが、これまで哺乳動物胚において検出されているのはI型のみであり、II型PGDHが哺乳動物胚に存在するか否かは不明である。本実験は、未受精期から胚盤胞期までのウサギの卵と胚について、PGE₂を基質に用いてII型PGDHの活性の検出を組織化学的に試み、ウサギの卵と胚にこの酵素が存在するか否かを検討するとともに、I型PGDHの活性の存在も併せて検討したものである。

方法：供試動物として日本白色種のウサギを使用した。観察した卵と胚は、前核期、2細胞期、4ないし8細胞期、桑実胚期および胚盤胞期のもので、交尾後それぞれ16時間、24時間、48時間、72時間および120時間に、卵管あるいは子宮をリン酸緩衝塩類溶液(pH 7.4)でかん流して採取した。なお、未受精卵は雄と交配させる代わりにhCGを注射した雌から、hCG注射後12時間に採取した。II型PGDHを検出するための基質液は、Nissen and Andersenが使用した処方⁵⁾に準じて作成した。すなわち、PGE₂(フナコシ薬品)0.3mM、NADP(Sigma, U.S.A.)0.75mM、ニトロBT(Sigma)0.075mMおよびリン酸緩衝液(pH 8.0)0.1Mで、全量を1mlとした。基質はあらかじめ0.1mlのエタノールに溶解して使用した。また、NADPの代わりにNADを0.75mM含む基質液も作成し、I型PGDHの検出にあてた。

結果：未受精期から胚盤胞期までのウサギの卵と胚をⅡ型PGDHの検出のための基質液に浸漬すると、卵と胚の細胞質にジホルマザン顆粒が観察された(図-1a)。この顆粒は基質を含まない液に浸漬した卵と胚の細胞質には出現しなかったので(図-1b)、この顆粒がPGDH活性を現していることが確認された。この顆粒の沈着量からⅡ型PGDH活性を判断すると、活性は1細胞期では強く、未受精期と前核期の卵で活性に相違はなかった。2細胞期では強度のものに混じって弱度のものも認められ、活性が低下していた。また、4細胞期から胚盤胞期の胚ではすべてが弱度であった。なお、NADを補酵素として用いたⅠ型PGDHの活性も、すべての発生時期の卵と胚に認められ、その強さはⅡ型PGDHのものと同じであった。

考察：PGDHは補酵素に対する依存性から2つの型、すなわちNAD依存性のⅠ型とNADP依存性のⅡ型に分けられるといわれており、これらは補酵素に対して高い特異性を有していることが確かめられている。哺乳動物の卵と胚において、Ⅰ型PGDHは数種の動物で組織化学的に検出されているが、Ⅱ型PGDHは全く検出されていない。本実験の結果から、Ⅱ型PGDHがウサギの卵と胚に存在することが初めて明らかとなった。Ⅱ型PGDHがウサギの卵と胚に存在する意義については明らかではないが、ブタ胞胚のトロホblastでは、PGA₁、PGA₂、PGB₁、PGB₂、PGE₁、PGE₂、PGF₁αおよびPGF₂αのいずれを基質に用いてもⅡ型PGDHを検出することができなかったといわれており⁴⁾、この酵素の存在はウサギの卵と胚の特徴のように考えられる。また、本実験の未受精期から胚盤胞期までのウサギの卵と胚がⅠ型およびⅡ型のPGDHを持っているという結果、およびウサギの卵と胚がPGE₂とPGF₂αを含有しているという免疫組織化学的結果⁵⁾とを考え併せると、ウサギの卵と胚は発生初期を通して常にPGを含有しているとともに、その代謝能を持っていることが示唆された。

主要文献：

- 1.新村末雄、石田一夫(1978). 家畜繁殖誌, 24, 16~18.
- 2.新村末雄、岡崎正幸、石田一夫(1987). 日畜会報, 58, 845~849.
- 3.三善隆広、小泉 攻、石田一夫(1984). 家畜繁殖誌, 30, 154~158.
- 4.新村末雄、石田一夫(1979). 家畜繁殖誌, 25, 79~81.
- 5.Nissen,H.M. and Andersen,H. (1968). Histochemie, 14, 189~200.
- 6.Niimura,S. and Ishida,K. (1989). Jpn.J.Anim.Reprod., 35, 222~227.

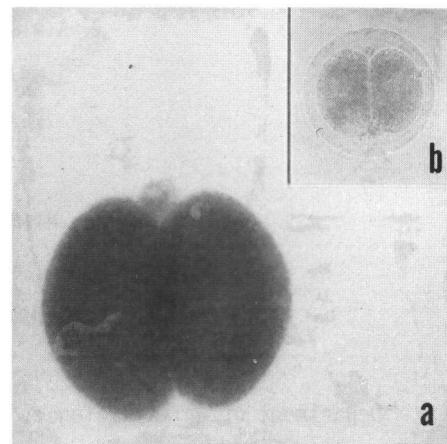


図1 Ⅱ型PGDH検出のための基質液に浸漬したウサギ2細胞胚(a)と対照の胚(b)

図

1

a

b

ウ

サ

ギ

2

細

胞

胚

(a)

と

対

照

の

胚

(b)

哺乳動物胚における割球分化の日時

The time of blastomere differentiation in preimplantation mammalian embryos

四谷伊公子・新村末雄・石田一夫

Ikuko YOTSUTANI, Sueo NIIMURA and Kazuo ISHIDA

新潟大学農学部畜産学科

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Niigata University

目的：初期発生の過程で哺乳動物胚は卵割を繰り返した後胚盤胞に移行するが、採取時期によっては胚盤胞への移行像を示す分割胚を見ることができる。これらの胚では、割球が球形と扁平な細胞に分かれ、内細胞塊細胞と栄養膜細胞にそれぞれ分化を始めている（分化胚）。演者ら¹⁾は最近、哺乳動物では割球分化の開始が（1）8細胞期のもの（ハムスター）、（2）16細胞期のもの（ラット）、（3）8細胞期と16細胞期のもの（マウス）、（4）64細胞期のもの（ウサギ）のあることを報告した。今回は、これらの動物の分化胚の出現割合を排卵後の時間を追って詳細に調べたので報告する。

方法：供試動物としてゴールデンハムスター、ラット（ウイスター系）、マウス（ICR系）およびウサギ（日本白色種）を使用した。いずれの動物においても、観察した胚は8細胞期から胚盤胞期までのもので、ハムスターでは排卵後63～81時間、ラットでは83～113時間、マウスでは56～88時間、ウサギでは31～88時間に卵管または子宮から採取した。採取した一部の胚は直ちに位相差顕微鏡で観察し、残りの胚はグルタルアルデヒドとパラホルムアルデヒドの混液とオスミウム酸で二重固定した後エポキシ樹脂に包埋し、厚切り切片を作製した。この切片にはトルイジン青染色を施した。なお、栄養膜細胞の接合装置を観察するために、一部の包埋試料は超薄切片として電子顕微鏡で観察した。

結果：各動物の排卵後の時間経過に伴う分化胚の出現状況は図1に示す通りである。すなわち、ハムスターでは割球が分化するのは8細胞期で、排卵後64時間に胚全数の40.9%に分化胚が出現した。ラットでは割球の分化は16細胞期で、排卵後89時間に胚全数の6.3%に分化胚が出現し、32細胞期ではすべて分化胚であった。マウスでは割球の分化は8細胞期で、排卵後60時間に胚全数の44.7%に分化胚が出現した。排卵後60～72時間では割球が分化していない16細胞期胚が相当数観察されたが、32細胞期ではすべて分化胚であった。ウサギでは割球の分化は64細胞期で、排卵後58時間に胚全数の38

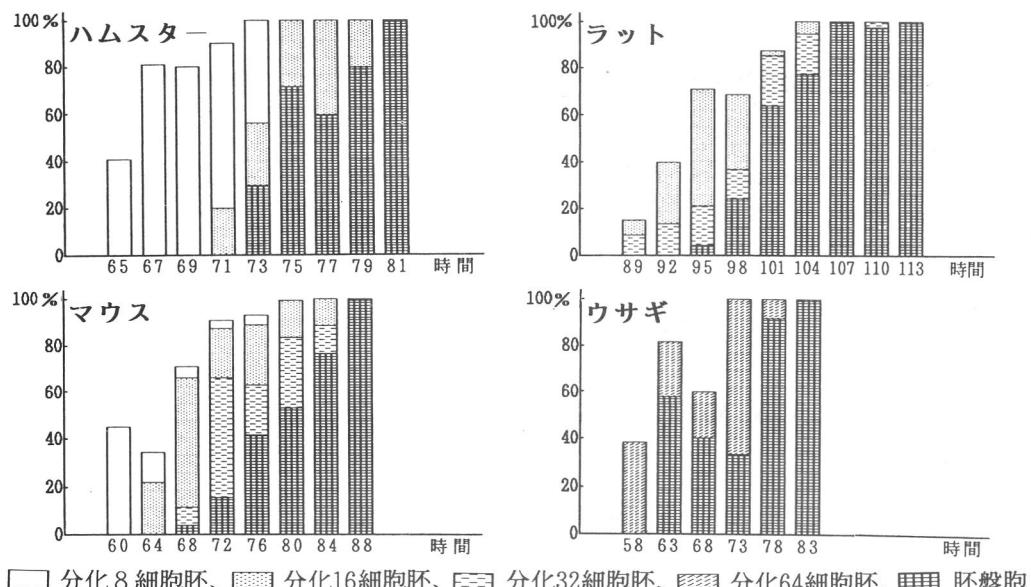


図1 ハムスター、ラット、マウスおよびウサギの分化胚の出現状況

.0%に分化胚が出現した。なお、割球分化の指標となる接合装置の形成は、いずれの動物においても分割胚にはみられず、分化胚になって初めて認められた。

考察：本実験において、ハムスターの分割胚の割球分化の時期は従来の報告²⁾と一致していたが、ウサギではGregoryの結果³⁾と異なっていた。すなわち、彼はウサギでは32細胞期に割球分化が起こると述べているが、本実験では排卵後58時間の64細胞期に初めて観察された。ウサギの胚を電子顕微鏡で観察したところ、割球分化の指標となる栄養膜細胞間における接合装置の形成は32細胞期ではみられず、64細胞期になって初めて観察された。したがって、ウサギの分割胚における割球分化の時期は64細胞期が正しいものと思われる。一方、マウスの分割胚の割球分化の時期は研究者の間で一致しておらず、DucibellaとAnderson⁴⁾は8細胞期であるといつており、Handyside⁵⁾は16細胞期であると述べている。本実験において、マウスの分割胚の割球分化は8細胞期で起こったが、分化していない16細胞期胚も相当数出現していた。しかし、32細胞期ではすべて分化胚であったことから、マウスでは割球分化は一部の胚では8細胞期に始まり、一部の胚では16細胞期に至って初めて始まることが明らかとなった。これらの相違はマウスの系統の違いによるものと推察される。

主要文献

1. 四谷伊公子・新村末雄・石田一夫 (1990). 第83回日本畜産学会大会 (口演).
2. 石田一夫 (1971). 家畜繁殖誌, 17, 25-28.
3. Gregory, P.W. (1930). Contr. Embryol. Carnegie Inst., 21, 141-173.
4. Ducibella, T. and Anderson, E. (1975). Dev. Biol., 47, 45-48.
5. Handyside, A.H. (1981). J. Reprod. Immunol., 2, 339-350.

マウス始原生殖細胞の全能性ならびに 多能性に関する研究 特に集合法による検討

Studies on the totipotency and pluripotency of the mouse primordial germ cells,
with a special reference to aggregation method

加藤容子・角田幸雄
Yoko KATO and Yukio TSUNODA

近畿大学農学部畜産学教室
Laboratory of Animal Reproduction, College of Agriculture,
Kinki University

目的：始原生殖細胞(primitive germ cells, PGCs)は、将来、精子あるいは卵子へと分化できる唯一の未分化な細胞群である。PGCsは、精子あるいは卵子へと分化し受精後全能性(個体へ発生する能力)を獲得するが、未分化の状態で全能性または多能性(キメラを形成する能力)を有するか否かは不明である。Tsunoda ら¹⁾は先に、雄PGCsの核移植を行い、再構築胚は少なくとも体外で胚盤胞まで発生するがレシピエントに移植後産子は得られないことを明らかにした。そこで、今回はPGCsを用いて、集合法による多能性の検討すなわちキメラマウスの作成を試みた。

材料と方法：実験に用いたPGCsは、De Felici and McLaren²⁾に従って、性別および日齢別に生殖隆起よりそれぞれ分離・採取した。すなわち、12.5～16.5日齢のCD-1系アルビノマウスの胎子よりPBS液中で眼科用メスと先の鋭いピンセットを用いて生殖隆起を分離し、ついでEDTA添加培地内に15分間静置したのち、10%FCS添加PBI液中に移し、27ゲージの注射針でつつくことによって、PGCsを浮遊させた。PGCsは、実験に供すまで流動パラフィン下のPBI+10%FCSドロップ中で保存した。供試胚は、過剰排卵F₁雌(C57BL×CBA)にCBA系雄を交配し、hCG投与後 時間目にM2液で採取した8細胞期胚を用いた。集合は、①従来の透明帯除去胚との集合法³⁾と、②PGCsを卵巣腔に注入する方法⁴⁾との2種のやり方で行った。すなわち、①プロナーゼ処理により透明帯を除去した8細胞期胚とPGCsとをPHA添加溶液内で、ピペットや先を丸めたガラス針を用いて接着させた。②あらかじめマイクロマニピュレーターを用いて透明帯の一部をカットした8細胞期胚の卵巣腔に、数個～10個のPGCsを注入した。いずれも操作胚は、M16液で一晩培養後、桑実胚～胚盤胞に発生したものを、妊娠0.5日齢マウスの卵管または2.5あるいは3.5日齢の子宮へそれぞれ移植した。

結果：①透明帯除去8細胞期胚と集合させた307個の胚のうち294個(96%)が桑実胚～胚盤胞に発育した。そのうち269個をレシピエントに移植したところ57匹(21%)の産子が得られたが、PGCs由来の遺伝形質を示す個体はみられなかった。②透明帯カット8細胞期胚との集合の結果、表に示すように96%の胚が発育し、レシピエントに移植したところ142匹の産子が得られた。しかしながら、①と同様に明らかなキメラ個体は得られなかった。

以上の結果より、本実験ではマウス始原生殖細胞の多能性を証明することはできなかったが、今後胚盤胞への注入法あるいは核移植による初期化技術を用いてさらに検討を進めてゆきたい。また、PGCsの細胞内分布やその運命についても検討する必要があると思われる。

- 1) Tsunoda, Y., Tokunaga, T., Imai, H. and Uchida, T. (1989) *Development* 407, 107.
- 2) De Felici, M. and A. McLaren (1983) *Exp. Cell Res.* 144, 417.
- 3) Tarkowski, A. K. (1961) *Nature* 190, 857.
- 4) Tokunaga, T. and Tsunoda, Y. (1990) *Ms. in preparation*

表 マウス始原生殖細胞と透明帯カット 8細胞期胚との集合成績

胎子の性別	胎子の日齢	供試胚数	発育胚数	移植胚数	妊娠雌数／レシピエント数(%)	産子数
雌	12.5	45	44	42	1/ 3 (33)	9
	13.5	120	111	105	5/ 10 (50)	31
	14.5	50	50	48	3/ 4 (75)	18
	15.5	40	39	40	3/ 4 (75)	18
	16.5	36	32	32	1/ 3 (33)	8
雄	12.5	49	46	46	2/ 4 (50)	5
	13.5	80	80	77	5/ 8 (63)	12
	14.5	31	31	30	2/ 3 (67)	5
	15.5	51	50	50	4/ 5 (80)	22
	16.5	31	30	30	2/ 3 (67)	14
合計		533	513(96)	500	28/47 (60)	142(28)

ハムスター卵成熟過程の電気生理学的解析

Electrophysiological study on the maturation of hamster oocytes

藤原敏博・堤 治・綾部琢哉・矢野 哲・三橋直樹・水野正彦・宮崎俊一*

Toshihiro FUJIWARA, Osamu TSUTSUMI, Takuya AYABE, Tetsu YANO,
Naoki MITSUHASHI, Masahiko MIZUNO, Shun-ichi MIYAZAKI*

東京大学医学部産科婦人科学教室, 東京女子医科大学第2生理学教室*

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, University of Tokyo
Department of Physiology, Tokyo Women's Medical School*

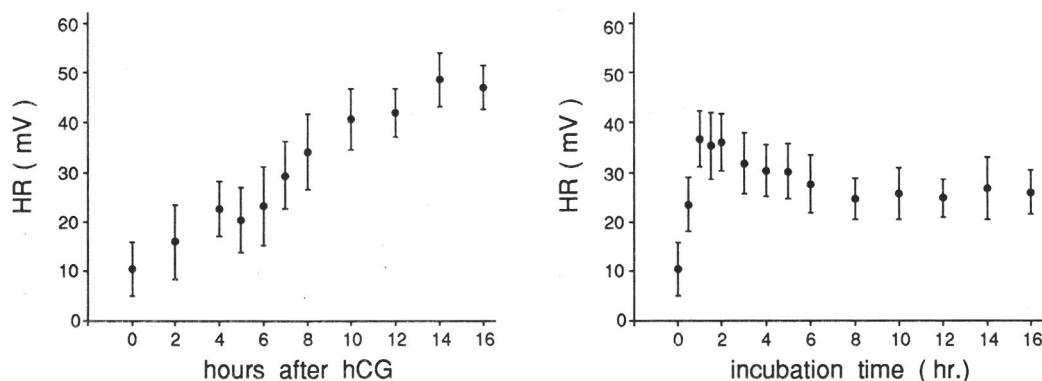
〔目的〕 哺乳類の卵成熟における卵の成熟度の指標としては、卵核胞崩壊 (G V B D) や極体の形成といった形態学的な指標が従来から用いられているが、これらの指標においては定量性に乏しい点と、主として核レベルでの成熟度の把握に止まる点が短所であった。ところで、成熟ハムスター卵では受精に際して細胞内カルシウム (Ca) の周期的増加が起こることが近年明らかにされた¹⁾。このメカニズムとして、受精時に細胞膜に存在する phospholipase C が活性化され、phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate の分解の結果產生される inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) が、二次メッセンジャーとして細胞内 Caストアからの Ca²⁺ の遊離を引き起こすとされている²⁾。成熟度の低い卵では透明帯を除去しても受精が不完全な形でしか起こらないが、この原因として上記のメカニズムの発達が十分でないことが想定される。従って、成熟過程の各々の時期にある卵で上記メカニズムの発達過程を調べることは意義のあることであり、またその発達過程に一定のパターンがあれば、これを卵成熟度の指標とすることが可能であると考えられる。ハムスター卵では細胞内 Ca²⁺ の増加が細胞膜電位の過分極反応 (H R) として電気生理学的に捉えることができるので、今回成熟段階の異なる卵に対して IP₃ の細胞内微量注入を行い、H R の値の変化の解析を試みた。

〔方法〕 成熟雌ゴールデンハムスターより採取した卵を材料として用いた。透明帯を除去した卵にマイクロマニピュレーターを用いてガラス微小電極を 2 本刺入し、一方の電極より IP₃ を一回の電流パルス (5 nA, 1 sec) により細胞内微量注入し、惹起される H R を他方の電極により記録した。実験は、1) PMS-hCG 投与後各時間毎に卵巣または卵管より採

取した卵、2) PMS投与48時間後に卵巣より採卵し、卵丘細胞を除去した後 *in vitro* で培養した自然成熟卵、について行った。

〔結果〕 PMS投与48時間後の未成熟卵のHRは 10.4 ± 5.5 mV (mean \pm SD) であった。実験1)ではhCG投与後の時間の経過に伴いHRは増強し、投与4~6時間後に一時横這いとなり10~12時間後に40 mVを越え、以後最大レベルに達した(図1)。実験2)では培養開始直後よりHRは急激に増強し、1~2時間後に35 mV程度のピークを形成した後低下し、3時間以降培養16時間後まで30~25 mVの範囲を推移した(図2)。

(図1) *in vivo*成熟におけるHRの変化 (図2) *in vitro*成熟におけるHRの変化



〔考察〕 1. 卵成熟と共にIP₃によって誘発されるHRの増強が認められた。即ち、卵成熟に伴いIP₃による細胞内Ca遊離機構が発達することが示され、これが細胞膜・細胞質レベルでの卵成熟の解析に有用な定量性のある指標と成り得ると考えられた。
 2. HR増強パターンが*in vivo*および*in vitro*での成熟様式において異なっており、本指標でみる限りこの2つの卵成熟過程が異なるものである可能性が示唆された。

〔文献〕

- 1) Miyazaki, S., Hashimoto, N., Yoshimoto, Y., Kishimoto, T., Igusa, Y. and Hiramoto, Y. (1986) *Developmental Biology*, 118 : 259-267
- 2) Miyazaki, S. (1988) *J. Cell Biology*, 106 : 345-353

マウス初期胚発生段階における DNA合成の検討

DNA synthetic activity in preimplanted mouse embryos

原田省・谷川正浩・大野原良昌・見尾保幸

HARADA Tasuku, TANIKAWA Masahiro, ONOHARA Yoshimasa, MIO Yasuyuki

鳥取大学医学部産科婦人科学教室

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

〔目的〕 マウス初期胚のDNA合成の指標として [³ H] thymidine の取り込み(incorporation)を測定し、時間経過に伴う取り込みの変化、BSA (ウシ血清アルブミン) 添加の影響、in vivo および in vitro 発育胚の比較検討を試みた。

〔方法〕 B6C3 F₁ 雌マウスに、PMS-hCG で過排卵処理を行い、同系の雄と交配後、hCG 注射から 44(Day 2), 68(Day 3), 90(Day 4) 時間後に、それぞれ、2細胞胚、桑実胚、胚盤胞を採取した。2細胞胚は BWW 培養液中 (BSA 1mg/ml 添加) で 5%CO₂ in Air にて、24~72 時間培養した。2細胞胚は 28~52 時間後に、桑実胚、胚盤胞は採取後直ちに methyl- [³ H] thymidine (50 μCi/ml) を含む BWW 培養液中で 4 時間培養した。 [³ H] の取り込み値は Balling らの方法に準じて 5 個ずつ液体シンチレーションカウンターにて測定した。なお、各測定値はそれぞれ [³ H] 中での培養 0 時間値を差し引いた値を元に算出した。

〔結果〕 2細胞胚から in vitro で培養した胚盤胞を用いた実験で、胚の数(5, 10, 20 個)と [³ H] 中での培養時間(2, 4, 6 時間)により [³ H] の取り込み値がほぼ直線的に増加することを確認した。

in vitro 発育胚では、Day 3, Day 4 と [³ H] の取り込みは増加したが、Day 5 では Day 4 のカウントに比較し半減した (Table. 1)。

in vitro と in vivo の発育胚を比較検討すると、Day 3 で in vitro 胚が in vivo 胚より高値をとったが、Day 4 では in vivo 胚が高値を示した (Table. 1)。

培養液に添加した BSA の影響についてみると、52 時間培養後の後期胚盤胞の発生率に差は認められなかった。同様に、胚盤胞の [³ H] の取り込み値にも差は認められなかった (Table. 2)。

Table.1 [³ H] thymidine incorporation(d.p.m./embryo) in in vitro and in vivo developed mouse embryos

	Day after hCG(hours after hCG)		
	Day 3	Day 4	Day 5
	(68-72)	(92-96)	(116)
in vitro	782±141 (6)	1900±202 (17)	849±191 (9)
in vivo	616±138 (9)	2241±195 (7)	

Number of groups(5 embryos) in parentheses

Table.2 [³ H] thymidine incorporation(d.p.m./embryo) in Day 4 embryos(96 hours after hCG) cultured in BSA supplemented and BSA free medium

No of groups	Counts
BSA +	2021±268
BSA -	1958±252

〔考察〕ヒト体外受精あるいは家畜体外受精技術においても、移植前胚の正常性と発育能に関する客観的評価法が強く望まれている。今回、我々は侵襲的な方法ではあるが、 [³ H] thymidine の取り込みを用いDNA合成を測定することにより、胚発育を評価することを試みた²⁾。

in vitro と in vivo 発育胚を比較検討すると、in vitro での胚発育が、培養時間が長くなるに従い遅延する傾向がみられた。また、in vitroで発育したDay 5 の後期胚盤胞で取り込み値が低下したのは、S期に対しG1期にある胚胞の割合が増加するためと推測された³⁾。

〔主要文献〕

1. Balling R and Beier HM, Toxicology, 34, 309, 1985.
2. Fischer B, J Reprod Fert, 79, 115, 1987.
3. Streefer C et al, Cell Tissue Kinet, 13, 139, 1980.

牛体外受精における屠殺時の血液性状と その発生能について

Serum hormones at slaughter and development of oocytes
matured, fertilized and co-cultured in bovine IVF

高木優二¹・森一樹²・長谷川喜久³・菅原七郎¹・正木淳二¹

Y. Takagi, K. Mori, Y. Hasegawa, S. Sugawara, J. Masaki

- 1) 東北大学 農学部 家畜繁殖学教室
- 2) 雪印乳業 E T 研
- 3) 群馬大学 医学部 産婦人科学教室

- 1) Lab. of Anim. Reprod., Fac. of Agri., Tohoku University
- 2) Embryo Transplantation Lab., Snow Brand Milk Products Co., Ltd.
- 3) Dept. of Gynecol. and Obstet., Fac. of Medicine, Gunma University

【目的】 近年、屠場由来の牛卵巣より採取した卵胞卵子を体外成熟・体外受精・体外発生させた移植胚から産子が得られるようになり実用化段階に入っている。しかし、移植可能胚は卵巣より採取される卵子の10%~25%と依然低く、数多くの卵巣を用いる必要がある。また、牛の過排卵処理において、一般的に個体差が大きいことが認められており、卵巣側の投与ホルモンへの反応性が各個体によって異なるためとされ、体外受精においても個体差の問題を考える必要がある。さらに、体外受精に供試される卵巣は、性周期の異なる雌個体より採取されたものであり、性周期によりその後の胚発生が異なるかどうかについても検討する必要がある。以上、本研究では、個体毎に卵胞卵子を吸引法および細切法により採取し、採卵数およびその後の発生率と、卵巣の形態および屠殺時の血液性状との関係について検討したので報告する。

【方法】 屠場より牛卵巣（黒毛和種）および血液を個体ごとに採取し研究室に持ち帰った。卵巣中の卵胞数（1cm以上）、黄体数、大きさおよび重量を測定後、以下の方法で卵胞卵子を採取した。
①24頭分の卵巣より吸引法により卵巣表面に認められる小卵胞から採取した。②吸引採取した後に卵巣皮質を m-PBS+PVA(1mg/ml)液中でメスを用いて細切して、吸引採取されなかった卵胞より卵子を採取した。採取した卵子は①②別々に洗浄後、成熟培養は25mM HEPES緩衝 TCM-199+10% FCS液で22時間行なった。精子は凍結精液を用い、10mMカフェイン加 BSA欠 B0液で2回洗浄後、精子濃度を調整し（ $3 \times 10^7/ml$ ）イオノフォア処理（ $0.1\mu M$ 60~90秒）を行なった。媒精は、 $50\mu l$ （20mg/ml BSA加 B0液）の受精培地に精子を $50\mu l$ 添加して行なった。媒精後6時間後に発生培地（TCM-199+5%FCS）に卵子を移し換えた。顆粒膜細胞からの遊離は、媒精後72時間に行ない、以後その上で培養を継続し、48時間ごと

に培地のみを交換した（森ら、第82回日畜）。血中各ホルモン（FSH、LH、inhibin、E₂、P₄）濃度はRIA法により測定した。

Table 1 Development of follicular oocytes matured, fertilized and cultured in vitro(n=24).

Methods of collection	No. of oocytes inseminated	No. and % (mean \pm SE) of oocytes developed to:			
		\geq 2-cell	\geq 8-cell	\geq Morula	\geq Blastocyst
Aspirate	427(17.8 \pm 1.9)	300(12.5 \pm 1.9) 58% \pm 7%	184(7.7 \pm 1.4) 35% \pm 5%	137(5.7 \pm 1.0) 26% \pm 3%	90(3.8 \pm 0.7) 17% \pm 3%
Mince	344(14.3 \pm 1.9)	174(7.3 \pm 1.4) 53% \pm 6%	94(3.9 \pm 0.8) 31% \pm 3%	71(3.0 \pm 0.7) 24% \pm 3%	47(2.0 \pm 0.5) 15% \pm 2%
Total	771(32.1 \pm 3.2)	474(19.8 \pm 2.8) 54% \pm 6%	(11.6 \pm 2.0) 32% \pm 4%	(8.7 \pm 1.5) 24% \pm 3%	137(5.7 \pm 1.1) 15% \pm 2%

Table 2 Correlation between development of embryos and hormones level

	Correlation to inhibin		
	Total	Aspirat	Mince
No. of oocytes	-	-	-
\geq 2-cell	-	-	-
\geq 8-cell	* r=.54	* r=.53	-
\geq Morula	* r=.56	* r=.57	* r=.52
\geq Blast	-	-	-
% of 2-cell	-	* r=.53	-
% of 8-cell	-	**r=.65	-
% of Morula	* r=.59	**r=.68	-
% of Blast	* r=.58	* r=.58	-
No. of follicle	-	-	-
No. of CL	-	-	-

CL: corpora luteum * p<0.05 ; ** p<0.01

【結果】表1に吸引法および細切法により採取した卵胞卵子の培養後の発生結果を示した。各採取方法共に供試可能卵子数と各ステージへの発生胚数との間に正の相関が認められた(p<0.001)。しかし、発生率については吸引法のみに相関(p<0.001)が見られ、吸引採取される卵子数が多い卵巣ほど発生率が高くなることが示された。一方、細切法で採取された卵子は、卵巣に関係なく一定の割合で発生することが示された。大卵胞数および黄体数と他の因子との間には全く相関は見られなかった。また、卵巣の大きさと吸引法での

8細胞、桑実胚、胚盤胞への発生胚数および8細胞、胚盤胞への発生率との間で正の相関(p<0.001)が見られた。FSH、LH、E₂、P₄、P₄/E₂、FSH/LH、LH/E₂の血中ホルモン濃度と胚数、発生率およびホルモン間で全く相関は認められなかった。しかし、表2に示した通り、血中 inhibin濃度との間で正の相関が示され、屠殺時の血中 inhibin濃度が高い卵巣ほど胚盤胞への発生率が高い傾向が示された。特に、吸引採取された卵子でその傾向が著しかった。

【考察】吸引法および細切法で採取される卵子とで異なる傾向が示され、吸引法で採取される卵胞卵子は卵巣の質に影響されることが示唆された。また、inhibin濃度との相関より、血中inhibin濃度が高くなる卵胞期後期の個体の小卵胞から卵子を採取した方が、その後の胚発生率が高くなることが示された。

ラット卵子の体外培養 —完全合成培地での発生能—

In vitro culture of rat eggs

-Development of rat eggs in chemical defined media-

松本浩道・高木優二・菅原七郎・正木淳二

Hiromichi MATSUMOTO, Yuhji TAKAGI, Shichiro SUGAWARA, Junji MASAKI

東北大学農学部 家畜繁殖学教室

Lab. of Anim. Reprod., Fac. of Agri., Tohoku University

【目的】 哺乳動物受精卵子の体外培養は幅広く研究され、数多くの成果が得られている。しかし、ラットでは、受精卵子の体外培養において1細胞期から胚盤胞期までの発生成功例は無い。受精卵子の体外培養では、動物種によりそれぞれ特有の発生段階で発生が中止する現象が知られている。ラットでは2-4細胞期ブロックがあり、ブロック解除は大きな課題となっている。そこで本研究では、ラット受精卵子の培養法を確立するための基礎実験として、完全合成培地における1細胞期、8細胞期からの培養法の検討を行った。

【方法】 ラットは本研究室で系統維持されている Wistar 系ラットを用いた。スメアで性周期を確認し発情前期を示した日の 15:00h に交配させ、翌朝の腔栓確認をもって妊娠第一日とした。1細胞期の卵子は妊娠第一日の 6:30-8:00h に卵管膨大部の切開により、8細胞期では妊娠第4日の 11:00-13:00h に卵管灌流により回収した。卵管の灌流、回収卵の洗浄は PBS(+) で行い、発生培地と同じ培養液で3-5回洗浄後、ミネラルオイルをかぶせた0.35mlの培養液中で培養した。培養液はマウス卵子の培養に用いられる TYH、B M O C III、本研究室においてブタ卵子培養用に開発された M II などで検討した。表1に示した培養液は全て血清類を 0.5mg/ml の PVA におきかえた。さらに、各培養液は 1μg/ml Insulin, 10μg/ml Transferrin, 0.29ng/ml Selenius acid、アミノ酸は Eagle's minimal essential media のアミノ酸 (GIBCO 社) をそれぞれ添加して用いた。発生状況は実験開始後 24 時間ごとに観察し、48 時間ごとに培地交換を行った。

【結果】 1細胞期からの培養では2-4細胞期でブロックが起こり、それ以上の発生はみられなかった。しかし表1に示したように、8細胞期からの培養では、ITS + Non essential amino acid の区において培養液間の発生率の差がみられた。そこで最も発生率の良好であった B M O C III を用い、添加するアミノ酸の質を変えてみた。その結果、アミノ酸添加は発生に有用であるが、Non essential amino

acidとEssential amino acidを同時に添加した区の発生率は低かった。

Table 1 Development of rat embryo from 8-cell stage

Culture medium	Growth factor	Amino acid	Total no. of eggs	No. and (%) eggs developed to :				
				≥16-cell	≥morula	≥blastcyst	≥exp. B	≥hatching B
TYH	I, T, S	N	25	22(88.0%)	17(68.0%)	12(48.0%)	3(12.0%)	0(0.0%)
MII	I, T, S	N	26	15(57.7%)	12(46.2%)	7(26.9%)	2(7.7%)	0(0.0%)
BMOCIII	I, T, S	---	18	11(61.1%)	10(55.6%)	9(50.0%)	5(27.8%)	1(5.6%)
BMOCIII	I, T, S	N	29	27(93.1%)	22(81.5%)	21(72.4%)	14(56.0%)	1(3.4%)
BMOCIII	I, T, S	E	27	20(74.1%)	19(70.3%)	18(66.7%)	10(37.0%)	4(14.8%)
BMOCIII	I, T, S	N, E	25	19(76.0%)	11(44.0%)	10(40.0%)	6(24.0%)	3(12.0%)

I : Insulin , T : Transferrin , S : Selenius acid

N : MEM non essential amino acid , E : MEM amino acid solution without L-glutamin

【考察】本実験から、1細胞期とブロック解除後の8細胞期では発生に必要な物質が違うことが分かった。また、8細胞期からではアミノ酸が有用であるが、発生に必要なものは Non essential amino acid に存在していることが示唆された。さらに、Non essential amino acid と Essential amino acid の両方を添加した場合、発生率が低下することから、この発生段階では両者はきっと抗して働くと思われる。しかし、例数をふやし、さらなる検討を加えて発生との関わりを明らかにする必要がある。

【主要文献】

- 1) Yutaka. TOYODA and M. C. CHANG(1974). Fertilization of rat eggs in vitro by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. J. Reprod. Fert. 36, 9-22.
- 2) Kohei WADA, Toshitaka HORIUCHI, Shichiro SUGAWARA and Junji MASAKI. (1981). Culture of rat eggs in vitro. Tohoku Journal of Agricultural Research. 32, 3.
- 3) Toshitaka HORIUCHI, Mariko OHTA, Masaru KOJIMA, Jutaro TAKAHASHI, Shichiro SUGAWARA, Junji MASAKI. (1983). In vitro culture of rat eggs from eight-cell to blastcyst in a modified Dulbecco's medium. 日本不妊学会誌、28, 3.
- 4) X. Zang , J. Rutledge and D. T. Armstrong. (1989). In vitro development of preimplantation rat embryos in chemically defined media. Society for the Study of Reproduction. 338.

近交系マウス未受精卵の超急速凍結保存

Cryopreservation of unfertilized mouse oocytes from inbred strains by ultrarapid freezing.

中瀧直己

Naomi Nakagata

順天堂大学医学部共同病理研究室

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

目的：最近、演者は、高濃度の保存液を用いて超急速的にF1由来マウス未受精卵の凍結保存を試み、良好な成績が得られたことを報告した¹⁾。そこで本実験では同様な超急速凍結法を用いて、BALB/c, C3H/He, C57BL/6 およびDBA/2 の近交系マウス未受精卵の凍結保存を試み、融解後の生存性について検討を行った。

方法：5iu PMSGと5iu HCG により、過排卵処理を施したBALB/c, C3H/He, C57BL/6 およびDBA/2 の雌マウス（10～12週令）の卵管膨大部より、HCG 投与後14-15 時間に採取し、0.1% hyaluronidaseで卵丘細胞を除去した裸化卵子を実験に供した。凍結は、卵子を20% FCS を含むHTF 培地²⁾ 内で10～20分培養後、直接サンプリングチューブ (volume:0.5ml, Sarstedt Co., Ltd) 内の DAP213³⁾ (2M dimethyl sulphoxide, 1M acetamide, 3M propylene glycol in Dulbecco's phosphate buffer saline) に移し (サンプリングチューブ当たり15-25 個) 、5-10秒後に、液体窒素中に浸漬することにより行なった。融解は凍結してから3-5週間後に液体窒素保管器よりサンプリングチューブを取り出し、37℃の温水中で素早く加温と同時に0.3M sucrose (in Dulbecco's phosphate buffer saline) を加えDAP213を希釀、HTF 培地にて洗浄後、卵子の形態学的検索を行なった。続いて形態的に正常と判定された卵子を授精用HTF 培地に移し、ICR 系成熟雄（10～14週令）の精巣上体尾部精子を用いて体外受精を行ない、授精24時間後に2細胞期へ発生した卵子を偽妊娠第1日目の受容雌へ移植することにより新生仔への発生について検討した。

結果：融解時における回収卵に対する形態的正常卵の割合は、BALB/c, C3H/He, C57BL/6 およびDBA/2 でそれぞれ76.8% (129/168), 84.2% (123/146), 90.9% (140/154) および60.2% (112/186) とC57BL/6 で最も高値を示した。表1に、授精24時間後に2細胞期へ発生した卵子の割合を示す。2細胞期への発生率は BALB/c, C3H/He およびC57BL/6 で約70% 以上と良好であったが、DBA/2 ではわずか33.9% にとどまった。2細胞期へ発生した卵子の移植成績を表2に示すが、各系統において移植胚の18.4% - 43.0% が新生仔へ発生した。

Table 1. The rate of 2-cell embryos that developed from frozen-thawed unfertilized mouse oocytes 24 hr after insemination in vitro.

Strain	No. of oocytes examined	No. and (%) of oocytes developed to 2-cell stage
BALB/c	129	102(79.1)
C3H/He	123	87(70.7)
C57BL/6	140	119(83.4)
DBA/2	112	38(33.9)

Table 2. Development to live young of 2-cell embryos derived from frozen-thawed unfertilized mouse oocytes after transfer to pseudopregnant recipients.

Strain	No. of recipients used	No. of 2-cell embryos transferred	No. of animals which delivered live young	No. of live young		
				♀	♂	Total(%)
BALB/c	7	102	7	14	20	34(33.3)
C3H/He	6	87	5	11	16	27(31.0)
C57BL/6	8	114	7	27	22	49(43.0)
DBA/2	3	38	2	5	2	7(18.4)

考察：超急速的に凍結したBALB/c, C3H/He, C57BL/6およびDBA/2の未受精卵は融解後、体外授精により受精可能であり、少なくともその一部は新生仔へ発生することが知られた。しかしながら、系統によっては必ずしも良好な結果が得られず、今後、さらに検討を要するものと思われる。

文献

- 1) Nakagata.N. (1989). High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. J. Reprod. Fert. 87, 479-483.
- 2) Quinn,P.Q., Kerin,J.F., & Warnes,G.M. (1985). Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. Fertil.Steril. 44, 493- 498.
- 3) 中瀬直己(1989) 体外受精由来マウス前核期卵受精卵の超急速凍結保存について
日本不妊学会雑誌. 34, 757-760.

混合耐凍剤によるマウス胚の凍結

Freezing of mouse embryos in cryoprotectant mixture

石森久雄, 宇高健二

Hisao Ishimori, Kenji Utaka

雪印乳業(株)受精卵移植研究所

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

【目的】哺乳動物胚の凍結においては種々の耐凍剤が用いられ、それらの比較検討がなされている^{1, 2)}。胚の解凍後の生存性に関する要因の一つとして凍結時の胚の発育段階が挙げられ^{3, 4, 5)}、発育段階によって適した耐凍剤の種類が異なると報告されている⁵⁾。また耐凍剤は一般に単独で用いられることが多いが、耐凍剤を混合して高い生存率が得られたとの報告がある^{6, 7)}。そこで今回、耐凍剤を混合した場合のマウス8細胞期胚と胚盤胞の解凍後の生存性の比較および混合の有効性について検討した。

【材料と方法】マウス(B6C3F₁ 4~5週令)に過排卵処置を施し、hCG投与64~66時間後に8細胞期胚を、88~90時間後に胚盤胞をD-PBS(GIBCO)+BSA(4mg/ml)(以下PBS)で卵管および子宮を還流し胚を採取した。凍結メディウムにはGlycerol(G)、Ethylene glycol(E)、Propylene glycol(P)、Dimethylsulfoxide(D)の4種類の耐凍剤をPBSにそれぞれ1.4%(v/v)濃度で溶解したものとそれらの凍結メディウムを容積比1:1で混合したもの(6組: G+E, G+P, G+D, E+P, E+D, P+D)を用いた。

胚を室温下一段階で各凍結メディウムに10~15分間平衡後、0.25mlストローに充填し、以下のように凍結した。4°Cから-4.8°Cまで1°C/分で冷却、植水後15分間保持して、-33°Cまで0.3°C/分で冷却後、液体窒素中へ投入した。解凍は37°Cの温水にストローを浸すことにより行った。耐凍剤の除去は胚を0.5モルSucrose加PBS中に5分間、次いでPBS中に5分間浸漬することにより行った。その後胚をM16⁸⁾中で培養し(37°C, 95% air, 5% CO₂, 鮫和湿度)、8細胞期胚は48時間後、胚盤胞は24時間後に拡張胚盤胞に発育した胚を生存胚とした。また対照として非凍結培養胚を用いた。

【結果】8細胞期胚の解凍後の生存率は、耐凍剤を単独あるいは混合して用いた場合、G+E:90%, P+D:82%, G+D:80%, E+P:78%, E+D:77%, E:76%, G:70%, P:69%, G+P:67%, D:55%の順であった。対照は86%であった。D単独だけが対照に比較して拡張胚盤胞への発育率は低かった(P<0.01)。胚盤胞における解凍後の生存率は、E+D:96%, D:89%, P+D:88%, G+D:84%, E:70%, E+P:69%, G+E:62%, P:56%, G+P:51%, G:36%の順であった。対照は89%であった。G+D, E+D, P+DあるいはD単独を用いた場合、対照と比較して拡張胚盤胞への発育率に差は認められなかった。8細胞期胚と胚盤胞で比較するとD単独あるいはE+Dを用いた場合は胚盤胞で高く、G単独あるいはG+Eを用いた場合は8細胞期胚で高かった(P<0.01)。E, P, G+P, G+D, E+Pにおいては差は認められなかった。

Table. Development to expanded blastocysts of mouse 8-cell embryos or blastocysts frozen in cryoprotectant single or mixture

Cryoprotectant	Percentages of development	
	8-cell embryos	blastocysts
Single	G 70 (28/40)	b c * 36 (20/56) f *
	E 76 (28/37)	a b c 70 (33/47) c d
	P 69 (29/42)	b c 56 (29/52) d e
	D 55 (18/33)	c * 89 (48/54) a b *
Mixture	G+E 90 (36/40)	a * 62 (31/50) d e *
	G+P 67 (29/43)	b c 51 (28/55) e f
	G+D 80 (37/46)	a b 84 (43/51) b c
	E+P 78 (32/41)	a b c 69 (35/51) c e
	E+D 77 (33/43)	a b c * 96 (50/52) a *
	P+D 82 (31/38)	a b 88 (50/57) a b
Control	86 (37/43) a b	89 (63/71) a b

G:Glycerol, E:Ethylene glycol, P:Propylene glycol, D:Dimethylsulfoxide

Figures in parentheses represent no. of developed embryos/no. of thawed & cultured embryos. Values with different superscripts are significantly different in the same column. (P<0.05)
*:significantly different in the same row. (P<0.01)

【考察】今回の実験結果より、マウス8細胞期胚の凍結にはD以外のG, E, Pの単独あるいは6組の混合が適していることが示された。また胚盤胞ではE+D, P+D, G+Dに有効性が認められたが、これら3組の混合はD単独を超えるものではなかった。8細胞期胚と胚盤胞で比較するとD単独あるいはE+Dを用いた場合は胚盤胞で高く、G単独あるいはG+Eを用いた場合は8細胞期胚で高くなり、発育段階による解凍後の生存性の違いが認められた。しかしG+D, P+Dを用いた場合8細胞期胚と胚盤胞の間、および対照と比較して生存率に差は認められなかったことから、8細胞期胚と胚盤胞の解凍後の生存性の違い^{4, 5)}は、それらの組合せにより、改善できることが示された。またE+Dも8細胞期胚と胚盤胞において対照との差は認められず、G+D, P+D, E+Dの3組が8細胞期胚と胚盤胞の両発育段階の凍結に適しているものと思われた。

Takeda & Elsden⁶⁾はマウス胚盤胞の凍結において1.5あるいは2モル濃度のD単独あるいは1.25モル濃度のG+Dの混合が最も効果的であったと報告している。今回の実験でもD単独あるいはG+Dが胚盤胞に有効であることが示され、彼らの結果とほぼ一致した。さらに今回E+Dでも高い生存率が得られたのは、解凍後の耐凍剤の除去にsucroseを用いたことによるものと推察されたが、耐凍剤を混合して用いた場合の耐凍剤の除去については今後検討が必要と思われた。

【文献】1)Kasai M, Niwa K & Iritani A(1981)J. Reprod. Fert., 63, 175-180. 2) 内海恭三(1984)日畜会報, 55, 523-534. 3) 宮本 元, 石橋武彦(1984)哺乳動物卵子研究会誌, 1, 95-98. 4) Massip A, Van Der Zwalm P & Leroy F(1984) Cryobiology, 21, 574. 5) 浦野浩司、高橋芳幸、金川弘司(1986)家畜繁殖誌, 32, 130-133. 6) Takeda T & Elsden RP(1982) Theriogenology, 17, 109(abstr.). 7) Hernandez-Ledezma JJ, Selgrath JP & Wright Jr. RW(1988) Theriogenology, 29, 259(abstr.). 8) Whittingham DG(1971) J. Reprod. Fert., 14, 7-21.

マウス裸化卵子の体外受精におよぼす

カルシウムの効果について

Effect of elevated calcium concentration
on fertilization of cumulus free mouse eggs in vitro

板垣 佳明・豊田 裕*

Yoshikaki ITAGAKI, Yutaka TOYODA*

伊藤ハム中央研究所、*東京大学医科学研究所 獣医学研究部

Central Research Institute, Itoham Foods Inc., *Department of Animal Pathology,
Institute of Medical Science, University of Tokyo

目的：マウス卵子の体外受精に影響をおよぼす要因について数多く報告されているが、これらの報告は排卵後の卵丘細胞に囲まれた卵子（以下、排卵卵子）での成績がほとんどであり、卵丘細胞を除いた裸化卵子についての知見は少ない。裸化卵子の体外受精では排卵卵子と同一条件下でも受精率は変動し、至適条件、言い換えれば卵丘細胞の受精に対する役割についても明らかでない¹⁾。一方、受精成立に必要な要因のうち、Ca²⁺は受精に関連したあらゆる局面で重要な役割を果たしており、排卵卵子では1.7 mMのCa²⁺濃度で安定した高い受精率が得られている²⁾。本研究では裸化卵子の体外受精における至適条件を検討する目的で受精用培地のCa²⁺濃度を高めたところ、裸化卵子の体外受精成績に改善がみられ（実験Ⅰ）、さらにCa²⁺濃度と精子前培養時間の関係について検討を加えた（実験Ⅱ）ので報告する。

方法：実験には雌雄ともICR系マウスを用いた。培地は精子前培養にはTYH、体外受精にはTYH (1.71 mM) およびTYHのCaCl₂濃度を2倍(3.42 mM)あるいは3倍(5.13 mM)に高めた培地を用いた。培養はすべて37°C、5%CO₂の条件下で行った。卵子はPMSGおよびhCG各5 IUを48時間間隔で腹腔内投与した雌の卵管膨大部よりhCG投与後15.5-16時間に採取した。卵丘細胞に囲まれた卵子は、150単位/mlヒアルロニダーゼを含むTYHで卵丘細胞を除去し、TYHに移し換えて洗浄後CaCl₂濃度の異なる200 μlの受精用培地に導入した。精子は精巣上体尾部より採取し、400 μlのTYH内で前培養した。受精は実験Ⅰでは精子前培養開始後80-105分の範囲内で行ったが、実験Ⅱでは精子前培養開始後90-180分にかけて30分間隔で同一前培養精子を用いて行った。裸化卵子を含む受精用培地への精子添加液量は5 μlとし、精子濃度の範囲は200~350/μlであった。実験Ⅰでは精子添加後6時間以降にホールマウント標本を作成し雌雄前核の形成がみられた卵子を、実験Ⅱでは精子添加後24時間で2細胞期へ発生した卵子をそれぞれ受精卵とした。

結果：（実験Ⅰ）TYH(1..71mM)で前培養した精子を、同じCaCl₂濃度の裸化卵子を含む培地へ添加した区では56.5%が受精したのに対し、同一前培養精子を用いて3.42mM CaCl₂を含む培地で受精させた区では84.2%が受精した($p < 0.001$; χ^2 -検定)。一方、5.13mM CaCl₂を含む培地で受精させた区では40.0%と低くなり、4回の実験における実験間の変動も最も大きかった。なお、多精子侵入卵は、3.42mMの2/64にみられたのみであった。

（実験Ⅱ）実験Ⅰと同じくTYHで精子を前培養し、前培養時間を見て、各濃度の受精用培地へ導入したところ、1.71mMでは90、120、150分で受精率はそれぞれ32.3、43.3および53.5%であり、前培養時間の経過とともに受精率は上昇したが、180分では56.4%と頭打ち状態であった。一方、3.42mMでは90分で40.0%であったのに対し、120分で66.2%、150分で76.1%と受精率は上昇したが、180分では65.5%と低下した。5.13mMではいずれの精子前培養時間においても受精率は50%以下であり、180分ではもっとも低く32.7%であった。

考察：マウス卵子の体外受精では、高いCa²⁺濃度(5.13mM≤)は受精に抑制的に働くことが示されているが³⁾、ラット卵子では逆に3.42mMまで高めることにより受精率が向上することが報告されている⁴⁾。これらの相違の一部は種差あるいは培養条件によるものと考えられるが、明確な原因は明かでない。本実験では従来の報告とは異なり、裸化卵子を用いていることや精子前培養には1.71mMのCa²⁺濃度を用いていることなど単純な比較はできないが、受精の場のCa²⁺の至適濃度は3.4mM附近にあるように思われる。排卵卵子の場合、精子の受精能獲得および先体反応にはそれぞれ90μMおよび900μM以上のCa²⁺が必要であることが知られている⁵⁾。しかし裸化卵子では最終段階で先体反応を引き起こすのに十分な卵子近傍の微小環境でのCa²⁺が不足している可能性も考えられる。あるいはCa²⁺と協同して作用する卵丘細胞中の因子が失われたためにより高いCa²⁺を必要とするのかも知れない。また、本実験では精子前培養に伴い受精率が変動したことや、高濃度(5.13mM)あるいは長い前培養時間(180分)で受精率が低下したことから、受精能獲得の過程における精子のCa²⁺に対する感受性の変化についてもさらに検討が必要であると考えられる。

文献

- 1) 板垣佳明、東 貞宏、Abdullah, R. B., 豊田 裕 1989; 哺乳卵研誌 6:59-60
- 2) 豊田 裕、横山峯介、星冬四郎 1971; 家畜繁殖誌 16:147-151
- 3) Miyamoto, H. and Ishibashi, T. 1975; J. Reprod. Fert. 45:523-526
- 4) Davis, B. K. 1978; Proc. Soc. exp. Biol. Med. 157:54-56
- 5) Fraser, L. R. 1987; J. Reprod. Fert. 81:77-89

Table 1 Effect of calcium concentration on fertilization of cumulus free mouse eggs in vitro

Concentration of calcium (mM)	No. of eggs examined	No. of eggs fertilized	(Range of % eggs fertilized)
1.71	69	39	(40.0 - 81.8)
3.42	76	64	(75.0 - 90.5)
5.13	60	24	(0 - 81.3)

体外受精・受精卵移植を用いたマウスの クリーニング（病原微生物の除去）

Rederivation of mice by means of in vitro
fertilization and embryo transfer

鈴木宏志・森口佳之・萬 啓悟・渡辺利彦・名倉政雄・龍味哲夫

Hiroshi SUZUKI.Yoshiyuki MORIGUCHI.Keigo YOROZU.Toshihiko WATANABE.

Masao NAKURA and Tetsuo TATSUMI

中外製薬 開発研究所

Drug Development Laboratories, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.

目的：Specific Pathogen Free (SPF)環境下に新規の系統を導入する場合、対象系統の雌マウスの分娩直前に帝王切開を施し、SPF マウスへ里仔哺育を行うことによって病原微生物を除去するのが一般的である。しかしながら、垂直感染を引き起こすような病原微生物では、胎仔期に感染が成立するために、帝王切開一里仔法は万全とは云えない。また、体外受精および胚の凍結保存等を用いた動物生産が実用化されるにあたり、配偶子ならびに得られた産仔の微生物学的清浄性の確保は、重要な課題であると思われる。本実験では、体外受精・受精卵移植系を用いたマウスのクリーニングの実用性を検証した。

方法：供試動物は、C57BL/KsJ(バスツレラ陽性) 雄3例、雌7例およびKK-A^Y (バスツレラおよびMHV 陽性) 雄4例であった。検疫用隔離動物室（以下、検疫室）内に収容した雌マウス (KK-A^Y) の卵子提供雌は、SPF のKKマウスであった。）に、PMSGおよびhCG 各5 i.u.の過排卵処理を施し、hCG 投与後16時間目に安全キャビネット内でと殺、開腹して雌性生殖器を摘出した。次いで、生殖器をあらかじめ37°Cに温めておいた0.3%の塩化ベンザルコニウム液（オスバン）に数十秒間浸漬し、さらに生理食塩液で洗浄した。洗浄後は卵管のみを切りだし、流動パラフィンで覆われたTYH 培地を含むプラスチックシャーレ内に投入した。卵子の採取は、解剖針を用いて卵管膨大部を引き裂き、卵丘細胞に包まれた卵子をTYH 内に導入することによって行った。精子については、雌性生殖器の場合と同様に消毒、洗浄した雄性生殖器の精巣上体尾部から採取し、ただちにTYH に懸濁した。次いで、2時間のブレインキュベート後、数μl の精子懸濁液を卵子を含む培地に添加することにより、体外受精を行

った。精子添加後6時間に、受精卵子を100 μM のEDTA添加Whitten's 培地に移し換え、精子添加後24時間に2細胞期胚を腔栓確認日のICR系受容雌の卵管に移植した。尚、移植操作はバリアー環境下の初期胚操作実験室で行い、他の操作はすべて検疫室内で行った。細菌検査は、咽喉頭滲出液、精子懸濁液、無菌的に粉碎した精巣上体尾部、受精用培地および卵子洗浄液をTSA 培地に塗布後、37°C、48時間培養して行った。また、受容雌および生後8週齢に達した産仔の咽喉頭滲出液についても、同様に菌分離を実施するとともに、血清抗体検査を行った。各サンプルの血清抗体検査は、以下に述べるCF（補体結合反応）法および凝集法によって行った。すなわち、0.5ml のサンプルをSPF のC57BL/KsJ-db m 系マウスの腹腔内に接種し、4週間後にエーテル麻酔下で下行大静脈より採血し、血清を分離した。また、病原微生物除去対象動物、受容雌および産仔についても同様に採血し、それらの血清をPBS で5倍希釈し、その25 μl に抗原(25 μl)と補体（正常モルモット血清：50 μl ）を加え、4°C で一晩静置した。次いで、ヒツジ感作赤血球(50 μl)を加え、37°C、2時間培養後に赤血球の溶解度によって抗体の有無を判定した。尚、抗原にはMHV の他、マイコプラズマ、ティザー菌およびHVJ を用いた。また、ネズミコリネ菌および気管支敗血症菌の抗体検査は、血清に抗原を添加して4°C、一晩静置後、凝集膜の有無により抗体の存在を判定する凝集試験によって行った。

成績：C57BL/KsJ およびKK-A Y の体外受精率は、それぞれ、38.2%(97/254) および62.3%(778/1249) であった。また、移植成績は、C57BL/KsJ で13.6%(12/88)、KK-A Y で15.6%(87/558) であった。微生物検査の結果では、病原微生物除去対象動物の血清および咽喉頭滲出液を除く、いずれのサンプルからも病原性微生物は検出されず、体外受精・受精卵移植系が、SPF 動物作出に有効な方法であることが確認された。今回対象としたパストレラについては、感染マウスの子宮から摘出飼育された産仔において、かなり高率に菌の存在が認められた例が報告されており、また、MHV については雌性生殖道内に存在することが報告されている。本実験に用いたTVH およびWhitten's 培地には、いずれもペニシリンおよびストレプトマイシンが加えられており、卵子あるいは精子の表面が細菌に汚染されていたとしても、これらの抗生物質によって殺菌された可能性も考えられる。だが、精巣上体尾部の検査成績では、雄性生殖器への感染の可能性は薄いと思われた。一方、透明帯に付着するある種のウイルスに対しては、短時間のトリプシン処理がウイルスの不活化、除去に有効との報告もある。体外受精・受精卵移植系では、卵（胚）を取り囲む透明帯あるいは卵細胞膜を病原性微生物が通過しない限り、感染を受ける可能性は少ないと思われる。したがって今後は、卵子（胚）の存在する培地内に、細菌あるいはウイルスを接種し、感染の成立の有無を確認することや、これに洗浄操作を加えることにより清浄化することが可能か否かを詳細に検証する必要があると考える。

精子ベクター法による
トランスジェニックアニマル作出の試み

Attempt to Produce Transgenic Animals
by Sperm-mediated DNA Transfer

保地 真一、二宮 隆、本間 美保、結城 悅

Shin-ichi HOCHI, Takashi NINOMIYA, Miho HONMA and Atsushi YUKI

雪印乳業株式会社生物科学研究所

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

目的：トランスジェニックアニマルの作出方法としては、外来DNAを1細胞期受精卵の雄性前核に顕微注入するマイクロインジェクション法がもっとも広く用いられている。一方、外来DNA導入のための他のシステムも開発されている。Lavitranoら(1989)は精子をDNAのベクターとした比較的簡単な方法を用いてトランスジェニックマウスを得ることに成功した。その後多くの研究者がこの方法の追試を行ったが、その再現性は確認されていない(Brinstor, 1989)。本研究では、精子をベクターとして導入した外来DNAの受精卵および産仔における存在を調べた。マウスにおいては、外来DNAが少なくとも拡大胚盤胞期まで受精卵内に存在したが、トランスジェニックマウスは得られなかった。しかし、この方法により1匹のトランスジェニックラットが得られたので、これらの結果について言及する。

材料および方法：導入するDNAにはpSV2-gpt(4.6kbp)を用いた。B6C3F₁マウスの精巣上体尾部精子をFM培地において $1-2 \times 10^6$ cells/mlで2時間前培養し、最後の30分間その精子に1、5、25 μ g/mlの濃度でDNAを添加した。B6C3F₁マウスの卵管膨大部から採取した成熟未受精卵を上記の培地中に加え、5時間媒精させた。そして卵子を洗浄後B16培地において2細胞期に発育した胚をICR系の偽妊娠雌に移植し、産仔を得た。また1 μ g/mlの濃度のDNAで処理した精子を用いて受精させた後、B16培地中で体外培養して、2、4～8細胞期、桑実胚～胚盤胞期、拡大胚盤胞期胚を得た。一方ラットでは、Wistarラットの精巣上体尾部精子をTC培地において $3-10 \times 10^5$ cells/mlで4時間前培養し、最後の30分間その精子に1 μ g/mlの濃度のDNAを添加した。Wistarラットの卵管膨大部から採取した成熟未受精卵を上記の培地中に加え、4時間媒精させた。そして卵子の洗浄後、TC培地において2細胞期に発育した胚をWistar系の偽妊娠ラットに移植し、産仔を得た。マウス受精卵、新生仔マウス、および新生仔ラットにおける外来DNAの検定にはPCR法を用いた(Ninomiya et al., 1989)。得られたトランスジェニックラットについては、Southern blot hybridizationにより染色

体への組み込み、および導入コピー数を調べた。

結果：マウスにおいてDNA処理精子での受精率を卵子の2細胞期への発育で評価したとき、DNA濃度の増加につれて受精率が低下することが認められた。これらの胚を偽妊娠マウスに移植して計130匹の新生仔マウスが得られた。これらのマウスにおける外来DNAの存在をPCR法により検定した結果、すべてのマウスにおいてトランジェニックな例は得られなかった (Table 1)。しかし、DNA処理精子で受精させ、体外培養により発生させた胚には、少なくとも拡大胚盤胞期まで外来DNAが存在することが認められた。一方ラットにおいては、1 μg/ml のDNA

で処理された精子を用いた体外受

精により46%の卵子が受精し、偽

妊娠雌への移植により計126匹の

産仔が得られた。このうち1例が

PCR法による検定により、トラン

ジェニックラットであること

が明らかになった (Table 1)。So

uthern blot hybridization によ

り、Multi-copiesのDNAがこの

ラットの染色体に組み込まれてい

た。しかし、このラットは導入さ

れたpSV2-gptのpSV2 regionに一

部または全部の欠失が認められた。

Table 1. Production of transgenic animals
by sperm-mediated DNA transfer.

Animals	DNA conc. (μg/ml)	No. of eggs transferred	No. of youngs	
			Born	Transgenic
Mouse	1	163	69	0
	5	105	40	0
	25	35	21	0
<u>Total</u>			303	130(100%)
Rat	1	590	126(100%)	1(0.8%)

部または全部の欠失が認められた。

考察：哺乳動物ではこれまでにマウス、ウサギ、ウシの精子が外来DNAを卵子内に持ち込むことが報告されているが、本研究において我々はマウスで少なくとも拡大胚盤胞期までの受精卵に外来DNAが残っていることを示した。しかし、これらの卵子から発育した産仔にトランジェニックマウスは見られなかった。精子により外来DNAが卵子内に持ち込まれたとしても、それらのDNAはうまくマウス染色体に取り込まれないのかもしれない。この精子ベクター法をラットに適用したところ、1匹のトランジェニックラットが得られた。トランジェニックラットの作出のマイクロインジェクション法による成功はすでに報告したが、精子ベクター法では Lavitranoらのグループ以外の初めての追試成功例で、また同法により作出された初めてのトランジェニックラットである。このトランジェニックラットは導入DNAの一部に欠失が認められたが、このような現象が精子ベクター法により作出されたトランジェニックアニマルに起こり易いことかどうかについてはさらに多くのサンプルが必要と思われる。

主要文献：(1) Lavitrano, M. et al., Cell 57, 717-723. (2) Brinster, R. L., Cell 59, 239-241. (3) Ni nomiya et al., Mol. Reprod. Dev. 1, 242-248.

新しい partial zona dissection 法

New method of partial zona dissection

斎藤英和、佐藤文彦、沼崎政良、椎名有二、小池数与

斎藤隆和、広井正彦

Hidekazu Saito, Fumihiko Sato, Masayoshi Numazaki, Yuuji

Shiina, Kazutomo Koike, Takakazu Saito, Masahiko Hiroi

山形大学医学部産科婦人科学教室

Dept. OB&GYN, Yamagata Univ. Sch. of Med.

目的：体外受精・胚移植は不妊症の種々な原因に応用されている。しかし男性不妊症においては、軽度、中等度の障害であれば、かなりのよい成績を示しているが、重症の男性不妊症においては、体外受精がいかに少ない容積を受精の場所としていても受精率は極端に低い。これに対して顕微受精という弱い精子の受精を助ける方法が開発され、それには、Partial zona dissection, zona drilling, 卵胞腔内精子注入法、卵細胞室内精子注入法などの方法が含まれている。しかしこれらの方法では、micromanupulatorという高価な道具を必要としており容易に入取できるとはかぎらない。そこで我々は、micromanupulatorを使用せずに partial zona dissectionが可能かどうか検討した。

方法：体外受精・胚移植を以前に1回以上施行し、成熟卵が2個以上採取されるも受精を認めなかった症例例を対象とした。卵胞発育刺激法はブセレリン $1200\text{ }\mu\text{g}$ を月経第1日目より第7日目まで使用し、ヒト閉経期性腺刺激ホルモン（h MG）を150単位、月経第3日目より連日投与した。2方向の平均卵胞直径が18mmを越えた卵胞が2個以上認めた時点でh MGを中止し、最終h MGより30から36時間後にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（h CG）10,000単位を投与し、h CGより31から35時間後に採卵した。採卵した卵は約2時間の前培養後、ヒアルロニダーゼ（ $1\text{ mg}/\text{ml}$ ）と機械的に処理し卵を取り囲む顕粒膜細胞を除去した。次に0.2モルショ糖を含むHTF培養液に卵を移し、この培養液中で実体顕微鏡下に新しいpartial zona dissection法を施行した。新しい方法は26ゲージの使い捨て可能な針の付いたツベルクリンシリンジを2本使用した。この2本の針を用いて縮少した卵細胞質に傷を加えないように透明帯に裂け目を形成した。精子の洗滌は、精液 1 ml に対しHTF培養液 10 ml を加え攪拌後遠心し、上清を除去後再度培養液を加え遠心洗滌した。培精には最大10万運動精子/ ml を目標としたが、これに到達する症例は少なかった。培精後16時間後に卵の状態を観察し、前核の有無にて受精の有無を判定した。

結果：11人の症例28個の卵に対して新しい方法を試みた。このうち24個(86%)が処理後完全な卵であった。これらの卵に対して精子濃度3万から2億6千万/ ml 、運動率2から66%の精子を培精した。16時間後に卵を観察し前核の存在を確認すると7個(29%)に前核を認めたが、このうち正常な2前核は4個(16%)であった。

Result of a New Partial Zona Dissection

Patient	No. of treated Ova	No. of intact Ova	Semen Concentration ($\times 10^6$)	Motility (%)	No. of fertilized Ova
1. R. Y.	3	3	0.5	40	1
2. J. M.	3	3	3.5	14	2
3. K. K.	2	1	0.03	66	0
4. M. H.	3	3	3.4	3	2
5. H. E.	3	2	14	3	0
6. R. O.	3	3	57	9	1
7. E. K.	1	1	260	38	0
8. S. K.	1	1	0.3	36	0
9. M. K.	3	3	58	13	0
10. N. N.	2	1	33	2	0
11. S. M.	4	3	0.9	44	1
Total	28	24 (86%)			7 (29%)

考察：体外受精は男性因子の治療法としてかなりの成績を治めているが、重度の男性因子に対してはその成績も低値を示していた。これに対して、卵への受精の道のりをより通過しやすいように種々な方法が開発された。しかしこれらの方法はmicronanupulator を用いなければならず高値な方法であった。我々の考案した新しいpartial zona dissection法は26ゲージのデスボーザルツベルクリンシリンジを用いるという安価な方法でありかつまたこの処理方法によって86%の卵が完全無傷であることにより信頼できる方法であると考える。また、この方法の受精率が29%、かつ正常の受精が16%であることは、他のpartial zona dissection法の報告よりは低い値を示してはいるが、彼らの用いた精子は通常の培精法でも低値ながらも受精するような精子を用いている可能性もある。我々はこの方法の際に通常の培精法も試みたが、我々の症例では1個の卵も受精を認めなかった。のことより、この新しい方法は、通常の培精法では受精する能力のない精子でも受精の道を開いた方法と考えられる。またこの方法は針による処理時間が2分ぐらいと比較的短時間に処理でき有用な方法と考えられる。以上より新しいpartial zona dissectionは安価、容易な方法であり、かつ十分受精を速進する方法であると考えられた。

主要文献

1. Lanzendorf SE et al; Fertil Steril 49:835, 1988
2. Malter HE et al; Fertil Steril 51:139, 1989
3. Ng SC et al; Fertil Steril 52:73, 1989
4. Bongso TA et al; Human Reprod 4:175, 1989
5. Lassalle B et al: Gamete Res 16:69, 1987
6. King AL et al: Fertil Steril 48:637, 1987
7. Gordon JW et al: Fertil Steril 50:68, 1988

囲卵腔内精子注入によるヒト卵子の受精

Fertilization of Human Oocytes by Subzonal Insertion of Spermatozoa

松井素子・木村麻美・淡路英雄・小林善宗・本田育子

中村加代子・井上正人・藤井明和

Motoko MATSUI, Asami KIMURA, Hideo AWAJI,
Yoshimune KOBAYASHI, Ikuko HONDA, Kayoko
NAKAMURA, Masato INOUE, Akikazu FUJII

東海大学医学部産婦人科学教室

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

目的：男性不妊の予後は IVF や GIFT をもってしても不良である。男性不妊では、その多くが精子の機能障害を合併しているためである¹。最近、男性不妊に対する新たな治療法として顕微操作 micromanipulation が注目されている¹。なかでも囲卵腔内精子注入は、安全性が高く、しかも注入する精子数を自由にコントロールできるという利点がある。また透明帯開孔術の適応とならない、運動性のない精子 (immotile cilia syndrome) でも、囲卵腔内に注入すれば十分受精は可能といわれている²。今回、われわれは IVF で受精しなかったヒト卵子を用いて囲卵腔内精子注入 subzonal insertion (SI) の有効性について検討した。

方法：ヒト卵子は通常の 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 18 mm 程度、血中 estradiol 300 pg/ml/卵胞 ($\geq 15\text{mm}$) 以上になった時点で HMG を中止し、約 32 時間後に HCG 10,000 IU を筋注した。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 時間の前培養ののち、swim up 法で回収した運動精子 (5～10 $\times 10^4/\text{ml}$) を加えてさらに培養した (37°C, 5 % CO₂, 95 % air)。精子の受精能力はあらかじめ、Ca ionophore A23187 を用いた zona-free hamster egg sperm penetration test (ZSPT) にて検査し、penetration rate $> 30\%$ を IVF-ET の適応とした¹。培養液は HTF に 7.5 % 非働化臍帯血血清を加えたものを使用した。受精の有無は媒精後約 18 時間で雌雄前核の存在により判定した。非受精卵は小さな pipette 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。

卵子はまず囲卵腔を広くするため 0.5 M sucrose を加えた PBS で 15 分間処理してから、培養液に移し、顕微操作を行った。

micromanipulator (ナリシゲ) を用いて、倒立顕微鏡 (オリンパス、IMT-2) 下に卵子を microholder で固

定した。ついで insemination mixture 中の夫の精子を数個、 micropipette の中に吸引した。透明帯開孔術の要領で micropipette を斜めに卵胞腔内に刺入し、精子を注入した。術後の卵子はただちに培養液に移し、18~24時間培養した。

結果：75個の卵子中63個（84%）が生存し、うち29個（46%）が受精した（表1）。多精子受精は14個（48.3%）に認められた。注入精子数は平均2.8個（1~10）で、受精卵のそれは4.1個であった。

表1
卵胞腔内精子注入の成績

卵子数	75
生存卵子	63 (84.0%)
受精卵	29 (46.0%)
多精子受精卵	14 (48.3%)
注入精子数	2.8 (1~10)

透過型電子顕微鏡による観察では、受精卵の細胞質内に精子尾部を確認し、卵胞腔内には精子頭部が認められた。

考察：IVF, GIFTの開発により、女性不妊の治療は大幅に進歩した。これに対して男性不妊の予後は相変らず不良である。適切な治療法がないといったのが実情である。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。¹

精子の機能検査法としてはZSPTがもっとも有効である。われわれの分析では、乏精子症の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%）が認められた。¹ ZSPTが正常(>70%)であれば、乏精子症であっても、予後は正常男子の場合と変わらない。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。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。IVFを行っても受精する確率はきわめて低く、GIFTの成績も不良である。一方、ZSPTが正常であっても、精子の運動性不良のためIVFで受精しないケースが少なからず認められる。このような症例に対しては、SIがもっとも合理的な治療法と思われる。精子の運動性が必要なのは、透明帯の貫通に対してであり、SIではこの点はあまり問題にならない。先天的に運動性のない精子でも、SIにより受精が起こることが確認されている。² SIでもっとも重要なことは精子が生体反応を起こしているかどうかという点である。SIは乏精子症に対しても有効である。Ngら(1988)³は乏精子症にSIを適用し、妊娠に成功したとすでに報告している。SIは男性不妊だけでなく、透明帯異常による受精障害や原因不明の受精障害にとても魅力的な方法である。IVFでは強力な過排卵処理を行うためか、原因不明の受精障害が決して少なくない。今回のわれわれの成績からも明らかのように、SIはIVFにおける非受精卵の取扱いにも十分活用できるのではないかと思われる。顕微操作の中では、SIはもっとも完成度の高い方法である。卵子内精子注入のように卵実質を損傷する心配はほとんどなく、しかも注入する精子数を自由にコントロールできるという、透明帯開孔術にはない大きな利点がある。問題は精子の人為的選択が介入することである。SIは今後、透明帯開孔術と共に男性不妊や透明帯の異常による受精障害の治療に広く用いられるようになるものと思われる。

- 文献：
1. 井上正人、他(1989). 配偶子操作による不妊症の診断、治療. 臨産婦, 43: 825
 2. Bongso, T. A., et. al. (1989). Human fertilization by micro-injection of immotile spermatozoa. Human Reprod., 4: 175
 3. Ng, S. C., et. al. (1988). Pregnancy after transfer of sperm under zona. Lancet. 1: 790

体外受精－胚移植（1988－1989）

Results of IVF-ET (1988-1989)

小林善宗・本田育子・津田朋男・中村加代子・

松山毅彦・淡路英雄・井上正人・藤井明和

Yoshimune KOBAYASHI, Ikuko HONDA, Tomoo TSUDA,

Kayoko NAKAMURA, Takehiko MATSUYAMA, Hideo AWAJI,

Masato INOUE, Akikazu FUJII

東海大学医学部産婦人科学教室

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

目的：最近の体外受精－胚移植(IVF-ET)の技術的な進歩にはめざましいものがある。その1つは超音波を用いた経腔採卵法の開発であり、外来ベースのIVF-ETが可能となった。もう1つは過排卵法としてのGnRHagonistの併用であり、pre-mature LH surgeの心配はなくなり、卵胞発育のmonitoringが大幅に簡素化された。今回、これらの技術を用いた当科における過去2年間のIVF-ETの成績を検討した。

方法：当科における1988-1989年のIVF-ETを対象とした。1988年6月からは外来ベースのIVF-ETにきりかえ¹⁾、1988年9月からは主にGnRHagonist併用過排卵法を用いた²⁾。IVFの方法は従来どおりである。

結果：年度別の対象の年令・不妊期間には差がなかった（表1）が、妊娠率は1989年度に向上し、臨床的妊娠数は104で、対移植妊娠率は32.6%に達した（表2）。過排卵法別ではGnRH-a-HMG-hCGが大半を占めるもののclomiphene-HMG-

IVF-ETの成績

	1988年度	1989年度
(1) 対象		
患者数(ET周期)	157名(175)	256名(319)
原発性不妊	79名	128名
続発性不妊	68名	128名
平均年令	33.6±3.6才	33.8±3.9才
平均不妊期間	8.7±3.4年	8.4±3.7年
	(M.±S.D.)	
(2) 成績		
妊娠患者数	48名	99名
妊娠数	48	104
対患者妊娠率	30.6%(48/157)	38.7%(99/256)
原発性不妊	35.4%(28/79)	34.4%(44/128)
続発性不妊	29.4%(20/68)	43.0%(55/128)
対周期妊娠率	27.4%(48/175)	32.6%(104/319)
(3) 過排卵法別妊娠率(対周期)		
CC-hCG	(0)	0%(0/1)
CC-HMG-hCG	31.3%(10/32)	44.4%(12/27)
HMG-hCG	50.0%(7/14)	0%(0/2)
GnRH-a-HMG-hCG	24.0%(31/129)	31.7%(92/290)

hCG法の妊娠率も良好であった(表3)。受精に関しては2年間に差はなかった(表4)。移植時期別では1989年度に分割胚移植の妊娠率が上昇した(表5)。主な不妊原因別では、1989年度には差がなくなってきた(表6)。妊娠の予後では、分娩まで至ったのは1988年度で58%であった。初期流産に加えて、18~24週の流産が存在した(表8)。対患者で分娩まで至ったのは1988年で17.8%であったが、1990年では22.3%が予想される(表9)。

考察：外来ベースのIVF-ETにより、多くの件数を行えるようになり、昨年の本研究会で予測した年間目標どおりで、件数・妊娠率でようやく世界のレベルに達したといえよう。妊娠率の上昇は採卵法や過排卵法の進歩とともに、受精・培養系の安定に帰するところが大きいと考えられる。重要な問題は分娩まで至る率の低いことであるのはいうまでもないが、1987年度の米国全体のIVF-ETの成績でも、移植回数200以上の7施設で移植あたりの妊娠率20%，分娩率15%であり³⁾、当科の成績も同様であった。この点に関しては内外に批判的な意見もあり、早急な改善が望まれるが、現状では慎重な産科管理と妊娠率の向上がとりあえずの決策といえよう。

文献：1) 小林善宗、他 (1989). 外来ベースの体外受精の成績、哺乳卵研誌 6: 59

2) 小林善宗、他 (1990). GnRHagonist併用HMG-hCG刺激によるIVF-ET 167回の成績

日本受精着床学会雑誌7 (in press)

3) Medical Research International and the Society of assisted Reproductive Technology,

The American Fertility Society (1989). In vitro fertilization/embryo transfer in the

United States: 1987 results from the National IVF-ET Registry. Fertil. Steril., 51: 13

	1988年度	1989年度
(4) 受精		
採取卵子数	7.4±4.3	7.8±4.9
採取成熟卵子数	5.6±3.6	6.9±3.7
受精卵数	5.9±3.8	5.9±3.4
正常受精卵数	4.1±3.0	4.3±2.9
胚数	4.7±3.2	5.1±3.1
正常胚数	2.3±1.7	2.7±2.3
	(M.±S. D.)	
(5) 移植法別妊娠率(対周期)		
前核期移植	32.2%(29/90)	29.4%(68/231)
分割胚移植	22.6%(19/84)	40.9%(36/88)
前核期+胚	0%(0/1)	(0)
(6) 主な不妊原因別妊娠率(対患者)		
卵管性	25.3%(23/91)	39.9%(55/138)
子宮内膜症	42.6%(20/47)	35.1%(27/77)
卵管内精子輸送障害*	16.7%(1/6)	42.1%(8/19)
原因不明	30.8%(4/13)	40.9%(9/22)
(7) 主な不妊原因別妊娠率(対周期)		
卵管性	21.9%(23/105)	31.9%(58/182)
子宮内膜症	40.0%(20/50)	31.5%(28/89)
卵管内精子輸送障害*	16.7%(1/6)	40.9%(9/22)
原因不明	28.6%(4/14)	22.2%(4/18)
(8) 妊娠の予後(1990年2月現在)		
妊娠数	48	104
胎児心拍確認	36(75.0%)	66*(63.5%)
初期流産	9(18.8%)	27(26.0%)
子宮外妊娠	3(6.3%)	12*(11.5%)
流産総数	17(35.4%)	36(34.6%)
多胎	12(25.0%)	20(19.2%)
分娩	28(58.3%)	30*(54.8%)
ongoing		27
出生児	39	43
新生児死亡	1(胎児水腫)	2(胎児水腫)
健児	38	41
(9) 分娩率		
対周期	16.0%(28/175)	17.9%(57/319)*
対患者	17.8%(28/157)	22.3%(57/256)*

* 内外同時妊娠1例を含む

* 予想値

偽妊娠子宮日齢からみた移植マウス胚 (2細胞～胚盤胞)の着床率

Implantation rate of mice embryos (2-cell～blastocyst) transferred
to the uterine associated with pseudopregnant days.

* 森 匠・ 清水 弘・ 北嶋 朋子・ 一戸 喜兵衛

Tadashi MORI, Hiroshi SHIMIZU, Tomoko KITAJIMA, Kihyoe ICHINOE

北海道大学農学部畜産学科

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Hokkaido University

*手稲一渓仁会病院 テイネ生殖研究室

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

目的

体外受精胚移植による不妊治療は普及しつつあるが、その基礎的な研究はかならずしも十分ではなく移植胚の着床発育と受胚子宮の排卵後の経過日数との関係もその一つであろう。マウスはヒト体外受精胚移植のモデルとして有効であるため、マウスを用いての体外受精と受精胚の移植成立条件について若干の研究を行ってきた。今回は偽妊娠経日による着床発生の可能性について、胚移植実験による検討を行ったので報告する。

方法

子宮内胚移植のため過排卵処理を施した ICR系成熟雌マウスより受精胚を以下の通りにしてえた。腹腔内にhCG 注射後雄と配偶させ、膣栓を交尾の証跡として膣栓発見日をもって妊娠 0.5日とした。2細胞期胚を妊娠 1.5日、4細胞期胚は妊娠 2.0日、8細胞期胚は妊娠 3.5日、桑実胚と胚盤胞は妊娠 4.5日に、それぞれ卵管または子宮の下向灌流により採取した。

胚を移植する雌(受胚雌)の偽妊娠(以下 P.P.と略す)は精管を切断した雄マウスと交尾させて誘起し、膣栓発見日を P.P. 1日目とした。採取した受精胚は保温した PBI中に保存しながら、細く引いたヘマトクリット管を用いて受胚雌の両側または片側子宮角にこれらの胚を移植した。胚採取から移植終了までは長くても 2時間であった。

実験 I では P.P. 2日目から P.P. 4日目の受胚雌に2細胞期胚を移植し、それぞれ48時間後に摘出子宮から胚の回収を行った。回収された胚は実体顕微鏡下で発生形態を観察した。

実験 II では受胚雌の P.P. 日数と胚の発生段階を種々の組み合わせで移植し、P.P. 日数の増加に伴う

着床とその後の発生可能な胚の発生段階を調べた。子宮角当りの移植胚数は 3 個とし、両側または片側に移植した。移植時の受胎雌 P.P. 日数に合わせて移植 10 日目から 14 日目に開腹により受胎雌への着床と胎児形成を確認し、その数を記録した。また妊娠していた場合は分娩日に産仔数を記録した。

結 果

＜実験 I＞ P.P. 2 日目に移植した場合、胚発生が移植時より進行したもののみられなかった。これに対し P.P. 3 日目に移植した 2 細胞期胚は約 20% (22/112) が桑実胚まで発生し、うち約 5% が胚盤胞であった。しかし P.P. 4 日目に移植した胚は、P.P. 2 日目での移植結果と同様に、移植時以上の発生の進行はみられなかった。

＜実験 II＞ P.P. 1 日目の受胎雌の子宮角に 2 および 4 細胞期胚を移植しても着床胚はたしかめられなかった。一方 P.P. 2 日目の移植でも 2 細胞期胚の着床はみられなかつたが、4 細胞期胚から胚盤胞では着床し、産仔までいたつた。また P.P. 3 日目における移植でも 2 細胞期胚の着床はみられなかつたが 4 細胞期胚からは着床し、8 細胞期胚から胚盤胞は産仔にいたり、着床率、産仔率とともに P.P. 2 日目での移植成績より良好であった。しかし P.P. 4 日目での移植では 8 細胞期胚の着床はみられず、胚盤胞移植においても着床率、産仔率は P.P. 3 日目のそれより低下する傾向にあつた。

考 察

P.P. 1 日目の子宮に移植を行つた場合、2 細胞期または 4 細胞期いずれの発生段階にある胚も着床することはなかつた。交尾後の子宮内精子は妊娠早期に除去される事実から、P.P. 1 日目に移植された胚も子宮外に排出されるものとおもわれた。移植後の胚回収の試みで胚形態をみなかつたこと¹⁾はこのことを裏付けている。P.P. 2 日目からは子宮内膜組織に bleb をはじめ progesterone による特有の変化が明らかとなり、腺周辺に着床がみられた。すなわち P.P. 2 日目に子宮側の着床準備が開始され、4 細胞期胚から胚盤胞まで移植胚の着床がみられた。しかし、2 細胞期移植胚の着床はみられず、実験 I の結果からも、P.P. 2 日目の子宮でも 2 細胞期胚の発生には子宮内膜は適当でないことが明らかとなつて一般に知られているマウスの 2-Cell block との関係も示唆された。P.P. 3 日目の子宮は着床準備が整うとされているが、子宮内膜間質細胞の諸変化からもこのことが宜べなわれた。しかしここでも着床可能な移植時の胚の発生段階は 4 細胞期から胚盤胞であった。P.P. 4 日目での胚盤胞の移植は他の研究者の報告²⁾と一致し、産仔率は 3 日目でのそれよりも低かつた。以上から胚移植の成功率は子宮側の着床適期と胚発生段階との関連がきわめて重大とおもわれた。

1) 森 匡, 清水 弘, 北嶋 朋子, 一戸 喜兵衛 体外および体内受精由来マウス胚の着床率の比較.

第30回 哺乳卵研誌, 6:63-64(1989)

2) McLaren, A. and Michie, D. Studies on the transfer of fertilized mouse eggs to uterine foster-mothers. J. Exp. Biol., 33:394-416(1956)

×

毛

哺乳動物卵子研究会会則

名 称

第 1 条 本会は、哺乳動物卵子研究会と称する。

事 務 局

第 2 条 本会の事務局は、東京都内または近隣県内に置く。

目 的

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

事 業

第 4 条 本会は、前条の目的を達成するために、次の事業を行う。

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

会 員

第 5 条 本会は、次の会員をもって組織する。

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

入 会

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

退 会

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

第 8 条 会員は、次の事項に該当する時は会員の資格を失う。

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

役 員

第 9 条 本会に次の役員を置く。

会 長 1名

副 会 長 1名

理 事 若干名
監 事 2名
幹 事 2名

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

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

第11条 役員の選出は、次によって行う。

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

第12条 役員の任期は2年とし、再任を妨げない。

総 会

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

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

第14条 総会は次の事項を審議し、決定する。

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

会 計

第15条 本会の会計年度は、毎年4月1日に始まり翌年3月31日に終わる。

2. 本会の経費は会費、寄付金およびその他の収入をもってこれにあてる。

附 則

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

哺乳動物卵子研究会誌投稿規定

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

雑誌の場合

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

単行本の場合

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

〒252

神奈川県藤沢市亀井野 1866

日本大学農獣医学部獣生生理学教室内

TEL 0466-81-6241 内線 332

哺乳動物卵子研究会編集委員会

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（福島県立医大）、安田 泰久（岩手大）

監事： 佐久間勇次、 岩城 章

幹事： 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

4年連続の暖冬で、今年の桜の開花は例年より10日余り早くなるそうです。本研究会誌も早いもので7巻1号を発行することになりました。

今回は、原著論文3編と第31回大会の特別講演および一般演題18題の抄録を掲載いたしました。一般演題の内容を7年前と比べますと大きく変化しており、研究の進展をものがたっております。

なお、7巻2号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いいたします。

(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 7 卷 第 1 号

Vol. 7

NO.1

平成 2 年 3 月 25 日 印刷

(会員頒布)

平成 2 年 4 月 1 日 発行

発行者 哺 乳 動 物 卵 子 研 究 会
代表 豊 田 裕

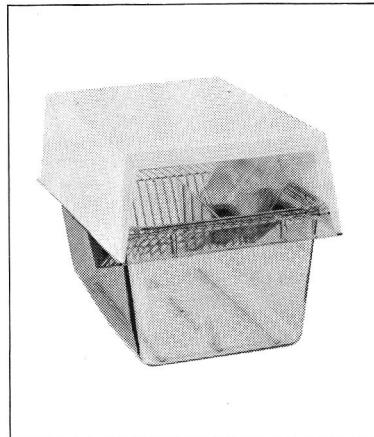
発行所 哺 乳 動 物 卵 子 研 究 会
〒252 藤沢市亀井野1866
日本大学農獣医学部獣医生理学教室内
TEL 0466-81-6241(内322)
郵便振替 横浜 8-20350

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

NEW!

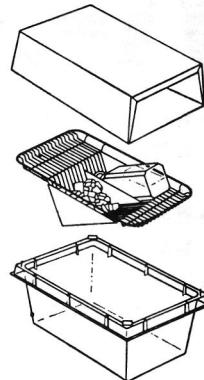
M-7 (Isocage & Isocap)

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

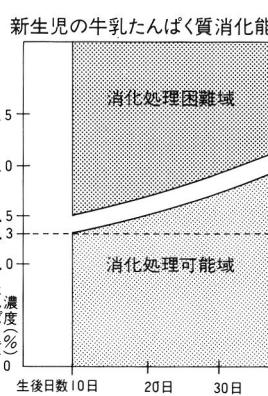


母乳に近い 機能をもったミルクが生まれました。

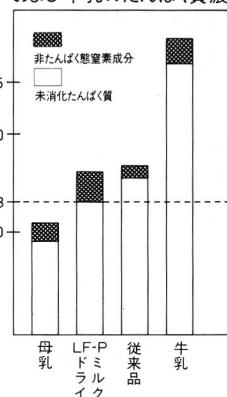
オリゴペプチド新配合で母乳のように おなかにやさしく

- ①オリゴペプチド(たんぱく質を酵素消化した形態)を配合することにより、非たんぱく態窒素の割合を母乳と同じ20%になるようにしました。
- ②未消化たんぱく質濃度を1.3%程度まで低減いたしました。
- ③全たんぱく質濃度を1.64%まで低減いたしました。
- 感染防御因子ラクトフェリンを世界で初めて配合
- ラクトフェリンを調乳液100mL当たり6.5mgとし母乳に近づけました。
- ビフィズス菌をもっとも増やす働きのあるラクトチュロース配合しました。
- ビタミンKを安定的に配合することに成功しました。

もう赤ちゃんを待たせません
1サジ=40mL…らくらく計量
(すりきり) (てき上り)
サッと溶ける…らくらく調乳



母乳・森永LF-Pドライミルク・従来品
および牛乳のたんぱく質濃度



母乳研究から生まれた…ペプチド栄養

森永 **LF-P ドライミルク**

森永乳業

健保適用

下垂体性性腺刺激ホルモン パーゴナル[®]注 75・150

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



【効能・効果】

間脳性（視床下部性）無月経、下垂体性無月経の排卵誘発

【用法・用量】

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

【包装】

パーゴナル注 75：10管
パーゴナル注150：10管



日本臓器製薬株式会社
東京都港区赤坂二丁目5番1号

【使用上の注意】

- 一般的注意
 - 1) 本療法の対象は不妊症患者のうち、間脳又は下垂体前葉の機能・器質的障害に由来する性腺刺激ホルモン低分泌無月経患者であるので次の点に注意すること。
 - ア. エストロゲン・プロゲステロンテストで初めて反応する第2度無月経又は抗エストロゲン療法（クエン酸クロミフェン、シクロフェニル等）が奏効しない第1度無月経の患者に投与すること。
 - イ. 患者の状態（例えばエストロゲン・性腺刺激ホルモン・ブレグナジオール分泌、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ヶ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) 卵巣腫瘍及び多のう胞性卵巣症候群を原因としない卵巣の腫大を有する患者
 - 2) 妊婦
 - 3) 次の患者には投与しないことを原則とするが、やむを得ず投与する場合には、慎重に投与すること。
 - 1) 児を望まない第2度無月経患者
 - 2) 多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、下腹部緊迫感、腹水・胸水を伴ういわゆる、Meigs様症候群等があらわれた場合には、直ちに投与を中止するなど、適切な処置を行うこと。
 - 2) その他 ときに恶心、頻尿、しびれ感、頭痛、浮腫があらわれることがある。また尿量が増加することがある。
 5. 相互作用 胎盤性性腺刺激ホルモンとの併用により、卵巣の過剰刺激による卵巣腫大、腹水・胸水を伴ういわゆるMeigs様症候群があらわれることがある。

繁殖障害に!!

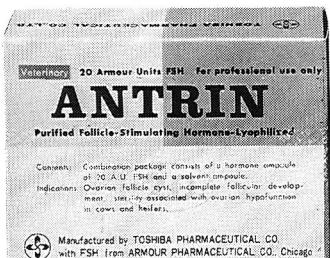


(家畜共済診療点数採用)

動物用医薬品
要指示医薬品

アントリン®

前葉性卵胞刺激
ホルモン剤



特 長 ○当社のホルモン精製技術によって製造された前葉性のFSH剤です。
○FSH成分を主に含有し、卵胞の発育、排卵、黄体化作用を有します。
○HCG又は、PMSGで無効或いは不的確な繁殖障害牛にも有効です。

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

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



テンカ製薬株式会社

神奈川県川崎市川崎区中瀬3-19-11
☎(044)266-0400 〒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

製 造 元

